

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
Laboratoire de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques

THÈSE présentée par :

Eugénie SCHAEFFER

Soutenue le : **18 novembre 2022**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**La peroxyrédoxine 2 est un acteur majeur de
l'hépatocarcinogénèse dans les maladies
métaboliques du foie**

THÈSE dirigée par :

Dr SCHUSTER Catherine
Pr BAUMERT Thomas F

HDR, DR Inserm, Université de Strasbourg
PU-PH, HDR, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr CLEMENT-LEBOUBE Sophie
Dr MUSSO Orlando

PhD, Université de Genève
MD PhD, HDR, CR INSERM, Université de Rennes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr METZGER Daniel
Dr BARTOSCH Birke

HDR, DRCE CNRS, Université de Strasbourg
HDR, CR INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

Marie Curie

Success is walking from failure to failure with no loss of enthusiasm.

Winston Churchill

*You become a diamond under pressure
So keep your head up no matter the weather
And if at first you don't succeed
Dust yourself off and flick that weave*

RuPaul Andre Charles

Les pierres font partie du chemin.

Proverbe roumain

*I hope that in this year to come, you make mistakes. Because if you are making
mistakes...you're Doing Something.*

Neil Gaiman

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Dr Sophie Clément Leboube, Dr Birke Bartosch, Dr Orlando Musso et Dr Daniel Metzger qui ont accepté d'évaluer les travaux de cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier le Dr Catherine Schuster et le Pr Thomas Baumert pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques et de m'avoir accordé leur confiance au cours de ces 4 années de thèse. Merci à toi Catherine, d'avoir voulu me faire confiance et de m'avoir compris dans mes qualités et mes défauts.

Je tiens également à remercier l'Université de Strasbourg, l'INSERM et l'association L'Alsace contre le cancer d'avoir financé mon travail au cours de ces quatre années.

"I don't know half of you half as well as I should like; and I like less than half of you half as well as you deserve."

"But I don't think I ought to leave my friends like this, after all we have gone through together."

John Ronald Reuel Tolkien

Je tiens ensuite à remercier les amis, la famille et les amis qui par la force des choses sont devenus pour moi une famille. Ces remerciements sonnent comme des adieux, mais il ne s'agit que de l'arrivée à la fin d'une étape.

A toi, Emilie, qui est là depuis le début de cette aventure, qui a monté ce projet, qui m'a tant appris et sans qui j'aurais probablement jeté l'éponge plusieurs fois. Merci de m'avoir poussée à ne jamais abandonner à deux mètres du bol de sangria. Merci pour **tout**, pour ta sincérité, pour nos disputes (parce qu'elles sont sincères et ne durent que le temps qu'il faut), pour ton soutien, pour cet humour aussi noir que le café que tu bois, pour ton amitié, ta fidélité, et parce que j'ai toujours parlé à cœur ouvert avec toi, merci pour ton écoute et ton cœur gros comme ça. Tu as un vrai bon cœur. J'ai trouvé en toi plus qu'une simple amie. J'ai retrouvé un peu de

moi chez toi, surtout pour la gourmandise parce que « *La joie de vivre et le jambon, y'a pas trente-six recettes du bonheur !* »

A toi Marine, qui garde toujours la pêche, toujours le sourire. Merci pour ton aide et ton soutien, ta motivation à toute épreuve. Merci d'avoir illuminé les longues journées de culture cellulaire, de boucherie et d'histologie avec le karaoké RFM, ton rire contagieux et ta bienveillance. Ton aide a été plus que précieuse, quand je devais me visser à mon bureau. Tu es une amie fidèle et précieuse.

A Clara, qui est toujours si sereine. Merci pour avoir été une compagne de bureau toujours enjouée et positive. Merci pour les souvenirs à l'Abattoir, au Bunnys, à l'Oktoberfest et pour les souvenirs que je n'ai plus par conséquent. Merci de toujours voir le bon côté des choses.

A Cloé, qui garde toujours le sourire et une telle énergie. Merci pour ta bonne humeur à toute épreuve !

A Marie, qui a été une technicienne bienveillante, toujours prête à m'aider bien que je sois une *control freak*.

A Laurent, parce que tu es toi, un ours, qui m'a beaucoup appris sur les expériences en animalerie et qui n'a pas abandonné quand les souris avaient décidé d'être chaos mais à côté. J'ai apprécié ta compagnie discrète et tes levés de sourcils qui veulent tout dire.

A Sarah, qui m'a appris beaucoup en histologie. Tu as passé tant de temps à mettre au point tellement de marquages.

A Frank sans qui les analyses de bioinformatique auraient été bien compliquées, merci.

A Patricia, qui a toujours eu bon cœur avec moi. Merci pour ton sourire dans les jours où il ne faisait pourtant pas très beau.

A Anne, pour avoir amené à ces quatre années, une dimension plus spirituelle.

A Alessia, merci d'être l'incarnation de Little Miss Sunshine.

A Fabio, merci beauc.... Hum beaucoup !

A Joachim, merci de ta bonne humeur à toute épreuve !

A Nevena, petit poussin, Keep going no matter what! You better work girl !!!

A Eloi, merci pour les minutes Eloi et d'être le personnage que tu es.

A vous les filles, Laura, Charlotte, inséparables comme Dupond et Dupont, comme J et K, comme Thelma et Louise ... Merci d'être vous.

A Nicolas, Christine, Zeina, Nuno, Valério, Zakaria, Marion, Julien, Romain et Romain, Emma, Margaux, Raffaella merci à vous.

A Dominique et à Sigis, vous avez toujours eu un humour bien à vous et j'ai été heureuse d'apprendre à le comprendre.

A Catherine C., qui m'a aidé dans l'organisation de ma soutenance et qui a géré l'administratif, merci !

Je voudrais également remercier les différents collaborateurs extérieurs avec qui j'ai eu l'occasion de travailler sur ce projet. Je remercie en particulier les équipes de Dr. Renaud Wagner et de Pascal Villa qui ont fourni tant d'efforts pour la production de la PRDX2 et le criblage des drogues ciblant PRDX2.

A Stéphane à force tu es comme mon frère, d'une autre mère. Tu étais là au début et maintenant la boucle se boucle et tu es toujours dans les parages. Merci pour toutes les aventures passées et à venir en ta compagnie ! *Mon oncle, n'est-ce pas vous même qui m'avez dit que rien ne remplaçait une véritable amitié et qu'en cas d'urgence c'était la seule corde à laquelle on pouvait vraiment se raccrocher ?*

A toi Manon, merci d'être un petit arc-en-ciel dans notre bande de vieux croustons presque tous trentenaires.

A vous Mathilde et Marc-Olivier, même si la distance et le travail et le Covid nous empêchent de nous voir autant que nous voudrions, vous restez dans mes pensées.

A mon petit Papa et ma petite Maman, sans qui je n'aurais pas ce caractère têtu et un front large et dur, qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout même si parfois je n'en avais plus envie. Merci de m'avoir donné cette exigence envers moi-même qui fait qu'aujourd'hui j'en suis ici.

A mon Papapa et ma Mamama qui sont toujours présents. Chère Mamama, tu t'es toujours occupée de moi et tu t'inquiètes toujours beaucoup trop. Si tu voyais ma paillasse « Ordnung ist das halbe Leben ! ». Tout va bien.

A ma toute petite mamie, qui même si elle ne se souvient pas toujours m'a élevée depuis que je suis toute petite. Et à mon papi qui veille depuis là-haut.

A Célestine, Héloïse et Odile mes petits frères et sœurs avec qui j'ai tout partagé et à qui je peux tout dire.

Enfin, je voudrais remercier mon petit chéri, mon Jordan. Merci d'avoir enduré tout cela à mes côtés, de m'avoir soutenue durant ces quatre années. Merci d'avoir repoussé nos projets, nos voyages pour que je puisse aller au bout de ce projet. Merci de me comprendre si bien même quand je ne dis rien. Sans toi rien de tout cela n'aurait été possible.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION.....	5
Préambule : Le foie : organisation et fonctions.....	7
I Les maladies hépatiques chroniques	9
1) Etiologies des maladies hépatiques chroniques.....	10
a. Les hépatites virales chroniques	10
i. L'hépatite C	11
ii. L'hépatite B et l'hépatite D.....	12
b. L'hépatopathie alcoolique	13
c. La maladie du soda ou NAFLD.....	14
2) La fibrose et la cirrhose hépatique	15
a. Epidémiologie.....	15
b. Mécanismes cellulaires et moléculaires généraux de la fibrose et de la cirrhose.....	17
II Zoom sur la NAFLD et la NASH	22
1) Epidémiologie de la NAFLD et de la NASH.....	22
2) Physiopathologie de la NAFLD et de la NASH.....	23
a. Rappel du métabolisme lipidique	23
b. Physiopathologie de la NAFLD	28
c. Progression de la maladie vers la NASH et le CHC.....	31
i. La dyslipidémie.....	31
ii. La mort cellulaire et l'inflammation	38
iii. Le stress oxydatif	42
iv. La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK)	44
v. Les peroxydases et les peroxyrédoxines (PRDX).....	46
III Le carcinome hépatocellulaire	54
1) Epidémiologie et étiologie du CHC	54
2) Physiopathologie du CHC	56
3) Le rôle du micro-environnement tumoral	63

IV	Diagnostic et traitements des maladies hépatiques chroniques et du CHC.....	67
1)	Diagnostic.....	67
2)	Stratégie thérapeutique contre les maladies hépatiques chroniques.....	74
a.	Lutte contre les étiologies des maladies hépatiques chroniques.....	74
b.	Développement de traitements contre la fibrose et de la cirrhose.....	75
c.	Stratégies de lutte contre la NASH en développement.....	76
3)	Gestion et traitements du CHC.....	78
	OBJECTIFS DE LA THESE :	81
	RESULTATS	89
	DISCUSSION	153
I	PRDX2 régulateur du métabolisme hépatique.....	155
1)	PRDX2 inhibe l'activité de l'AMPK	155
2)	PRDX2 et le métabolisme lipidique.....	158
II	PRDX2 et les maladies hépatiques chroniques.....	162
1)	PRDX2 et la fibrose hépatique.....	162
2)	PRDX2 et la NASH.....	164
3)	PRDX2 et les réponses immunitaires.....	169
III	PRDX2 favorise le développement du CHC	173
1)	PRDX2 chez les patients atteints de CHC	173
2)	PRDX2 et le caractère précurseur des cellules de CHC.....	178
IV	Cibler PRDX2 pour traiter les maladies hépatiques chroniques et prévenir le CHC	180
	CONCLUSION GENERALE	188
	BIBLIOGRAPHIE	189

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation du foie.....	8
Figure 2 : Histoire naturelle des maladies hépatiques chroniques	10
Figure 3 : Mortalité globale due à la cirrhose	17
Figure 4 : Mécanismes de la fibrose hépatique	19
Figure 5 : Altérations vasculaires et architecturales de la cirrhose.	21
Figure 6 : Prévalence globale de la maladie du foie gras (NAFLD).....	23
Figure 7 : Métabolisme des lipoprotéines riches en TG (LRT), résumé des voies de transport des lipides exogènes et endogènes.	25
Figure 8 : Métabolisme des HDL et transport inverse du cholestérol.....	27
Figure 9 : Physiopathologie de la NAFLD.....	30
Figure 10 : Vue d'ensemble des mécanismes cellulaires induits par l'oxLDL et aboutissant à la NASH	33
Figure 11 : Dérégulation du métabolisme lipidique lié à la NASH dans les hépatocytes.....	37
Figure 12 : L'activation immunitaire est un facteur clé dans le déclenchement et l'amplification de l'inflammation hépatique dans la NAFLD/NASH	41
Figure 13 : Régulation physiologique et fonctions métaboliques de l'AMPK	45
Figure 14 : Mécanismes des trois sous-types de PRDX.....	48
Figure 15 : Exemple de rôle d'agents doubles des PRDX dans les maladies hépatiques chroniques	53
Figure 16 : Incidence globale du CHC.....	55
Figure 17 : Etiologies du CHC	56
Figure 18 : Hépatocarcinogénèse dans les foies cirrhotiques et non cirrhotiques.....	58
Figure 19 : Classification moléculaire et immunitaire du CHC	62
Figure 20 : Le microenvironnement tumoral	66
Figure 21 : La signature moléculaire associée au pronostic des patients	70
Figure 22 : Modélisation de la signature hépatique pronostique clinique (PLS) dans un système cellulaire (cPLS).....	72
Figure 23 : Mécanisme d'action des médicaments contre la NASH actuellement en phase II et en phase III de développement.....	77
Figure 24 : Stratégie de traitement dans la prise en charge du CHC.....	80
Figure 25 : Expression de facteurs clés du métabolisme du cholestérol dans les souris CDAHFD.	158

Figure 26 : Expression d’Hmgcr et Acat2 dans une cohorte de souris nourries avec une CDAHFD (GSE137449)	160
Figure 27 : Expression de LXR α chez les souris CDAHFD.....	160
Figure 28 : Marqueurs de l’inflammation chez les souris CDAHFD.....	167
Figure 29 : Expression des isotypes de PRDX dans le foie des souris CDAHFD.....	168
Figure 30 : Rôle de PRDX2 hépatocytaire sur la différenciation des macrophages.....	171
Figure 31 : Rôle de PRDX2 sur la différenciation des macrophages dans les cellules THP1.....	172
Figure 32 : Survie et risque de récurrence chez des patients atteints de CHC en fonction de l’expression de PRDX2	177
Figure 33 : Principe expérimental du criblage par anisotropie de la fluorescence.....	184
Figure 34 : Test des drogues candidates sur l’activité de la PRDX2 et détermination de la cytotoxicité des drogues en Huh-7.5.1	186

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les six protéines peroxyrédoxines (PRDX) de mammifères classées en fonction de leurs propriétés structurales et mécanistiques	47
Tableau 2 : Expression différentielle des membres de la famille PRDX dans les types de tumeurs	51
Tableau 3 : Exemples de composés en développement clinique visant à réduire la fibrose hépatique	75
Tableau 4 : Facteurs clés associés à la progression des maladies hépatiques chroniques du risque de CHC	82
Tableau 5 : Facteurs clés de la cPLS.....	84

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAD	antiviraux à action directe
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ACAT2	acétyl-coenzyme-A acétyltransférase 2
ACC1	acétyl-CoA carboxylase-1
ACLY	ATP-citrate lyase
ACTA2	actine de type 2 des muscles lisses
ADN	acide déoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AFP	alpha foetoprotéine
AgHBs	antigène de surface du VHB
AKT	<i>Ak strain transforming</i>
ALT	alanine aminotransférase
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
Apo	apolipoprotéine
ARID	<i>AT-rich interaction domain</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ASGR1	<i>asialoglycoprotein receptor 1</i>
AST	aspartate aminotransférase
ATP	adénosine triphosphate
AXIN1	axine 1
Bad	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>
Bak	<i>BCL2-antagonist/killer</i>
Bax	<i>BCL2-associated X</i>
BCL2	<i>B cell lymphoma-2</i>
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
CAF	fibroblastes associés au cancer
CAMKK2	calcium-/calmodulin-activated kinase kinase 2
CAT	catalase
CCL2	ligand 2 de la chimiokine
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CD68	<i>cluster of differentiation 68</i>
CE	cholestérol estérifié
CDAHFD	<i>choline deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet</i>
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKL2	<i>cyclin dependent kinase like 2</i>
CETP	protéine de transport du cholestérol estérifié
CHC	carcinome hépatocellulaire
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CM	chylomicron
COL1A1	collagène de type 1
COX2	cyclooxygénase 2

CPT-1	carnitine palmitoyltransferase-1
CRP	protéine C-réactive
CTNNB1	caténine β 1
CYP7A1	cholestérol 7 alpha- hydroxylase
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DEN	diéthylnitrosamine
DGAT	déacylglycérol acyltransférase
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EPCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FASN	<i>fatty acid synthase</i>
FATP	<i>fatty acid transport protein</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFA	acides gras libres
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FOXO3	<i>Forkhead Box Protein O3</i>
FPS	<i>fibrosis progression signature</i>
FXR	<i>farnesoid X receptor</i>
GCKR	<i>glucokinase regulator</i>
GSH	glutathion
GSH-Px	glutathion peroxydase
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HFD	<i>high fat diet</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HMGB1	<i>high-mobility group box1</i>
HMGCR	hydroxyméthylglutaryl-CoA
HP	haptoglobine
HSC	cellule stellaire hépatique
HSPG	héparane sulfate protéoglycan
ICF	<i>immune mediated cancer field</i>
ICI	inhibiteur de checkpoint immunitaires
IDL	<i>intermediate-density lipoproteins</i>
IFN	interféron
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IGFR	<i>insulin-like growth factor receptor</i>
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
JAK	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KC	cellules de Kupffer

KMT2	histone–lysine N-méthyltransférase 2
K-Ras	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LCAT	lécithine cholestérol acyltransférase
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LDL-R	<i>low density lipoproteins receptor</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
LOX-1	<i>lectin-type oxidized LDL receptor 1</i>
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharides
LRP1	<i>low density lipoproteins receptor related protein 1</i>
LSEC	cellules endothéliales sinusoïdales
LXR	<i>liver X receptor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MBOAT7	<i>membrane-bound O-acyltransferase 7</i>
MCL-1	<i>myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MDSC	cellules myéloïdes suppressives
MEC	matrice extracellulaire
MET	<i>MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase</i>
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like protein</i>
MMP	métalloprotéinase
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MYC	<i>MYC protooncogene</i>
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	stéatohépatite non alcoolique
nCEH	<i>neutral cholesterol ester hydrolase</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NK	<i>natural killer</i>
NKT	lymphocyte T <i>natural killer</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NPC1L1	<i>Niemann–Pick C1-like 1</i>
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PI3k	phosphoinositide 3- kinase
PKC	protéine kinase C
PLS	<i>prognostic liver signature</i>
PNPLA3	<i>patatin-like phospholipase domain-containing</i>
PRDX	peroxyrédoxine
PROM1	<i>prominin 1</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>

PTEN	<i>phosphatase and TENsin homolog</i>
PUMA	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>RAS protooncogene</i>
RB1	<i>rétinoblastome 1</i>
RE	<i>réticulum endoplasmique</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
ROS	<i>espèces réactives de l'oxygène</i>
SAM	<i>scar associated macrophages</i>
SCD1	<i>stéaryl-CoA désaturase</i>
SEPT9	<i>septin-9</i>
SOD	<i>superoxyde dismutase</i>
SOX9	<i>SRY-Box Transcription Factor 9</i>
SR-A	<i>scavenger receptor A</i>
SR-BI	<i>scavenger receptor class B type 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SVR	<i>réponse virologique soutenue</i>
TAK1	<i>TGF-β activated kinase 1</i>
TAM	<i>macrophages associés au tumeur</i>
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TG	<i>triglycérides</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TM6SF2	<i>transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TME	<i>micro-environnement tumoral</i>
TNFR-1	<i>TNF receptor 1</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TP53	<i>tumor protein 53</i>
TRAIL	<i>tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
TRAIL-R	<i>TRAIL receptor</i>
TROP2	<i>tumor-associated calcium signal transducer 2</i>
TRX	<i>thiorédoxine</i>
TrxR	<i>thiorédoxine réductase</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VHB	<i>virus de l'hépatite B</i>
VHC	<i>virus de l'hépatite C</i>
VHD	<i>virus de l'hépatite D</i>
VIH	<i>virus de l'immunodéficience humaine</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WNT	<i>wingless/integrated</i>

INTRODUCTION

Préambule : Le foie : organisation et fonctions

Le foie est le plus gros organe du corps humain. Chez l'adulte, il représente 2-3 % de la masse du corps humain. Le foie est un organe crucial de par ses nombreuses fonctions telles la régulation du métabolisme des protéines et des acides aminés, du glucose, des lipides et du cholestérol, mais également la production d'acide biliaire, la régulation du volume sanguin, l'immunité, la détoxification de composés xénobiotiques, la production de facteurs de la coagulation et le stockage des vitamines (Trefts *et al.*, 2017; Kalra *et al.*, 2021).

Le foie est composé de différents types cellulaires : les hépatocytes sont des cellules épithéliales du foie qui forment le parenchyme hépatique, ils représentent la population cellulaire majoritaire du foie et réalisent de nombreuses fonctions métaboliques. Les cholangiocytes ont une fonction épithéliale plus traditionnelle en tapissant la lumière des canaux biliaires (Trefts *et al.*, 2017). Les hépatocytes et les cholangiocytes possèdent des capacités régénératrices (Michalopoulos and Bhushan, 2021). Les cellules stellaires (HSC) représentent une population de cellules dynamiques qui existent sous une forme quiescente, où elles stockent la vitamine A dans des gouttelettes lipidiques, et une forme active, où elles prolifèrent et sont responsables de la production, du dépôt et de l'organisation de la matrice extracellulaire lors d'une lésion du foie (Trefts *et al.*, 2017). Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie situées dans la lumière sinusoidale. Ces cellules peuvent être activées par différents facteurs pathogènes ou des substances toxiques apportés dans le foie par la circulation portale et peuvent avoir des actions pro- ou anti-inflammatoires dans le processus de cicatrisation du foie. Enfin, les cellules endothéliales sinusoidales sont des cellules endothéliales ayant des caractéristiques uniques. En effet, ces cellules forment un endothélium fenestré au niveau de la lumière sinusoidale. Cette organisation originale est essentielle pour l'échange de protéines et de particules entre le plasma et les cellules hépatiques, au niveau de l'espace entre la lumière sinusoidale et les membranes basolatérales des hépatocytes, appelé « espace de Disse », tout en maintenant une fonction de barrière (**Figure 1**).

Les cellules hépatiques sont organisées autour d'une unité fonctionnelle appelée « lobule » (**Figure 1**). Les hépatocytes sont polarisés et organisés en travées de façon hexagonale autour d'une veine centrale. Une triade portale se trouve à chaque sommet de cet hexagone. Elle est composée d'une veine portale, d'une artère hépatique et d'un canalicule biliaire. L'espace de Disse permet la communication entre le capillaire sanguin et les microvillosités présentes sur la face basolatérale des hépatocytes. Cet espace contient également

une matrice extracellulaire permettant de structurer les hépatocytes, le lobule et les cellules stellaires (Trefts *et al.*, 2017).

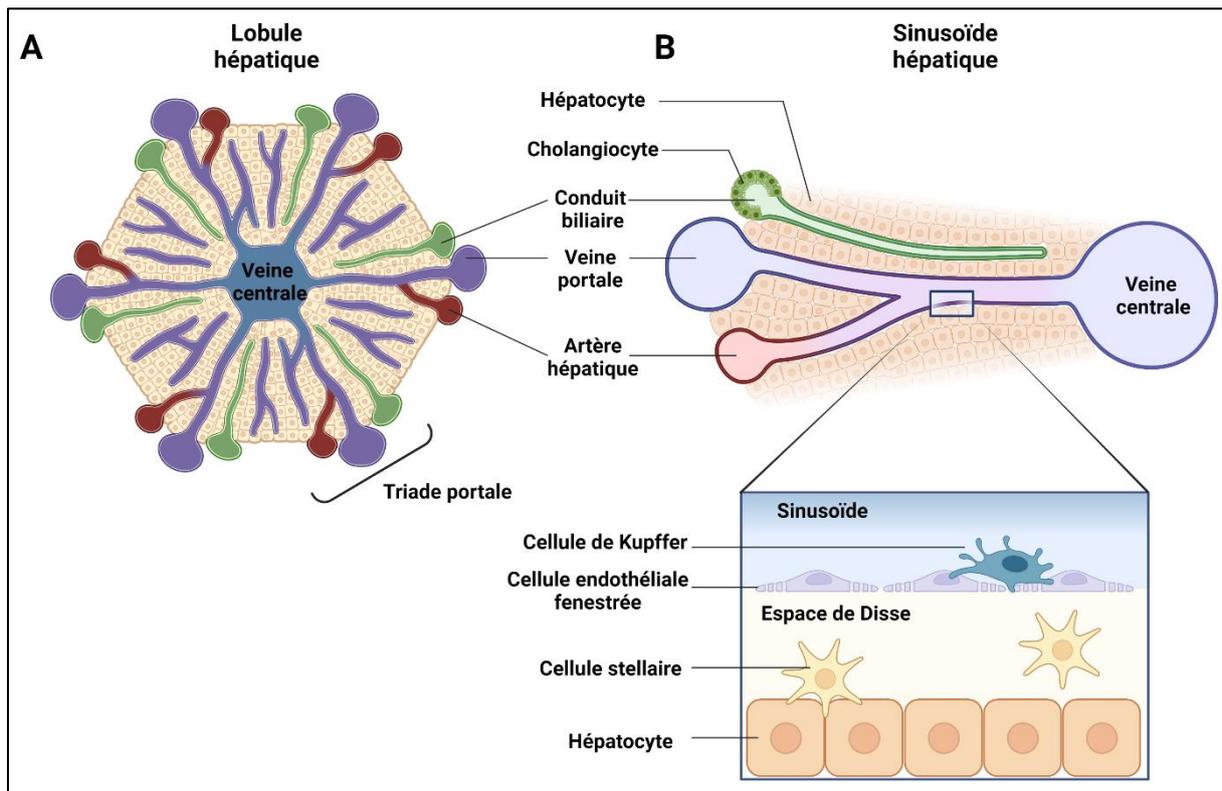


Figure 1 : Organisation du foie. A. Représentation schématique du lobule hépatique. De forme hexagonale, les sommets représentent la zone de la triade portale, qui contient des branches de l'artère hépatique, de la veine porte et du canalicule biliaire. Le sang oxygéné de l'artère hépatique se mélange au sang riche en nutriments de la circulation portale drainé par l'intestin. Ce sang traverse le lobule par un réseau sinusoidal avant de se drainer dans les branches de la veine centrale. Cette organisation entraîne la formation d'un certain nombre de gradients, notamment d'oxygène, d'hormones, de nutriments et de déchets, ainsi que l'organisation conséquente de processus métaboliques, appelés « zonation métabolique ». **B. Schéma d'un sinusoïde hépatique.** L'espace entre la membrane sinusoidale des hépatocytes et les cellules endothéliales est appelé espace de Disse. Les cellules endothéliales forment un endothélium fenestré, créant une barrière minimale entre le sang circulant et les hépatocytes. Les hépatocytes, leurs prolongements cytoplasmiques, sont en contact avec l'espace de Disse, ainsi qu'avec la lumière des sinusoides par l'intermédiaire des pores fenestrés des cellules endothéliales. L'espace de Disse contient les cellules stellaires et des protéines de la matrice extracellulaire. Dans les sinusoides, les cellules de Kupffer sont en contact avec l'endothélium. D'après (Trefts *et al.*, 2017). Créé avec BioRender.com

Le foie est responsable d'un grand nombre de fonctions métaboliques. Il est capable de stocker, synthétiser, métaboliser et libérer du glucose pour répondre aux besoins énergétiques du corps humain. Le foie est également un acteur central du métabolisme des lipides ; il est responsable de la production et de la sécrétion d'acides biliaires permettant l'absorption des

lipides issus de la digestion. Il est également capable de synthétiser les lipides, les stocker sous forme de triglycérides et les sécréter sous forme de lipoprotéines, d'utiliser les acides gras issus de la digestion comme source d'énergie interne ou de transmettre cette énergie aux autres organes sous forme de triglycérides. De plus, le foie joue un rôle crucial dans l'homéostasie du cholestérol dans le corps. Le cholestérol est une molécule importante pour la synthèse et le maintien de la fluidité des membranes cellulaires. Il s'agit d'un précurseur pour de nombreuses molécules, telle que la vitamine D, différentes hormones sexuelles (oestrogènes), des acides biliaires et de seconds messagers, tels les oxystérols et le farnésol. Le foie est capable d'absorber le cholestérol sous forme de chylomicrons issus des intestins ou de le synthétiser *de novo*. Le foie est également responsable de la synthèse et du métabolisme de nombreuses protéines retrouvées dans la circulation sanguine. Il produit environ 85-90 % du volume de protéines circulatoires, notamment l'albumine et les facteurs de coagulation qui sont les protéines plasmatiques les plus abondantes. De plus, le foie sécrète les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, telles la protéine C-réactive (CRP) et l'haptoglobine (HP), des facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et l'*insulin-like growth factor* (IGF) et des peptides impliqués dans la régulation de la composition sanguine, telles que la transferrine et la transthyréline. De plus, le foie est capable de métaboliser les protéines afin de recycler les acides aminés, et de fournir de l'énergie aux hépatocytes (Trefts *et al.*, 2017).

Le foie est un organe dynamique et hétérogène, soumis à un contrôle physiologique hautement régulé. Le développement et la régulation des fonctions hépatiques se font grâce à une synchronisation, une localisation et une intensité appropriées des signaux. Ces dernières décennies la compréhension du développement, du métabolisme et de la régénération hépatique a fortement progressé. Cependant, les pathologies hépatiques continuent de progresser et représentent actuellement une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. Il est donc nécessaire de comprendre au mieux la physiologie et la physiopathologie hépatique pour comprendre ces maladies et proposer de nouvelles solutions thérapeutiques (Trefts *et al.*, 2017).

I Les maladies hépatiques chroniques

Les maladies hépatiques chroniques sont un problème majeur de santé publique, responsables d'approximativement deux millions de décès dans le monde chaque année. Ces maladies représentent en plus un lourd fardeau d'invalidité et sont responsables de l'accroissement des besoins de soins de santé (Moon *et al.*, 2020). Les maladies hépatiques chroniques concernent 1,7 milliards de personnes dans le monde et sont le plus souvent dues à

la maladie du soda (NAFLD) (60%), les infections chroniques du virus de l'hépatite B (VHB) (29%), de l'hépatite C (VHC) (9%) et à l'hépatopathie alcoolique (2%) (Moon *et al.*, 2020). En Europe, il est estimé qu'environ 20% de la population souffre de maladie hépatique chronique (Blachier *et al.*, 2013). En Europe, les problèmes de santé publique liés aux maladies hépatiques sont les plus importants au monde et la fréquence des maladies hépatiques chroniques est en constante augmentation (Pimpin *et al.*, 2018). Bien que chaque étiologie de maladie hépatique chronique possède des caractéristiques propres en terme de physiopathologie, celles-ci partagent des mécanismes moléculaires communs qui mènent au développement de la fibrose et de la cirrhose (**Figure 2**) (Fujiwara *et al.*, 2018). Les maladies hépatiques chroniques évoluent silencieusement et progressivement vers la fibrose hépatique. Dans 20-40% des cas, la fibrose évolue vers la cirrhose hépatique sur une période de 15 à 30 ans et une fois la cirrhose établie, le risque de développement d'un carcinome hépatocellulaire augmente de 1-8 % chaque année (Hoshida *et al.*, 2014; Fujiwara *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2018; Seitz *et al.*, 2018; Anstee *et al.*, 2019).

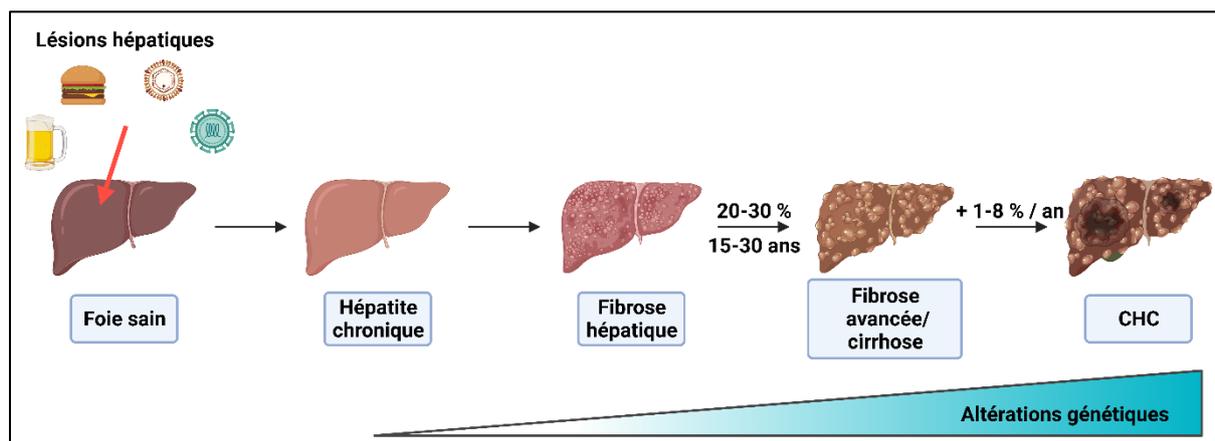


Figure 2 : Histoire naturelle des maladies hépatiques chroniques. Les différentes étiologies des lésions hépatiques provoquent un état inflammatoire chronique et évoluent silencieusement vers la fibrose. L'état fibrotique peut évoluer dans 20-30% des cas vers la cirrhose en 15-30 ans selon l'étiologie. Pour un patient cirrhotique, le risque de développer un CHC augmente de 1 à 8 % chaque année. Modifiée d'après (Hoshida *et al.*, 2014; Baffy, 2015)

1) Etiologies des maladies hépatiques chroniques

a. Les hépatites virales chroniques

Les hépatites virales sont la septième cause de mortalité au monde. En 2015, les maladies liées aux hépatites virales ont causé 1,34 millions de décès. Les infections par le virus de

l'hépatite A n'induisent pas de chronicité et cela est également vrai dans la majorité des cas d'infections par le virus de l'hépatite E. Les infections par ces deux virus sont responsables de 0,8 % et 3,3 % des décès imputables aux hépatites virales. A l'inverse, les hépatites chroniques et la cirrhose dues aux infections par les virus de l'hépatite B et C sont des facteurs de risques importants pour le développement du CHC et du cholangiocarcinome (Asrani *et al.*, 2019). En 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé a développé un plan d'action afin de réduire le nombre d'infections par les virus de l'hépatite B et C de plus de 90 % d'ici 2030 afin de prévenir considérablement les risques de cirrhose hépatique et de cancer du foie liés à ces infections (https://www.who.int/health-topics/hepatitis#tab=tab_1).

i. L'hépatite C

L'infection chronique par le virus de l'hépatite C (VHC) touche 58 millions de personnes dans le monde et environ 1,5 millions de personnes sont infectées par le VHC chaque année. Le manque de dépistage du VHC participe notamment à sa large propagation et pour faire face à cela, en juillet 2021, l'OMS a déployé un programme de dépistage massif du VHC (OMS, 2021). Le VHC se transmet essentiellement par voie parentérale. Avant 1990, les transfusions sanguines étaient les principales causes de contamination. Ce mode de transmission est devenu rare dans les pays industrialisés mais demeure un problème dans les pays en voie de développement, comme le Pakistan où l'utilisation de matériel médical pas ou mal stérilisé est le facteur de risque principal d'infection. De nos jours, la consommation de drogues par voie intraveineuse est le principal mode de transmission. Dans les pays industrialisés, l'administration de drogues avec du matériel partagé (seringues, pailles,...) représente 50-60% des cas d'infection VHC (Manns *et al.*, 2017; Taherkhani and Farshadpour, 2017).

Bien qu'environ 30 % des personnes infectées par le VHC éliminent spontanément le virus sans traitement, les 70 % restant développeront une hépatite chronique avec un risque de 15-30 % de développer une cirrhose hépatique dans les 20 ans suivant l'infection et une fois la cirrhose hépatique établie, le risque de développer un CHC pour ces patients augmente de 2-3 % chaque année (OMS, 2021) (Llovet *et al.*, 2021b; WHO | Global hepatitis report, 2017, n.d.). Le développement d'un vaccin prophylactique contre le VHC est difficile à cause de la grande variabilité génétique du virus (Fujiwara *et al.*, 2018). La mise au point de médicaments antiviraux à action directe (AAD), en particulier les inhibiteurs de la protéase (NS3) (Telaprevir) et de la polymérase (NS5A/B) (Sofosbuvir), a permis d'augmenter très significativement le nombre de patients qui développent une réponse virologique soutenue pour

lutter contre l'infection chronique du VHC. Actuellement, 99% des patients guérissent en 6 à 8 semaines de traitement, ce qui est remarquable. L'utilisation d'AAD permet de réduire de 50-80 % le risque de développer un CHC, mais ne le supprime pas (Hamdane *et al.*, 2019). Cependant, beaucoup de patients infectés par le VHC ne sont pas traités avec des AAD car ces traitements sont trop coûteux et peu accessibles pour les populations à risque (Kulik and El-Serag, 2019). En effet, il est estimé qu'en 2019 parmi les 58 millions de personnes infectées chroniquement par le VHC, environ 21 % d'entre elles avaient été diagnostiquées soit 15,2 millions de personnes. Parmi les personnes diagnostiquées, seuls 62 % (9,4 millions) d'entre elles ont eu accès à un traitement AAD. Actuellement, les AAD ciblant les différents génotypes du HCV restent très coûteux, bien que les prix aient récemment chuté de manière significative. Il est intéressant de noter qu'en France un traitement curatif de 3 mois avec le sofosbuvir coûte 41 000 euros et est pris en charge à 100 % par la Sécurité Sociale. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>). Récemment, l'association Médecin Sans Frontières est parvenue à conclure un accord pour l'achat de versions génériques du sofosbuvir et du daclatasvir, à 1,40 dollars (1,20 euros) par jour, soit 120 dollars (un peu plus de 100 euros) pour un traitement de 3 mois, ce qui reste encore très onéreux dans certaines pays en voie de développement (<https://www.msf.fr/communiqués-presse/hepatite-c-msf-negocie-un-prix-de-120-dollars-pour-un-traitement-generique>).

ii. L'hépatite B et l'hépatite D

Les infections chroniques par le virus de l'hépatite B (VHB) constituent environ 60 % des cas de CHC en Asie et en Afrique et 20 % dans les pays occidentalisés (Llovet *et al.*, 2021b). En 2019, l'OMS estimait que 296 millions de personnes souffrent d'une infection chronique par le VHB et que chaque année, il y a environ 1,5 millions nouvelles contaminations. Le VHB est un virus sexuellement transmissible, et se transmet également par voie sanguine. Dans les zones hautement endémiques, il se transmet principalement de la mère à l'enfant, mais aussi par l'usage de matériel médical souillé et l'exposition à des fluides corporels contaminés. Chez les adolescents et les adultes, les principales voies d'infection sont la transmission sexuelle, en particulier dans les pays occidentaux, ou l'utilisation d'aiguilles contaminées lors de la consommation de drogues par voie intraveineuse. L'augmentation de la couverture vaccinale préventive contre le VHB dans le monde a permis de réduire le nombre d'enfants contaminés de manière périnatale. En 2015, la couverture mondiale avec 3 doses de vaccin était de 84 % et devrait atteindre les 90 % d'ici 2030 (WHO, 2021, (Asrani *et al.*, 2019)). Le risque de

développer une hépatite chronique à la suite d'une infection par le VHB dépend de l'âge du patient. Il est de 90 % lors d'une infection périnatale mais diminue à 5 % chez l'adulte. Toutefois, l'infection chronique par le VHB augmente considérablement le risque de développer un CHC et ce même sans développer une cirrhose hépatique (10-30 % des cas). En effet, le génome du VHB est capable de s'intégrer au génome de la cellule hôte, ce qui peut mener à la mutagenèse et à l'activation d'oncogènes (Llovet *et al.*, 2021b). Ces deux dernières décennies, l'utilisation d'analogues nucléosidiques (entécavir) et nucléotidiques (ténofovir) qui ciblent directement l'activité transcriptase inverse de la polymérase virale du VHB a permis de diminuer le risque de développer un CHC. Cependant, l'élimination totale du VHB n'est jamais atteinte et la prise de ces médicaments reste nécessaire tout au long de la vie du patient (Zoulim *et al.*, 2016).

Le virus de l'hépatite D (VHD) est un virus satellite du VHB qui requiert l'expression des antigènes de surface du VHB AgHBs S, M et L pour l'assemblage de ses particules infectieuses. Dans le monde, 20 à 40 millions de personnes sont infectées par le VHD (Asrani *et al.*, 2019; Llovet *et al.*, 2021b). Ce virus est retrouvé chez des patients infectés par le VHB et la co-infection ou la surinfection par le VHB et le VHD est associée à un risque 2 fois plus important de décompensation de la cirrhose hépatique et 3,2 fois plus important de développer un CHC par rapport à une infection par le VHB seul (Sureau and Negro, 2016). Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace contre le VHD. Cependant, le vaccin préventif contre le VHB offre une protection croisée contre le VHD. De plus, le Myrcludex B, un peptide dérivé du domaine PréS1 de la protéine HBs L qui possède un domaine de liaison au récepteur *sodium/taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP), protège contre l'infection par le VHB, module la propagation virale dans des modèles animaux et diminue la charge virale du VHD chez les patients dans un essai clinique de phase III (NCT02888106) (Verrier *et al.*, 2016).

b. L'hépatopathie alcoolique

La consommation abusive d'alcool concerne environ 2,3 milliards de personnes dans le monde (Singal *et al.*, 2018; Global status report on alcohol and health 2018, n.d.) (OMS,2018). Il est estimé que, mondialement, 27% des cas de décès associés à une cirrhose hépatique et 30% des cas de décès associés au CHC sont attribuables à l'hépatopathie alcoolique (Seitz *et al.*, 2018). Les maladies liées à la consommation abusive d'alcool sont en rapide augmentation dans des pays d'Asie, tels que la Chine, la Corée du Sud et l'Inde. Ces maladies sont également retrouvées plus fréquemment dans les pays d'Europe de l'Est qu'en Europe de l'Ouest et ce

probablement grâce à des mesures légales menant à la diminution de la consommation d'alcool dans ces pays (Singal *et al.*, 2018). Environ 1 adulte sur 12 a une consommation abusive d'alcool définie par plus de 42 g d'alcool par jour pour un homme et plus de 28 g pour une femme. Les formes précoces de maladie hépatique alcoolique sont une accumulation anormale de lipides dans le foie (stéatose) associée à une augmentation des taux d'enzymes hépatiques (aspartate aminotransférase AST, alanine aminotransférase ALT) et à une diminution de la bilirubine (< 3 mg/dL) (Singal *et al.*, 2018). Cette forme est en général asymptomatique et la stéatose peut être rapidement inversée suite à l'arrêt de la consommation d'alcool. En revanche, avec une consommation continue d'alcool, 30 % des patients développent une stéatohépatite alcoolique caractérisée par une inflammation hépatique associée à une fibrose dans 20-40 % des cas et à une cirrhose dans 8-20 % des cas. Les patients souffrant d'une cirrhose alcoolique ont un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) avec un risque à vie d'environ 3-10 % et un risque annuel d'environ 1 %. Actuellement, les traitements de la stéatohépatite alcoolique incluent l'utilisation de corticostéroïdes afin de diminuer l'inflammation sévère du foie et l'abstinence (Singal *et al.*, 2018). Cependant, ceux-ci n'apportent un bénéfice de survie qu'à court terme chez environ 50% des patients traités et ne peuvent prévenir la progression de la maladie hépatique sous-jacente. De plus, l'utilisation des corticostéroïdes présente de nombreux effets adverses et son utilisation est contre-indiquée chez les patients infectés par le VHB ou souffrant de tuberculose (Singal *et al.*, 2018; Seitz *et al.*, 2018).

c. La maladie du soda ou NAFLD

La maladie du soda ou *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) est une maladie du foie associée à l'obésité ($\text{IMC} \geq 30$), à la résistance à l'insuline, au diabète de type 2, à l'hypertension et à l'hyperlipidémie. Le spectre clinique de la NAFLD s'étend de la stéatose simple qui est l'accumulation de plus de 5 % de lipides (Byrne and Targher, 2015) dans les hépatocytes en l'absence d'autres étiologies (alcool, infection virale, drogues, maladie auto-immune), à la stéatohépatite (NASH) qui est la forme la plus sévère. La NASH présente une évolution progressive menant à la fibrose du foie, à la cirrhose, et au CHC (Younossi, 2019). Les détails de la physiopathologie et les traitements de la NAFLD seront abordés plus en aval.

La NASH est devenue l'une des indications majeures de transplantation hépatique dans le monde (Terrault and Pageaux, 2018), et il n'y a actuellement aucune solution thérapeutique pour traiter la NASH et empêcher son évolution vers des pathologies plus graves telles le CHC

(Anstee *et al.*, 2019). La stéatose hépatique simple est une pathologie plus répandue que la NASH, ce qui suggère qu'une grande partie des patients souffrant de stéatose parviennent à éviter le développement de la NASH (Diehl and Day, 2017). De plus, des études précliniques ont permis d'identifier des facteurs de risques qui favorisent le développement de la NASH et par conséquent d'identifier des populations de patients plus ou moins à risque de développer des formes plus graves de la maladie tel que le CHC (Diehl and Day, 2017; Anstee *et al.*, 2019). Ces dernières décennies, le développement des modes de vie sédentaires ainsi que l'augmentation de l'obésité et du diabète participent grandement à l'augmentation rapide et continue de la prévalence de la NAFLD. L'obésité est considérée comme la pandémie du 21^{ème} siècle. En 2016, l'OMS considère que près de deux milliards de personnes sont en surpoids ou obèses et que ce nombre va encore drastiquement augmenter au vu des 41 millions d'enfants en dessous de 5 ans qui sont en surpoids (Anstee *et al.*, 2019). Par conséquent, une forte augmentation des cas de NASH est à prévoir dans un futur proche (Piazzolla and Mangia, 2020). Il est actuellement prédit que d'ici 2030, les taux d'incidence mondiaux de cancers primaires du foie liés à la NAFLD et à la NASH augmenteront de façon dramatique (Anstee *et al.*, 2019; Younossi and Henry, 2021). Il est intéressant de noter qu'une étude rétrospective anglaise a observé en 2010 que les CHC induit par la NASH représentaient 35% de tous les cas de CHC en Angleterre, ce qui représente une augmentation de dix fois en dix ans (Anstee *et al.*, 2019). De plus, il est estimé que l'incidence des CHC induits par la NASH augmentera de 137% d'ici 2030 (Estes *et al.*, 2018). Actuellement, les solutions thérapeutiques pour lutter contre la NASH sont principalement des modifications du style de vie en luttant contre la sédentarisation, augmentant l'exercice physique et en modifiant l'alimentation. En effet, la NASH étant généralement liée au surpoids et à l'obésité, les cliniciens recommandent à ce type de patients de perdre environ 7 % de leur masse corporelle, de limiter leur consommation en boissons riches en fructose et en boissons alcoolisées et recommandent la consommation de café (Diehl and Day, 2017).

2) La fibrose et la cirrhose hépatique

a. Epidémiologie

La fibrose hépatique est un phénomène de cicatrisation du foie pathologique caractérisée par l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) à la suite d'un dommage du foie. Dans le cas d'un dommage aigu ou limité, ces changements structurels sont transitoires et l'architecture du foie est restaurée (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Cependant, dans le cas des maladies

hépatiques chroniques, les dommages sont soutenus et l'accumulation de MEC, ainsi que l'inflammation chronique persistante, conduisent au remplacement progressif du parenchyme hépatique par du tissu cicatriciel (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Il est estimé que parmi les patients souffrant de maladies hépatiques chroniques, 25-30 % d'entre elles sont susceptibles de développer une fibrose avancée et une cirrhose hépatique et ce sur une période de 15 à 30 ans (Pinzani *et al.*, 2005). Les différents stades de développement de la fibrose corrént avec la perte de fonction hépatique et représentent un facteur de risque majeur au développement du CHC (Roehlen *et al.*, 2020). Si la fibrose hépatique est de façon générale largement asymptomatique, sa progression au stade de la cirrhose est associée à une morbidité et une mortalité accrue. Environ 4 à 12 % des patients atteints de cirrhose développent au moins un événement de décompensation par an. Les événements de décompensation les plus courants sont l'ascite, l'hémorragie variqueuse et l'encéphalopathie hépatique. Jusqu'à 40 % des patients atteints de cirrhose développeront une encéphalopathie hépatique dans un délai de cinq ans. La présence de ces complications est un indicateur pronostique important, avec une mortalité significativement plus élevée pour les cirrhoses décompensées que pour les cirrhoses compensées (Moon *et al.*, 2020).

Actuellement, la cirrhose est considérée comme la onzième cause de décès la plus fréquente dans le monde et la quatrième cause de décès chez l'adulte en Europe centrale (Asrani *et al.*, 2019; Roehlen *et al.*, 2020). Il est estimé que la cirrhose hépatique affecte environ 1-2 % de la population globale et cause chaque année environ un million de décès dans le monde, avec une croissance du nombre de cas de plus de 50 % au cours de ces trois dernières décennies (Qian *et al.*, 2022) (**Figure 3**). Il faut noter que la prévalence de la cirrhose pourrait être sous-estimée. En effet, il est estimé qu'une grande partie des patients souffrant de NASH ou d'infection chronique par le VHC ne sont pas diagnostiqués pour la cirrhose et que le diagnostic de la cirrhose intervient souvent tardivement au moment de la décompensation ou post-mortem (Schuppan and Afdhal, 2008). La cirrhose est le principal facteur de prédisposition au cancer du foie. Cependant, compte tenu des avantages limités en termes de survie et du coût élevé des options thérapeutiques actuellement disponibles aux stades avancés de la maladie, agir en amont par l'amélioration des méthodes de diagnostic de la cirrhose à un stade précoce ainsi que la prévention de la progression de la fibrose à des stades plus précoces apparaît comme la stratégie la plus prometteuse pour ce besoin médical non satisfait (Qian *et al.*, 2022).

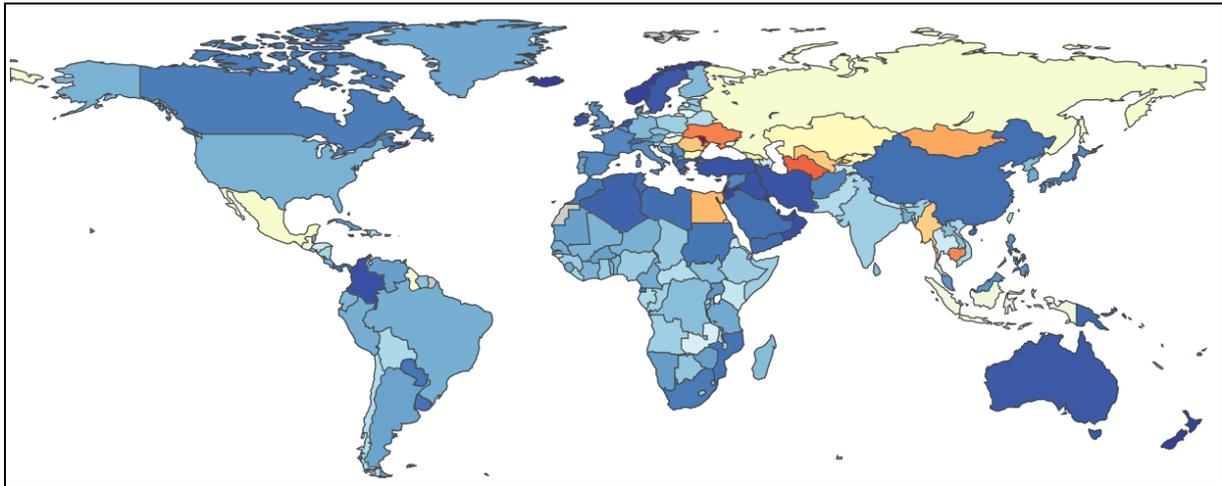


Figure 3 : Mortalité globale due à la cirrhose. Le risque de mortalité selon l'âge (pour 100 000 personnes) attribué à la cirrhose est indiqué. Légende (mortalité pour 100 000 personnes) : bleu foncé à bleu clair (0-40), jaune (40-50), jaune-orange (50-60), orange-rouge (60-70) et rouge (>70). Adapté de l'étude Global Burden of Disease, 2019 (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>).

b. Mécanismes cellulaires et moléculaires généraux de la fibrose et de la cirrhose

Malgré des mécanismes différents de lésions du foie et des réponses cellulaires spécifiques selon les étiologies, la progression de la fibrose hépatique en cirrhose suit des schémas communs pour les principales étiologies de maladies hépatiques chroniques (Roehlen *et al.*, 2020). En effet, le stress induit par les infections virales chroniques ou les maladies métaboliques entraînent des lésions hépatocytaires, tels que le *ballooning* suivi de la mort des hépatocytes qui sont des événements fondamentaux pour l'initiation de la maladie chronique. Les hépatocytes en nécrose sécrètent des *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) tels que le *high-mobility group box1* (HMGB1), de l'ADN nucléaire et mitochondrial et des dérivés nucléotidiques de la purine, capables d'activer les cellules stellaires (HSC) et de promouvoir le recrutement et l'activation de cellules immunitaires pro-inflammatoires, dont les lymphocytes, les cellules de Kupffer (KC) et les macrophages dérivés de monocytes (**Figure 4**). Par ailleurs, il est observé l'activation des récepteurs de mort Fas lors de l'apoptose des hépatocytes permet également d'induire une réponse pro-fibrogénique (Roehlen *et al.*, 2020). Dans le cas des maladies métaboliques telle que la NAFLD, l'accumulation d'acides gras libres (FFA) et de cholestérol libres dans les hépatocytes participe également à l'induction d'une réponse pro-fibrogéniques en stimulant la sécrétion d'ATP par les hépatocytes endommagés et en conduisant à la formation de cristaux de cholestérol qui stimulent le recrutement et l'agrégation

de KC autour des hépatocytes morts formant des structures en forme de couronnes (« *crow-like structures* ») et favorisant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'activation des cellules stellaires.

Le recrutement et l'activation des cellules immunitaires est un événement important du développement et de la progression de la fibrose hépatique. Les KC et les macrophages dérivés des monocytes peuvent être recrutés et activés par les DAMP, les ROS sécrétées par les hépatocytes lésés ainsi que par les réponses immunitaires induites par les hépatites virales chroniques et les maladies métaboliques. Les KC peuvent également être activés par l'accumulation de FFA libres et l'absorption du cholestérol libre formant ainsi des *foam cell* et induisant l'activation des voies *Toll like receptor-4* (TLR4), *c-Jun terminal kinase* (JNK) et *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B). Lors de l'initiation de la maladie, les macrophages possèdent un profil pro-inflammatoire. Les KC sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, tels l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-6, le *tumor necrosis factor α* (TNF- α) et des chimiokines à motif C-C (CCL2, CCL5) qui participent à l'activation des HSC et au recrutement des macrophages dérivés de monocytes. Ces cellules sécrètent également le *transforming growth factor β* (TGF- β) et le *platelet derived growth factor* (PDGF) qui sont les deux cytokines majeures responsables de l'activation et de la prolifération des HSC. Les différentes cytokines induisent un réseau complexe de voies de signalisation, dont la voie de l'inflammasome *Nod like receptor family, pyrin domain containing 3* (NLRP3) - Caspase1, la voie du NF- κ B) et la voie WNT/ β caténine orchestrant les interactions cellulaires pro-fibrogènes. Par ailleurs, des études démontrent que le recrutement de lymphocytes T CD4+ ainsi que leur différenciation en cellules T *helper* stimule la fibrogenèse chez les HSC activées (Roehlen *et al.*, 2020).

L'activation des HSC est un événement clef de la mise en place de la fibrose. Elles peuvent être activées par les DAMP et les ROS sécrétés par les hépatocytes lésés, ainsi que par les cytokines sécrétées par les différentes cellules immunitaires. L'association de ces différents éléments promeut l'activation des HSC et leur transdifférenciation en myofibroblastes hépatiques. Ces myofibroblastes perdent progressivement leur capacité de stockage de la vitamine A ainsi que leurs gouttelettes lipidiques et acquièrent des caractéristiques prolifératives, migratoires et contractiles en exprimant notamment l'actine de type 2 des muscles lisses (*ACTA2*). Ces cellules sont responsables du dépôt excessif de matrice extracellulaire dans le parenchyme. Elles sécrètent des collagènes non fibrillaires, tels que les types IV et XVIII, des collagènes fibrillaires de type I et III, de la fibronectine, des laminines parmi d'autres glycoprotéines de la MEC et des protéoglycans (Tsuchida and Friedman, 2017;

Roehlen *et al.*, 2020). De plus, en sécrétant des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire, telles que les métalloprotéinases (MMP), et des cytokines pro-inflammatoires, elles induisent le remplacement de la matrice extracellulaire saine par une matrice altérée. Cette matrice modifiée participe à la rétention des cellules immunitaires et de cytokines pro-inflammatoires dans le foie, ce qui participe à perpétuer la réponse inflammatoire et l'activation des HSC. Les HSC sont également responsables du maintien de leur état activés en exprimant elles aussi le TGF- β et le PDGF (Tsuchida and Friedman, 2017; Roehlen *et al.*, 2020). Ces différents éléments sont responsables de la mise en place de la fibrose hépatique. De plus, la contraction tonique des myofibroblastes entraîne une résistance accrue au flux sanguin dans le sinusoiide hépatique (Bataller and Brenner, 2005; Roehlen *et al.*, 2020). Les interactions cellulaires, impliquées dans le développement de la fibrose sont représentées dans la **Figure 4**.

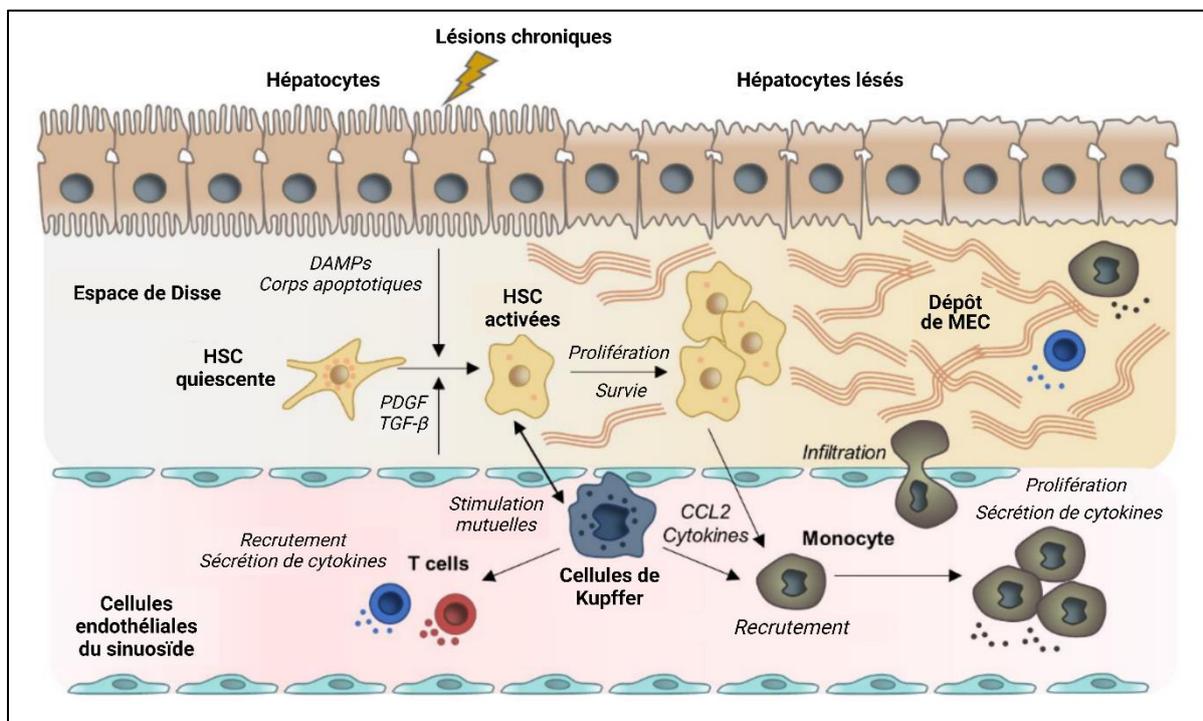


Figure 4 : Mécanismes de la fibrose hépatique. Les lésions chroniques des hépatocytes entraînent la sécrétion de DAMPs et de corps apoptotiques qui activent les cellules stellaires hépatiques (HSC) et recrutent des cellules immunitaires. Des interactions multidirectionnelles complexes entre les HSC activées et les cellules de Kupffer, ainsi que les cellules immunitaires innées, favorisent la trans-différenciation en myofibroblastes prolifératifs et producteurs de matrice extracellulaire (MEC). Abréviations : PDGF : *platelet derived growth factor*; TGF- β : *transforming growth factor β* ; CCL2 : ligand 2 de la chimiokine (motif C-C). Traduit de (Roehlen *et al.*, 2020). Modifiée avec Biorender.com

La forme la plus avancée de fibrose hépatique est la cirrhose, caractérisée par une distorsion du parenchyme hépatique et de l'architecture vasculaire (Schuppan and Afdhal, 2008; Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Roehlen *et al.*, 2020). En effet, la caractéristique pathologique principale de la cirrhose est la formation de nodules de régénération du parenchyme entourés de septa fibrotiques pouvant contenir, dans les cas des nodules les plus larges, des veinules portales terminales (Hernandez-Gea and Friedman, 2011) (**Figure 5**). Le développement de ces nodules conduit à un *shunt* des circulations portales et artérielles dans le foie. De plus, le dépôt de MEC dans l'espace de Disse provoque la perte des villosités des hépatocytes et déclenche un processus de « capillarisation du sinusoiide » caractérisé par la perte du caractère fenestré de l'endothélium. Ces phénomènes provoquent la diminution des échanges métaboliques bidirectionnels entre le flux de la veine portale et les hépatocytes, compromettant ainsi les échanges entre le parenchyme et les sinusoiides hépatiques et conduisant à une perte de la fonction hépatique et au développement d'une hypertension portale qui est la cause majeure des complications cliniques telles que la décompensation hydropique, les saignements et encéphalopathie hépatique, les varices œsophagiennes, la vasoconstriction et l'hypoperfusion rénale (Schuppan and Afdhal, 2008; Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Roehlen *et al.*, 2020). Par ailleurs, les anomalies circulatoires générales de la cirrhose (vasodilatation splanchnique, vasoconstriction et hypoperfusion rénale, rétention d'eau et de sel, augmentation du débit cardiaque) sont intimement liées aux altérations vasculaires hépatiques et à l'hypertension portale qui en résulte (Schuppan and Afdhal, 2008).

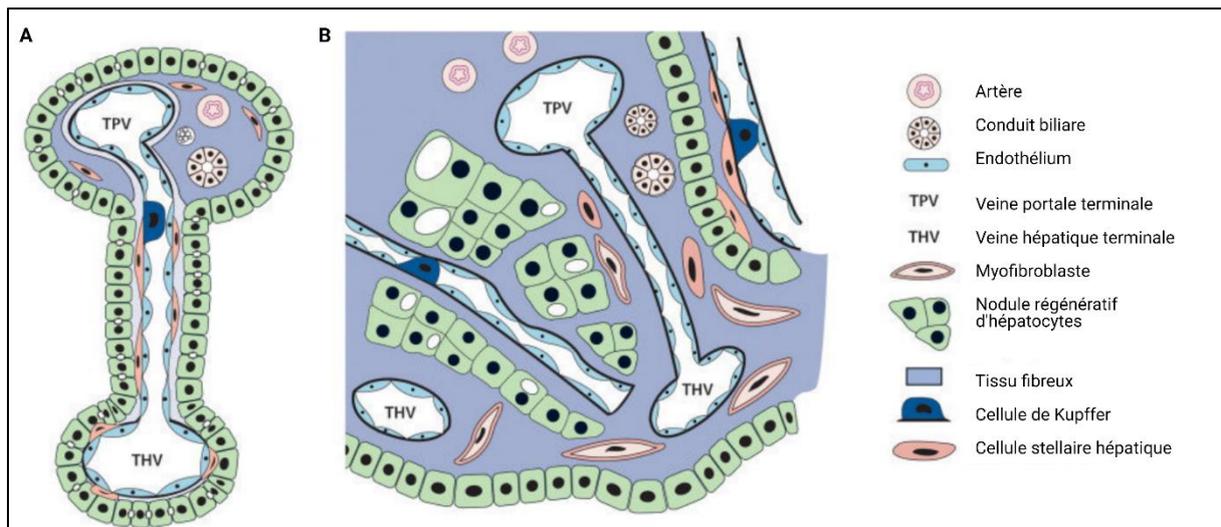


Figure 5 : Altérations vasculaires et architecturales de la cirrhose. Le sang mésentérique s'écoule par la veine porte et l'artère hépatique qui se ramifient en voies portales terminales. **A.** foie normal : Le sang du canal porte terminal traverse les sinusoides hépatiques où l'endothélium sinusoidal fenestré repose sur un tissu conjonctif lâche (espace de Disse) et permet un échange métabolique important avec les hépatocytes lobulaires. Le sang sinusoidal est collecté par les veinules hépatiques terminales qui débouchent dans l'une des trois veines hépatiques et enfin dans la veine cavalière. **B.** cirrhose : Les myofibroblastes activés qui dérivent des cellules stellaires hépatiques périsinusoïdales et des fibroblastes de la veine porte ou centrale prolifèrent et produisent un excès de matrice extracellulaire (MEC). Cela entraîne une expansion fibreuse du tractus portal, une fibrose de la veine centrale et une capillarisation des sinusoides, caractérisée par la perte des fenestrations endothéliales, la congestion de l'espace de Disse par la MEC et la séparation/encastrement des îlots hépatocytaires périsinusoïdaux du flux sanguin sinusoidal par des septa collagènes. Le sang est directement dérivé des veines et artères portales terminales vers les veines centrales, avec pour conséquence une hypertension portale (intra-hépatique) et une fonction de synthèse du foie compromise. Traduit de (Schuppan and Afdhal, 2008). Modifiée avec Biorender.com

La résolution de la fibrose hépatique est associée à l'apoptose des myofibroblastes hépatiques et à la dissolution du tissu cicatriciel médiée par des *scar-associated macrophages* (SAMs). Dans le cadre des maladies hépatiques chroniques, cette résolution n'est cependant que partielle (Roehlen *et al.*, 2020). En effet, il a été observé qu'environ 15 % des patients souffrant d'une infection virale chronique du foie ne présentent pas de résolution de la fibrose hépatique malgré une réponse virale soutenue (D'Ambrosio *et al.*, 2012). De plus, la résolution spontanée de la fibrose se produit lentement et peut ne pas prévenir les complications potentiellement mortelles, telles que la décompensation, l'insuffisance hépatique et le CHC, en particulier dans les cas de la fibrose avancée. Les stratégies anti-fibrotiques apparaissent donc

comme nécessaires pour contrer la progression et accélérer la résolution de la fibrose hépatique. Malgré le développement de nombreuses molécules candidates, il n'y a à ce jour aucun traitement approuvé pour lutter contre la fibrose hépatique (Roehlen *et al.*, 2020).

II Zoom sur la NAFLD et la NASH

1) Epidémiologie de la NAFLD et de la NASH

Les maladies hépatiques chroniques sont responsables de plus de deux millions de décès par an dans le monde (Asrani *et al.*, 2019). La prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique ou *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) est estimée à environ 23-25 % dans le monde. Elle varie selon les régions, les pays du Moyen Orient et d'Amérique du Sud ayant les prévalences les plus hautes (respectivement 31,79 et 30,45 %) contre 14 % dans les pays d'Afrique et 23,71% en Europe (Younossi, 2019; Anstee *et al.*, 2019; Lazarus *et al.*, 2021) (**Figure 6**). Il est estimé que le nombre de cas de NAFLD augmentera d'environ 30% d'ici 2030 avec une forte augmentation dans les pays d'Asie tel que la Chine en raison de l'urbanisation de ces régions (Younossi, 2019). En Europe et aux Etats Unis, la NAFLD deviendra d'ici 2030 la cause la plus fréquente de transplantation hépatique (Pais *et al.*, 2016; Terrault and Pageaux, 2018). La NAFLD est une maladie progressive, qui dans les stades précoces est caractérisée par une accumulation anormale de gras dans le foie (stéatose) avec pas ou peu d'inflammation et pas de signes de dommages cellulaires. Elle peut évoluer vers une forme plus grave, la *non alcoholic steatohepatitis* (NASH) qui inclue l'établissement de l'inflammation avec des degrés variables de fibrose et la cirrhose (Diehl and Day, 2017). Elle peut notamment évoluer vers le carcinome hépatocellulaire (CHC). La prévalence de la NASH est estimée à 3-5 % dans le monde (Younossi *et al.*, 2018). Il est estimé que la prévalence de la NASH dans le monde augmentera de 15-56 % d'ici 2030 (Younossi, 2019). De nos jours, la NAFLD et la NASH représentent un problème majeur de santé publique en Europe avec un coût direct estimé à 35 milliards d'euros (Younossi *et al.*, 2018).

Récemment, une nouvelle définition, basée sur une pratique clinique empirique et sur des données issues d'hépatologues et de médecins généralistes, a été proposée : la stéatose hépatique associée au dysfonctionnement métabolique, *metabolic dysfunction-associated fatty liver disease* (MAFLD). La MAFLD prend en compte l'hétérogénéité de la pathologie métabolique et inclut les autres étiologies de maladies hépatiques chroniques, telles que l'hépatopathie alcoolique et les prédispositions génétiques, mais aussi les stéatoses associées aux infections chroniques par le VHB et le VHC, ce qui pourrait rendre la stratification des

patients très complexe. De plus, des preuves scientifiques sont encore nécessaires pour approfondir la définition de la MAFLD. Enfin, l'utilisation du terme MAFLD est encore sujet à débat dans la communauté scientifique et médicale et devrait faire l'objet d'une discussion plus approfondie, car il s'agit d'une pathologie qui affecte le secteur médical, mais aussi la productivité du travail et l'économie sociale (Eslam *et al.*, 2020; Kawaguchi *et al.*, 2022).

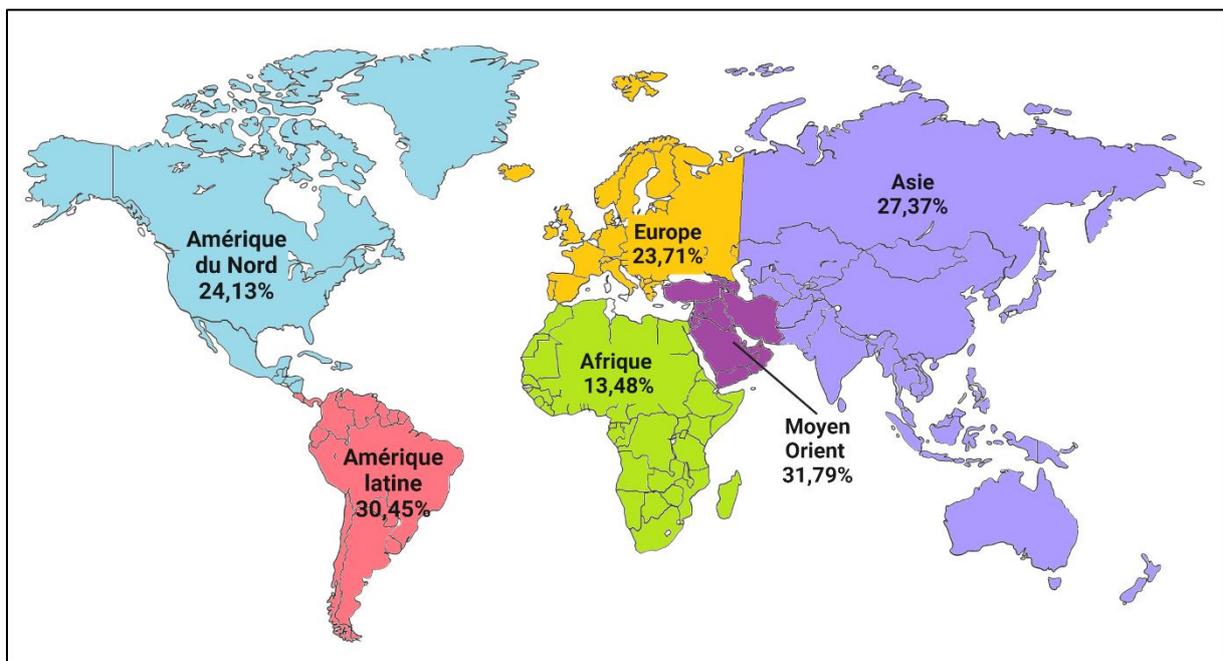


Figure 6 : Prévalence globale de la maladie du foie gras (NAFLD) D'après (Younossi *et al.*, 2019).
Modifié avec BioRender.com

2) Physiopathologie de la NAFLD et de la NASH

a. Rappel du métabolisme lipidique

L'organe primaire du métabolisme lipidique est le foie, dont les fonctions principales sont le maintien de l'homéostasie lipidique et l'équilibre énergétique de l'organisme (Alannan *et al.*, 2020). Les principales sources d'acides gras dans le foie, sont les acides gras synthétisés *de novo*, les acides gras issus du bol alimentaire et enfin les lipides périphériques stockés initialement dans le tissu adipeux et sont redirigés vers le foie en fonction des besoins physiologiques (Musso *et al.*, 2009). Les lipides issus du bol alimentaire sont absorbés par les entérocytes au niveau de l'intestin grêle (**Figure 7**) (Crouchet *et al.*, 2017). Les triglycérides sont hydrolysés par les lipases pancréatiques afin de générer des acides gras libres (FFA) qui sont absorbés par les entérocytes *via* les *fatty acid binding proteins* (FABP), qui sont de petites

protéines fortement exprimées qui se lient de manière réversible aux acides gras, aux eicosanoïdes et à d'autres lipides (Musso *et al.*, 2009; Crouchet *et al.*, 2017). De même, le cholestérol libre issu de la digestion est absorbé dans les entérocytes par le récepteur *Niemann–Pick C1-like 1* (NPC1L1). Les FFA et le cholestérol libre (FC) sont associés à l'apolipoprotéine ApoB-48 pour former des chylomicrons qui sont excrétés dans la circulation sanguine et lymphatique où ils acquièrent des apolipoprotéines telles que ApoE et ApoC issus des *high density lipoproteins* (HDL). La lipoprotéine lipase (LPL) métabolise les chylomicrons afin de libérer des FFA et des chylomicrons résiduels. Les FFA sont dirigés par la circulation sanguine vers les cellules musculaires afin de produire de l'énergie ou vers les adipocytes pour y être stockés. Les chylomicrons résiduels peuvent être absorbés par les hépatocytes *via* les récepteurs de l'ApoE, *Low Density Lipoproteins Receptor related protein 1* (LRP1) et les héparanes sulfates protéoglycans (HSGP) (Crouchet *et al.*, 2017). Les lipides issus du bol alimentaire peuvent également être stockés dans les hépatocytes. Les acides gras libres peuvent y être catabolisés par la β -oxydation au sein des mitochondries ou des peroxyosomes, générant ainsi de l'acétyl-CoA. Ils peuvent également être utilisés pour la synthèse *de novo* de triglycérides par la stéaryl-CoA désaturase 1 (SCD1) et les déacylglycérol acyltransférase 1 et 2 (DGAT1, DGAT2) (Michelotti *et al.*, 2013; Ipsen *et al.*, 2018). En parallèle, le cholestérol libre peut être estérifié par **l'acétyl-coenzyme-A acétyltransférase 2 (ACAT2)**¹ ou être métabolisé par la cholestérol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) en acides biliaires sécrétés dans les canalicules biliaires *via* le transporteur *ATP-binding cassette (ABC) transporters 11* (ABCG11) (Ioannou, 2016). Les hépatocytes sont également capables de synthétiser les FFA et le cholestérol à partir de l'acétyl CoA respectivement *via* l'acétyl-CoA carboxylase-1 (ACC1) et de la *fatty acid synthase* (FASN) qui sont des enzymes clés de la synthèse d'acides gras et *via* **l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMGCR)**² qui est l'enzyme clé de la synthèse de cholestérol (Sunami, 2020).

En fonction des besoins de l'organisme, les triglycérides stockés par le foie dans des gouttelettes lipidiques et le cholestérol estérifié peuvent être mobilisés dans les hépatocytes pour former des *very low density lipoprotein* (VLDL) qui acquièrent l'ApoE et l'ApoC. Elles sont sécrétées dans la circulation sanguine pour transporter les lipides, principalement les TG, vers les tissus périphériques (Crouchet *et al.*, 2017). L'hydrolyse des VLDL dans le plasma par

¹ Les différents acteurs du métabolisme lipidiques mis en évidence dans le texte sont cruciaux : ACAT2 est l'enzyme limitante de l'estérification du cholestérol mobilisé pour la formation de VLDL et sont excrétion vers l'espace de Disse.

² HMGCR est l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol.

la LPL conduit à la libération de FFA et à formation d'*intermediate-density lipoproteins* (IDL) qui sont soit éliminées de la circulation *via* leur interaction avec le LDL-R hépatocytaire ou sont catabolisés par la lipase hépatique pour former des *low density lipoproteins* (LDL). Les LDL sont riches en cholestérol et fournissent du cholestérol aux tissus périphériques par l'interaction de l'ApoB-100 avec le LDL-R (Crouchet *et al.*, 2017).

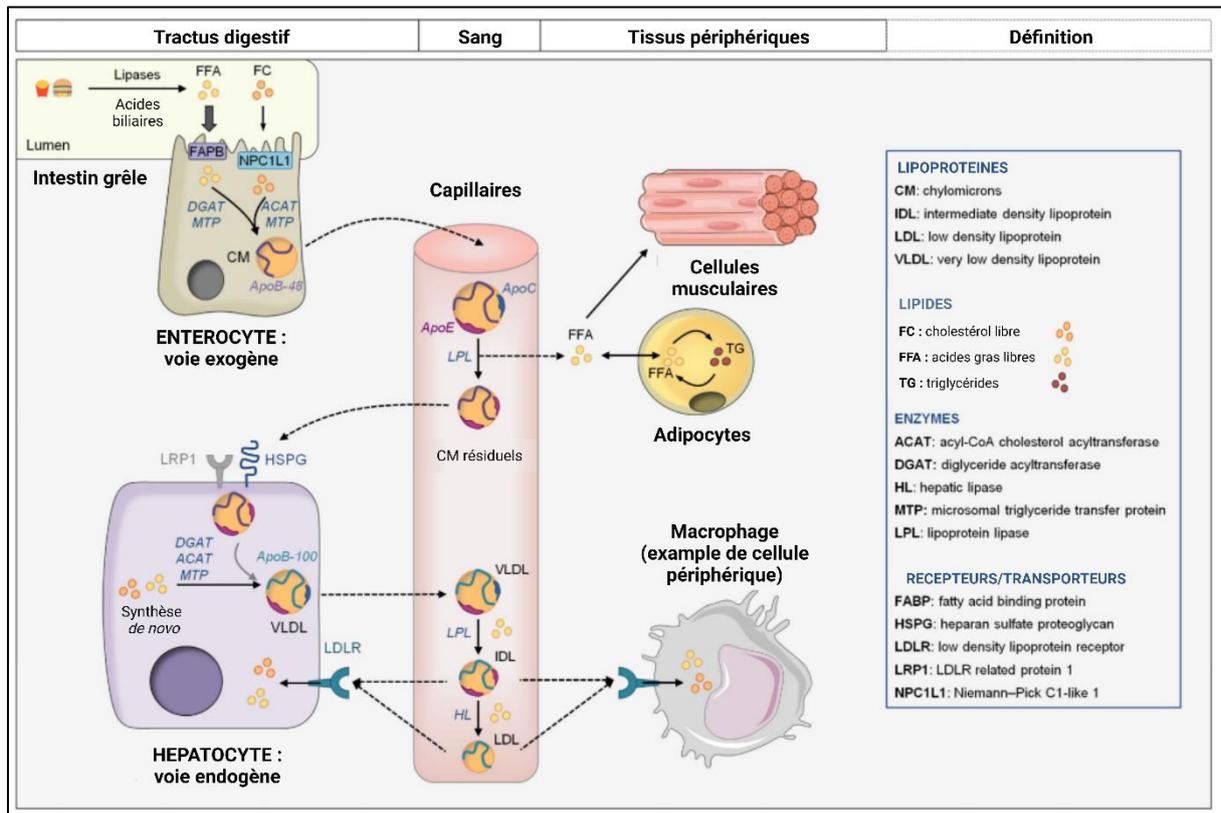


Figure 7 : Métabolisme des lipoprotéines riches en TG (LRT), résumé des voies de transport des lipides exogènes et endogènes. Pendant la digestion, les FFA et le FC sont absorbés par les entérocytes par l'intermédiaire de FABP et de NPC1L1 respectivement et sont assemblés avec ApoB-48 pour former des CM. Les CM sont sécrétés et maturés dans la circulation lymphatique et sanguine en acquérant des apolipoprotéines échangeables telles que l'ApoE et l'ApoC. Les CM sont métabolisés par la LPL pour libérer les FFA et les CM résiduels. Les FFA sont absorbés par les cellules musculaires pour la production d'énergie ou par les adipocytes pour le stockage. Les CM résiduels sont capturés par les hépatocytes grâce à l'interaction de l'ApoE avec les récepteurs des CM résiduels (LRP1 et HSPG). Les lipides alimentaires peuvent être stockés dans les hépatocytes. Les lipides stockés et synthétisés de novo peuvent être mobilisés pour produire des VLDL. La production de VLDL nécessite l'ApoB-100 et le MTP. Elles sont sécrétées dans la circulation sanguine pour transporter les lipides, principalement les TG, vers les tissus périphériques. Les TG sont hydrolysées par la LPL pour libérer les FFA et les restes de VLDL également appelés IDL. Les IDL peuvent être captées par le foie ou être métabolisées en LDL. Les LDL sont enrichies en cholestérol et assurent son transport vers les tissus périphériques et le foie. Traduit de (Crouchet *et al.*, 2017).

Par ailleurs, le transport réverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie peut se faire *via* les **high density lipoproteins (HDL)** (**Figure 8**). La sécrétion d'ApoA-I par les hépatocytes ou les entérocytes constitue la première étape de formation des HDL. L'ApoA-I peut interagir avec l'**ATP binding cassette sub-family A member 1 (ABCA1)**³ qui permet le transport de phospholipides et de cholestérol vers l'ApoA-I pour former des particules discoïdales. Les HDL discoïdes sont converties en HDL₃ sphériques par la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) qui estérifie le cholestérol. Ces HDL₃ interagissent avec ABCG1 dans les tissus périphériques pour acquérir plus de cholestérol et se transformer en HDL₂ matures. Ces HDL₂ peuvent interagir avec le **récepteur scavenger BI (SR-BI)**⁴ pour permettre l'afflux de cholestérol dans les hépatocytes. Par ailleurs, SR-BI peut délivrer du cholestérol aux tissus stéroïdogènes pour produire des précurseurs hormonaux. Il est intéressant de noter que les HDL et les lipoprotéines contenant de l'ApoB peuvent échanger du cholestérol estérifié contre des triglycérides grâce à l'action de la protéine de transport du cholestérol estérifié (CETP). De cette manière, le cholestérol estérifié est également renvoyé vers les hépatocytes par l'intermédiaire du LDL-R (Crouchet *et al.*, 2017).

³ ABCA1 est un transporteur essentiel des HDL et un médiateur important de l'efflux de cholestérol.

⁴ SR-BI est un récepteur des HDL. Il est également impliqué dans l'efflux de cholestérol.

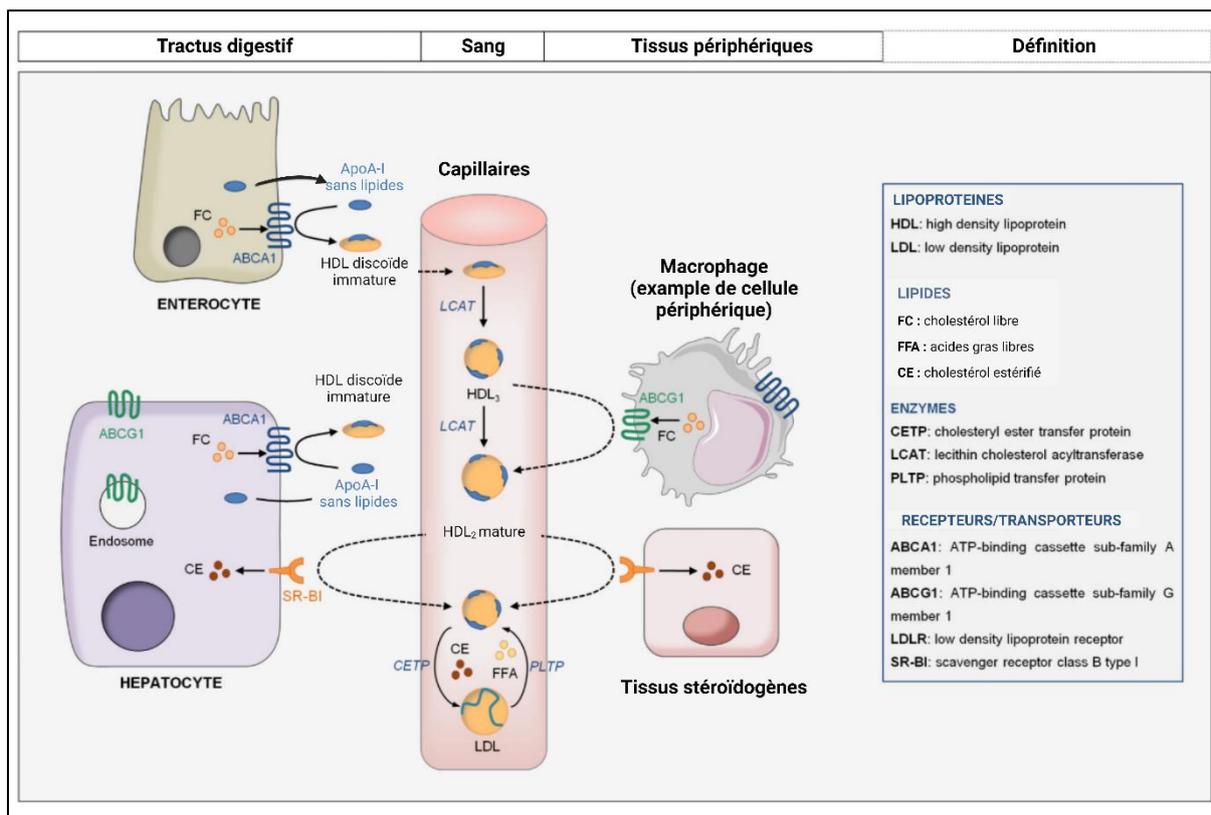


Figure 8 : Métabolisme des HDL et transport inverse du cholestérol. L'ApoA-I est principalement produite par les hépatocytes et les entérocytes. La synthèse des HDL commence par l'interaction de l'ApoA-I avec ABCA1 qui assure l'efflux de cholestérol pour produire des HDL discoïdes naissants. Les HDL discoïdes sont converties en HDL₃ sphériques par la LCAT. Les HDL₃ sont ensuite enrichies en cholestérol par leur interaction avec ABCG1 dans les tissus périphériques pour se transformer en HDL₂ matures. Les HDL₂ sont des ligands pour SR-BI qui assure l'afflux de cholestérol dans les hépatocytes ou dans les tissus stéroïdogènes. Alternativement, le cholestérol retourne au foie par la voie de la CETP : La CETP assure le transfert du CE sur les lipoprotéines contenant de l'Apo-B qui sont capturées par les hépatocytes par l'intermédiaire du LDL-R. Traduit de (Crouchet *et al.*, 2017).

Le foie possède plusieurs mécanismes lui permettant de limiter l'accumulation de lipides, tels que le cholestérol libre, les triglycérides et les acides gras. Le facteur de transcription *sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1c) régule l'expression des gènes de la synthèse d'acides gras et son activation induit une augmentation de l'expression de l'ATP-citrate lyase (ACLY), de l'acétyl-CoA carboxylase-1 (ACC1), de la *fatty acid synthase* (FASN) et de la stéaryl-CoA désaturase 1 (SCD1) qui sont des enzymes clés de la synthèse d'acides gras (Sunami, 2020). L'activation des facteurs de transcription *farnesoid X receptor* (FXR) et

liver X receptor α (LXR α)⁵ permet stimuler le métabolisme du cholestérol, sa transformation en acide biliaire et son excrétion (Ioannou, 2016). FXR promeut l'excrétion de cholestérol en induisant l'expression de ABCG8 et ABCG5⁶ et favorise le métabolisme des lipides en augmentant la sensibilité hépatique à l'insuline, en inhibant la synthèse *de novo* de lipides et en augmentant la β -oxydation des lipides. Le LXR α est un senseur du cholestérol, son activation induit l'expression de gènes impliqués dans l'efflux de cholestérol (ABCG5/8, ABCA1) et réduit l'expression du récepteur *Niemann–Pick C1-like 1* (NPC1L1) (Duval *et al.*, 2006) et de LDL-R (Zelcer *et al.*, 2009), impliqués dans l'absorption du cholestérol. Il induit l'expression de la cholestérol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) impliquées dans la formation d'acides biliaires (Musso *et al.*, 2013; Arguello *et al.*, 2015) et la formation et la sécrétion de VLDL (Russo-Savage and Schulman, 2021). L'estérification du cholestérol par l'ACAT2, l'inactivation de la synthèse de cholestérol *via* la dégradation ou l'inhibition d'HMGCR et l'inhibition de SREBP-2 qui stimule la synthèse et l'absorption du cholestérol, permet également de limiter l'accumulation de lipides dans le foie.

b. Physiopathologie de la NAFLD

La NAFLD est la manifestation hépatique du syndrome métabolique défini par au moins trois des éléments suivants : obésité abdominale, taux élevé de triglycérides plasmatiques, faible taux de cholestérol HDL plasmatique, pression artérielle élevée, glycémie à jeun élevée (Lillich *et al.*, 2021). Le risque de NAFLD est également associé à un polymorphisme génétique dans plusieurs gènes associés au métabolisme des lipides (*PNPLA3*, *TM6SF2*, *GCKR*, *MBOAT7*) (**Figure 9**) (Barbara *et al.*, 2018). Entre 7 et 20 % des patients NAFLD ne sont ni obèses, ni en surpoids et souffrent de NAFLD dite « maigre » liées à des prédispositions génétiques, des maladies infectieuses (infections chroniques par le VHC, VIH), des maladies inflammatoires (maladies cœliaque, dysbiose intestinale) et à l'utilisation de certains médicaments (Tamoxifène, diltiazem, amiodarone) (Albhaisi *et al.*, 2019). Cette forme de NAFLD touche environ 7 % de la population aux Etats-Unis et est beaucoup plus fréquente dans les populations asiatiques (Younossi *et al.*, 2018; Albhaisi *et al.*, 2019). Elle est aussi associée à des patients plus jeunes ainsi qu'à une morbidité et une mortalité plus importante. Au-delà de la mortalité et de la morbidité liées au foie, la NAFLD est associée à des manifestations extra-hépatiques

⁵ LXR α est un facteur de transcription, senseur du cholestérol, impliqué dans la régulation du métabolisme du cholestérol

⁶ ABCG5 et ABCG8 sont des transporteurs clefs du cholestérol libre vers les canalicules biliaires

telles que les maladies cardio-vasculaires, la sclérose de la valve aortique, l'arythmie cardiaque, le dysfonctionnement, l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque congestive, et cérébro-vasculaires, comme la réduction de la perfusion cérébrale (Byrne and Targher, 2015; Airaghi *et al.*, 2018; Younossi *et al.*, 2019).

La stéatose hépatique apparaît lorsque l'import ou la synthèse de lipides excède leur export et leur dégradation (Machado and Diehl, 2016). Or, les lipides tels que les acides gras, les cholestérols, les oxystérols et les phospholipides sont impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire. L'accumulation de ces lipides rompt l'homéostasie métabolique des hépatocytes et cause leur apoptose. La toxicité des lipides s'explique en partie par leur métabolisme. En effet, l'accumulation excessive de lipides induit différents stress cellulaires tels que le stress du réticulum endoplasmique, inhibe l'autophagie et induit une réponse inflammatoire, ce qui cause des dommages cellulaires et l'apoptose. De plus, l'oxydation des acides gras par la mitochondrie et le peroxyosome génèrent des espèces réactives de l'oxygène qui sont directement toxiques pour l'hépatocyte et sensibilise la cellule au stress oxydatif. Ce stress peut être aggravé par l'accumulation de fer dans les hépatocytes qui induit un stress oxydatif, la peroxydation des lipides et des dommages de l'ADN (Fujita *et al.*, 2009; Machado and Diehl, 2016). L'accumulation d'acides gras dans la mitochondrie génère également des dommages mitochondriaux induisant ainsi l'apoptose ou la nécrose des hépatocytes. Par ailleurs, l'accumulation d'acides gras dans le foie exacerbe la résistance hépatique à l'insuline et l'hyper-insulinémie, ce qui aggrave l'accumulation de lipides dans le foie, induit les réponses pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques ainsi que des réponses mitogéniques qui sont carcinogènes (Machado and Diehl, 2016).

Enfin, plusieurs études suggèrent qu'un déséquilibre dans le microbiote intestinal et la perméabilité intestinale peuvent déterminer l'exposition du foie à divers produits bactériens tels que les lipopolysaccharides, l'éthanol et les métabolites de la choline (Machado and Diehl, 2016) qui contribuent à l'établissement de la maladie hépatique.

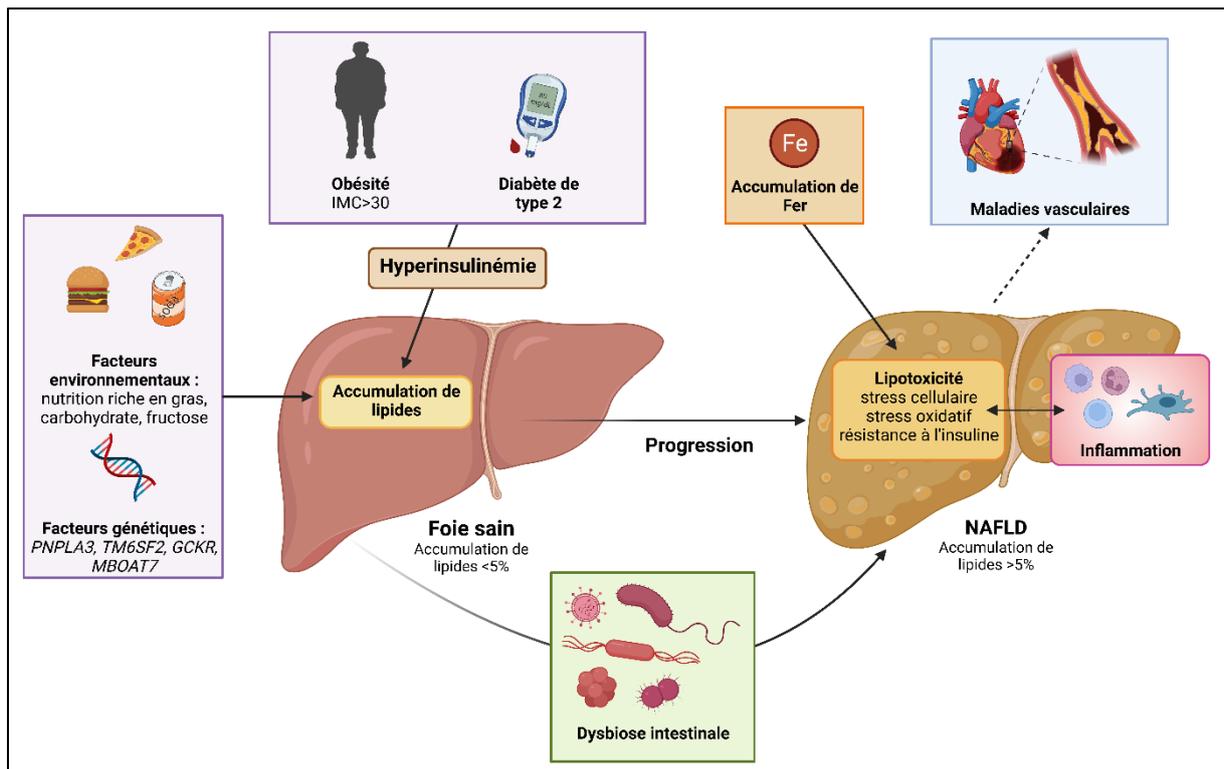


Figure 9 : Physiopathologie de la NAFLD. L'accumulation de graisse ectopique viscérale, qui se produit souvent en cas d'inflammation et de diabète de type 2, entraîne une résistance à l'action de l'insuline et induit l'accumulation de lipides hépatiques. Une mauvaise alimentation (en particulier des apports élevés en graisses et en fructose) et la sédentarité ainsi que des facteurs génétiques (par exemple, les polymorphismes du *PNPLA3*) jouent également un rôle dans la progression de la NAFLD en augmentant l'accumulation des lipides hépatiques et en accroissant le risque de fibrose hépatique. L'accumulation de lipides hépatiques provoque un phénomène de lipotoxicité et une nécro-inflammation hépatique (par activation des cellules de Kupffer) aggravée par l'accumulation de fer avec activation des cellules stellaires hépatiques et production accrue de matrice collagène. Des modifications du régime alimentaire entraînent une dysbiose du microbiote intestinal avec des effets hépatotoxiques. La dysbiose altère la production d'acides gras à chaîne courte (issus de la fermentation des glucides alimentaires) et augmenter la production de lipopolysaccharides dans la circulation portale (par l'évacuation des bactéries intestinales causée par une perméabilité intestinale accrue). La NAFLD est également associée à des manifestations extra-hépatiques telles que les maladies cardiovasculaires et cérébro-vasculaires. D'après (Byrne and Targher, 2015; Barbara *et al.*, 2018; Younossi *et al.*, 2019). Créé avec BioRender.com.

c. Progression de la maladie vers la NASH et le CHC

L'accumulation chronique de lipides dans le foie contribue à la formation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, causant ainsi un phénomène de ballonnement hépatocytaire. Ce ballonnement hépatocytaire s'accompagne d'une dilatation du réticulum endoplasmique, de formation d'inclusions hyalines cytoplasmiques appelées « corps de Mallory-Denk » et de défaut dans le cytosquelette. Il est responsable d'une compression de l'espace de Disse de 50 % (Scorletti and Carr, 2021), ce qui provoque l'hypoxie du tissu. L'hypoxie induit l'activation des cellules stellaires. Elle provoque la production de VEGF, de cytokines pro-inflammatoires (TNF, TGF- β) par les hépatocytes ce qui active les cellules stellaires. Celles-ci acquièrent un phénotype myofibroblaste, ce qui provoque la production et le dépôt de MEC et la réduction du flux sanguin dans les sinusoides hépatiques. Ce remodelage continu de la matrice extracellulaire contribue de manière importante à l'établissement de la fibrose hépatique et à la progression de la maladie vers la NASH (Roehlen *et al.*, 2020; Scorletti and Carr, 2021). La maladie est associée à une accumulation chronique de lipides dans le tissu hépatique provoquant des phénomènes de lipotoxicité, de dyslipidémie qui aboutissent à la mise en place d'une inflammation chronique qui participe à la progression vers la NASH.

i. La dyslipidémie

Les lipides exogènes dérivés de l'alimentation ainsi que les lipides endogènes produits par l'organisme, dont le foie, doivent être transportés vers les différents organes et cellules pour être utilisés ou stockés. Cependant, l'insolubilité des lipides dans le plasma aqueux nécessite leur association avec des protéines amphipathiques dans des macromolécules sphéroïdales miscibles à l'eau appelées lipoprotéines (Crouchet *et al.*, 2017). La NAFLD et la NASH sont caractérisées par une hypercholestérolémie qui conduit à un déséquilibre des lipoprotéines dans le sang. En effet, il est observé chez les patients NAFLD et les souris nourries avec un régime riche en graisses (*high-fat diet*, HFD) ou riche en graisses et déficient en choline (*choline deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet*, CDAHFD), une augmentation des taux de lipoprotéines de basse densité (LDL). De plus, il a été observé chez les patients NAFLD et les souris nourries avec la CDAHFD une diminution des lipoprotéines de hautes densité (HDL) dans le sang (Chatrath *et al.*, 2012; Medrikova *et al.*, 2012; Toita and Kang, 2020). Les LDL aggravent l'accumulation de cholestérol, dans les hépatocytes et les macrophages, et l'activation de la réponse immunitaire inflammatoire. Plusieurs études suggèrent l'implication

de LDL oxydés (oxLDL) dans les processus inflammatoires de la NASH (Houben *et al.*, 2017) (**Figure 10**). En effet, il a été montré que les oxLDL peuvent être internalisés par les hépatocytes où ils induisent l'activation de l'inflammasome et l'apoptose des hépatocytes (Houben *et al.*, 2017). De plus, plusieurs études montrent que l'internalisation d'oxLDL *via* les récepteurs CD-36 ou *scavenger receptor A* (SR-A) par les KC et les macrophages dérivés de monocyte, induit la formation de l'inflammasome et le blocage des processus autophagique, activant ainsi ces cellules vers un phénotype pro-inflammatoire (Pang *et al.*, 2015; Houben *et al.*, 2017; Lara-Guzmán *et al.*, 2017; Pei *et al.*, 2019). Par ailleurs, les cellules stellaires activées peuvent également capter les oxLDL *via* le récepteur CD36, stimulant ainsi la production de MEC (Schneiderhan *et al.*, 2001). Dans le cadre, de l'athérosclérose, il a été observé que les cellules endothéliales internalisent les oxLDL par le récepteur *lectin-like oxidized LDL receptor-1* (LOX-1), ce qui a pour effet d'activer dans ces cellules la voie NF- κ B et d'endommager l'endothélium fenestré (Pirillo *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013). Enfin, dans un modèle de NASH induit par la HFD, il a été démontré que l'adjonction d'oxLDL à ce régime aggravait la stéatose hépatique, l'inflammation hépatique et le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires, la fibrose, l'accumulation de triglycérides dans le foie et l'hypercholestérolémie, démontrant ainsi l'importance des oxLDL dans la pathogenèse de la NASH (Yimin *et al.*, 2012).

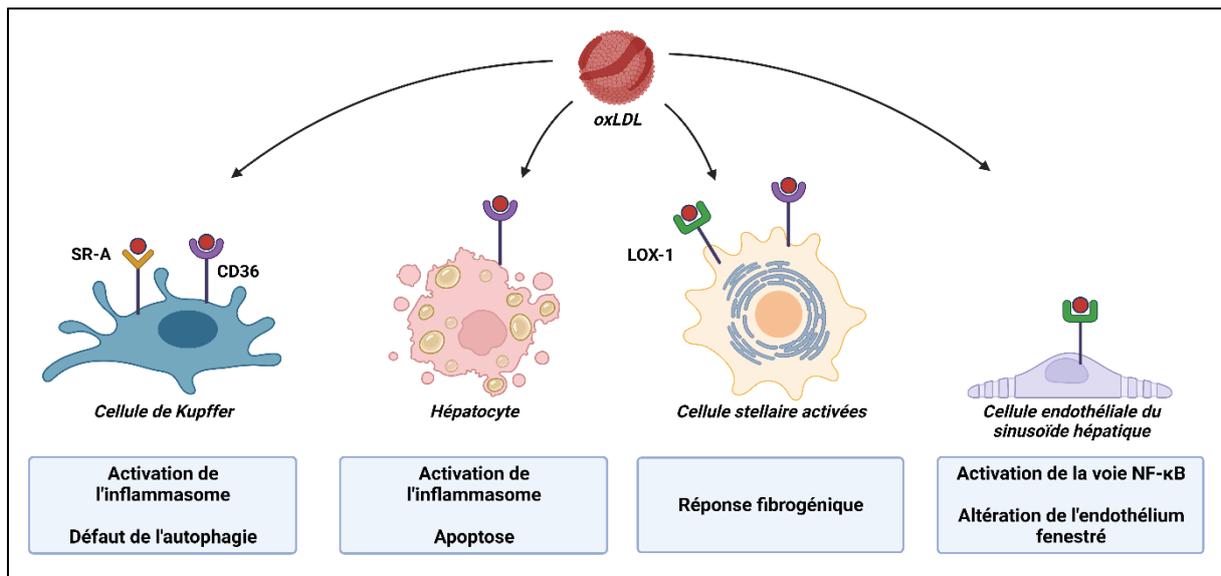


Figure 10 : Vue d'ensemble des mécanismes cellulaires induits par l'oxLDL et aboutissant à la NASH.

La NASH induite par l'oxLDL peut être médiée par différents mécanismes. En internalisant l'oxLDL *via* les récepteurs CD36 et *scavenger receptor A* (SR-A), l'activation de l'inflammasome et/ou l'altération de l'autophagie permettent à la cellule de Kupffer de déclencher une inflammation hépatique. L'absorption de l'oxLDL par les hépatocytes conduit à l'activation de l'inflammasome et provoque l'apoptose des hépatocytes, deux processus qui induisent l'inflammation. L'internalisation de l'oxLDL *via* CD36 et *Lectin-like oxidized LDL receptor-1* (LOX-1) est capable d'activer les cellules stellaires, entraînant une réponse pro-fibrotique. Enfin, LOX-1 est également capable d'internaliser l'oxLDL dans les cellules endothéliales, ce qui entraîne une activation de NF-κB, des lésions endothéliales et l'altération de l'endothélium fenestré. Cependant, les réponses inflammatoires hépatiques médiées par l'oxLDL et les cellules endothéliales hépatiques *in vivo* ne sont pas documentées. De plus, les interactions intercellulaires (les types de cellules hépatiques affectant d'autres types de cellules hépatiques, par exemple l'activation par l'oxLDL des cellules de Kupffer affectera les hépatocytes) contribueront également au développement de la NASH.

Le métabolisme lipidique est finement régulé dans le foie. Cependant, l'apport excessif de lipides issus de l'alimentation ou du tissu adipeux mène à un déséquilibre et une dérégulation du métabolisme lipidique et à l'accumulation excessive de lipides dans le foie qui mène au développement et à la progression de la maladie hépatique.

La NAFLD est caractérisée par une accumulation de cholestérol libre dans le foie (Min *et al.*, 2012; Musso *et al.*, 2013), qui peut participer directement aux lésions hépatocellulaires qui conduisent au développement du CHC (Arguello *et al.*, 2015). Chez les patients NAFLD, la dérégulation du métabolisme du cholestérol conduit à une forte accumulation de cholestérol dans les hépatocytes (Caballero *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2012). L'hyper-insulinémie associée au diabète, à l'obésité est caractéristique de la NAFLD. Elle conduit à la suractivation de SREBP-2

responsable de l'augmentation de l'expression de l'HMGCR et du récepteur LDL-R, ce qui participe à l'accumulation de cholestérol dans le foie. Par ailleurs, l'activation constante de l'AKT par l'insuline conduit à l'inhibition de l'AMPK qui mène à la perte de l'inhibition de l'activité de HMGCR menant à la surproduction de cholestérol dans les hépatocytes (González *et al.*, 2020). De plus, la surexpression des enzymes SCD1, DGAT1 et DGAT2 promeut la lipogenèse hépatique et participe au développement de l'hypertriglycéridémie ainsi que de la stéatose (Michelotti *et al.*, 2013). La dérégulation du métabolisme lipidique participe également à la progression de la maladie de la NAFLD vers la NASH. L'altération de l'absorption et de la sécrétion du cholestérol est caractéristique chez les patients NAFLD/NASH. En effet, il a été constaté une augmentation de l'expression des récepteurs LDL-R, SR-BI, et CD36, responsables de l'absorption de cholestérol ainsi qu'une diminution de l'expression des transporteurs ABCA1, ABCG5 et ABCG8, responsable de l'efflux de cholestérol vers les canaux biliaires (Musso *et al.*, 2013; Arguello *et al.*, 2015). Les mécanismes d'estérification et de déstérification du cholestérol sont également dérégulés. L'augmentation de l'expression de l'ester de cholestérol neutre hydrolase (nCEH) et la diminution de l'expression de CYP7A1 (Arguello *et al.*, 2015) limitent l'estérification du cholestérol et donc son export sous forme de VLDL. De plus, l'expression de l'ACAT2 est soit diminuée ou inchangée, ce qui participe également à l'accumulation de cholestérol dans les cellules (Min *et al.*, 2012; Musso *et al.*, 2013). Par ailleurs, le rôle du récepteur NPC1L1 dans la réabsorption du cholestérol depuis les canalicules biliaires contribue au développement de la stéatose, à la diminution de la sécrétion de VLDL (Toyoda *et al.*, 2019), et en outre à l'accumulation de triglycérides dans les cellules. De plus, l'accumulation de cholestérol contribue au déséquilibre des membranes du réticulum endoplasmique promouvant le stress du réticulum endoplasmique (Musso *et al.*, 2013; Arguello *et al.*, 2015). L'accumulation de cholestérol dans des gouttelettes lipidiques conduit également à la formation de cristaux de cholestérol caractéristique de l'évolution de la NAFLD vers la NASH (Ioannou, 2016). Ces cristaux sont responsables de l'activation de l'inflammasome dans les hépatocytes, donc de la pyroptose des hépatocytes et du recrutement de KC autour des hépatocytes en nécrose pour former des structures en couronnes. L'absorption de ces cristaux par les KC conduit à leur transformation en *foam-cell* ainsi qu'à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines recrutant des cellules inflammatoires avec les cellules stellaires (Duell *et al.*, 2010; Ioannou, 2016; Ioannou *et al.*, 2019).

La NASH est caractérisée en plus de l'hyper-insulinémie, par une insulino-résistance qui mènent à la lyse du tissu adipeux et au relargage des acides gras dans le plasma. Il s'agit là de

la plus grande source d'acides gras qui arrivent au foie (Musso *et al.*, 2009). L'augmentation de l'absorption de lipides dans les cellules hépatiques est une des caractéristiques de la NASH. Elle peut se faire par le biais de l'endocytose de LDL *via* les LDL-R, de l'importation d'acides gras *via* la translocase CD36 ou par les protéines de transport d'acides gras (FATPs) (Snaebjornsson *et al.*, 2020). L'expression des récepteurs CD36 et LDL-R est augmentée dans les hépatocytes des patients souffrant de NASH (Musso *et al.*, 2009; Musso *et al.*, 2013). De plus, la synthèse *de novo* de lipides est un élément important de la NASH (**Figure 11**). L'hyperinsulinémie a aussi pour conséquence d'activer les voies de signalisation phosphoinositide 3-kinase (PI3/Akt) et SREBP-1 régulant le métabolisme, la prolifération cellulaire et la survie (Michelotti *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; DeBerardinis and Chandel, 2016). De plus, l'activité de FXR est diminuée chez les patients NASH, ce qui limite encore plus l'excrétion et le catabolisme des lipides (Musso *et al.*, 2013; Arguello *et al.*, 2015). L'activité du facteur de transcription LXR α a un effet plus nuancé sur la NASH et le développement du CHC. En effet, LXR α régule également le métabolisme lipidique et son activation induit l'expression de plusieurs gènes lipogéniques (ACC1, SCD1, FAS, SREBP-1c, CD36) dont l'augmentation de l'expression corrèle avec le développement de la stéatose et de la NASH (Musso *et al.*, 2009; Wouters *et al.*, 2010). Au sein des mitochondries, l'accumulation de cholestérol libre conduit à la génération de ROS et à la peroxydation des lipides, ce qui provoque l'apoptose et la nécrose massive des hépatocytes et promeut l'inflammation caractéristique de la NASH (Musso *et al.*, 2013). Le cholestérol joue également un rôle important dans l'activation des KC et des cellules stellaires, qui absorbent le cholestérol principalement sous forme de LDL-oxydées (oxLDL) *via* CD36 et LOX-1 respectivement. La quantité de oxLDL est drastiquement augmentée dans le plasma des patients NASH (Musso *et al.*, 2013; Houben *et al.*, 2017). L'accumulation de cholestérol dans ces deux types cellulaires participe à leur activation, et par conséquent à la mise en place de l'inflammation et du développement de la fibrose hépatique qui sont des événements importants du développement du CHC (Arguello *et al.*, 2015 ; Ioannou, 2016 ; Musso *et al.*, 2013).

La dérégulation du métabolisme lipidique en faveur de l'absorption et la synthèse *de novo* des lipides favorisent également le développement du CHC. En effet, la surexpression des enzymes de la synthèse *de novo* des acides gras et des triglycérides SCD1, DGAT1/2, ACLY, ACC (Sunami, 2020). De plus, l'activation aberrante de la FASN et de la synthèse *de novo* de lipides est par ailleurs un événement majeur dans le développement du CHC (Sunami, 2020). L'accumulation de cholestérol libre dans les cellules participe au développement de la maladie

et à l'occurrence du CHC en soutenant la survie des cellules cancéreuses (Snaebjornsson *et al.*, 2020). Il est intéressant de noter que SCD1 est impliquée dans la résistance du CHC au Sorafénib et favorise le maintien du caractère progéniteur des cellules cancéreuses (Sunami, 2020). Enfin, de manière surprenante, l'activation du facteur de transcription LXR α , induit la mort des cellules cancéreuses de CHC et il est à noter que ceci a été confirmé *in vivo* à la fois pour des tumeurs de CHC et d'autres tumeurs solides (Nguyen *et al.*, 2019; Rudalska *et al.*, 2021).

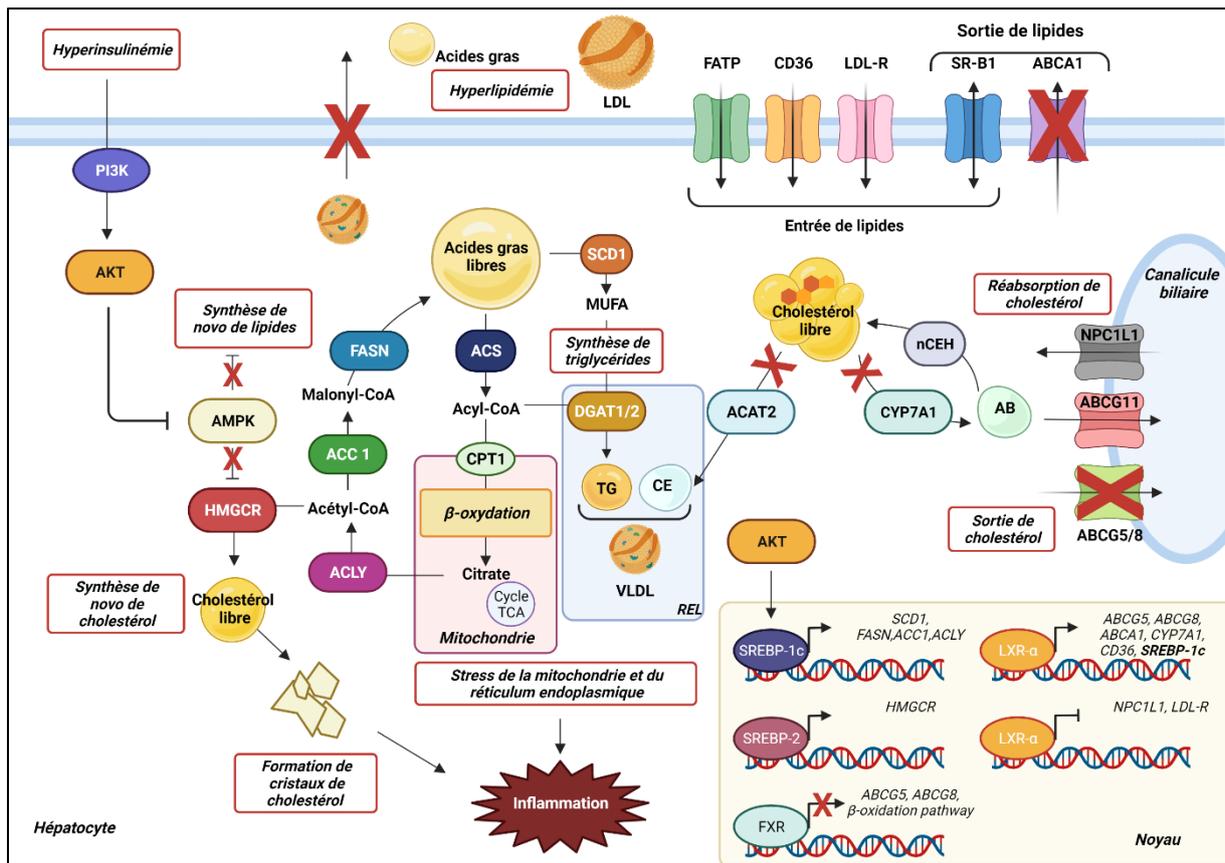


Figure 11 : Dérégulation du métabolisme lipidique lié à la NASH dans les hépatocytes. Le métabolisme des lipides est fortement perturbé dans la NAFLD favorisant l'accumulation d'acides gras et de cholestérol libres et de TG dans les hépatocytes. Des changements à plusieurs niveaux se produisent dans le foie, notamment l'activation des voies de biosynthèse du cholestérol et des acides gras et des voies d'import des lipides, l'atténuation de l'estérification du cholestérol et des voies d'exportation des lipides et de synthèse des AB. Ces changements peuvent contribuer à l'accumulation d'acides gras et de cholestérol libre dans le cadre de la NAFLD. L'accumulation de TG, d'acides gras et de cholestérol libres dans les hépatocytes participe au stress des mitochondries et du réticulum endoplasmique (RE). Le cholestérol libre peut également former des cristaux qui participent à l'inflammation et à la pyroptose. AB : acides biliaries, ABC : *ATP-binding cassette transporters*, ACAT2 : l'acétyl-coenzyme-A acétyltransférase 2, ACC : Acetyl-CoA carboxylase, ACLY : ATP-citrate lyase, ACS : Acyl-CoA synthétase, AKT : protéine kinase B, AMPK : *AMP-activated protein kinase*, CE : Cholestérol estérifié, CPT1 : carnitine palmitoyltransférase I, CYP7A1 : cholestérol 7 alpha-hydroxylase, DGAT : déacylglycérol acyltransférase, FASN : *Fatty acid synthase*, FATP : protéines de transport d'acides gras, FXR : *farnesoid X receptor*, HMGCR : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, MUFA : acides gras mono-insaturés, LDL : *low density lipoproteins*, LDL-R : récepteurs de LDL, LXR : *liver X receptor*, nCEH : cholestérol neutre hydrolase, NPC1L1 : *Niemann-Pick C1-like 1*, PI3K : phosphoinositide 3-kinase, SCD1 : stéaryl-CoA désaturase 1, SR-B1 : *scavenger receptor class B type I*, SREBP : *Sterol-regulatory element-binding protein*, TG : triglycérides, VLDL : *very low density lipoproteins*

Adapté de (Musso *et al.*, 2009; Arguello *et al.*, 2015). Créé avec BioRender.com

ii. La mort cellulaire et l'inflammation

Le phénomène de lipotoxicité au sein des hépatocytes est une des caractéristiques principales de la NASH (Hirsova and Gores, 2014). Elle est causée par l'accumulation d'intermédiaires lipidiques qui provoquent des dysfonctionnements cellulaires tels, le stress du réticulum endoplasmique (RE) et de la mitochondrie. Dans la progression de la maladie, les hépatocytes accumulent des triglycérides et divers métabolites lipidiques, dont le cholestérol libre, les céramides et les acides gras libres (FFA). Les FFA, tels que le palmitate, sont considérés comme les médiateurs majeurs de la lipotoxicité. La lysophosphatidyl choline induit le stress du RE par l'accumulation de protéines mal ou non repliées (Kakisaka *et al.*, 2012; Hirsova and Gores, 2014). Les FFA causent également la déstabilisation des lysosomes ce qui entraîne la libération de la cathepsine B dans le cytosol et une expression accrue du TNF- α . Le TNF- α peut favoriser la perméabilisation des lysosomes, exacerbant encore les lésions hépatiques dans une boucle de rétroaction (Hirsova and Gores, 2014). Dans les hépatocytes, l'accumulation de cholestérol libre dans les gouttelettes lipidiques conduit à la formation de cristaux de cholestérol associés à l'activation de l'inflammasome du NLRP3 et par conséquent à l'induction de la mort cellulaire programmée associée à l'inflammation, la pyroptose (Düwell *et al.*, 2010; Ioannou *et al.*, 2013; Ioannou *et al.*, 2019). L'excès de cholestérol au sein des hépatocytes participe également au stress du RE, aux dommages mitochondriaux et à la formation d'oxystérols toxiques. De plus, l'accumulation de cholestérol dans les KC et les HSC induit leur activation et ainsi promeut l'inflammation et le développement de la fibrose (Musso *et al.*, 2013; Tall and Yvan-Charvet, 2015).

La mort cellulaire induite par la lipotoxicité est une caractéristique importante de la NASH (Arrese *et al.*, 2016; Schuster *et al.*, 2018). L'apoptose est le mode de mort cellulaire prédominant dans la NASH (Arrese *et al.*, 2016). Il s'agit d'une mort cellulaire très organisée, caractérisée par le rétrécissement de la cellule, le bourgeonnement de la membrane, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques (Hirsova and Gores, 2014). Elle est induite par des facteurs extracellulaires ou intracellulaires qui mènent à l'activation des caspases 3, 6 et 7. La voie extrinsèque est initiée par des récepteurs de mort cellulaire appartenant à la famille des récepteurs du TNF. L'activation des récepteurs de mort Fas, du récepteur 1 du TNF (TNFR-1), et des récepteurs 1 et 2 du ligand inducteur d'apoptose lié au TNF (TRAIL-R), entraîne la formation d'un complexe multiprotéique induisant la mort cellulaire, *death-inducing signaling complex* (DISC). Ce complexe est composé entre autres de la caspase 8 et de protéines adaptatrices, telles que la protéine associée

à Fas avec domaine de mort (FADD). La caspase 8 est responsable du clivage de la protéine *BH3 Interacting Domain Death Agonist* (Bid), et la partie carboxy-terminale de Bid (tBid) déclenche la libération de facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c dans le cytosol depuis la mitochondrie. Le cytochrome c favorise la formation de l'apoptosome, qui active les caspases 3, 6 et 7 qui exécutent la démolition cellulaire (Hirsova and Gores, 2014). La voie intrinsèque est due à la perméabilisation des mitochondries et/ou des lysosomes et est régulée par les protéines de la famille *B cell lymphoma-2* (BCL2). Les protéines *BCL2-associated X* (Bax) et *BCL2-antagonist/killer* (Bak) sont responsables de la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Les protéines BCL2 et *myeloid leukemia cell differentiation protein* (MCL-1) peuvent lier Bak et Bax pour inhiber leur activité, et les protéines Bid, *BCL2 associated agonist of cell death* (Bad) et *p53 up-regulated modulator of apoptosis* (PUMA) activent Bak et Bax directement ou indirectement en séquestrant les protéines anti-apoptotiques. De plus, le stress du RE dû aux FFA provoque l'induction du facteur de transcription pro-apoptotique *C/EBP homologous protein* (CHOP) ou de la JNK qui active PUMA (Parthasarathy *et al.*, 2020).

La nécrose est une mort cellulaire causée par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui entraîne le dysfonctionnement des mitochondries et ainsi provoque une chute des niveaux d'ATP en dessous du seuil requis pour maintenir l'intégrité cellulaire (Arrese *et al.*, 2016). Elle est caractérisée par une altération de la membrane cellulaire avec libération du contenu cellulaire. La nécrose est cependant une caractéristique histopathologique rare de la NASH (Arrese *et al.*, 2016). La nécroptose est une mort cellulaire qui intègre les caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose. Elle partage certains mécanismes moléculaires avec l'apoptose, mais le résultat final ressemble à la nécrose avec un gonflement des organelles et une fuite cellulaire. Elle est induite par l'activation des récepteurs de la voie apoptotique extrinsèque TNF-R1 et Fas. L'activation de ces récepteurs conduit à la formation de complexes multiprotéiques appelés nécrosomes. Ils sont composés de la caspase 8, de FADD et des *receptor-interacting protein-1* et *-3* (RIP1, RIP3). Dans le cas de la nécroptose, la déficience de la caspase 8 qui permet à RIP3 d'activer les effecteurs de la nécroptose dont la *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) responsable de la perméabilisation de la membrane plasmique et entraîne une mort cellulaire qui ressemble morphologiquement à une nécrose (Hirsova and Gores, 2014; Arrese *et al.*, 2016). Il faut cependant noter que l'implication de la nécroptose dans la progression de la NAFLD vers la NASH est un fait encore controversé.

Enfin, la pyroptose est déclenchée par la présence de PAMP endogènes, tels que les lipopolysaccharides. Elle implique la formation de l'inflammasome *via* le recrutement des procaspase-1, de NLRP3 et de l'*apoptosis-associated speck-like protein containing a*

CARD (ASC). L'activation de la caspase-1 permet la maturation des interleukines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. La pyroptose entraîne la formation de pores dans la membrane plasmique, le gonflement des cellules et la libération massive du contenu cellulaire pro-inflammatoire. Plusieurs études révèlent l'importance de l'activation de l'inflammasome et de la pyroptose dans le développement de la NASH (Wree *et al.*, 2014; Beier and Banales, 2018; Xu *et al.*, 2018).

La mort cellulaire participe à la mise en place de l'inflammation soutenue qui favorise la progression de la maladie hépatique (**Figure 12**) (Arrese *et al.*, 2016; Machado and Diehl, 2016). La mort cellulaire provoque la sécrétion de DAMP tels que HMGB1, de l'ADN nucléaire et mitochondrial, des dérivés nucléotidiques de la purine, de l'acide urique, ... (Arrese *et al.*, 2016). Différents effecteurs cellulaires de l'immunité innée sont capables de capter ces DAMPs et sont responsables de l'inflammation dans le foie. Ces DAMPs peuvent lier des récepteurs de l'immunité innée, tels que les TLR retrouvés à la surface des KC et des cellules stellaires. Ceci provoque une réponse inflammatoire locale et participe à l'amplification des dommages tissulaires. D'autres *pattern recognition receptors* (PRR), les *NOD-like receptors* (NLR), peuvent être activés par les DAMPs provoquant la pyroptose (Wree *et al.*, 2014). L'activation des KC joue un rôle important dans la progression et la pathogenèse de la NASH (Arrese *et al.*, 2016). En effet, l'activation des KC vers un phénotype pro-inflammatoire provoque la production de différentes cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques, tels que le TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IL-12, CCL2, CCL5 (Arrese *et al.*, 2016), permettant le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires dont les neutrophiles et les macrophages dérivés des monocytes (Schuster *et al.*, 2018). L'accumulation de neutrophiles dans le foie est une des caractéristiques principales de la NASH. Les neutrophiles contribuent aux dommages hépatocellulaires en aggravant l'inflammation par leur rôle dans le recrutement des macrophages et en interagissant avec des cellules présentatrices d'antigènes (Schuster *et al.*, 2018).

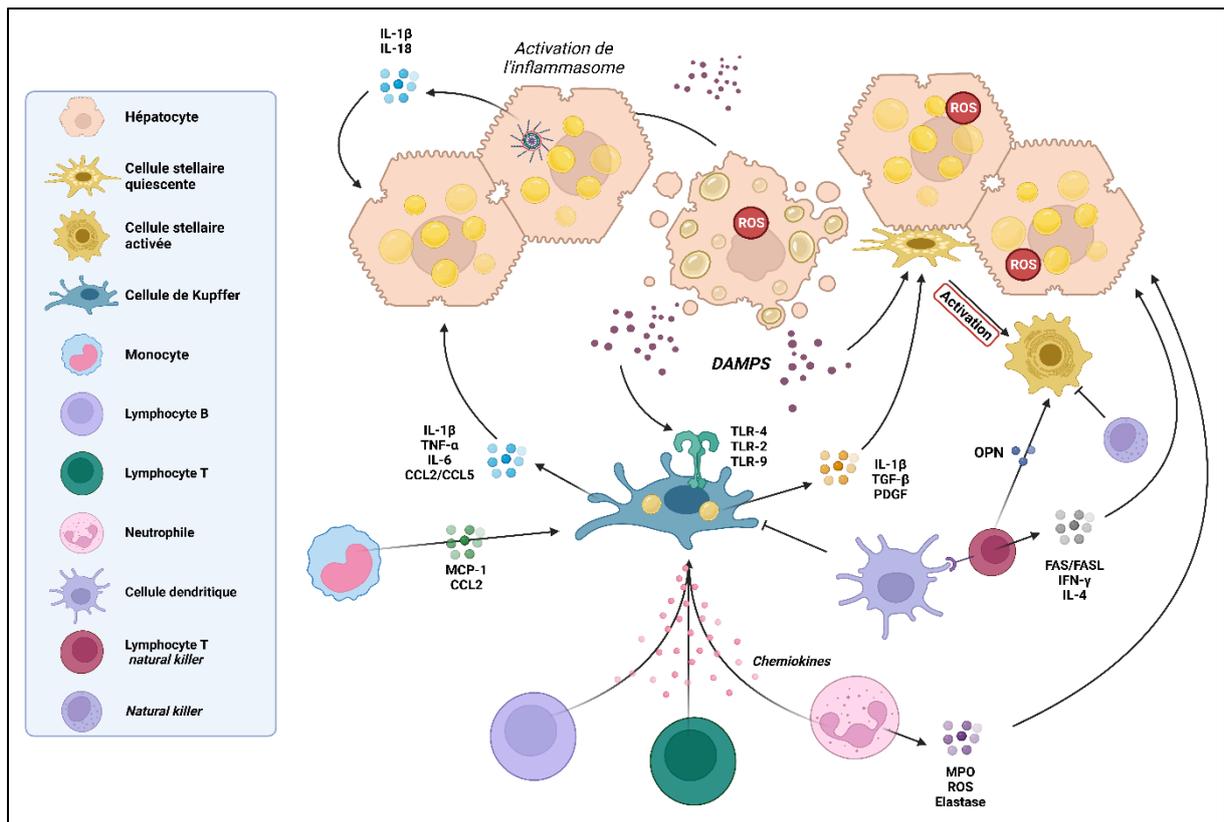


Figure 12 : L'activation immunitaire est un facteur clé dans le déclenchement et l'amplification de l'inflammation hépatique dans la NAFLD/NASH. La surcharge en graisses des hépatocytes induit une lipotoxicité et la libération de motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) qui activent les cellules de Kupffer et les cellules stellaires hépatiques (CSH) en favorisant respectivement l'inflammation et la fibrose. Les cellules de Kupffer (KC) activées produisent à leur tour des cytokines et des chimiokines inflammatoires telles que le facteur de *tumor necrosis factor* α (TNF- α), l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-6 et les ligands 2 et 5 du motif C-C (CCL2 et CCL5) qui contribuent aux lésions et à la nécrose inflammatoire des hépatocytes. La sécrétion par les KC du *tumoral growth factor*- β (TGF- β) et du *platelet derived growth factor* (PDGF) favorise également le développement de la fibrose grâce aux stimuli de ces facteurs sur les CSH. La population de KC peut être reconstituée par les monocytes dérivés de la moelle osseuse qui amplifient l'activation et le recrutement des KC par la production de la protéine chimioattractante monocyttaire MCP-1/CCL2. Le rôle d'autres types de cellules immunitaires dans la NAFLD/NASH est moins clair. La fonction des cellules tueuses naturelles (NK) s'est avérée altérée dans la NASH expérimentale et ces cellules pourraient réguler négativement la fibrose par des interactions avec les CSH. Les lymphocyte T *natural killer* (NKT) semblent être épuisées pendant le développement de la stéatose mais augmentent plus tard au cours de la maladie, contribuant probablement à l'inflammation et à la fibrose dans la NASH par la production IL-4, d'ostéopontine (OPN) et d'interféron- γ (IFN- γ). Les neutrophiles exacerbent l'état inflammatoire en cours en contribuant au recrutement des macrophages et aux dommages cellulaires par la libération de myéloperoxydase (MPO), d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'élastase. Les cellules dendritiques (CD) infiltrent également rapidement le foie dans la NASH en présentant un phénotype immunitaire activé, mais leur déplétion exacerbe l'inflammation du foie, ce qui suggère que les CD atténuent la réponse

inflammatoire probablement en modulant l'activation des CD. Les réponses des lymphocytes B et T contribuent également à la boucle inflammatoire par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'activation pro-inflammatoire des cellules kératinisées. D'après (Arrese *et al.*, 2016). Modifié avec Biorender.com

iii. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est une perturbation dans l'équilibre entre les pro-oxydants et les anti-oxydants en faveur des pro-oxydants avec la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et qui mène à de potentiels dommages cellulaires. C'est un mécanisme important qui favorise la transition de la maladie hépatique chronique vers le CHC. Plusieurs voies de signalisation sont sensibles aux changements rédox au sein de la cellule. La stimulation par certaines hormones, telle que l'insuline, des facteurs de croissance, comme *l'epidermal growth factor* (EGF), ou des cytokines induit la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui agit comme messenger secondaire en oxydant des protéines cibles, telles que les récepteurs eux-mêmes ou d'autres cibles plus en aval dans la voie de signalisation (Lennicke and Cochemé, 2021). De façon intéressante, l'H₂O₂ est important pour l'activation des voies PI3K-AKT médiée par l'insuline, NF-κB, c-Jun N-terminal kinase (JNK) et *signal transducers and activators of transcription* (STAT) et de différents facteurs de transcription (Lennicke and Cochemé, 2021). De plus, il a été démontré que l'AMPK peut également être activée par l'H₂O₂ (Zmijewski *et al.*, 2010). Enfin, les ROS sont également impliqués la régulation des réponses immunitaires En effet, les ROS régulent les voies de signalisation métaboliques intervenant dans le développement, l'activation, la prolifération et les fonctions des lymphocytes T, B et les macrophages (Muri and Kopf, 2021). Par conséquent, le stress oxydatif est impliqué dans le développement de diverses pathologies, telles que le cancer (Lennicke and Cochemé, 2021).

Dans le cadre des maladies hépatiques, la dérégulation du métabolisme lipidique et l'accumulation d'acides gras dans les hépatocytes ou la réplication virale chronique provoquent un stress du réticulum endoplasmique et un dysfonctionnement des mitochondries, causant un stress oxydatif qui induit des dommages cellulaires (Michelotti *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Chusri *et al.*, 2016). Chez les patients NAFLD, le stress oxydatif et l'expression de biomarqueurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-6, le TNF-α et le malondialdéhyde sont fortement corrélés avec l'accumulation de lipides intrahépatique (Monserrat-Mesquida *et al.*, 2020). Cette accumulation de ROS participe au remodelage du métabolisme hépatique qui favorise l'accumulation de lipides dans les hépatocytes générant ainsi un stress métabolique qui

entretient la production de ROS, formant ainsi un cercle vicieux (Anstee *et al.*, 2019). Dans des modèles murins, il a été démontré que le stress oxydatif induit par l'accumulation de lipides induisait le développement de la NASH de façon STAT-1 dépendante et du CHC de façon STAT-3 dépendante (Matsuzawa *et al.*, 2007; Grohmann *et al.*, 2018). L'accumulation de ROS dans la cellule peut provoquer des dommages génomiques (Llovet *et al.*, 2021b), telles que des mutations ponctuelles ou des lésions plus larges du génome (Gabbia *et al.*, 2021) qui participent au développement du CHC. Le stress oxydatif est également associé à l'inflammation chronique, les dommages à l'ADN causés par les ROS produits par les macrophages et les neutrophiles associés à la réponse proliférative compensatoire, favorisent la carcinogenèse (Anstee *et al.*, 2019). De plus, le stress oxydatif est également impliqué dans le développement de la fibrose et de la cirrhose hépatique (Anstee *et al.*, 2019).

La gestion du stress oxydatif est également importante pour la survie et la prolifération des cellules tumorales. Les cellules cancéreuses augmentent leur production de ROS. Cela est dû à l'effet Warburg, qui est caractérisé par une augmentation de l'absorption de glucose *via* les activités glycolytiques, résultant en une production accrue de lactate dans un microenvironnement aérobie, aux lésions oncogéniques et au microenvironnement tumoral (DeBerardinis and Chandel, 2016; Kim *et al.*, 2016). Par exemple, l'activation soutenue de la voie PI3K-AKT et l'hypoxie stimulent la production de ROS par les mitochondries. Cette accumulation de ROS dans les cellules cancéreuses leur permet de contrôler différentes voies métaboliques et les facteurs de transcription afin de maintenir leur prolifération, d'inactiver les suppresseurs de tumeurs tels que PTEN, de remodeler le métabolisme cellulaire pour l'adapter au stress nutritionnel et hypoxique de la tumeur (Gorrini *et al.*, 2013; Sies and Jones, 2020; Lennicke and Cochemé, 2021). Les ROS favorisent également la motilité et l'invasion des cellules cancéreuses, contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire et augmentent la néo-angiogenèse (Kim *et al.*, 2016). Cependant, une trop forte accumulation de ROS peut également être cytotoxique pour les cellules tumorales et une surexpression d'enzymes antioxydantes, telles que la catalase (CAT) et les superoxyde dismutases (SOD), est observé dans les cellules tumorales en particulier dans les stades de lésions pré-néoplasiques (Gorrini *et al.*, 2013). Ces enzymes antioxydantes permettent aux cellules souches tumorales de maintenir leurs caractéristiques de précurseurs et favorisent la survie des cellules métastatiques lorsqu'elles migrent vers des organes distants (Gorrini *et al.*, 2013).

iv. La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK)

L'*AMP-activated protein kinase* (protéine kinase activée par l'AMP, AMPK) est l'enzyme régulatrice centrale de plusieurs voies métaboliques hépatiques dont celles du glucose et des lipides (**Figure 13**). Il s'agit d'une protéine kinase, exprimée de façon ubiquitaire et activée par le déficit énergétique cellulaire (Day *et al.*, 2017). Elle est composée de trois sous-unités α , β et γ . La sous-unité α est la sous-unité catalytique de cette enzyme et les sous-unités β et γ sont les sous-unités régulatrices. L'activation de l'AMPK se fait par la phosphorylation en T172 de la sous-unité α . Cette phosphorylation est régulée par différentes kinases, telles que la *liver kinase B1* (LKB1), la *calcium-/calmodulin-activated kinase kinase 2* (CAMKK2) et la *TGF- β activated kinase 1* (TAK1) et des phosphatases comme les protéine-phosphatase (PP) 2C et PP2A. Lorsque les ratios AMP/ATP et ADP/ATP sont élevés ou en présence d'un stress oxydatif, l'activation de l'AMPK est favorisée (Jeon, 2016; Trefts and Shaw, 2021). L'AMPK a pour rôle de réguler les métabolismes des lipides, du glucose et le statut rédox cellulaire. Dans le foie, la régulation du métabolisme lipidique est la fonction première de l'AMPK : elle inhibe la synthèse de lipides *de novo* en induisant la phosphorylation inhibitrice de l'ACC1, de l'HMGCR et de SREBP-1c (Li *et al.*, 2011; Jeon, 2016). L'AMPK favorise le catabolisme des lipides par la β -oxydation en augmentant l'activité de la *carnitine palmitoyltransferase-1* (CPT-1) et en inhibant l'activité de l'ACC2 (Jeon, 2016; Trefts and Shaw, 2021). Par ailleurs, l'AMPK joue aussi un rôle dans la régulation du stress oxydatif. L'AMPK peut augmenter l'expression de différentes enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la thiorédoxine (TRX) et le facteur de transcription *Forkhead Box Protein O3* (FOXO3) (Greer *et al.*, 2007; Jeon, 2016). De plus, son rôle même dans la régulation du métabolisme lipidique permet de maintenir les taux de NADPH et de GSH, assurant ainsi l'équilibre mitochondrial et la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Jeon, 2016). Enfin, l'AMPK a une activité anti-inflammatoire *via* l'inhibition de la voie NF- κ B (Jeon, 2016) et la limitation du stress du réticulum endoplasmique (Day *et al.*, 2017). De plus, dans les macrophages l'AMPK promeut un phénotype anti-inflammatoire, stimule l'efflux de cholestérol et les protège contre la résistance à l'insuline induite par l'obésité (Day *et al.*, 2017). Par ailleurs, un étude démontre que l'AMPK promeut l'immunité antitumorale en inhibant l'expression de la protéine *Programmed cell death 1* (PD-1) dans les lymphocytes T régulateurs (Pokhrel *et al.*, 2021).

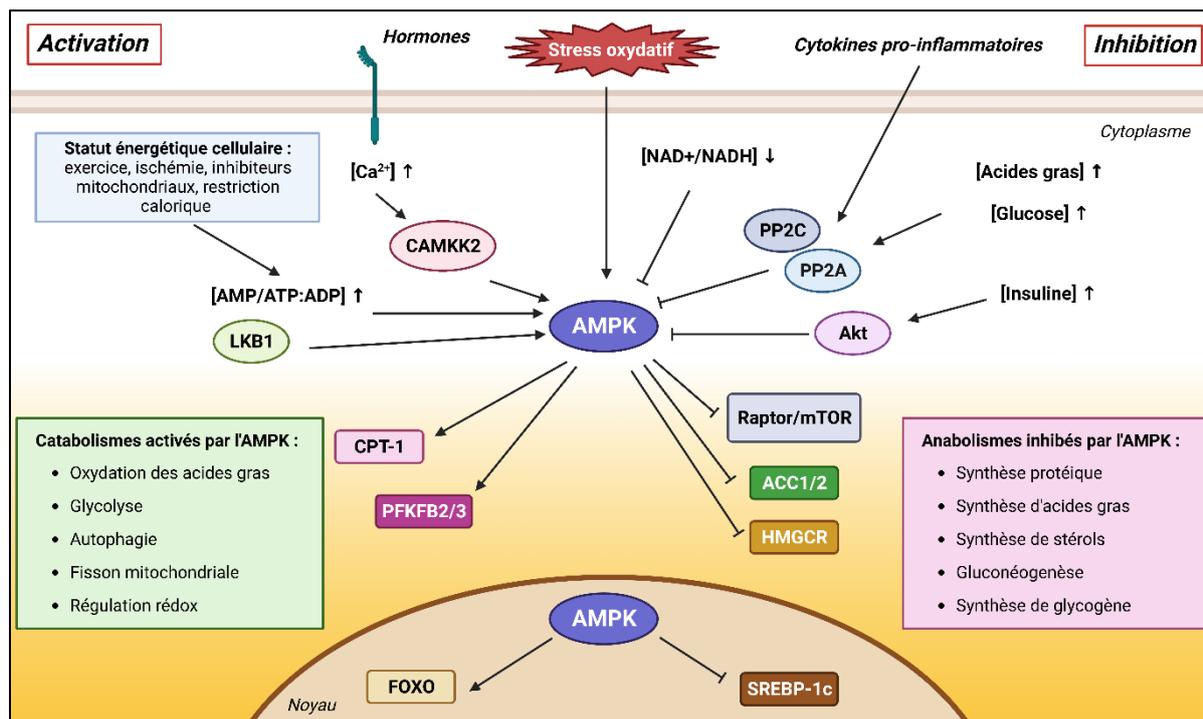


Figure 13 : Régulation physiologique et fonctions métaboliques de l'AMPK. Schéma résumant les mécanismes de régulation des voies métaboliques induits par l'AMPK et des voies de régulation de l'AMPK. La flèche indique l'activation, et la ligne en forme de barre indique l'inhibition. ACC : *acétyl-CoA carboxylase-1*, AMPK : *AMP-activated protein kinase*, (LKB1), CAMKK2 : *calcium-/calmodulin-activated kinase kinase 2*, CPT-1 : *carnitine palmitoyltransferase-1*, FOXO : *Forkhead Box Protein O*, HMGCR : *hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase*, LKB1 : *liver kinase B1*, mTOR : *mammalian target of rapamycin* PP2C/A : Protéine phosphatase 2C/A, SREBP-1c : *sterol regulatory element binding protein-1c*. Adapté de (Jeon, 2016; Garcia and Shaw, 2017). Créé avec BioRender.com

Plusieurs études ont montré que chez les patients obèses, souffrant de syndromes métaboliques ou de NASH, les fonctions de l'AMPK sont altérées (Gauthier *et al.*, 2011; Coughlan *et al.*, 2013; Jeon, 2016; Zhao *et al.*, 2020). En effet dans le cas de la NAFLD, l'hyperinsulinémie a pour effet d'activer la voie PI3/AKT qui en retour inhibe l'activité de l'AMPK (Jeon, 2016). Par ailleurs, l'hyperlipidémie dans la NASH se caractérise également par l'accumulation de diacylglycérol, ce qui a pour effet d'inhiber l'AMPK *via* la phosphorylation inhibitrice par la protéine kinase C (PKC). De plus, dans le CHC, la diminution de l'expression de LKB1 et AMPK est associée à un mauvais pronostic. Enfin, la voie de l'AMPK régule directement la prolifération et la survie des cellules cancéreuses du CHC (Li *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2020).

v. Les peroxydases et les peroxyrédoxines (PRDX)

Les ROS sont des molécules hautement toxiques qui doivent être détoxifiées par la cellule. Afin de lutter contre les différents dommages que peuvent causer les ROS les cellules possèdent des systèmes de protection anti-oxydants avec une composante non enzymatique et une composante enzymatique. La composante non enzymatique comprend de petites molécules telles que le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C), le rétinol (vitamine A) et le tocophérol (vitamine E), l'hème oxygénase-1 (HO-1) et les protéines redox, qui agissent comme des récepteurs d'électrons et protègent les biomolécules ainsi que les structures cellulaires contre les dommages causés par les ROS. La composante enzymatique quant à elle comprend différentes enzymes capables de catalyser la réduction des ROS. Parmi les plus importantes, il y a les SOD, CAT, la glutathion peroxydase et réductase (GSH-Px), les peroxydases et les peroxyrédoxines (Arroyave-Ospina *et al.*, 2021). Dans la suite de cet exposé nous nous intéresserons plus particulièrement aux peroxyrédoxines (PRDX), une famille de peroxydases, qui depuis quelques années suscitent l'intérêt notamment à cause de leur implication dans diverses pathologies, telles que les pathologies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Pick, Kreutzfeld Jacob sporadique...) et les maladies inflammatoires (athérosclérose, arthrite rhumatoïde, obésité ...) (Park *et al.*, 2016a).

Les peroxyrédoxines (PRDX) sont une famille de peroxydases très conservées et exprimées de façon ubiquitaire (Rhee, 2016). Elles sont considérées comme les défenses principales contre le stress oxydatif dans tous les organismes vivants (Cao and Lindsay, 2017). A la différence d'autres enzymes antioxydantes, leur activité ne repose pas sur un hème ou sur un résidu sélénocystéine mais sur deux cystéines qui réalisent la catalyse (Cao and Lindsay, 2017). Les PRDX sont des enzymes qui catalysent la réduction des peroxydes telles que le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes organiques et les peroxydites (Nicolussi *et al.*, 2017). Les PRDX sont responsables de la détoxification de plus de 90 % des peroxydes cellulaires (Cao and Lindsay, 2017). Chez l'Homme, six isotopes de PRDX sont retrouvées et peuvent être classées en trois groupes selon leurs caractéristiques structurelles, la position de la cystéine résolutive et leur mécanisme d'action (Forshaw *et al.*, 2019) (**Tableau 1**). Les PRDX ont une sublocalisation spécifique dans la cellule. En effet, la PRDX1, la PRDX2 et la PRDX6 sont localisées dans le cytosol ainsi que dans le noyau. La PRDX3 et la PRDX4 sont spécifiquement localisées dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique respectivement. La PRDX5 est localisée dans le cytosol, la mitochondrie et le peroxysome (Forshaw *et al.*, 2019). Les PRDX peuvent être sécrétées par les cellules qui subissent un stress oxydatif et lors

d'une activation du récepteur TLR4, suggérant l'implication des PRDX dans les processus inflammatoires (Salzano *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016a; Lee, 2020). En effet, il a été proposé que les PRDX jouent un rôle de PAMPs ou de DAMP en liant les TLR pour provoquer une réaction inflammatoire (Salzano *et al.*, 2014; Mullen *et al.*, 2015; Rhee, 2016). Par ailleurs les PRDX possèdent des fonctions immunomodulatrices notamment en activant la voie NF- κ B, en induisant la sécrétion de cytokines ou en agissant en tant que régulateur transcriptionnel (Robinson *et al.*, 2010; Riddell *et al.*, 2010; Salzano *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2016a).

Protéine	PRDX1	PRDX2	PRDX3	PRDX4	PRDX5	PRDX6
Classe	PRDX1				PRDX5	PRDX6
Mécanisme	2-Cystéines "typiques"				2-Cystéines "atypique"	1-Cystéine
Localisation	Noyau Cytosol	Cytosol Noyau Membranes lipidiques	Mitochondrie	Golgi Réticulum endoplasmique Extracellulaire	Cytosol Mitochondrie Peroxysome	Cytosol

Tableau 1 : Les six protéines peroxyrédoxines (PRDX) de mammifères classées en fonction de leurs propriétés structurales et mécanistiques. Traduit de (Forshaw *et al.*, 2019). Créé avec BioRender.com

Les PRDX de type PRDX1 sont des PRDX possédant deux résidus cystéine catalytiques, une cystéine peroxydique (Cp) et une cystéine résolutive (Cr). Ces PRDX fonctionnent selon le mécanisme « typique » des PRDX. Cela concerne les PRDX1-4. La PRDX5 est une PRDX qui elle aussi possède deux résidus cystéine mais fonctionne selon un mécanisme dit « atypique ». Enfin, la PRDX6 ne possède qu'un seul résidu cystéine catalytique. Lors de la catalyse des peroxydes, la Cp des PRDX est oxydée en un acide sulfénique intermédiaire instable. Cet acide sulfénique peut interagir avec la cystéine résolutive d'un autre monomère de PRDX, dans le cas des PRDX dites « typiques », formant ainsi des ponts disulfures intermoléculaires et libérant des molécules d'eau lors du processus. Dans le cas des PRDX « atypiques », la Cr se trouve sur le même monomère de PRDX5 et dans le cas de la PRDX6, celle-ci interagit avec de petites molécules réductrices telles que le glutathion. Les PRDX peuvent ensuite retourner à un état réduit grâce à l'intervention de la thioredoxine (Trx) et de la thioredoxine réductase (TrxR) qui utilisent le NADPH comme donneur d'électron (Forshaw

et al., 2019) (**Figure 14**). Les PRDX peuvent également être hyperoxydées. Dans ce cas, le résidu Cp est oxydé encore une fois au-delà de son état d'acide sulfénique, ce qui inhibe son activité catalytique. Cet état d'hydroxydation inactivante peut être réversé par une enzyme ATP-dépendante, la sulfiredoxine.

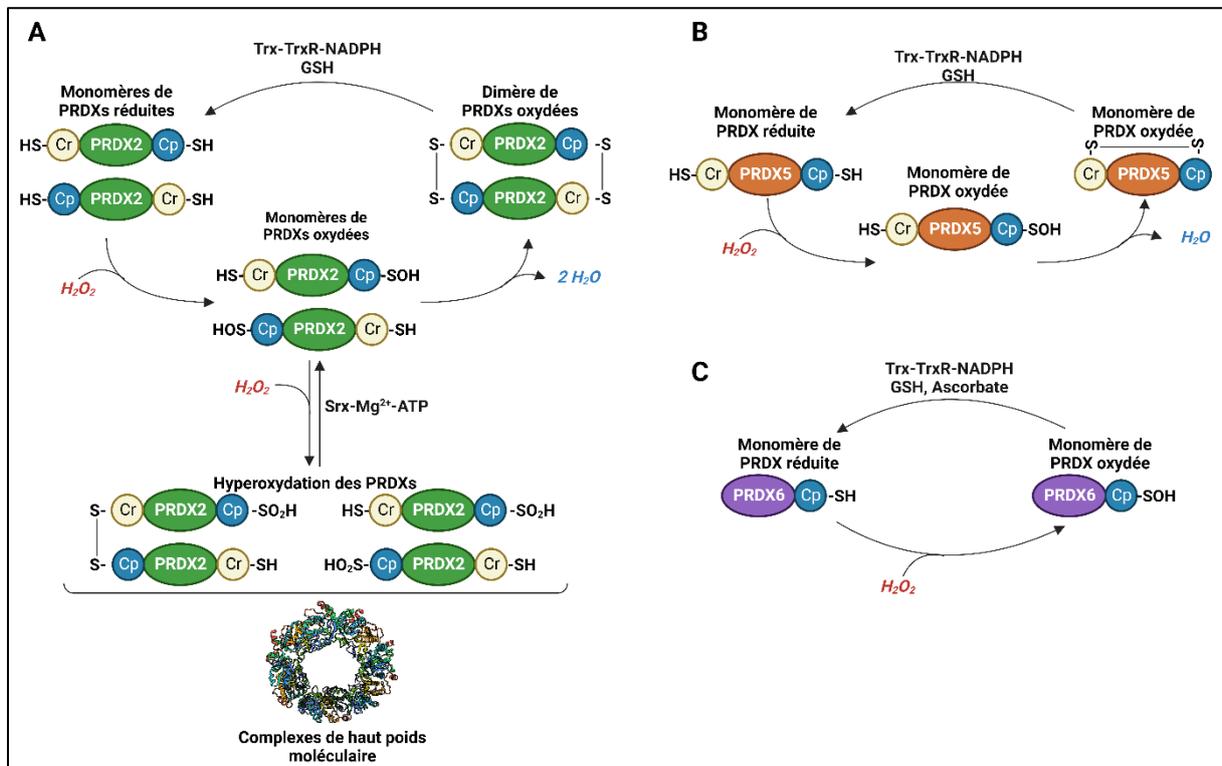


Figure 14 : Mécanismes des trois sous-types de PRDX. **A.** Dans les PRDX 2-Cys typiques, le résidu principal de la cystéine (Cp) réagit avec le résidu Cr sur la deuxième sous-unité du dimère. La cystéine peroxydique (CP, -SPH) est oxydée par H₂O₂ pour former l'acide cystéine sulfénique (-SPOH). Pendant la catalyse normale, cet intermédiaire forme un disulfure avec la cystéine résolutive (CR, -SRH). Dans Prx1-4, la CR est située près de l'extrémité C-terminale et forme un lien disulfure intermoléculaire avec sa sous-unité partenaire dans l'homodimère obligatoire. La réduction de ce disulfure est effectuée par le système thiorédoxine-thiorédoxine réductase-NADPH (Trx-TrxR-NADPH). Lorsque les concentrations de H₂O₂ augmentent, l'un ou les deux résidus cystéines peroxydés peuvent être hyperoxydés et inactivés car l'intermédiaire -SPOH réagit avec une deuxième ou une troisième molécule de H₂O₂ pour former respectivement de l'acide cystéine-sulfonique (-SPO₂H) ou de l'acide cystéine-sulfonique (-SPO₃H). La sulfiredoxine (Srx) est capable de réparer les PRDX hyperoxydées en présence de Mg²⁺ et d'ATP. **B.** Dans les PRDX à 2 cystéines atypiques, la Cp oxydée réagit avec le résidu Cr situé dans la même molécule. **C.** Dans les PRDX à 1 cys, le résidu Cp génère de l'acide sulfénique et est régénéré directement par le don d'un électron à la forme thiol en présence d'ascorbate ; Grx, glutaredoxine ; GSH, glutathion réduit ; ROOH, peroxyde ; Cp, Cys peroxydique ; Cr, cystéine résolutive ; Trx, thiorédoxine. Modifié d'après (Nicolussi *et al.*, 2017; Forshaw *et al.*, 2019). Créé avec BioRender.com

Les PRDX ont une activité de peroxydase et détoxifient l'H₂O₂, les hydroperoxydes organiques et les peroxynitrites afin de protéger les différents composants cellulaires de dommages oxydatifs (Rhee, 2016). Elles sont donc impliquées dans la régulation des concentrations cellulaires de l'H₂O₂ qui est un messager secondaire dans de nombreuses voies de signalisation, telles que les voies de l'insuline (PI3K/Akt), de l'IFN- γ et de différents facteurs de croissance comme l'EGF (Rhee, 2016; Lennicke and Cochemé, 2021). En plus de leur activité antioxydante, les différentes PRDX régulent l'homéostasie de la cellule. Les PRDX ont notamment des fonctions de contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose, de protection de l'ADN génomique des dommages liés au stress oxydatif (Cao and Lindsay, 2017). La PRDX1 participe à la régulation de la voie de signalisation du TNF- α (Nicolussi *et al.*, 2017). PRDX2 est impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT3 (Sobotta *et al.*, 2015). Par ailleurs, PRDX2 est impliquée dans la modulation de la voie de signalisation de différents facteurs de croissance, tels que PDGF et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Choi *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2011). D'autres PRDX, comme PRDX3, 4 et 5 du fait de leur localisation particulière, participent à l'homéostasie des mitochondries, du réticulum endoplasmique et du peroxysome (Park *et al.*, 2016a). L'hydroxydation des PRDX induit la formation de complexes de PRDX de haut poids moléculaire, tels que des anneaux décameriques ou dodécameriques qui peuvent s'assembler pour former des nanotubes. Ces complexes, bien que catalytiquement inactifs, jouent un rôle de molécules chaperonnes pour elles-mêmes et protéger les protéines mal repliées de la dégradation (Yewdall *et al.*, 2016; Cao and Lindsay, 2017).

Bien que du l'hydroxydation des résidus cystéines soit l'évènement le mieux décrit pour la régulation de l'activité des PRDX, il est intéressant de noter que leur l'activité peut être régulée au niveau transcriptionnel et par des modifications post-traductionnelles, telles des phosphorylations ou des N-homocystéinylations (Park *et al.*, 2016a). Il a été démontré que l'expression de PRDX3 et 5 est régulée par le facteur de transcription FOXO3a (Olmos *et al.*, 2013). De plus, l'expression de PRDX6 est régulée par le *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) et il y a des éléments de liaison à Nrf1 et 2 dans le promoteur du gène de PRDX5 (Park *et al.*, 2016a). Une étude suggère également que l'expression de PRDX2 peut être régulée par Nrf2 (Li *et al.*, 2010). De plus, il existe plusieurs sites de phosphorylation, telles que les thréonines 90 et 194 de la PRDX1 et de nitrosylation sur les PRDX1 et 6, notamment sur les cystéines effectrices qui régulent leur activité (Park *et al.*, 2016a; Forshaw *et al.*, 2019).

Différentes études montrent que les PRDX jouent un rôle dans les maladies hépatiques chroniques. En effet, plusieurs études ont démontré que l'expression de différentes PRDX protégeait le foie du développement de la NAFLD et d'autres pathologies liées. En effet, dans des modèles murins de NAFLD et de NASH induites par le régime alimentaire, il a été observé que l'expression de la PRDX4 permet de réduire le « ballooning » des hépatocytes et l'activité des enzymes hépatiques ASAT et ALAT (Nawata *et al.*, 2016). De plus, l'expression de PRDX4 dans ces modèles protège les individus du développement d'un diabète de type 2 et diminue le syndrome métabolique associé à la NASH (Nabeshima *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans des modèles de souris obèse, il a été observé que l'expression de la PRDX5 permet de réduire l'inflammation causée par l'accumulation de lipides et d'empêcher la progression de la NAFLD en régulant différentes voies de signalisation du métabolisme lipidique, notamment en activant l'AMPK et en réduisant l'activité de SREBP-1 (Kim *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020). Enfin, l'expression de la PRDX2 et de la PRDX4 permettent de prévenir le développement de l'athérosclérose dans différents modèles murins (Park *et al.*, 2011; Yamada and Guo, 2018). Ces différentes études montrent le rôle des PRDX dans le développement de la NAFLD et des pathologies qui y sont associées. Si ces études montrent l'effet protecteur des PRDX d'autres suggèrent au contraire que les PRDX participent aux dommages hépatiques dans d'autres maladies. En effet, plusieurs études suggèrent que la PRDX6 est impliquée dans la gravité des dommages hépatiques dûs à la mauvaise utilisation de l'acétaminophène *via* notamment l'activation de JNK (Mohar *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2020). De plus, il a été suggéré que dans les phases de lésion aiguë du foie, la PRDX1 sécrétée agit comme un DAMP et induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α chez les macrophages aggravant ainsi l'inflammation hépatique et accentuant les dommages hépatiques (He *et al.*, 2019). Ces différentes études soulignent les rôles contradictoires des PRDX dans les maladies hépatiques. Ceci est d'autant plus flagrant dans l'étude de Roede et collaborateurs qui démontre que l'extinction de l'expression de *Prdx6* mais aussi sa surexpression dans un modèle murin d'hépatopathie alcoolique participent à la progression de la maladie hépatiques avec notamment, le développement de la stéatose alcoolique et l'induction de la peroxydation des lipides (Roede *et al.*, 2009). L'ensemble de ces études soulignent bien le caractère « d'agent double » des PRDX, tantôt elles soutiennent le développement et la progression des maladies hépatiques et, tantôt elles semblent favoriser la résolution des maladies hépatiques en protégeant les hépatocytes contre les dommages.

Comme décrit précédemment, les cellules cancéreuses produisent de plus forte quantité de ROS et surexpriment différentes familles de peroxydases afin de réguler le stress oxydatif et de se protéger des dommages liés aux ROS. L'augmentation ou la diminution de l'expression de différentes PRDX a été observée dans des cancers humains (Nicolussi *et al.*, 2017) (**Tableau 2**). En effet, plusieurs études ont démontré que selon la PRDX spécifique et le contexte tumoral, l'augmentation de l'expression de PRDX pouvait inhiber ou promouvoir la prolifération des cellules tumorales (Nicolussi *et al.*, 2017). Le **Tableau 2** récapitule les différents cancers dans lesquels l'expression des PRDX est altérée.

PRDX	Expression dans différents types de tumeurs
PRDX1	Augmentation : Cancer du poumon, cancer de la vessie, carcinome ovarien, carcinomes épidermiques œsophagiens agressifs, mésothéliome, glioblastome, cholangiocarcinome hilaire, carcinome épidermique œsophagien, cancer du foie et cancer du pancréas. Diminution : Tumeurs thyroïdiennes (PTC)
PRDX2	Augmentation : Cancers colorectaux, cellules de lymphome primaire dérivées de cellules B, carcinome vaginal, cancer du col de l'utérus, cancer de l'ovaire, cancer de la prostate, cancer de l'œsophage. Diminution : Mélanome
PRDX3	Augmentation : Carcinomes hépatocellulaires, mésothéliome malin, carcinome mammaire, cancer de la prostate, carcinome cervical et cancer du poumon.
PRDX4	Augmentation : Cancer du pancréas, cancer de la prostate, carcinome épidermoïde de la cavité buccale, cancer colorectal, cancer du sein, cancer de l'ovaire et cancer du poumon. Diminution : Cancer du pancréas et leucémie aiguë promyélocytaire.
PRDX5	Augmentation : Lymphomes hodgkiniens agressifs, mésothéliome malin, carcinome mammaire, carcinome ovarien et cancer de la thyroïde. Diminution : Carcinome adrénocortical
PRDX6	Augmentation : Cancer du sein, mésothéliome malin, cancer de la vessie, cancer de l'œsophage, cancer du poumon, cancer de l'ovaire, cancer du pancréas, cancer de la zone gingivo-buccale et lymphome. Diminution : Tumeurs de la thyroïde

Tableau 2 : Expression différentielle des membres de la famille PRDX dans les types de tumeurs.
D'après (Nicolussi *et al.*, 2017).

Dans les cancers du sein, il a été démontré que la PRDX1 réduisait l'activité transcriptionnelle de c-Myc et de la voie PTEN/AKT et stimule l'immunité antitumorale médiée par les cellules NK (Nicolussi *et al.*, 2017; Klopotoska *et al.*, 2022). De plus, PRDX5 semble

avoir un effet protecteur contre le cancer du sein et son expression est fortement diminuée dans ces tumeurs (Park *et al.*, 2016a). Dans le cancer du poumon, la PRDX1 module l'activation de la voie *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (K-Ras) (Nicolussi *et al.*, 2017). Dans les cas de leucémie, il a été observé que PRDX1 promeut l'expression de différents suppresseurs de tumeurs tels que DEP-1 (Nicolussi *et al.*, 2017). Dans le cas de la PRDX2, son activité antitumorale semble dépendre du type de tumeur et du stade de progression tumorale en particulier dans les mélanomes. Il a été démontré dans des cellules de mélanomes et dans des modèles de mélanomes métastatiques que la diminution de l'expression de PRDX2 stimulait la prolifération et la migration des cellules tumorales et participait à l'acquisition de caractéristiques métastatiques (Lu *et al.*, 2014a; Nicolussi *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2021). Dans de nombreux cancers, l'augmentation de l'expression des PRDX est associée à un mauvais pronostic. En effet, il a été démontré que dans différents cancers, tels que les cancer du sein, des poumons, gastrique, du foie, du pancréas, de la prostate, colorectal, ovarien et du col de l'utérus, l'augmentation de l'expression des PRDX avait un effet pro-tumoral et participait à la résistance des cancers à la radiothérapie (Park *et al.*, 2016a; Nicolussi *et al.*, 2017; Forshaw *et al.*, 2019). En plus, de protéger les cellules cancéreuses du stress oxydatif, les PRDX régulent différentes voies de signalisation pro-carcinogéniques, telles que les voies *wingless/integrated* (Wnt)/ β -caténine et les voies des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (Park *et al.*, 2016a). En effet, il a été démontré dans différents cancers que les PRDX1, PRDX4 et PRDX6 participent à l'activation des voies des MAPK, et que dans le cancer des poumons, la PRDX6 stimule le développement tumoral *via* l'activation de la voie *janus kinase 2* (JAK2)/STAT3 (Park *et al.*, 2016a). De plus, dans le cancer colorectal, la PRDX2 stimule la prolifération cellulaire et active la voie Wnt/ β -caténine favorisant ainsi le développement et la croissance des tumeurs (Lu *et al.*, 2014b). Ces données suggèrent que les PRDX constituent des cibles intéressantes pour le traitement des cancers. A nouveau ces études, démontrent que les PRDX ont des rôles contradictoires dans divers cancers en soutenant la prolifération des cellules cancéreuses, leur caractéristiques invasive et migratoire ou au contraire en favorisant les réponses immunitaires antitumorales.

L'ensemble de ces travaux démontrent que les PRDX constituent un groupe de peroxydases avec des rôles dans les maladies hépatiques et le cancer complexes. Dans des conditions physiologiques, les PRDX protègent les cellules contre les lésions oxydatives, telles que l'instabilité génomique, la régulation de la signalisation cellulaire associée à H₂O₂, et l'influence sur la différenciation et la prolifération cellulaire, les réponses immunitaires et

l'apoptose (**Figure 15**) (Nicolussi *et al.*, 2017). Les maladies impliquant une dérégulation du métabolisme, tels que les cancers, le diabète et la NASH impliquent un stress oxydatif et une dérégulation du contrôle des ROS. Un déséquilibre de la régulation rédox au sein des cellules peut générer une instabilité génomique qui participe à la transformation maligne des cellules et à la tumorigenèse. De plus, les cellules cancéreuses présentent une hyperprolifération associée à une production accrue de ROS, en partie causée par une perte du contrôle redox approprié (Park *et al.*, 2016a; Nicolussi *et al.*, 2017). Cependant, une génération incontrôlée de ROS dans les cellules cancéreuses peut conduire à une plus grande instabilité génomique et à l'induction de l'apoptose. Les PRDX étant des antioxydants, ils détoxifient les ROS dans les cellules cancéreuses et favorisent la survie et le maintien des tumeurs en protégeant les cellules de l'apoptose induite par le stress oxydatif.

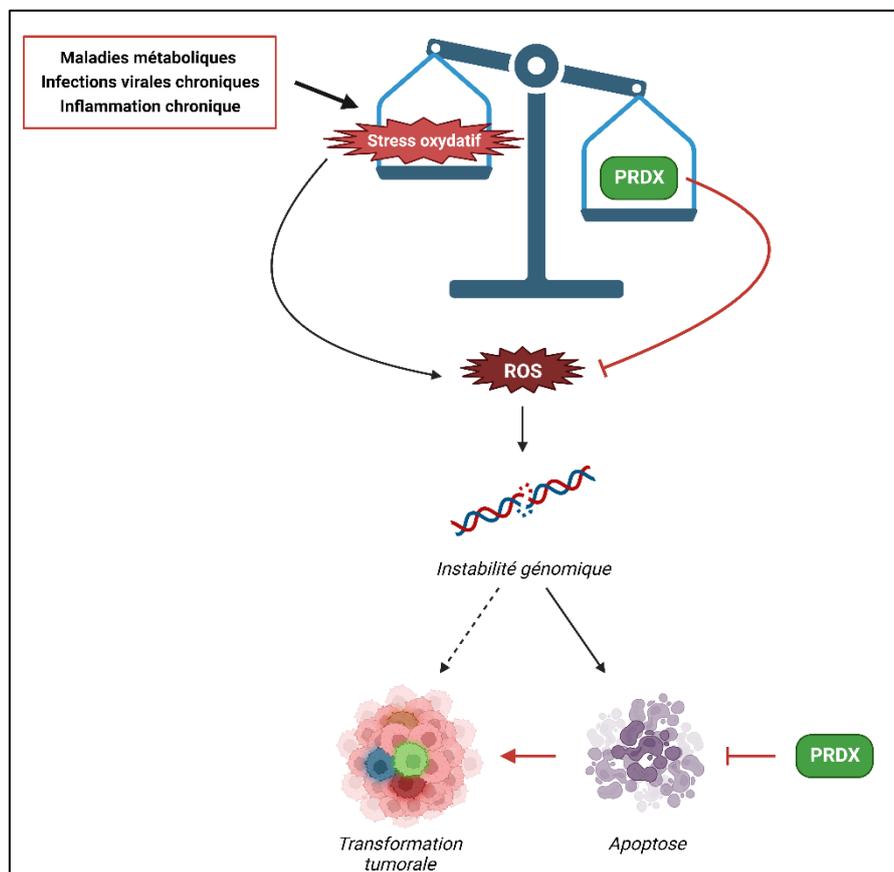


Figure 15 : Exemple de rôle d'agents doubles des PRDX dans les maladies hépatiques chroniques. Les PRDX détoxifient les ROS issues du stress oxydatif causé par les maladies hépatiques. Elles permettent ainsi une meilleure survie des cellules. Cependant, elles permettent aussi la survie de cellules avec une grande instabilité génomique, favorisant ainsi la tumorigenèse. Adapté de (Nicolussi *et al.*, 2017). Créé avec BioRender.com

III Le carcinome hépatocellulaire

1) Epidémiologie et étiologie du CHC

Le CHC est un problème de santé publique majeur dont l'incidence augmente rapidement et régulièrement. Il représente 90 % des cas de cancer du foie et est responsable de plus de 830 000 morts dans le monde chaque année (Sung *et al.*, 2021). Le CHC est le sixième cancer le plus fréquent (Llovet *et al.*, 2021b) et la troisième cause de décès par cancer dans le monde (Llovet *et al.*, 2021b). L'incidence et le taux de mortalité du CHC sont plus élevés dans les pays d'Asie du Sud Est et en Afrique. De plus, le nombre de cas de CHC augmente rapidement dans les pays européens et aux USA. En effet, le CHC est la cause de décès liée au cancer qui connaît la plus forte croissance depuis les années 2000 aux Etats Unis (Llovet *et al.*, 2021b) (**Figure 16**). Cette augmentation est notamment due aux changements de mode de vie avec l'augmentation de la sédentarité, de l'obésité et du diabète (Anstee *et al.*, 2019). De plus, il est estimé qu'en raison de l'expansion de la consommation de drogues illicites et des transfusions contaminées dans les années 1970 et 1980, l'infection par le VHC est particulièrement répandue dans la population des "baby-boomers" (personnes nées entre 1945 et 1965). Des études antérieures estiment que 3,3 % des *baby-boomers* sont porteurs d'anticorps anti-VHC et représentent jusqu'à 75 % de toutes les infections VHC aux États-Unis. Cependant, 43 % à 85 % des *baby-boomers* ignorent leur statut d'infection par le VHC (Galbraith *et al.*, 2015). Entre 2003 et 2014, il a été observé la proportion d'hospitalisations liées au CHC chez les *baby-boomers* a presque doublé et le nombre de transplantations hépatiques liées à un CHC a triplé avec une forte prévalence des CHC induits par l'infection chronique au VHC. Plusieurs facteurs sociodémographiques sont également associés à des risques accrus de développement du CHC, en particulier chez les patients souffrant de cirrhose hépatique. En effet, l'âge et le sexe des patients sont des facteurs de risques importants, ainsi les personnes âgées de plus de 70 ans sont les plus à risque de développer un CHC. Par ailleurs, le CHC touche deux à trois fois plus d'hommes que de femmes. Ceci s'explique notamment par l'accumulation de divers facteurs de risques chez les hommes et par la différence des hormones sexuelles (Llovet *et al.*, 2021b). Certaines études suggèrent aussi une incidence plus élevée de CHC dans certaines minorités ethniques, tels que dans les populations hispaniques (Kulik and El-Serag, 2019; Llovet *et al.*, 2021b). Cette différence s'explique partiellement par une prédisposition génétique de mutations du gène *PNPLA3*.

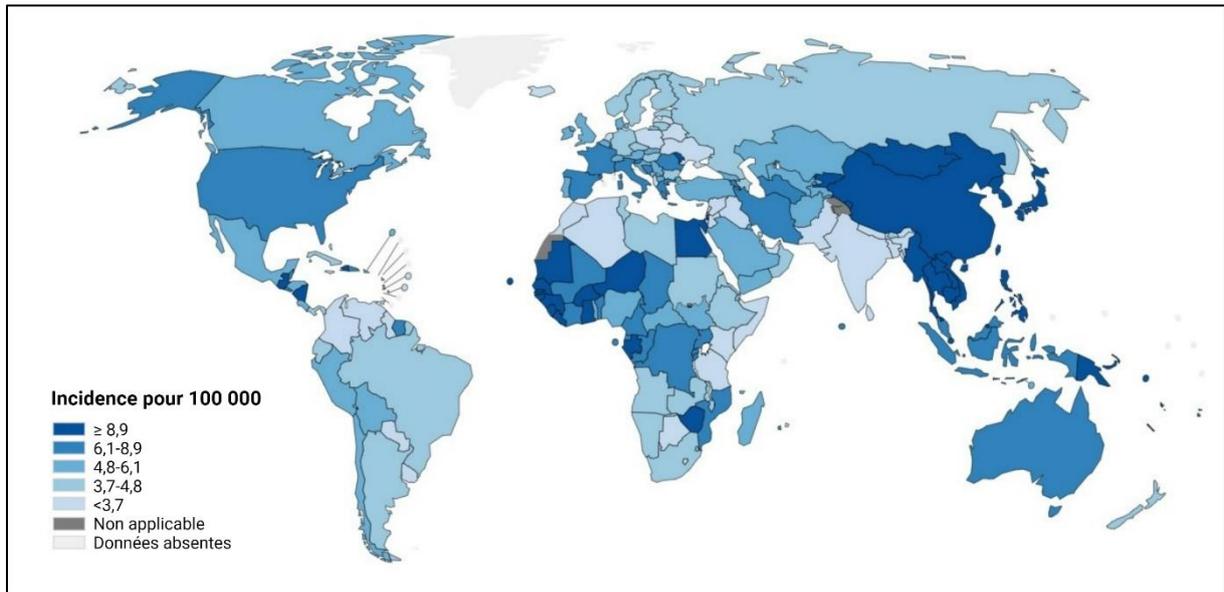


Figure 16 : Incidence globale du CHC (GLOBOCAN 2020) <https://gco.iarc.fr/>

Plus de 90% des cas de CHC apparaissent dans le cadre d'une maladie hépatique chronique. Le CHC est la cause majeure de décès chez les patients avec une cirrhose hépatique, avec une incidence annuelle de 1-6%. Les étiologies majeures de CHC sont la consommation abusive d'alcool, les infections chroniques par les virus de l'hépatite B, C et D, le diabète, l'obésité, les maladies du foie gras et la NASH. Il existe également d'autres facteurs de risques moins fréquents, telles que la cholangite biliaire primaire, l'hémochromatose et la déficience de trypsine- α 1 (Villanueva, 2019; Llovet *et al.*, 2021b) (**Figure 17**).

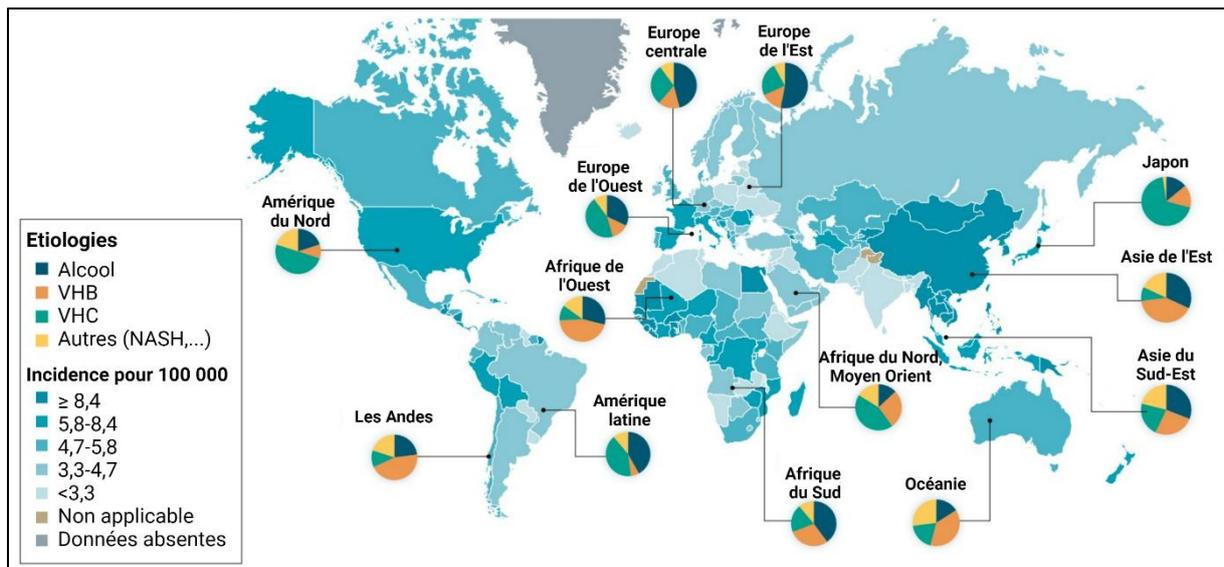


Figure 17 : Etiologies du CHC L'incidence et les principaux facteurs étiologiques impliqués dans l'hépatocarcinogénèse sont représentés dans cette figure. L'incidence la plus élevée du carcinome hépatocellulaire (CHC) est observée en Asie de l'Est. Le virus de l'hépatite B (VHB) est le principal facteur étiologique dans la plupart des régions d'Asie, en Amérique du Sud et en Afrique ; le virus de l'hépatite C (VHC) est la cause prédominante en Europe occidentale, en Amérique du Nord et au Japon. La consommation d'alcool est le facteur majeur en Europe centrale et orientale. La stéatohépatite non alcoolique (NASH), la principale étiologie incluse dans la catégorie "Autres", est un facteur de risque en augmentation rapide qui devrait devenir la cause prédominante du CHC dans les pays occidentaux dans un avenir proche. Traduit de (Llovet *et al.*, 2021b).

2) Physiopathologie du CHC

Le développement du CHC est un processus complexe qui fait intervenir de multiples étapes qui n'ont pas été totalement élucidées malgré de nombreuses études. L'accumulation de différents facteurs génétiques et épigénétiques est à l'origine de la transformation maligne des cellules hépatiques en particulier dans le contexte de la cirrhose hépatique. Dans le foie cirrhotique, la régénération constante du tissu hépatique induit le développement successif de nodules cirrhotiques pré-cancéreux, appelés nodules dysplasiques de bas grade, qui précède leur développement en nodules dysplasiques de haut grade (**Figure 18**). Ces derniers peuvent ensuite se transformer en CHC à un stade précoce, puis en CHC de stade plus avancé. La transformation maligne peut venir de différents types cellulaires hépatiques (Marquardt *et al.*, 2015), notamment des hépatocytes matures et des cellules précurseurs. Dans la NASH, il a notamment été démontré que le stress oxydatif empêche la prolifération régénératrice physiologique des hépatocytes matures et déclenche le recrutement de cellules progénitrices hépatiques. Ces cellules forment ce qu'on appelle la « réaction ductulaire » à l'interface des

hépatocytes et de l'arbre biliaire. Elles sont capables de se différencier à la fois en hépatocytes et en cholangiocytes (Roehlen *et al.*, 2020).

Le concept de cellules d'origine du CHC est débattue. Les hépatocytes matures ont une longue durée de vie et gardent un potentiel prolifératif important pour faire face aux dommages hépatiques (Marquardt *et al.*, 2015; Llovet *et al.*, 2021b). Plusieurs études suggèrent que les hépatocytes adultes sont les cellules d'origine du CHC. En effet ces cellules possèdent une plasticité qui leur permet de se dédifférencier en cellules précurseurs pour restaurer le pool hépatocytaire lors de dommages tissulaires. Or, suite à l'accumulation de dommages génomiques, les hépatocytes adultes peuvent également se dédifférencier en précurseurs qui dégénèrent en CHC et possèdent des marqueurs de cellules progénitrices, tels que *epithelial cell adhesion molecule* (EPCAM), le facteur de transcription *SRY-Box Transcription Factor 9* (SOX9), *Tumor-associated calcium signal transducer 2* (TROP2) et *Prominin 1* (PROM1) (Sia *et al.*, 2017; Aizarani *et al.*, 2019). La présence continue de l'inflammation, de la fibrose et de la régénération aberrante du foie, crée un environnement favorable à l'accumulation de mutations génétiques et épigénétiques qui conduisent à l'apparition du CHC. De plus, dans le cas des infections chroniques par les virus de l'hépatite C et de l'hépatite B, il a été démontré que les protéines NS3, NS4B, NS5B et core du VHC et la protéine HBx du VHB ont des propriétés oncogéniques. L'intégration du génome du VHB dans le génome des hépatocytes sont également une source importante de déséquilibre génomique au sein des cellules et un facteur de risque de développement de CHC.

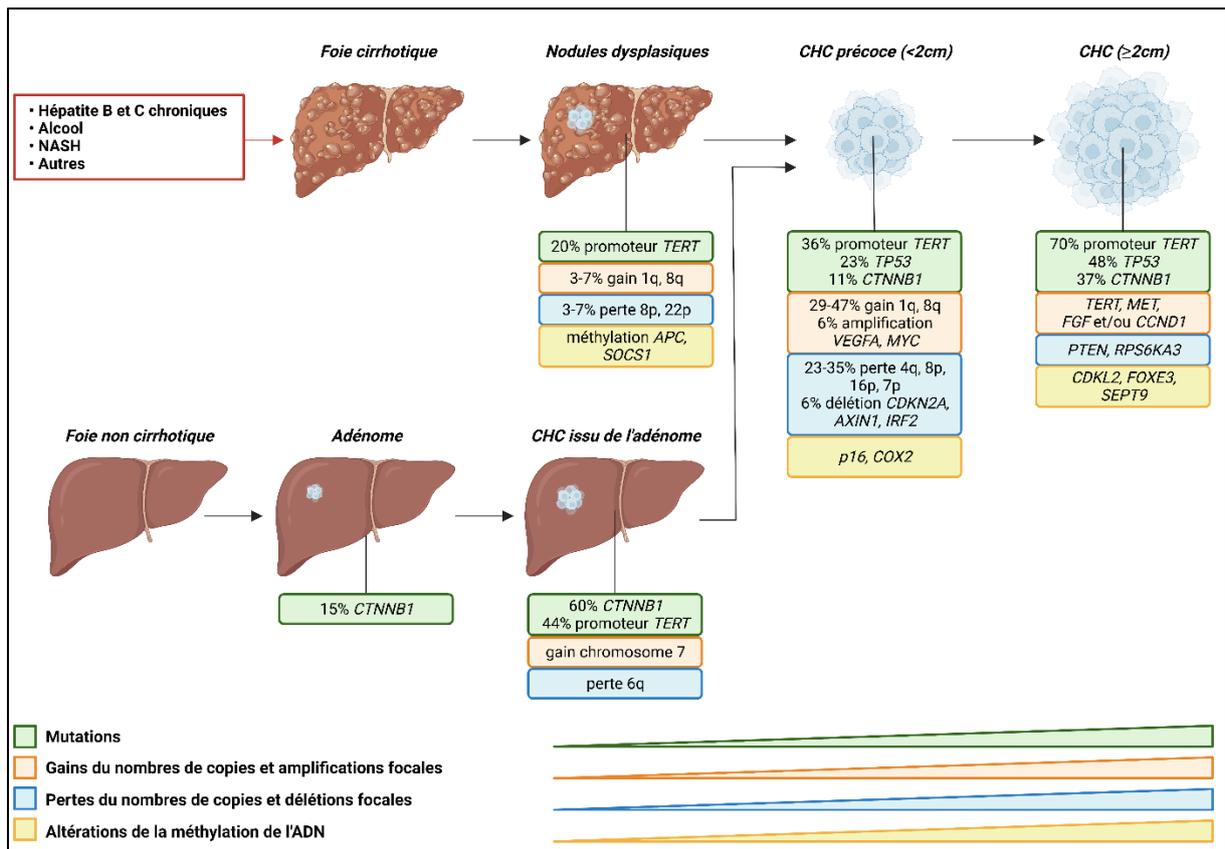


Figure 18 : Hépatocarcinogénèse dans les foies cirrhotiques et non cirrhotiques (exemple de l'adénome) La plupart des carcinomes hépatocellulaires (CHC) (>90%) apparaissent sur fond d'inflammation chronique du foie, de cirrhose et de fibrose (séquence dysplasie-carcinome). On pense que les altérations moléculaires détectables dans les nodules dysplasiques (ND) et les CHC précoces (par exemple, les mutations du promoteur *TERT* et les aberrations chromosomiques) fonctionnent comme des gardiens de la transformation maligne. Les mutations de *tumor protein 53* (*TP53*) et *caténine β1* (*CTNNB1*) se produisent relativement tôt dans le développement du CHC mais sont absentes dans les ND et sont donc considérées comme des facteurs de progression plutôt que des gardiens. Au cours de la transformation en CHC avancé, des altérations moléculaires supplémentaires sont acquises, notamment des amplifications focales d'ADN (par exemple, *vascular endothelial growth factor A* (*VEGFA*), *MYC proto-oncogene* (*MYC*)) et des délétions (par exemple, *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A*), *AXIN1*), ainsi que la méthylation de l'ADN des régions promotrices. Dans les adénomes hépatiques, les mutations de *CTNNB1* dans l'exon 3 sont associées à un risque accru de transformation maligne, révélant un rôle de gardien de *CTNNB1* dans la séquence adénome-carcinome de l'hépatocarcinogénèse. Les mutations du promoteur de *TERT* apparaissent plus tard dans le CHC lié à l'adénome que dans la cirrhose et les ND. *APC* : *adenomatous polyposis coli*, *CCND1* : *cyclin D1*, *CDKL2* : *Cyclin Dependent Kinase Like 2*, *COX2* : *cyclooxygénase 2*, *FGF* : *fibroblast growth factor*, *FOXO3* : *Forkhead box protein E3*, *IRF2* : *Interferon regulatory factor 2*, *MET* : *MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*, *NASH* : stéatohépatite non alcoolique, *PTEN* : *Phosphatase and TENSin homolog*, *RPS6KA3* : *ribosomal protein S6 kinase A3*, *SEPT9* : *Septin-9*, *SOCS1* : *suppressor of*

cytokine signaling protein 1, *TERT* : *telomerase reverse transcriptase*, autres : cholangite biliaire primaire, hémochromatose, déficience de trypsine- $\alpha 1$... D'après (Craig *et al.*, 2020).

Chaque tumeur de CHC présente une combinaison unique d'altérations génétiques et épigénétiques. En effet, chaque nodule de CHC présente en moyenne 40-80 altérations somatiques situées dans des régions codantes (Llovet *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2016) et les mutations liées au CHC les plus prévalentes affectent des voies de signalisations clés de la physiologie de la cellule. Les voies des récepteurs des facteurs de croissance EGFR, VEGFR, TGF, *fibroblast growth factor* (FGFR), IGFR ainsi que leur intermédiaires cytoplasmiques, telles que les voies de la PI3K/Akt/*mammalian target of rapamycin* (mTOR) et des MAPK sont souvent altérées (Hoshida *et al.*, 2008; Hoshida *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2022). De plus, les voies clés de la différenciation cellulaire, telles que les voies Wnt/ β -caténine et JAK/STAT, *Hippo*, *Hedgehog* et *Notch* sont souvent affectées dans le développement du CHC (Goossens *et al.*, 2015; Marquardt *et al.*, 2015; Fujiwara *et al.*, 2018). L'accumulation de ces mutations au sein des cellules du CHC participe à l'hétérogénéité des cellules cancéreuses (Garcia-Lezana *et al.*, 2021). Par ailleurs, les phénomènes d'altérations du nombre de copies de l'ADN sont des événements fréquents dans le développement du CHC et participent au déséquilibre chromosomique (**Figure 19**).

Parmi les mécanismes précoces de transformations malignes des hépatocytes, l'activation des voies WNT- β -caténine, la ré-expression de gènes fœtaux (*Notch*, *glypican 3*, *alpha-foetoprotein* (AFP)), la dérégulation du repliement protéique et de la réponse au stress oxydatif jouent un rôle important. Par ailleurs, le maintien des télomères et le complexe de télomérase semblent jouer un rôle important dans l'initiation et la promotion du CHC chez les patients cirrhotiques (Llovet *et al.*, 2016; Craig *et al.*, 2020). Les mutations affectant le promoteur du gène *TERT* de la télomérase reverse transcriptase sont retrouvées dans 70 % des cas de CHC et l'activation de *TERT* est retrouvée dans 90% des cas de CHC (Schulze *et al.*, 2016). Alors que le gène *TERT* n'est plus exprimé dans les hépatocytes normaux, son expression est réactivée dans les nodules dysplasiques et on retrouve des mutations dans le promoteur de ce gène dans les nodules dysplasiques et dans le CHC. D'autres mutations somatiques sont également retrouvées dans le CHC. Les mutations des gènes de la β -caténine (*CTNNB1*) et de l'axine 1 (*AXINI*) sont présentes dans respectivement 30% et 10% des cas de HCC (Llovet *et al.*, 2016). Les mutations de *CTNNB1* sont liées à l'activation de la voie WNT- β -caténine impliquée dans le maintien des cellules initiatrices de tumeurs, la résistance à la chimiothérapie, la progression tumorale et les métastases. La protéine P53 est un suppresseur de tumeur qui contrôle le cycle

cellulaire. Cette protéine induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en réponse au stress. Les mutations qui affectent le gène *TP53* et inactivent la protéine P53 sont retrouvées dans 30 % des cas de CHC (Llovet *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2016; Garcia-Lezana *et al.*, 2021) et plusieurs mutations dans des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ont été identifiés, tels que *RBI* et *CDKN2A*. En plus, des mutations qui affectent la régulation du cycle cellulaire, l'altération des mécanismes de remodelage de la chromatine et des régulateurs épigénétiques apparaît comme un évènement majeur du développement du CHC (Schulze *et al.*, 2016). En effet, plusieurs mutations inactivantes ont été retrouvées dans les gènes de la famille des méthyltransférases *KMT2* et dans les gènes *ARID1A* et *ARID2* codant des protéines d'interaction aux domaines riches en AT qui font partie des complexes de remodelage de la chromatine (Llovet *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2016). De manière intéressante, la méthylation de l'ADN est globalement altérée dans le CHC et plusieurs modifications génomiques aberrantes ont été associées au pronostic du CHC et à l'infection par le VHB (Llovet *et al.*, 2016). De plus, diverses mutations activant les voies de signalisations RAS- *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF)-MAPK, PI3K-AKT-mTOR, JAK-STAT, TGF- β impliquées dans la prolifération, la différenciation, le maintien des cellules souches cancéreuses et la survie cellulaire, ainsi que les voies de signalisation du stress oxydatif ont été également identifiées (Fujiwara *et al.*, 2018; Garcia-Lezana *et al.*, 2021). Enfin, il a été démontré que des modifications épigénétiques induites par les maladies hépatiques chroniques sont associées au risque de CHC. En effet, des modifications de l'acétylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27) sont observées chez les patients atteints de VHC chronique et traités par les AAD ou de NASH et précèdent le développement du CHC. Ces modifications corrént avec le score clinique de la maladie, le stade de développement de la fibrose, la survie des patients et le risque global de CHC (Hamdane *et al.*, 2019; Jühling *et al.*, 2021).

L'ensemble de ces mutations et modifications de la chromatine participent à l'hétérogénéité moléculaire du CHC. Deux classes moléculaires de CHC ont été identifiées en se fondant sur les études génomiques et épigénétiques, associées à des études de l'histopathologie du CHC (**Figure 19**). Ces deux classes représentent chacune environ 50 % des cas de CHC et sont associées à des altérations spécifiques du génome, à des caractéristiques histopathologiques et à l'issue clinique du CHC.

La classe dite « proliférative » est associée à un mauvais pronostic avec des tumeurs plus agressives, une forte invasion vasculaire et une forte augmentation des niveaux d'alpha-fœtoprotéine (AFP). Elle est le plus souvent associée aux CHC dus aux infections par le VHB. Les cellules sont peu différenciées, avec un phénotype progéniteur, elles expriment des

marqueurs de cellules souches, tels que EPCAM, PROM1, SOX9, l'haptoglobine (HP), *Tumor-associated calcium signal transducer 2* (TROP2) et *asialoglycoprotein receptor 1* (ASGR1) (Aizarani *et al.*, 2019; Llovet *et al.*, 2021b). Cette classe présente aussi une forte instabilité génomique, de fréquentes mutations de *TP53*, une hypométhylation globale de l'ADN et l'activation des voies de signalisation PI3K-AKT-mTOR, WNT-TGF- β , RAS-MAPK, et de la prolifération cellulaire.

La classe dite « non proliférative » est caractérisée par des tumeurs moins agressives avec une meilleure différenciation des cellules du CHC, des niveaux plus faibles d'AFP et une invasion vasculaire moins fréquente. Ces tumeurs sont plus souvent associées aux étiologies de la NASH, de l'hépatopathie alcoolique et des infections par le VHC. Elles présentent également une plus grande stabilité génomique et des mutations de *CTNNB1*, et une activation des voies WNT- β caténine et JAK-STAT (Llovet *et al.*, 2021b).

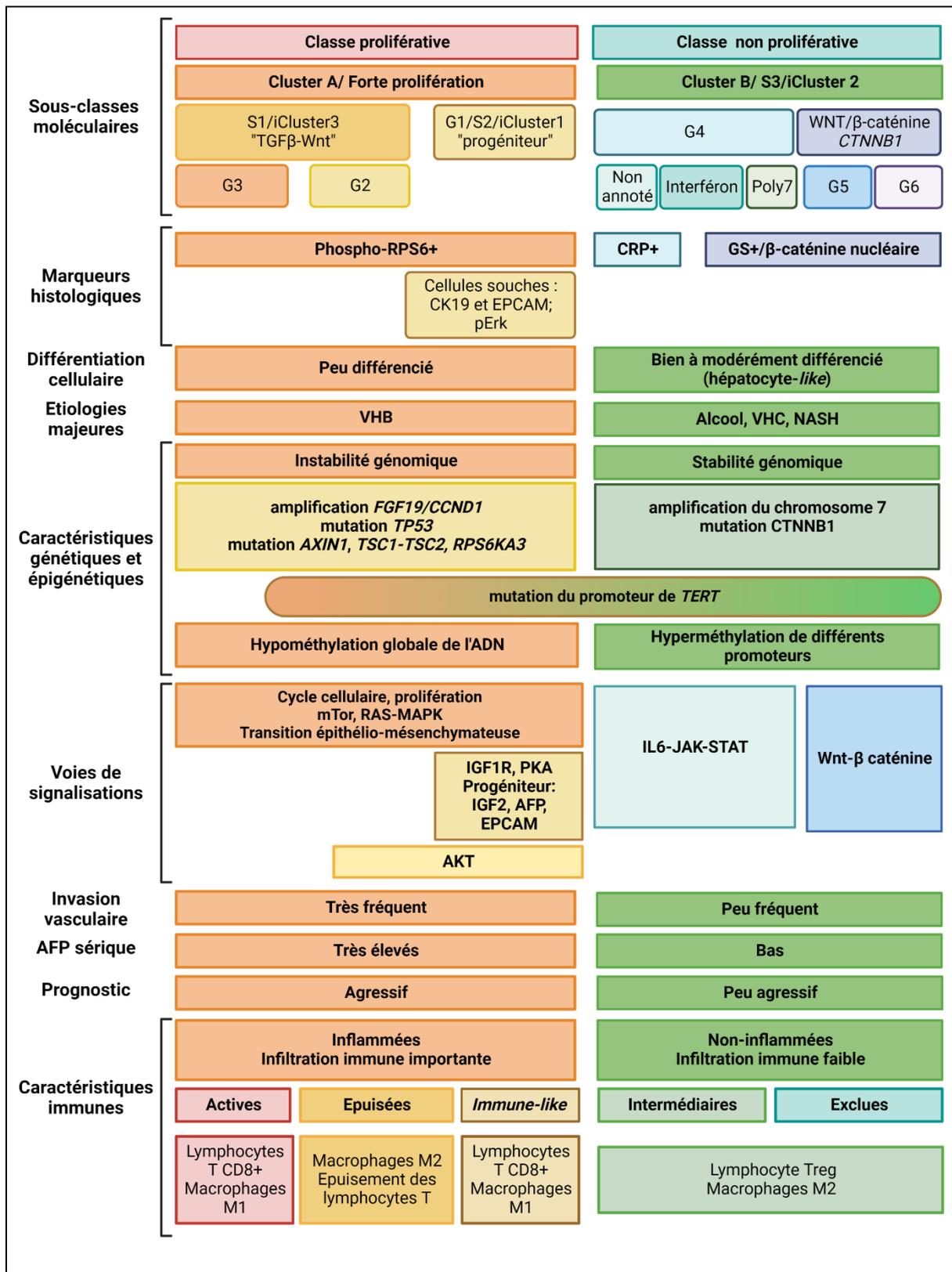


Figure 19 : Classification moléculaire et immunitaire du CHC. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) peut être classé en deux groupes moléculaires majeurs basés sur des classes phénotypiques transcriptomiques. La classe proliférative est caractérisée par des tumeurs plus agressives avec une faible différenciation histologique, une forte invasion vasculaire et des niveaux accrus d'α-fœtoprotéine (AFP). Cette classe peut

encore être divisée en deux sous-classes : S1 ou iCluster 3 caractérisée par une activation Wnt-TGF- β , qui entraîne un phénotype d'épuisement immunitaire, et S2 ou iCluster 1, caractérisée par un phénotype de type progéniteur, avec l'expression de marqueurs de cellules souches (CK19, EPCAM) et des voies de signalisation IGF2 et EPCAM activées. Les tumeurs associées au virus de l'hépatite B (VHB) présentent une activation fréquente des voies classiques de prolifération cellulaire telles que les cascades PI3K-AKT-mTOR, RAS-MAPK, MET et IGF. En outre, des mutations *TP53* fréquentes, une instabilité chromosomique élevée et une hypométhylation globale de l'ADN constituent des caractéristiques supplémentaires de cette classe. La classe dite « non-proliférative » est caractérisée par une différenciation histologique des tumeurs bonne à modérée, de faibles niveaux d'AFP et une invasion vasculaire moins fréquente. Ces tumeurs sont liées à la stéatohépatite non alcoolique (NASH), à la stéatohépatite alcoolique et à l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC). Des sous-groupes distincts ont été caractérisés au sein de cette classe : la sous-classe WNT- β -caténine *CTNNB1* présente des mutations fréquentes de *CTNNB1* et une activation de la voie de signalisation WNT- β -caténine, ce qui entraîne un phénotype d'exclusion immunitaire avec une faible infiltration immunitaire, la sous-classe interféron présente une voie de signalisation IL-6-JAK-STAT fortement activée, avec un microenvironnement tumoral plus inflammé. Cette classe se caractérise par une stabilité génomique avec des mutations fréquentes du promoteur TERT. Modifié et traduit de (Llovet *et al.*, 2021b; Montironi *et al.*, 2022).

3) Le rôle du micro-environnement tumoral

Le micro-environnement tumoral est le milieu qui entoure les tumeurs. Il est constitué de cellules, de vaisseaux, de facteurs solubles, de la matrice extracellulaire qui peuvent influencer la croissance de la tumeur et peuvent être influencés par celle-ci.

Le micro-environnement au sein du CHC joue un rôle important dans le développement des tumeurs et leur sensibilité aux traitements (Llovet *et al.*, 2021b). Le foie est un organe central de la régulation de l'immunité (Ringelhan *et al.*, 2018). En effet, il possède la population la plus abondante de macrophages résidents que sont les KC et une grande densité de cellules *natural killer* (NK), de cellules *natural killer T* (NKT), ainsi que de lymphocytes T CD8+ et CD4+ résidents ou transitant par le foie. Par ailleurs, les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC) et les cellules stellaires sont impliquées dans la détection et la capture de pathogènes, la présentation d'antigènes, la production de cytokines, le maintien de l'équilibre entre l'immunotolérance et l'activation du système immunitaire hépatique (Ringelhan *et al.*, 2018).

La dérégulation du micro-environnement hépatique est un événement clé qui mène au développement du CHC. Elle est impliquée dans les différentes étapes de la progression maligne de la maladie hépatique de la transformation initiale jusqu'à la phase d'invasion et de développement des métastases (Llovet *et al.*, 2016). Le microenvironnement tumoral (TME)

joue un rôle essentiel dans la détermination du pronostic de la réponse immune antitumorale (Fasano *et al.*, 2021). Il influe également sur le développement de la fibrose hépatique, sur la transition épithélio-mésenchymateuse, l'invasion et le développement de métastases (Ringelhan *et al.*, 2018; Fasano *et al.*, 2021). Les principaux éléments du TME sont les cellules cancéreuses, les cellules stromales, les cellules du système immunitaire inné et adaptatif, les fibroblastes associés au cancer (CAFs), la MEC et les cytokines inflammatoires (Fasano *et al.*, 2021) (**Figure 20**). Dans le contexte de l'inflammation chronique du foie, les interactions entre les différents types cellulaires du TME sont cruciales pour déterminer l'évolution du CHC. Le modèle de l'*immunoediting* décrit les interactions entre les cellules cancéreuses et celles du système immunitaire lors des premières étapes du développement tumoral. Il comprend trois phases : élimination, équilibre et échappement (Craig *et al.*, 2020). Lors de la phase d'élimination, les cellules cancéreuses exprimant des néoantigènes fortement immunogènes sont éliminées efficacement par le système immunitaire. Au fur et à mesure que les cellules cancéreuses prolifèrent, celles-ci acquièrent des caractéristiques moins immunogènes permettant leur échappement du système immunitaire, lors de la phase d'équilibre. Ces cellules tumorales expriment notamment le marqueur *programmed cell death ligand 1* (PD-L1). PD-L1 fixe le PD-1 exprimé à la surface des lymphocyte T, lymphocytes B, cellules dendritiques et monocytes. La voie de signalisation PD-1/PD-L1 régule la réponse immunitaire et inhibe l'activation de ces cellules, leur prolifération, la sécrétion de cytokines et favorise l'apoptose ou l'anergie des lymphocytes T. Ce phénomène est responsable l'évasion immunitaire des cellules tumorales et de l'« épuisement » de la réponse immunitaire (Hudson *et al.*, 2020:3; Llovet *et al.*, 2021a). Enfin, lors de la phase d'échappement, il y a une sélection des populations de cellules cancéreuses les moins immunogènes, qui deviennent dominantes et prolifèrent lors de la progression tumorale (Craig *et al.*, 2020). L'implication des différents éléments du TME dans le développement et la progression du CHC est largement discutée dans (Lee *et al.*, 2022) et (Fasano *et al.*, 2021). Les cellules tumorales, les KC, les LSEC et les cellules stellaires contribuent à la création d'un environnement immunosuppresseur en inhibant l'activité antitumorale des lymphocytes T effecteurs et des récepteurs inhibant les NK ainsi qu'en recrutant des cellules immunotolérantes telles que les macrophages dérivés de monocytes différenciés en un phénotype immunotolérant, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les neutrophiles (Fasano *et al.*, 2021). L'expression de cytokines immunosuppresseuses (IL-10, TGF- β) par les MDSCs et les macrophages associés au tumeur (TAM) de type M2 inhibe la réponse antitumorale médiée par les neutrophiles, les *natural killer* et les lymphocytes T (Fasano *et al.*, 2021). En parallèle, des cellules non immunitaires jouent un rôle important dans

la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) participent au remodelage de la matrice extracellulaire en libérant divers facteurs solubles et des exosomes. Elles participent également au recrutement des différentes cellules immunitaires au sein du TME et sécrètent divers facteurs pro-tumoraux (VEGF, FGF, TGF- β et les métalloprotéinases de matrice (MMP)-2 et MMP-9). Ces métalloprotéinases participent à l'altération de la composition de la matrice extracellulaire, qui peut également stocker les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les effecteurs cellulaires, contribuant ainsi à l'inflammation, à la fibrogenèse, à la prolifération des hépatocytes et à la carcinogenèse.

Le microenvironnement immun hépatique joue également un rôle important dans le développement du CHC. Il est également impliqué dans l'invasion de cellules cancéreuses et le développement de métastases. En effet, les CHC peuvent également être classés selon des critères immunologiques. Ainsi, deux classes immunologiques du CHC se distinguent : les classes « inflammées », caractérisées par une infiltration importante de cellules immunitaires et les classes « non-inflammées », caractérisées par une infiltration moins importante que les classes inflammées. Elles représentent respectivement 35% et 65% des CHC. Les classes inflammées se divisent en trois classes : « actives », « épuisées », « *immune-like* » et les classes non-inflammées en deux classes : « intermédiaires » et « exclues » (**Figure 19**). Les classes actives qui représentent environ 15 % des CHC, présentent un enrichissement en lymphocytes T auxiliaires actifs (CD4+) et en lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). Elles sont également sensibles aux traitements par les inhibiteurs de checkpoint immunitaire (ICIs). Les classes *immune-like* se différencient des classes actives par une signalisation élevée de l'interféron, une activité cytolytique, l'expression de cytokines immuno-effectives et un répertoire de lymphocytes T plus diversifié. Inversement, les classes épuisées présentent un enrichissement en cellules CD8+ ayant perdu leurs fonctions effectrices et donc dites « épuisées ». Les classes exclues quant à elles sont caractérisées par un déficit de lymphocytes T infiltrés et présentent une suractivation des voies d'extinction de l'immunité. Elles sont également présentées comme résistantes aux traitements par les ICIs (Llovet *et al.*, 2021b; Montironi *et al.*, 2022).

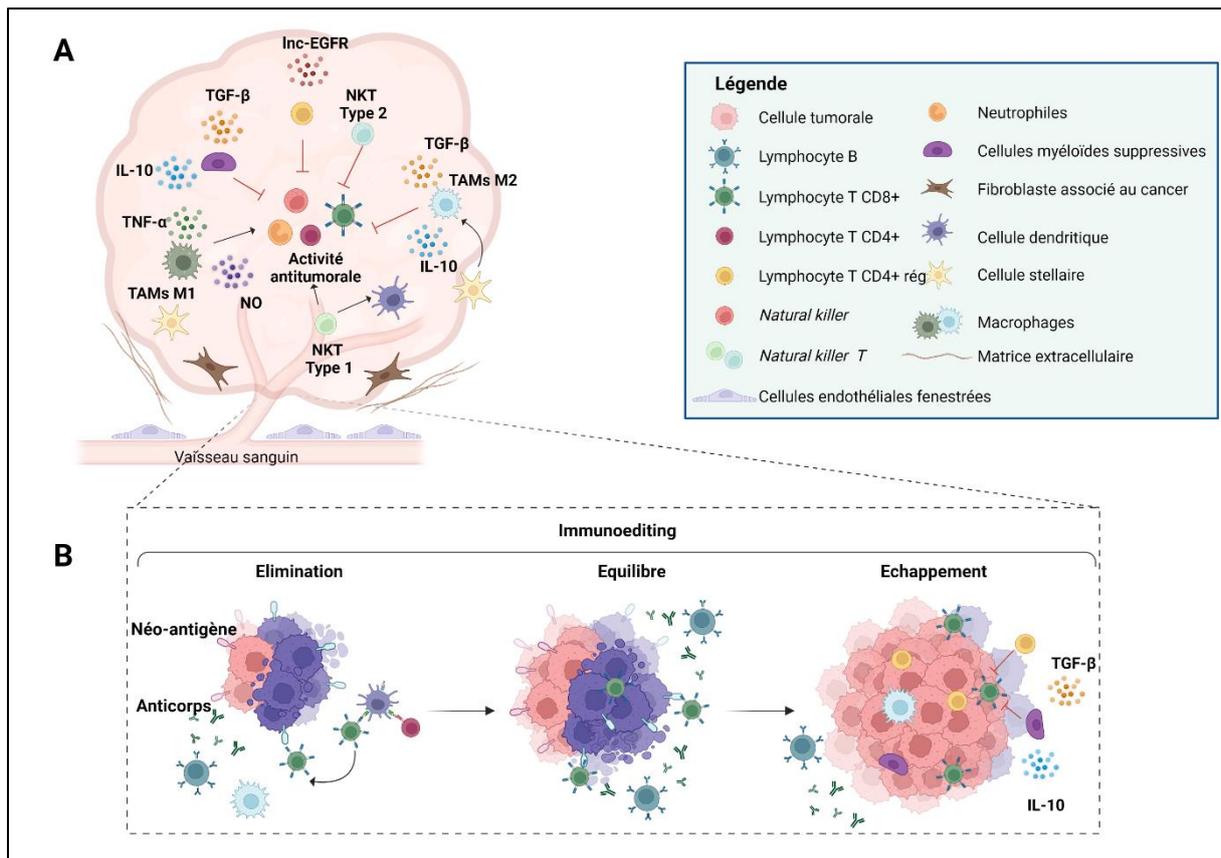


Figure 20 : Le microenvironnement tumoral **A.** Les interactions entre les cellules effectrices infiltrant la tumeur et les autres types de cellules sont cruciales pour déterminer l'évolution du CHC. Les cellules myéloïdes suppressives, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) de type M2 et les lymphocytes T régulateurs (Tregs) libèrent des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β , ainsi que du *long non coding* EGFR, inhibant l'activité antitumorale. Les TAMs M1 libérant du TNF- α et de l'oxyde nitrite (NO) et les cellules *natural killer T* (NKT) de type I favorisent une réponse immunitaire antitumorale. Les cellules NKT de type II suppriment la réponse immunitaire. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) contribuent au développement d'un microenvironnement immunosuppressif. **B.** L'*immunoediting* se divise en trois étapes. La première étape est l'élimination, au cours de laquelle les néoantigènes tumoraux déclenchent une réponse immunitaire qui élimine la plupart des cellules tumorales malignes. Pendant la phase d'équilibre, les cellules tumorales exprimant des néoantigènes stimulant la réponse immunitaire sont éliminées, tandis que d'autres cellules tumorales possédant des néoantigènes non immunogènes ou ayant acquis d'autres méthodes d'évasion immunitaire survivent et prolifèrent. Au cours de la phase d'échappement, les cellules tumorales qui ont échappé à l'immunosurveillance continuent de proliférer alors que, dans le même temps, la nature prolongée de la réponse immunitaire adaptative au site de la tumeur entraîne le développement d'un microenvironnement immunosupprimé. Modifié d'après (Craig *et al.*, 2020; Fasano *et al.*, 2021). Adapté avec BioRender.com

IV Diagnostic et traitements des maladies hépatiques chroniques et du CHC

1) Diagnostic

Les maladies hépatiques chroniques sont souvent asymptomatiques et progressent silencieusement vers le CHC. En effet, la cirrhose est souvent indolente, asymptomatique et insoupçonnée jusqu'à ce que les complications de la maladie hépatique se manifestent, telles que les ascites, les thromboses des veines portales ou hépatiques ou les encéphalopathies hépatiques. Une proportion des patients cirrhotiques ne sont jamais diagnostiqués et la cirrhose est encore fréquemment découverte lors de l'autopsie (Schuppan and Afdhal, 2008). La progression de la maladie vers le CHC se fait également de manière asymptomatique. La majorité des cas de CHC apparaissent dans des populations identifiables de patients, tels que les patients chroniquement infectés par le VHB et le VHC et la surveillance de ces populations permet de détecter une partie des CHC. Cependant, les stades précoces du CHC (nodules <2 cm) sont souvent indolents et asymptomatiques ou présentent des symptômes très génériques, tels que les nausées, la perte d'appétit, la fatigue. Par conséquent, environ 50 % des CHC dans le monde sont diagnostiqués de manière fortuite, lors d'examens d'imagerie réalisés pour d'autres raisons ou lorsque le patient présente des symptômes de perte de fonction hépatique, de poids ou de douleur abdominale concordant avec un CHC au stade avancé. Le diagnostic du CHC dans les stades précoces reste compliqué pour plusieurs raisons. Dans les directives de pratique clinique, le dépistage semestriel régulier du CHC est recommandé comme mesure de détection précoce de la tumeur chez les patients présentant des conditions prédisposantes telles que les infections chroniques par le VHC ou le VHB. Une fibrose hépatique plus avancée et l'hypertension portale ont été impliquées dans l'augmentation du risque de CHC, alors que le CHC peut également se développer dans des foies non cirrhotiques dans certaines étiologies, telles que l'infection par le VHB et la NAFLD (Athuluri-Divakar and Hoshida, 2019). De plus, la surveillance du CHC est souvent sous-utilisée. En effet, il a été observé dans différentes cohortes rétrospectives mondiales une adhésion au dépistage allant de 5,7 % à 78,8 %, les taux les plus élevés étant observés dans les pays disposant de programmes de dépistage nationaux. Une étude américaine portant sur 13 002 patients a montré que seuls 42 % des patients atteints de cirrhose du VHC ont subi un ou deux tests de surveillance au cours de la première année et que seuls 12 % d'entre eux ont bénéficié d'une surveillance deux à quatre ans après le diagnostic de cirrhose (Li *et al.*, 2020). Par ailleurs, il y a également une insuffisance du dépistage dans certaines pratiques cliniques, en particulier dans les pays en voie de développement (Llovet *et al.*, 2021b). L'Association américaine pour l'étude des maladies du foie (AASLD) recommande

la surveillance des patients cirrhotiques par un examen d'ultrasonographie associé ou non à la surveillance des taux d'AFP sériques tous les 6 mois (Marrero *et al.*, 2018). Les patients présentant alors un taux d'AFP supérieur à 20 ng/mL et des lésions nodulaires de plus de 10 mm nécessitent un diagnostic plus approfondi par tomographie à quadruple phase ou par imagerie à résonance magnétique (IRM) dynamique avec contraste (Marrero *et al.*, 2018). Cependant, le dépistage du CHC recommandé par les guides de pratique pour la détection précoce des tumeurs est utilisé par moins de 20 % de la population cible, et la performance des modalités de dépistage est sous-optimale (Fujiwara *et al.*, 2018). Bien que la surveillance par ultrasons soit actuellement le standard pour la surveillance du CHC, il existe des inconvénients, notamment des sensibilités allant de 47 % à 84 % selon l'expérience de l'opérateur (Li *et al.*, 2020). De plus, même si la sensibilité et la spécificité de ces techniques permet de confirmer le diagnostic de CHC dans 90 % des cas sans confirmation histopathologique, dans le cas de lésions ne présentant pas les caractéristiques radiologiques du CHC, une biopsie est nécessaire (Marrero *et al.*, 2018; Llovet *et al.*, 2021b). Ceci est notamment le cas des patients souffrant de NAFLD ou de NASH. En effet, 25-30 % des cas de CHC causés par la NASH apparaissent en l'absence de cirrhose et par conséquent ces patients risquent d'être diagnostiqués plus tardivement et de nécessiter une biopsie pour confirmer le diagnostic.

La NAFLD et la NASH sont asymptomatiques jusqu'à un stade avancé et beaucoup de patients sont diagnostiqués à des stades tardifs de la NASH (Piazzolla and Mangia, 2020). Dans le cas des personnes obèses, l'utilisation de l'ultrasonographie est peu recommandée car la précision de cette technique baisse de façon critique avec le stade d'obésité du patient (Dashe *et al.*, 2009). Actuellement, la biopsie reste l'examen standard de diagnostic et de pronostic de la maladie, mais cette méthode invasive présente des risques de complications et de ce fait est difficile à systématiser (Piazzolla and Mangia, 2020). Il y a donc une nécessité de développer des outils de diagnostic non-invasif de la NAFLD et de la NASH. Bien qu'actuellement aucune méthode non-invasive fiable ne soit disponible, il semblerait que la fraction lipidique de densité protonique dérivée de l'imagerie par résonance magnétique (IRM-PDFF) soit la plus précise pour le diagnostic de la stéatose hépatique et que l'élastographie du foie permette d'identifier les patients NASH. De plus, d'autres méthodes d'imagerie et d'examens sanguins sont actuellement à l'étude pour diagnostiquer la NASH le plus précocement possible (Piazzolla and Mangia, 2020).

Ainsi, la détection précoce et la prévention du développement du CHC constituent, la stratégie la plus efficace pour améliorer le pronostic des patients (Fujiwara *et al.*, 2018). La

prédiction du CHC chez les patients à risque est donc une question à adresser. En 2008, une signature moléculaire spécifique du foie appelée *prognosis liver signature* (PLS) a été décrite en analysant l'expression de plus de 6000 gènes dans les tissus adjacents aux tumeurs hépatiques de CHC chez des patients chroniquement infectés par le VHC. Cette signature comprend 186 gènes dont l'expression est fortement corrélée à la progression de la maladie, le risque de développement du CHC, à la récurrence du CHC et la survie du patient (**Figure 21**) (Hoshida *et al.*, 2008; King *et al.*, 2015). Les auteurs ont démontré que chez les patients infectés par le VHC ayant un fort risque de développement d'un CHC (mauvais pronostic), 113 gènes associés au bon fonctionnement du foie étaient sous-exprimés (gènes de protéines plasmatiques, des enzymes des métabolismes glucidiques et lipidiques ...) tandis que 73 gènes associés à la réponse inflammatoire et au cycle cellulaire étaient surexprimés. Cette signature moléculaire a été validée dans plusieurs cohortes de patients souffrant de diverses étiologies du CHC (hépatites virales, alcool, NAFLD/NASH) et pourrait constituer un outil de prédiction de l'évolution de la maladie (Hoshida *et al.*, 2008; Hoshida *et al.*, 2013; King *et al.*, 2015; Nakagawa *et al.*, 2016). Cette signature moléculaire a d'ores et déjà été utilisée dans différentes études pour démontrer que l'inhibition de l'EGFR avec des inhibiteurs approuvés par la FDA représente une approche thérapeutique prometteuse pour la réduction de la fibrogenèse et la prévention du CHC chez les patients atteints de cirrhose à haut risque de CHC (Fuchs *et al.*, 2014).

Une version réduite de la PLS qui comporte 32 gènes a été définie de manière computationnelle (King *et al.*, 2015) et a été validée dans différente cohorte de patients. Les résultats soutiennent la capacité pronostique pan-étiologique de cette signature génétique réduite chez les patients atteints de VHC, VHB, alcool ou NASH (Nakagawa *et al.*, 2016). Ces différentes études ont également permis d'utiliser la PLS en tant que biomarqueur du CHC dans un essai clinique (NCT02273362). De plus, l'utilisation de la PLS clinique associée à des études de transcriptomiques de foies de plus de 500 patients cirrhotiques a permis d'identifier des modules génétiques régulateurs globaux conduisant au risque de CHC et la voie de l'acide lysophosphatidique comme cible centrale de chimioprévention (Nakagawa *et al.*, 2016).

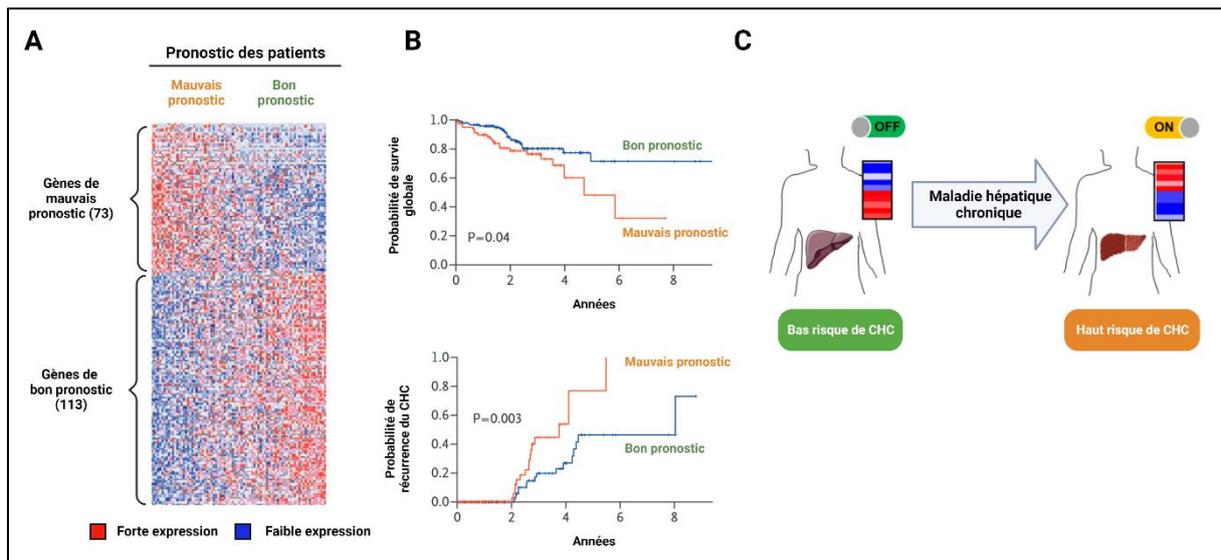


Figure 21 : La signature moléculaire associée au pronostic des patients. **A.** Patron d'expression des 186 gènes de la signature moléculaire : le rouge indique une forte expression des gènes et le bleu, une faible expression. Dans la signature de mauvais pronostic, 73 gènes impliqués dans l'inflammation et la régulation du cycle cellulaire sont surexprimés, tandis que 113 gènes impliqués dans le métabolisme hépatique sont sous exprimés. Chez les patients à risque, les gènes de mauvais pronostic sont fortement exprimés tandis que les gènes de bon pronostic sont réprimés **B.** Courbes de survie globale et de risque de récurrence du CHC en fonction du temps selon la signature mise en évidence dans les tissus des patients. L'induction de la signature est corrélée avec la probabilité de survie des patients et le risque de récurrence du CHC. (C) Association entre signature et pronostic chez les patients. La maladie chronique hépatique peut induire la signature de mauvais pronostic chez le patient. D'après (Hoshida *et al.*, 2008).

Malgré la capacité pronostique confirmée de la PLS, la nécessité d'une biopsie du foie limite son utilisation généralisée dans la pratique clinique. Afin de répondre à ce besoin clinique, un substitut sanguin de la PLS a été développé : la signature pronostique du sécrétome hépatique (PLSec). Son utilité clinique a été validée dans trois cohortes de patients présentant les principaux scénarios cliniques de prédiction du risque de CHC. La PLSec est composée de 8 protéines et corrèle avec le risque de développement du CHC (Fujiwara *et al.*, 2021). En parallèle, une signature moléculaire de la progression de la fibrose (FPS) a été définie chez de patients souffrant de NAFLD ou d'une infection chronique par le VHC pour prédire la progression de la fibrose. La FPS comprend 20 gènes et a été utilisée pour évaluer des candidats anti-fibrotiques dans des cultures organotypiques ex vivo de tissus hépatiques fibrotiques cliniques. De même une FPS basée sur 7 protéines sériques a été développée et testée dans une cohorte de patients atteints de cirrhose compensée (Qian *et al.*, 2022). Enfin, le raffinement de la PLS a permis le développement d'une PLS spécifique pour les patients atteints de NAFLD

(PLS-NAFLD) afin d'identifier au mieux les patients présentant les risques les plus élevés de développer un CHC. Cette signature comporte 133 gènes et prédit le risque de CHC sur une période de 15 ans d'observation. Par ailleurs, une PLSec-NAFLD contenant 4 protéines a également pu être identifiée (Fujiwara *et al.*, 2022). L'utilisation de l'ensemble de ces signatures moléculaires constitue une opportunité d'identifier les patients à risque de CHC de manière efficace. De plus, ces différentes signatures permettront également d'identifier des cibles thérapeutiques et des traitements potentiels pour traiter les maladies hépatiques chroniques et prévenir le développement du CHC selon les différentes étiologies. Par conséquent, les systèmes PLS, FPS et PLS-NAFLD pourraient être utilisés comme *read out* dès les essais précliniques afin d'identifier les meilleures cibles thérapeutiques potentielles.

A partir de ces études, un système simple et robuste utilisant des cellules hépatiques a été développé afin de modéliser la PLS en culture cellulaire de manière inductible et réversible (**Figure 22**). Les cellules hépatocytaires Huh-7.5.1 différenciées par un traitement au diméthylsulfoxyde (DMSO) (Huh-7.5.1^{dif}) ont été soumises à une infection persistante par le VHC Jc1, qui possède un génome viral chimérique dérivé du génome de la souche virale *Japanese fulminant hepatitis* (JFH-1) pour les protéines non structurales et de la souche J6 pour les protéines structurales. Ce système permet de modéliser en 20 jours, les dérèglements observés chez le patient sur une période de vingt à trente ans avant le développement du CHC et a été nommée signature hépatique pronostique cellulaire (cPLS). Cette étude offre de plus la possibilité de combiner le système cPLS à des études de perturbations de l'expression des gènes par l'utilisation du système CRISPR Cas-9 *in vitro* et *in vivo* spécifiquement dans le foie afin de confirmer le rôle fonctionnel de HRH2 dans l'hépatocarcinogénèse (Crouchet *et al.*, 2021).

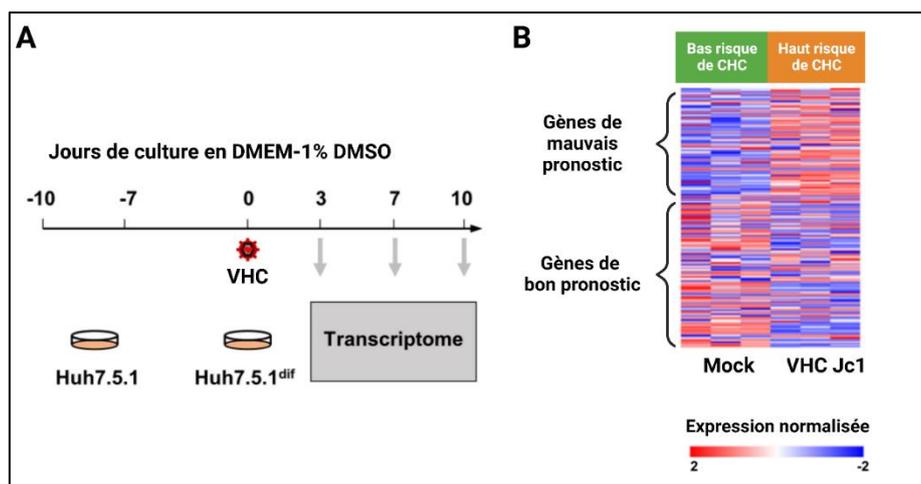


Figure 22 : Modélisation de la signature hépatique pronostique clinique (PLS) dans un système cellulaire (cPLS). **A.** Approche expérimentale. Des cellules Huh-7.5.1 différenciées au DMSO 1% (Huh-7.5.1^{Dif}) sont infectées chroniquement avec le virus de l'hépatite C (VHC) et le transcriptome est analysé à jour 3,7 10. **B.** Analyse de la PLS dans les cellules Huh-7.5.1^{dif} après infection par le VHC. La *heatmap* obtenue après x jours post infection montre la surexpression des gènes de mauvais pronostic et la baisse de l'expression des gènes de bon pronostic (signature de 186 gènes). Traduit d'après (Crouchet *et al.*, 2021).

Il est intéressant de noter que l'étude de Crouchet *et al.*, 2021 démontre la possibilité de reproduire le système PLS dans des modèles de CHC murins et chez le rat, lorsque le CHC est induit par l'injection d'un carcinogène, le dyéthylnitrosamine (DEN) et un régime riche en gras et déficient en choline *choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet* (CDAHFD) sur 24 semaines, régime qui mime la maladie NASH (Wolf *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Pinyol *et al.*, 2021).

Il faut souligner qu'il existe d'autres outils de pronostique du CHC chez les patients atteints de maladies chronique hépatique. En effet, il existe de nombreuses signatures génétiques et métaboliques dérivées de tissus de foie de patients souffrant de maladie chroniques hépatiques et qui sont en corrélation avec le risque de décompensation hépatique, de développement du CHC chez les patients ainsi qu'avec la probabilité de survie des patients. Ces différentes signatures ont pour but d'améliorer la stratification des patients et ainsi pouvoir proposer une meilleure prise en charge des patients atteints de maladies hépatiques chroniques. On peut citer les travaux de l'équipe du Pr. Quentin M. Anstee, qui a décrit une signature moléculaire spécifiques chez les patients souffrant de NAFLD. Elle comprend 25 gènes dont l'expression corrèle avec le développement et la progression de la fibrose vers la cirrhose

(Anstee *et al.*, 2020; Govaere *et al.*, 2020). Plus récemment, cette même équipe a développé une signature sanguine métabolique qui comprend des lipides et divers métabolites. Cette signature corrèle avec la progression de la maladie vers la NASH et le développement ainsi que la progression de la fibrose. Il est intéressant de noter que cette signature sanguine fait actuellement l'objet d'un essai clinique (NCT04442334) (McGlinchey *et al.*, 2022). En parallèle, l'étude des transcriptomes de tissus de foie de patients souffrant de cirrhose ou d'un CHC à un stade précoce a permis d'identifier des modifications de l'expression de gènes régulant la réponse immunitaire. Cette étude a permis d'établir une signature moléculaire qui comprend 172 gènes dont l'expression est associée à la dysrégulation de la réponse immunitaire. Cette signature est appelée *immune-mediated cancer field* (ICF) et corrèle avec le risque de développement du CHC chez des patients souffrant de cirrhose (Moeini *et al.*, 2019). Une autre signature comportant 415 gènes a été découverte chez des patients souffrant de CHC avec des métastases intrahépatiques veineuses. Cette signature peut être réduite à 17 gènes est corrèle avec le risque de récurrence du CHC, la survie des patients et le développement de métastases veineuses (Budhu *et al.*, 2006). Par ailleurs, une autre étude basée sur le séquençage d'exomes de patients souffrant de CHC a permis de déterminer une signature mutationnelle associée à des étiologies spécifiques et prédisant la survie des patients atteints de CHC (Schulze *et al.*, 2015). D'autres travaux se sont également penchés sur la détermination d'une signature moléculaire liée à la ferroptose chez les patients atteints de CHC. Cette signature comprend l'étude de l'expression de différents *long non coding RNA* (lncRNA) et prédit la survie chez les patients atteints de CHC (Liang *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021). Une étude récente a construit une signature moléculaire liée au métabolisme lipidique et associée à la réponse immunitaire prédisant la survie chez les patients atteints de CHC (Hu *et al.*, 2020). La recherche de signatures moléculaires spécifiques prédisant de manière robuste le risque de CHC, la survie des patients et la récurrence du CHC a pris beaucoup d'ampleur ces dernières années et la construction d'un modèle stable et l'utilisation de celui-ci à une grande échelle permettra une meilleure stratification des patients et offrira l'opportunité d'améliorer la prise en charge des patients à haut risque de développer un CHC.

2) Stratégie thérapeutique contre les maladies hépatiques chroniques

a. Lutte contre les étiologies des maladies hépatiques chroniques

Afin de prévenir le risque de développement de CHC, il semble intéressant de cibler les causes des maladies hépatiques chroniques.

La lutte contre le VHB par la vaccination préventive, ainsi que l'utilisation des AN pour traiter les patients infectés par le VHB permet de réduire le risque de CHC (Fujiwara *et al.*, 2018). Le risque annuel du CHC chez les patients atteints de cirrhose hépatique liée à une infection chronique par le VHC est de 1-8 % et diminue à 0,07-1,2 % après l'élimination de l'infection chronique par le VHC par des thérapies virales avec l'obtention d'une réponse virologique soutenue (SVR) (Baumert *et al.*, 2017). Les traitements à base d'interféron n'ont pas ou peu d'impact sur le risque de CHC, en raison de leur faible utilisation et de leur efficacité modeste à atteindre la SVR, et l'utilisation d'AAD, mieux tolérés que l'interféron, ne permet pas d'éliminer les perturbations moléculaires, génétiques et épigénétiques associées au risque de développement du CHC (Hoshida *et al.*, 2008; Hamdane *et al.*, 2019).

L'arrêt de la consommation alcoolique reste le traitement le plus efficace dans le cadre des maladies hépatiques alcooliques. Il a été démontré que l'abstinence diminue le risque de CHC de 6-10 % par an et après une abstinence de plus de 20 ans, le risque est le même que celui de la population générale. Cependant, l'objectif de la sobriété est à la fois complexe et compliqué à maintenir. Le disulfiram est le traitement le plus commun pour traiter l'alcoolisme et favorise l'abstinence à court terme. Cependant, ce traitement présente des effets secondaires désagréables. Par ailleurs, la naltrexone est un agent qui bloque les récepteurs opioïdes, ce qui entraîne une réduction des niveaux de dopamine et une diminution de la consommation d'alcool. L'étude *Combined Pharmacotherapies and Behavioral Interventions* (COMBINE) (NCT00006206) a démontré que la naltrexone, lorsqu'elle est administrée avec des conseils médicaux, entraîne une augmentation du nombre de jours d'abstinence (Li *et al.*, 2020).

Les différentes stratégies thérapeutiques pour lutter contre les étiologies des maladies hépatiques chroniques ne peuvent cependant pas éliminer le risque de développer un CHC. De plus, il n'y a à ce jour aucun traitement chimiopréventif approuvé pour contrer la progression des maladies hépatiques chroniques et lutter contre le développement du CHC.

b. Développement de traitements contre la fibrose et de la cirrhose

Malgré de nombreux essais précliniques et cliniques, il n'existe à ce jour aucun médicament anti-fibrotique approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) et la seule option de traitement curatif disponible pour les patients atteints de cirrhose hépatique avancée est la transplantation hépatique (Roehlen *et al.*, 2020). En effet, malgré de nombreux essais cliniques, le développement de beaucoup de molécules candidates est interrompu lors des essais cliniques par manque d'efficacité chez l'humain. Plusieurs antifibrotiques sont actuellement en cours d'essais cliniques et sont listés ci-dessous dans le **Tableau 3**. La fibrose et la cirrhose qui peut en découler sont les facteurs prédisposant majeurs du CHC. La progression de la fibrose vers la cirrhose prend généralement 2 à 3 décennies. Par conséquent, il est en pratique difficile, voire impossible, de confirmer cliniquement le bénéfice pronostique des thérapies antifibrotiques expérimentales (Qian *et al.*, 2022). En général, les thérapies anti-fibrotiques peuvent être divisées 3 groupes selon leurs effets anti-fibrotiques : *i*) par la protection des hépatocytes, *ii*) l'inhibition de l'activation des cellules stellaires hépatiques et de l'évolution de la cicatrice fibrotique, ou *iii*) la modulation immunitaire.

Mécanisme antifibrotique	Drogue	Phase de l'essai clinique
Inhibition de l'apoptose des hépatocytes	Emricasan : inhibiteur pan-caspase	Phase 2 : NCT02960204 A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Emricasan, an Oral Caspase Inhibitor, in Subjects With Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) Cirrhosis and Severe Portal Hypertension
Réduction du stress oxydatif	GKT137831 : inhibiteur NOX1/4	Phase 2 : NCT03226067 Study to Assess Safety & Efficacy of GKT137831 in Patients With Primary Biliary Cholangitis Receiving Ursodiol.
Inhibition de l'activation des cellules stellaires	PRI-724 : inhibiteur CBP/ β -catéine	Phase 2 : NCT03620474 Safety and Effectiveness of PRI-724 for Hepatitis C or B Virus Derived Liver Cirrhosis
Réduction de l'évolution de la cicatrice fibrotique et de la contractilité	BMS986263 : nanoparticules lipidiques libérant des siRNA ciblant Hsp47	Phase 1b/2 : NCT02227459 Safety and tolerability of multiple doses of ND-L02-s0201 in subjects with moderate to extensive hepatic fibrosis
	Simtuzumab : Anticorps monoclonal spécifique de LXL2	Phase 2 : NCT01672853 Simtuzumab (GS-6624) in the Prevention of Progression of Liver Fibrosis in Adults With Primary Sclerosing Cholangitis (PSC)

Tableau 3 : Exemples de composés en développement clinique visant à réduire la fibrose hépatique
D'après (Roehlen *et al.*, 2020).

Le manque de traitements pour lutter contre la fibrose hépatique et les différents échecs observés lors des essais cliniques démontrent qu'il est urgent de développer des biomarqueurs de substitution fiables prédisant la progression de la fibrose à long terme qui permettront d'estimer le bénéfice pronostique cliniquement significatif des thérapies antifibrotiques dans le délai des essais cliniques thérapeutiques typiques. En outre, ces biomarqueurs pronostiques permettront d'enrichir la population des essais cliniques afin d'améliorer la puissance statistique de détection de l'efficacité thérapeutique (Qian *et al.*, 2022).

c. Stratégies de lutte contre la NASH en développement

Il n'y a actuellement aucune stratégie thérapeutique approuvée pour lutter contre la NASH. En effet, malgré de nombreux essais, le développement de nombreuses drogues, telles que l'elafibranor, l'acide obéticholique (OCA), le selonsertib, le cenicriviroc et l'emricasan, a été interrompu en raison de d'un manque d'efficacité dans les phases clinique II et III. Il est également à noter que le développement de ces drogues est rendu compliqué par la sensibilité des patients NASH qui souvent présentent plusieurs comorbidités telles que le diabète de type 2 et des maladies cardio-vasculaires (Qureshi and Neuschwander-Tetri, 2020; Vuppalanchi *et al.*, 2021). En raison de la forte progression de la prévalence de la NASH dans le monde, l'intérêt pour le développement de drogues anti-NASH s'est fortement accru. Les études précliniques ont également permis l'identification de cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la NASH et plusieurs drogues ont désormais atteints la phase III clinique de test (Diehl and Day, 2017) (**Figure 23**). Ces cibles peuvent être divisées en quatre catégories : les cibles métaboliques afin de limiter la lipogenèse, rétablir la sensibilité à l'insuline, améliorer la lipolyse ; les cibles inflammatoires afin d'inhiber le recrutement des cellules immunitaires, bloquer les voies de signalisation inflammatoire, réduire les stress oxydatif et/ou du réticulum endoplasmique, inhiber l'apoptose des hépatocytes ; les cibles de l'axe foie/intestin afin de moduler la circulation des acides biliaires, d'altérer le microbiote intestinal ; les drogues anti-fibrotiques qui ciblent directement les cellules stellaires, diminuent le dépôt de collagène dans le foie ou augmentent la fibrolyse (Vuppalanchi *et al.*, 2021). Parmi les drogues dont le développement est le plus avancé, on trouve des agonistes de FXR, tels que le tropifexor et le cilofexor. L'Aramchol est un inhibiteur partiel de SCD1. Son utilisation est associée à une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose hépatique, à un effet anti-fibrotique indirect, à une réduction de l'accumulation de gras dans le foie et à une amélioration de l'activité

des enzymes hépatiques (ALT, AST) (Ratzu *et al.*, 2021). Le Resmetirom est un agoniste des récepteurs des hormones thyroïdiennes, qui montre des résultats encourageants sur la résolution de la NASH et a un effet favorable sur le profil lipidique en réduisant les taux de LDL (Tacke and Weiskirchen, 2021; Vuppalanchi *et al.*, 2021).

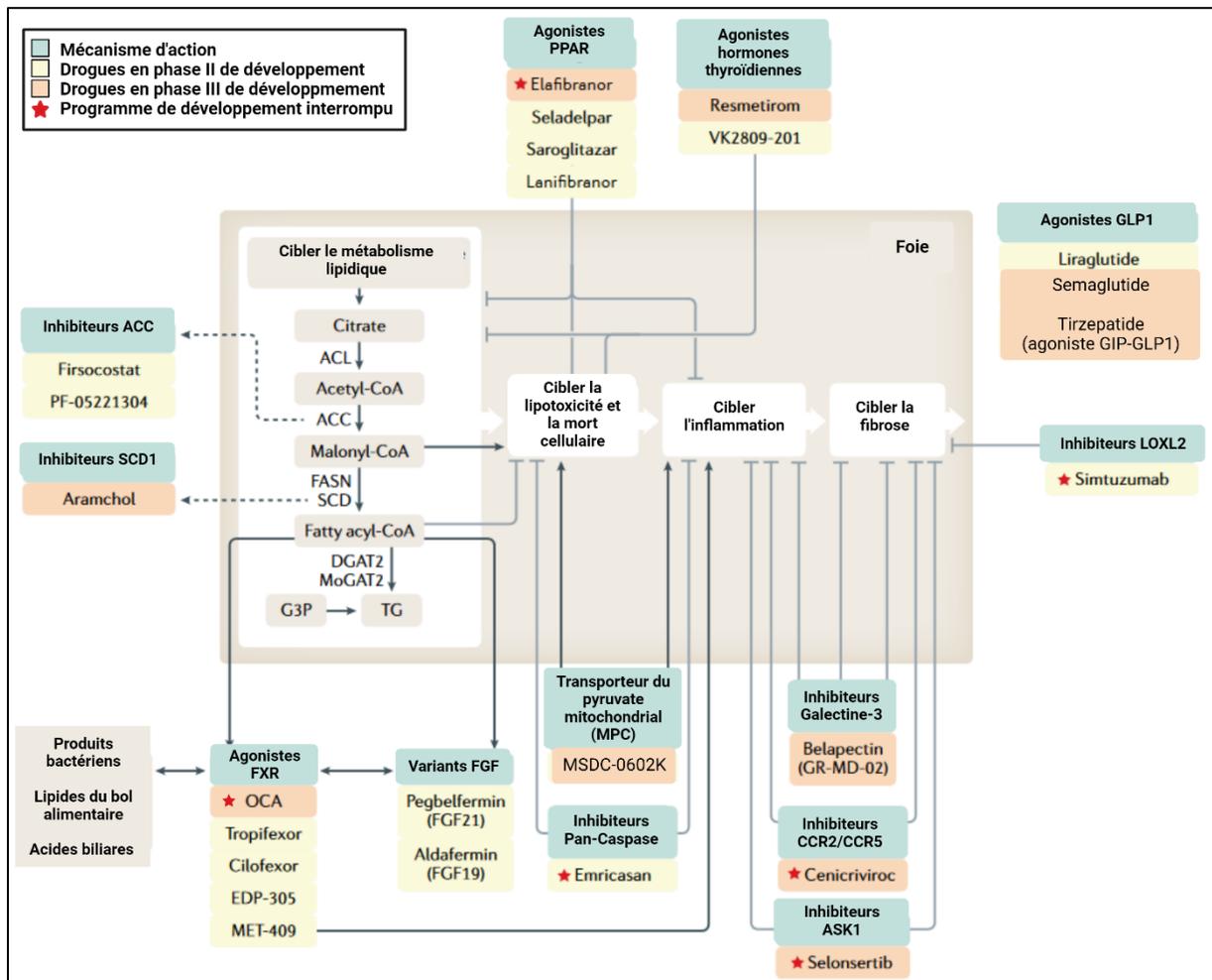


Figure 23 : Mécanisme d'action des médicaments contre la NASH actuellement en phase II et en phase III de développement. Plusieurs médicaments contre la stéatohépatite non alcoolique (NASH) sont actuellement en phase avancée de développement. ACC, acétyl CoA carboxylase ; ACL, ATP-citrate lyase ; CCR, récepteur des CC-chemokines ; DGAT2, diacylglycérol O-acyltransférase 2 ; FASN, acide gras synthase ; FGF, facteur de croissance des fibroblastes ; FXR, récepteur X des farnésoides ; G3P, glycérol-3-phosphate ; GLP1, *glucagon-like peptide 1* ; MoGAT2, monoacylglycérol O-acyltransférase 2 ; OCA, acide obéticholique ; PPAR, récepteur activé par les proliférateurs de peroxysses ; SCD, stéaroyl-CoA désaturase ; TG, triglycéride. Traduit et mis à jour de (Vuppalanchi *et al.*, 2021).

3) Gestion et traitements du CHC

La gestion des patients souffrant de CHC s'est améliorée de façon substantielle au cours de la dernière décennie (Li *et al.*, 2020) (**Figure 24**). Le système de stadification clinique du cancer du foie de Barcelone (BCLC) permet d'attribuer un type de traitement selon le stade tumoral et les bénéfices attendus des principales interventions. Les solutions thérapeutiques sont essentiellement chirurgicales. Les thérapies curatives comprennent la résection, la transplantation hépatiques et des techniques d'ablation telles que l'ablation thermique (Marrero *et al.*, 2018). Les solutions non curatives tentent de prolonger la survie des patients en empêchant la progression des tumeurs par chimio- ou radio-embolisation transartérielle (TACE/TARE) ou par radiothérapie stéréotaxique (SBRT) ou chimiothérapie systémique (Marrero *et al.*, 2018). En raison d'un diagnostic souvent tardif, seuls 30-40 % des patients diagnostiqués d'un CHC sont éligibles aux approches chirurgicales. De plus, pour 70 % des patients opérés, la récurrence intervient dans les 5 ans suivant l'opération (Fujiwara *et al.*, 2018; Llovet *et al.*, 2018). Pour les patients souffrant d'une cirrhose décompensée, la transplantation hépatique est choisie (Marrero *et al.*, 2018; Kulik and El-Serag, 2019; Llovet *et al.*, 2021b). Pour les patients avec un stade tumoral intermédiaire, la chimioembolisation est privilégiée et pour les patients à un stade plus avancé, présentant plusieurs nodules tumoraux et une invasion de la veine portale, donc à fort risque de récurrence post-opératoire les thérapies systémiques sont privilégiées. En 2007, les résultats de la phase III de l'essai clinique SHARP, ont démontré que l'inhibiteur multi-kinase, Sorafénib permettait d'améliorer la survie d'environ 3 mois des patients atteints d'un CHC (Llovet *et al.*, 2008; Llovet *et al.*, 2018), ce qui représente un progrès mineur d'autant plus que ce traitement est souvent mal toléré par les patients. Le Sorafénib ne présente donc pas de bénéfice majeur pour le traitement du CHC. Actuellement, le Sorafénib est prescrit à des patients avec un stade de CHC avancé et dont les fonctions hépatiques sont bien conservées (Llovet *et al.*, 2018). Depuis, de nouvelles thérapies dont les bénéfices sont similaires au Sorafénib ont été mises au point, tels que les inhibiteurs multi-kinase comme le Lenvatinib, le Cabozantinib et le Regorafenib (EASL, 2018). Récemment, l'immunothérapie a permis de réduire la récurrence du CHC, ainsi que la survie sans récurrence des patients (EASL, 2018) (Llovet *et al.*, 2021a). En effet, les ICIs, tels que l'Atezolizumab, l'Ipilumab, le Nivolumab et plus récemment le Pembrolizumab, l'Avelumab et Ipilimumab ont démontré une grande efficacité sur le CHC à un stade avancé (Llovet *et al.*, 2018; Llovet *et al.*, 2021a). De plus, l'utilisation combiné des inhibiteurs multi-kinases à des ICIs montre une efficacité légèrement supérieure au Sorafénib dans le traitement du CHC avec un effet synergique (Llovet

et al., 2021a). En effet, l'utilisation combinée du Bevacizumab et de l'Atezolizumab permet de ralentir la progression du CHC d'environ 3 mois et ainsi d'améliorer la survie des patients de près de 6 mois par rapport aux patients traités avec le Sorafénib, ce qui reste encore peu satisfaisant (Finn *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2022). D'autres thérapies combinatoires sont actuellement en phase clinique afin d'améliorer les effets de cette solution thérapeutique (EASL, 2018; Llovet *et al.*, 2021a). Cependant, le CHC est un cancer très résistant aux traitements de chimiothérapie et par conséquent difficile à traiter. En effet, il est observé que 50-60 % des patients traités au Sorafénib, présentent une progression de la maladie ce qui démontre une résistance du CHC à ce traitement. De plus, il est observé que seuls 15-20 % des patients traités avec des inhibiteurs des ICI répondent au traitement. Les traitements actuels ont des effets modestes sur la survie des patients. Par conséquent, il y a un besoin médical important pour de nouvelles thérapies. En effet, l'amélioration moyenne de la survie des patients n'est que de quelques mois (EASL, 2018; Llovet *et al.*, 2018). Par ailleurs, il n'existe actuellement aucune thérapie permettant de prévenir le développement du CHC chez les patients souffrant de maladies hépatiques chroniques. Par conséquent, de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prévention et le traitement du CHC sont urgemment nécessaires.

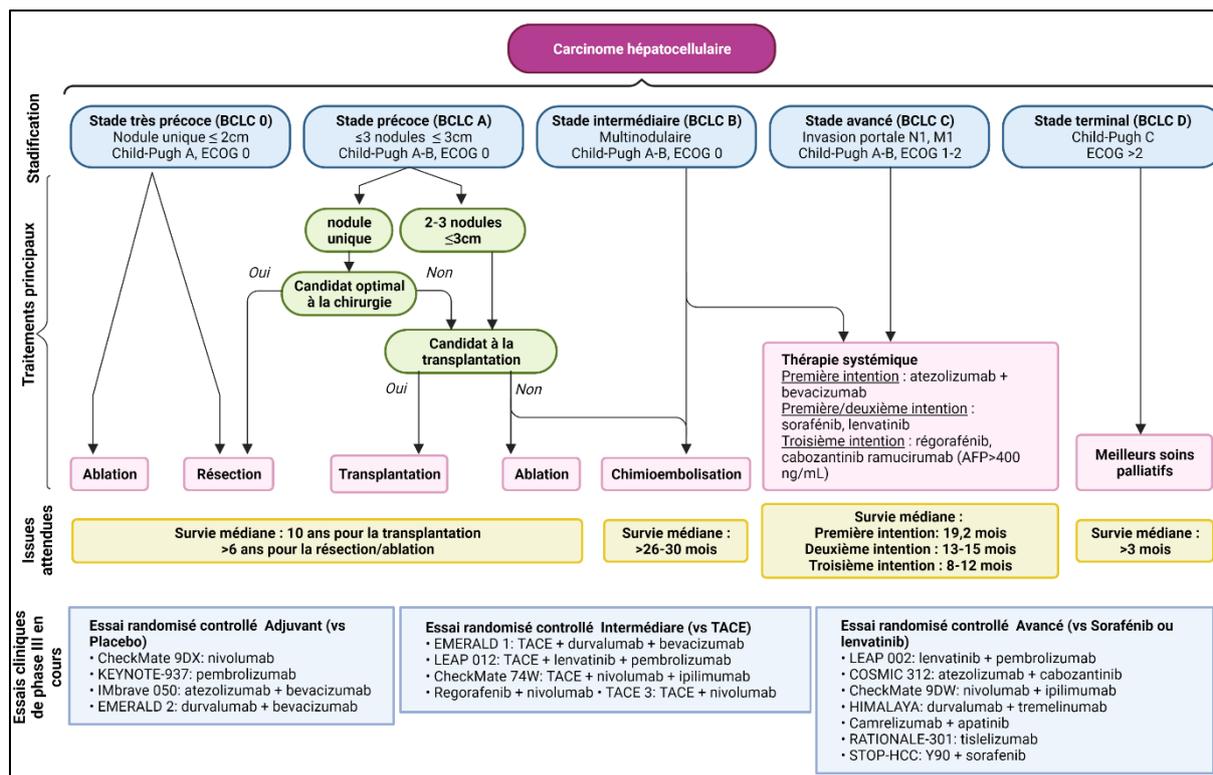


Figure 24 : Stratégie de traitement dans la prise en charge du CHC. Le système de stadification du cancer du foie de la clinique de Barcelone (BCLC) comprend cinq stades en fonction de l'extension de la maladie, de la fonction hépatique et de l'état de performance. Les patients asymptomatiques présentant une faible charge tumorale et une bonne fonction hépatique (BCLC 0/A) sont traités par des traitements curatifs locaux (résection, ablation ou transplantation, en fonction de la présence d'une hypertension portale, du nombre de nodules et de la fonction hépatique). Les patients asymptomatiques présentant une maladie multinodulaire et une fonction hépatique adéquate (BCLC B) bénéficieront une chimioembolisation et les patients présentant une thrombose portale ou une propagation extrahépatique (BCLC C) se verront proposer des thérapies systémiques. Les essais de phase III en cours à tous les stades de la maladie sont représentés. AFP, α -foetoprotéine ; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group ; HCC, carcinome hépatocellulaire ; M1, métastase à distance ; N1, métastase ganglionnaire ; TACE, chimioembolisation transartérielle. Pour les patients présentant une maladie hépatique au stade terminal de classe C de Child-Pugh, il sera envisagé une transplantation hépatique. Les patients présentant une fonction hépatique préservée de la classe A de Child-Pugh, une bilirubine normale et une absence d'hypertension portale sont des candidats optimaux pour une résection hépatique. Le sorafénib et le lenvatinib sont également considérés comme un traitement de première ligne en cas de contre-indication à l'atezolizumab + bevacizumab. Traduit de (Llovet *et al.*, 2021b). Créé avec BioRender.com

OBJECTIFS DE LA THESE :

Malgré le développement de nouvelles molécules et de nouvelles thérapies, les traitements restent limités dans le cas des CHC à un stade avancé (Jung *et al.*, 2017; El-Khoueiry *et al.*, 2017; Llovet *et al.*, 2018; Llovet *et al.*, 2021a). Les traitements actuels ont des effets limités sur la survie des patients et par conséquent il y a un besoin médical important pour de nouvelles thérapies (EASL, 2018; Llovet *et al.*, 2018). Par ailleurs, il n'existe actuellement aucun traitement disponible pour traiter la fibrose du foie (Diehl and Day, 2017; Tacke and Weiskirchen, 2021), ni aucune thérapie permettant de prévenir le développement du CHC chez les patients souffrant de maladies hépatiques chroniques (Fujiwara *et al.*, 2018). Il est urgemment nécessaire de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des maladies hépatiques chroniques, la prévention du CHC.

Avant mon arrivée en thèse, les travaux menés dans le laboratoire ont exploité deux stratégies complémentaires afin d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la progression de la maladie hépatique vers le CHC. Nous avons tiré profit de la PLS découverte par Y. Hoshida et son équipe ainsi que du système de la PLS cellulaire (cPLS) développé dans notre laboratoire (Hoshida *et al.*, 2008; Crouchet *et al.*, 2021) (**IV. 1. Diagnostic**).

Dans un premier temps, nous avons utilisé les résultats d'une étude antérieure de l'équipe de notre collaborateur **Dr. Y. Hoshida** de l'*University of Texas Southwestern Medical Center*. Dans cette étude, une analyse transcriptomique a été réalisée dans des biopsies de foies de patients souffrant de fibrose hépatique à un stade avancé ou de CHC. Cette étude s'est concentrée sur les perturbations moléculaires globales induites par le développement de la fibrose, de la cirrhose et liées au risque de CHC, afin de pouvoir identifier des acteurs majeurs de l'hépatocarcinogénèse dans les étiologies principales de maladies hépatiques chroniques. Dans cette étude, la méta-analyse de l'expression génique dans des tissus de foie de 523 patients atteints de cirrhose a permis la construction d'une « carte » du transcriptome des foies cirrhotiques et l'identification de 31 « modules génétiques » interconnectés, c'est-à-dire d'ensemble de gènes dont l'expression est corrégulée et associée à la progression de la maladie hépatique ainsi qu'au développement du CHC. Des voies/fonctions moléculaires, impliquées dans la pathogenèse de l'inflammation, de la fibrogenèse et de la carcinogénèse du foie, ont été identifiées dans ces modules (Nakagawa *et al.*, 2016). Au sein de chaque module, Nakagawa et collaborateurs ont bio-informatiquement identifié les gènes régulateurs centraux, dont l'expression influe sur l'état de régulation de tous les autres gènes du module. Ils ont ainsi prédit 30 facteurs clés associés à la progression des maladies hépatiques chroniques et au risque de

CHC, nommés « *drivers* » de la maladie. Parmi ces facteurs clés, ils ont identifié plusieurs cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6 ...), des facteurs de transcription (*CCAAT/enhancer binding protein alpha* (CEBPA), *RELA proto-oncogene*, *NF-kB subunit* (RELA), SREBF1...), différentes enzymes et protéines de transport (**Tableau 4**).

Drivers du CHC

Gene ID	Gene Symbol	Description
2181	ACSL3	<i>Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3</i>
1050	CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
8824	CES2	<i>Carboxylesterase 2</i>
8655	DYNLL1	<i>Dynein light chain LC8-type 1</i>
2064	ERBB2	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
2167	FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
10447	FAM3C	<i>Family with sequence similarity 3 member C</i>
2773	GNAI3	<i>G protein subunit alpha i3</i>
3162	HMOX1	<i>Heme oxygenase 1</i>
3586	IL-10	<i>Interleukin 10</i>
3596	IL-13	<i>Interleukin 13</i>
3553	IL-1B	<i>Interleukin 1 beta</i>
3565	IL-4	<i>Interleukin 4</i>
3569	IL-6	<i>Interleukin 6</i>
3643	INSR	<i>Insulin receptor</i>
26227	PHGDH	<i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>
5465	PPARA	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>
5479	PPIB	<i>Peptidylprolyl isomerase B</i>
5516	PPP2CB	<i>Protein phosphatase 2 catalytic subunit beta</i>
7001	PRDX2	<i>Peroxiredoxin 2</i>
5721	PSME2	<i>Proteasome activator subunit 2</i>
5898	RALA	<i>RAS like proto-oncogene A</i>
5970	RELA	<i>RELA proto-oncogene, NF-kB subunit</i>
6193	RPS5	<i>Ribosomal protein S5</i>
291	SLC25A4	<i>Solute carrier family 25 member 4</i>
4088	SMAD3	<i>SMAD family member 3</i>
6696	SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
6720	SREBF1	<i>Sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>
7035	TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
7124	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

Tableau 4 : Facteurs clés associés à la progression des maladies hépatiques chroniques du risque de CHC. Prédiction des drivers de la maladie hépatique et du CHC à l'aide d'études transcriptomiques de tissus hépatiques de patients atteints d'une maladie hépatique avancée (Nakagawa *et al.*, 2016).

En parallèle, nous avons exploité le système de cPLS développé au sein de notre laboratoire (Crouchet *et al.*, 2021). Les cellules hépatocytaires Huh-7.5.1^{dif} ont été soumises à une infection persistante par le VHC pour induire la PLS de mauvais pronostic. Des études transcriptomiques et protéomiques ont été réalisées à 0, 3, 7 et 10 jours post-infection (Lupberger *et al.*, 2019). Ensuite, notre collaboratrice, **Dr. N. Pochet** du Broad Institute a effectué des analyses computationnelles afin de prédire des gènes régulateurs de la cPLS à l'aide de l'algorithme AMARETTO (www.broadinstitute.org) (Champion *et al.*, 2018; Lupberger *et al.*, 2019). L'algorithme AMARETTO permet de prédire les gènes régulateurs connus de la maladie avec les gènes cibles co-exprimés qu'ils contrôlent. Ceci a permis d'identifier plusieurs gènes régulateurs de voies de signalisations dérégulées dans les maladies hépatiques chroniques et le CHC et impliqués dans l'induction de la PLS de mauvais pronostic, ou « driver de la cPLS ». Parmi les gènes régulateurs candidats, une sélection a été réalisée pour garder ceux fortement exprimés dans le foie, dont l'expression corrèle à la progression des maladies hépatiques chroniques et le risque de développement du CHC chez les patients, et qui codent l'expression d'une protéine dont l'activité peut être ciblée et altérée par de petites molécules. Cette analyse a permis d'identifier 30 facteurs clés associés à la cPLS de mauvais pronostic et peuvent prédire le développement du CHC. Parmi ces facteurs, nous avons identifié divers facteurs de transcriptions (CEBPG, FOXA3, FXR ...), des kinases (MAP4K4, JAK1), et des cytokines (*Macrophage migration inhibitory factor* (MIF)) (**Tableau 5**). De manière intéressante, nous avons identifié au sein des deux listes de drivers des voies de signalisations communes et des facteurs connus de la progression des maladies hépatiques chroniques vers le CHC, telles que les voies SMAD3/TGF- β (Hoshida *et al.*, 2009), TNF- α /NF- κ B (Park *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2014) et la voie IL-6/STAT3 (Lupberger *et al.*, 2019), entre autres, confirmant ainsi la robustesse de notre approche.

Drivers de la cPLS

Gene ID	Gene Symbol	Description
197	AHSG	<i>Alpha 2-HS glycoprotein</i>
467	ATF3	<i>Activating transcription factor 3</i>
727	C5	<i>Complement C5</i>
1017	CDK2	<i>Cyclin dependent kinase 2</i>
1054	CEBPG	<i>CCAAT/enhancer binding protein gamma</i>
9586	CREB5	<i>cAMP responsive element binding protein 5</i>
1543	CYP1A1	<i>Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1</i>
144455	E2F7	<i>E2F transcription factor 7</i>
2353	FOS	<i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
3171	FOXA3	<i>Forkhead box A3</i>
9734	HDAC9	<i>Histone deacetylase 9</i>
3399	ID3	<i>Inhibitor of DNA binding 3, HLH protein</i>
182	JAG1	<i>Jagged 1</i>
3716	JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
9448	MAP4K4	<i>Mitogen -activated protein kinase kinase kinase kinase 4</i>
4282	MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)</i>
4609	MYC	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
10062	NR1H3	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3</i>
9971	NR1H4	<i>Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4</i>
10891	PPARGC1A	<i>PPARG coactivator 1 alpha</i>
7001	PRDX2	<i>Peroxiredoxin 2</i>
5915	RARB	<i>Retinoic acid receptor beta</i>
11186	RASSF1	<i>Ras association domain family member 1</i>
5971	RELB	<i>RELB proto-oncogene, NF-kB subunit</i>
4093	SMAD9	<i>SMAD family member 9</i>
6594	SMARCA1	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1</i>
6659	SOX4	<i>SRY-box 4</i>
6774	STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
7105	TSPAN6	<i>Tetraspanin 6</i>
79862	ZNF669	<i>Zinc finger protein 669</i>

Tableau 5 : Facteurs clés de la cPLS. Prédiction des drivers de la signature de mauvais pronostic dans les cellules Huh-7.5.1^{dif} à l'aide d'études transcriptomiques et protéomiques, suivies d'analyses computationnelles et intégratives des voies (AMARETTO) (Champion *et al.*, 2018; Lupberger *et al.*, 2019).

Par ailleurs, nous avons également identifié une protéine commune aux deux listes, par deux approches différentes réalisées dans deux laboratoires différents indépendamment, la peroxyrédoxine 2 (PRDX2). PRDX2 est une enzyme soluble, responsable de la régulation du stress oxydatif dans les cellules en détoxifiant l'H₂O₂ généré lors du stress oxydatif. Comme exposé, plus haute dans le paragraphe « **II.2.c.v. Les peroxydases et les peroxyrédoxines** »

PRDX2 est donc impliquée dans la régulation de nombreux processus biologiques (Park *et al.*, 2016a; Nicolussi *et al.*, 2017). Elle est impliquée dans le développement et la progression du cancer colorectal et le cancer du sein. Elle favorise également la croissance ainsi que la survie des cellules cancéreuses (Stresing *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014b; Peng *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2020). Cependant, comme pour les autres peroxyrédoxines, le rôle de PRDX2 dans les maladies hépatiques chroniques et le développement du CHC n'est pas élucidé. En effet, comme discuté plus haut, les PRDX de par leur activité antioxydante semblent jouer un rôle d'agent double dans les maladies chroniques hépatique et le développement du CHC. Par conséquent, mon projet de thèse a été centré sur la caractérisation de PRDX2 en tant que cible thérapeutique de la progression des maladies hépatiques chroniques et du développement du CHC.

L'objectif premier de mes travaux de thèse a été de caractériser le rôle de PRDX2 dans la progression des maladies hépatiques chroniques et le développement du CHC. Dans les travaux de thèse qui seront présentés dans la suite de cet exposé, nous avons utilisé un modèle murin de référence de maladie hépatique chronique induite par un régime riche en lipides et déficient en choline, CDAHFD associé à une injection d'un carcinogène, diéthylnitrosamine (DEN) pour mimer l'hépatocarcinogenèse induite par la maladie métabolique hépatique. Dans ce modèle, nous avons réalisé l'extinction du gène *Prdx2* spécifiquement dans les hépatocytes murins grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Ce modèle murin nous permet d'étudier le rôle de PRDX2 dans les hépatocytes sur le développement du CHC ainsi que la progression de la maladie métabolique hépatique. Par ailleurs, l'analyse transcriptomique des tissus hépatiques de ce modèle nous permet de décrypter les mécanismes d'actions de PRDX2 dans la maladie hépatique et le développement du CHC.

Parallèlement, afin de de décrire le rôle de PRDX2 dans le développement du CHC et la croissance tumorale, nous avons utilisé un modèle murin de xéno greffe où nous avons injecté des cellules Huh-7.5.1, où nous avons réalisé l'extinction de *PRDX2* grâce à la technologie CRISPR-Cas9, en sous-cutané dans des souris immunodéficiente et suivi la croissance des tumeurs sous-cutanées. Ce modèle nous a permis d'étudier le rôle de PRDX2 sur la croissance des tumeurs et la prolifération des cellules tumorales.

Les observations faites dans les deux modèles murins concernant les mécanismes d'actions de PRDX2 sont validées *in vitro* par des études de perturbations de l'expression de PRDX2 dans des cellules hépatocytaires dérivées de CHC (Huh-7.5.1). De plus, l'exploitation du modèle cellulaire de CHC, nous permet également de vérifier le rôle de PRDX2 sur les caractéristiques

des cellules cancéreuses, à savoir, la prolifération, la migration, l'invasion et la résistance au stress oxydatif.

L'ensemble de ces travaux permet de décrypter les mécanismes de la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC et ainsi pouvoir proposer un nouveau paradigme dans le domaine de la cancérologie. De plus, l'exploitation des modèles *in vitro* ainsi qu'*in vivo* dans cette étude permettra également de valider l'intérêt thérapeutique de cibler PRDX2 afin de prévenir le développement du CHC chez les patients à risque et souffrant de maladies métaboliques telles que la NAFLD et la NASH, le but à terme, étant l'amélioration de l'offre des soins dans le cadre du CHC.

En parallèle de ces travaux visant à élucider le rôle de PRDX2 dans les maladies hépatiques et ainsi valider son intérêt en tant que cible thérapeutique pour le traitement des maladies hépatiques chroniques et la chimioprévention du CHC, nous avons travaillé à découvrir des molécules thérapeutiques ciblant PRDX2. Certes, il existe des drogues telles que la conoïdine A capables d'inhiber l'activité de PRDX2, mais celle-ci sont peu spécifiques, cytotoxiques et agissent à des concentrations trop élevées pour être utilisables chez les patients souffrant de maladies hépatiques. Nous avons décidé de réaliser un criblage de petites molécules thérapeutiques ciblant l'activité de PRDX2. Pour réaliser ce projet, nous avons donc établi une collaboration avec la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (Dr Pascal Villa, spécialiste en criblage de petites molécules, Illkirch Graffenstaden), la Plateforme IMPReSs (Dr Renaud Wagner, spécialiste dans la production de protéines recombinantes) et le Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (Dr Dominique Bonnet, spécialiste en chimie et structure des molécules). Les objectifs communs de cette collaboration ont été :

- De produire la PRDX2 dans un système eucaryote afin de pouvoir obtenir la conformation la plus proche de la PRDX2 humaine afin de pouvoir réaliser le criblage.
- De mettre au point un test enzymatique fiable, afin de pouvoir vérifier l'activité de la PRDX2 produite et par la suite vérifier les capacités inhibitrices des petites molécules identifiées lors du criblage.
- Mettre au point le criblage de banques de petites molécules bioactives afin d'identifier des molécules liant et inhibant PRDX2.

CONTRIBUTION :

Au cours de ce projet, j'ai pu travailler en collaboration avec les Dr. Emilie Crouchet Dr. Laurent Mailly et Dr Frank Jühling. Le Dr Mailly m'a guidée et conseillée dans l'utilisation de modèles murins, me permettant ainsi de mettre en évidence l'implication de PRDX2 dans la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC. Grâce au Dr. Crouchet et au Dr F. Jühling, j'ai pu analyser et exploiter les données de transcriptomiques du modèle murin de NASH/CHC afin de mettre en évidence le rôle de PRDX2 dans le métabolisme lipidique ainsi que dans la régulation des voies de signalisations carcinogéniques. En collaboration avec le Dr. Crouchet j'ai pu mettre au point les expériences *in vitro* qui m'ont permis de décrypter le rôle de PRDX2 dans la prolifération, l'invasion, la migration et la survie des cellules cancéreuses. J'ai notamment mis au point, dans le laboratoire, les expériences de migration et d'invasion cellulaire. J'ai également pu mettre au point, le test enzymatique basé sur les propriétés d'oxydoréduction de PRDX2 pour mesurer son activité, afin de quantifier l'efficacité des molécules identifiées lors d'un criblage de banque de molécules bioactives inhibant l'activité de PRDX2. Enfin, j'ai eu l'occasion de gérer la communication entre notre équipe et nos partenaires, afin de mettre en place les collaborations pour le criblage des drogues ciblant PRDX2.

RESULTATS

L'ensemble des résultats de cette étude ont été valorisés par un article scientifique signé en co-première auteure soumis pour publication dans le journal *Nature Communications*. Ils sont présentés ci-après.

Peroxiredoxin 2 is a driver of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease

Emilie Crouchet*¹, Eugénie Schaeffer*¹, Frank Jühling¹, Hussein El Saghire¹, Naoto Fujiwara⁵, Shija Zhu⁵, Fahmida Akter Rasha⁵, Julien Moehlin¹, Marine A Oudot¹, Clara Ponsolles¹, Nicolas Brignon¹, Sarah C Durand¹, Marie Parnot¹, Nourdine Hamdane¹, Danijela Heide², Jenny Hetzer², Mathias Heikenwälder², Emanuele Felli^{1,3,4}, Patrick Pessaux^{1,3,4}, Nathalie Pochet^{5,6}, Yujin Hoshida⁷, Laurent Mailly¹, Thomas F. Baumert^{§1,3}, Catherine Schuster^{§1}.

¹Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMR_S1110, Strasbourg, France; ²Division of Chronic Inflammation and Cancer, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany; ³Service d'hépatogastroentérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁴Institut hospitalo-universitaire (IHU), Institute for Minimally Invasive Hybrid Image-Guided Surgery, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁵Broad Institute of Harvard and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA; ⁶Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; ⁷Liver Tumor Translational Research Program, Simmons Comprehensive Cancer Center, Division of Digestive and Liver Diseases, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX

* These authors contributed equally

§ corresponding authors

To whom correspondence should be addressed:

Catherine Schuster, PhD, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1110,
Université de Strasbourg, Strasbourg, France. Email: catherine.schuster@unistra.fr

Thomas F. Baumert, MD, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1110,
Université de Strasbourg, Strasbourg, France. Email: thomas.baumert@unistra.fr

Electronic word count (excluding references):

Number of Figures: 5

ABSTRACT 144/150 words

Treatment options for advanced liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC) are limited and strategies to prevent HCC development are lacking. Aiming to discover novel therapeutic targets, we combined genome wide transcriptomic analysis of liver tissues from patient with advanced liver disease and HCC and a cell-based system predicting liver disease progression and HCC risk. Computational analysis identified peroxiredoxin 2 (PRDX2) as a driver of hepatocarcinogenesis and HCC risk. *In vivo* perturbation study in a mouse model for NASH driven hepatocarcinogenesis showed that *Prdx2* knockout significantly decreased HCC development by suppressing oncogenic signaling and improving metabolic liver functions and metabolism through activation of the AMPK. Finally, PRDX2 loss-of-function studies in hepatoma cell-based models and a CDX mouse model unraveled that PRDX2 mediates cancer cell proliferation, migration, invasion, and survival. Targeting PRDX2 may therefore be a valuable strategy to prevent HCC development in metabolic disease.

INTRODUCTION

Chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC) are major public health burdens responsible for more than 2 million deaths per year worldwide ¹. HCC accounts for the majority of liver cancer and is a leading and fast rising cause of cancer-related death globally ². The major causes of HCC are chronic hepatitis B and C, alcohol abuse, and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). While viral hepatitis has been a major cause of liver disease and HCC in the past, metabolic liver disease such as NASH will be the major cause of HCC in the future due to change in the lifestyle with increasing obesity and diabetes ³.

Despite tremendous efforts, current treatment options for HCC are still unsatisfactory. Only 30-40% of HCC patients are eligible to curative surgical approaches and about 70% of them experience tumor recurrence within 5 years ². While recently approved combination of VEGF-targeting agents with immune checkpoint inhibitors targeting programmed cell death 1 (PD-1) have changed standard of care, overall response rates and improvement of survival remains low ⁴. Prevention of HCC development and recurrence, and treatment of the underlying etiology in patients at risk has therefore emerged as an important strategy to decrease the overall HCC burden ⁵. However, discovery of chemopreventive approaches have been challenging due to the complexity of the disease biology and the absence of tangible models reflecting disease progression and HCC risk.

A prognostic liver signature (PLS) comprising 186 genes (73 poor-prognosis- and 113 good-prognosis genes) has been shown to predict clinical progression of liver disease to HCC across all the main etiologies ⁶⁻¹¹. A reduced version of this signature comprising 32 genes has been computationally determined and validated in multiple pan-etiological patient cohorts ^{9,10} and implemented in an FDA-approved diagnostic platform for clinical use as Laboratory Developed Test (LDT)¹²⁻¹⁴. Recently, we have developed a simple and robust human cell culture system modelling the PLS (cPLS, for cell-culture PLS) in an inducible and reversible

manner^{12,15,16}. This system has been shown to model the cell circuits relevant for liver disease progression and HCC risk and to discover novel targets and compounds for HCC¹².

Here, we combined transcriptomic analysis of liver tissues from patients with the cPLS system to identify clinically relevant targets for HCC prevention and treatment. By performing computational analyses, we identified peroxiredoxin 2 (PRDX2) as a novel driver and therapeutic target for metabolic liver disease induced HCC.

MATERIAL AND METHODS:

For reagents, primers, antibodies, and other resources, see **Supplementary Table 2**.

Human subjects

RNA sequencing data from patients were obtained from NCBI Geodata sets. *PRDX2* expression levels were extracted using Geo2R. The following public databases were used in the study are available on <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE14520>: HBV-related liver cancer patient cohort¹⁷, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE20140>: HCV-related liver cancer patient cohort and <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>: The Cancer Genome Atlas (TCGA) patient cohort. Representative liver sections from patients with HCC and control patients stained with PRDX2 antibodies were obtained from the Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

Research experiments on live vertebrates Mice breeding and experiments are carried out at the Institute of Viral and Liver Disease animal facility (approval number E-67-482-7). The experiments are compliant with the relevant ethical regulations regarding animal research and

were reviewed and approved by the local ethical committee and authorized by the French Ministry of Research and Higher Education (authorization numbers APAFIS# 828-20150611155923v5 and 27709-2020101514256404v4). Alb-Cre (B6.Cg-Speer6-ps1Tg(Alb-cre)21Mgn/J) and Cas9 (B6J.129(B6N)-Gt(ROSA)26Sortm1(CAG-cas9*,-EGFP)Fezh/J) mice were purchased from The Jackson Laboratory, NRG mice were purchased from Charles River.

NASH-HCC mouse model: Alb-Cre and Cas9 mice were crossed to generate the Alb-Cre/Cas9 F1 generation. Only male mice from the F1 generation were used in subsequent experiments. AAV8-sgCtrl and AAV8-sgPrdx2-3 (10^{11} genome equivalent per mouse) were delivered through intravenous injection in 4- to 5-week-old Alb-Cre/Cas9 mice. Three weeks later, mice were intraperitoneally injected with 100 mg/kg diethylnitrosamine (DEN) and after one week they were fed with a choline-deficient amino-acid adapted high-fat diet (CDA-HFD, Research Diet #A 06071302) for 6 months. At the time of sacrifice, animals were anesthetized, weighted and a terminal blood collection was performed by cardiac puncture. The plasma fraction was kept at -80°C until further analyses. Livers were weighted, fixed in formalin or mounted in optimal cutting temperature (OCT) compound and kept at -80°C until further analyses.

Cell-derived xenograft (CDX) mouse model: Six- to eight-week-old NRG mice were subcutaneously transplanted with $5 \cdot 10^6$ of either Huh7.5.1_Cas9-sgCTRL or Huh7.5.1_Cas9-sgPRDX2 cells and monitored weekly for tumor growth for 5 weeks. Tumor volume was determined by caliper measurement and calculated using the formula $(L \times W^2) \times 0.5$ where L and W represent length and width of the tumors respectively.

HCC driver prediction: Co-regulatory gene modules in human cirrhotic livers (cirrhosis gene modules) were derived from our previous study, synthesizing three cohorts including 523 cirrhosis patients from Asia, Europe, and the U.S. by using MEGENA algorithm based on

Fisher's inverse chi-square statistic ¹⁰. Hub genes among the module member genes were identified as key driver genes by using KDA algorithm ¹⁰. The raw data can be explored on Gene Expression Omnibus (GEO): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE64520>. Among the 31 cirrhosis gene modules, gene co-expression networks in the module no.8, which was uniquely associated with elevated HCC risk, were visualized by using Cytoscape software (ver. 3.9.1) ²⁰. For PLS driver prediction, DMSO-differentiated Huh7.5.1^{dif} cells were subjected to HCV Jc1 infection for a total of 10 days. Cells were collected at different time points (0, 3, 7 and 10 days post-infection) and subjected to RNA sequencing and proteomic analyses. "Mock-infected cells" were used as control for each time point. PLS driver prediction was performed by using AMARETTO ¹⁶. The raw data can be explored on Gene Expression Omnibus (GEO): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE126831>.

PLS calculation: The PLS 32 gene expression profiling was performed using 250-500 ng total RNA by using nCounter Digital Analyzer system (NanoString). For the PLS 32 gene list, refer to **Supplementary Table 1** for full PLS gene list, refer to ^{10,12}. PLS gene expression was normalized according to 6 housekeeping gene expression using GenePattern genomic analysis toolkits^{21,22}. Detailed PLS gene expression profiles are presented as heatmaps showing the mean expression of the 32 PLS genes using Morpheus software (z scores of log₂ normalized data). Induction or suppression of the PLS signature was determined as previously reported by using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), implemented in GenePattern genomic analysis toolkits^{21,22}. PLS was always determined by using CTRL cells as references. Results are presented as simplified heatmaps showing the classification of PLS global status as poor or good prognosis and the significance of induction/suppression of PLS genes (log₁₀ of false discovery rate (FDR)

values). Global status corresponds to the difference between low risk- and high risk-gene expression.

RNA sequencing analysis and data processing: 500ng of total liver RNA from 3 CDAHFD sgCTRL and 3 CDAHFD sgPrdx2 mice liver were submitted to Next Generation Sequencing (Biomedical Sequencing Facility, CEMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna (Austria)). Data were analyzed as previously described in Jühling *et al.*, 2021¹⁸.

Histology, immunohistochemistry, plasma biochemistry: Macroscopic tumor nodules were counted from total liver and their size was determined on liver pictures using ImageJ. Formalin-fixed samples were embedded in paraffin, cut in 6 µm sections and stained with hematoxylin and eosin or Picrosirius Red. Additional sections were stained with antibody specific to peroxiredoxin 2 (PRDX2), DNA replication licensing factor (minichromosome maintenance complex component 2 MCM2). For TUNEL staining, sections were stained with the TUNEL Assay Kit – HRP DAB (Abcam #206386) following the manufacturer instructions. OCT-mounted samples were cut in 10 µm sections and stained with Oil Red O. Glass slide-mounted tissues were scanned with Nanozoomer scanner (Hamamatsu) and images were analyzed using image processing software (ImageJ).

Hydroxyproline quantification: Hydroxyproline was quantified in frozen liver tissues from the diet-based NASH/HCC mouse model, using the Hydroxyproline Assay Kit (Sigma) following manufacturer's instructions. Briefly, between 12 to 21 mg of frozen liver tissues were sampled from each mouse (Chow diet n=6, CDAHFD sgCTRL n=18, CDAHFD sgPrdx2

n=14), homogenized in 100 µL of water and hydrolyzed with 100 µL HCl (12M) at 120°C for 3 hours. Then 25µL of each sample were used in duplicates for hydroxyproline quantification.

Immunoblotting: Total proteins from mice liver were obtained by crushing samples with liquid nitrogen and adding 200 µL of Lysis Buffer 6 (R&D Systems) complemented with proteinase inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich). After vortexing, the samples were left on ice for 30 minutes and centrifuged at 10 000 g for 10 minutes. The supernatants were then collected and kept at – 80°C before use. Total proteins from cell culture were obtained by lysing cells with Lysis Buffer 6 (R&D Systems) complemented with proteinase inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich). The concentration in the supernatant was determined with a Pierce BCA Protein Assay kit (Pierce Biotechnology). 20 µg of proteins extract were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were then blocked in 5% milk– TBS 1x Tween 0.05 % and incubated with primary antibody and secondary antibody in 1 %milk- TBS1x Tween 0.05 %. The membranes were then visualized using chemiluminescence detection reagents Clarity Western ECL Substrate (Biorad) and the ChemiDoc™ Touch Imaging System (Biorad).

Gene expression analysis: Total RNA from mice liver were obtained using Tri Reagent (MRC) and Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo Research). Total RNA from cells in culture were obtained using the ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems kit (Promega). RNA quantity and quality was assessed using Nanodrop. Total liver RNA (500ng) was used for cDNA synthesis using Maxima H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher), cDNA was then used for quantitative real-time qPCR with iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad) or iTaq

Universal Probes Supermix (Biorad). TaqMan Assays (Thermofisher). Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta CT}$ method, using GAPDH as reference gene.

Cells: Huh7.5.1 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-depleted fetal bovine serum, gentamycin (0.05 mg/mL) and non-essential amino acids (complete DMEM) at 37°C with 5% CO₂. For proliferation arrest and differentiation (Huh-7.5.1^{dif} cells), Huh-7.5.1 cells were cultured in complete DMEM supplemented with 1% DMSO for 10 days before seeding ¹². All cell lines were certified mycoplasma free.

HCV infection: Cell culture-derived HCVcc Jc1¹⁹ were produced in Huh7.5.1 cells by electroporation of viral RNA. The cell culture supernatants were harvested every 3 days for a total of 12 days and were concentrated 10 times using Vivaspin 20, 10,000 MWCO PES (Sartorius). In parallel, Huh7.5.1 were subjected to the electroporation protocol without viral RNA and the supernatants were collected and concentrated in the same conditions (mock-electroporated cells). HCV infectivity was determined by calculating the Tissue culture Infective Dose 50 (TCID₅₀). To analyze the PLS induction, Huh7.5.1^{dif} cells were infected with HCV Jc1 (TCID 10⁶ infectious particle /mL), for a total of 10 days ¹². Cell culture supernatants from mock-electroporated cells (without viral RNA) were used for control experiments. PLS induction in virus-infected cells was always determined using mock-infected cells as control references.

Production of AAV vectors for in vivo gene editing: Recombinant adeno-associated virus serotype 8 (AAV8-sgCtrl and AAV8-sgPrdx2) were produced by PEI-mediated transient

transfection of a HEK293T-derived cell line (293T/17) with pAAV-sgCTRL or pAAV-sgPrdx2 expression plasmids and the pDP8.ape helper plasmid for serotype 8 (N°478, Plasmidfactory). Two days after transfection, AAV vectors were purified from cell lysate by Iodixanol gradient ultracentrifugation²³. Briefly, cells were harvested in 24 mL lysis buffer per *HYPERFlask cell culture vessel* (Corning). The lysate was subjected two freeze-thaw cycles in dry ice/ethanol and 37 °C water baths, further treated with 100 U/mL Benzonase (Merck) for 1 hour at 37 °C and clarified by centrifugation at 3,000 x g for 15 min. AAV vectors were purified by Iodixanol gradient ultracentrifugation as described in OptiPrep™ Application Sheet V14 (Axis Shield). Viruses were dialyzed and concentrated against AAV formulation buffer (Dulbecco's PBS with 0.5 mM MgCl₂) using centrifugal filters (Amicon Ultra-15, 100 KDa cutoff) and finally filtered through 0.22 µm. Viral titers were determined by qPCR using [LightCycler480 SYBR Green I Master](#) (Roche) with primers 5'-GACGACGGCAACTACAAGA-3' and 5'-GTGGCTGATGTAGTTGTACTC-3'. The standard curve was performed with 10-fold serial dilutions of pAAV that was freshly denatured in 200mM NaOH for 45 min at 65°C and neutralized by addition of an equimolar amount of HCl. AAV8 viruses were diluted to a final concentration of 1x 10¹³ viral genome per ml (vg/ml) and stored at -80°C until use.

In vitro CRISPR/Cas9 gene editing: Lentiviruses expressing single guide RNA (sgRNAs) were generated by transient transfection of HEK 293T cells. HEK 293T cells were adjusted to a density of 2.10⁵ cells/mL and 10mL were added to a 10 cm diameter Petri dish. The day after, the cell culture media was replaced. In parallel, 8.1 µg of PS-PAX2 (#12260 Addgene), 2.7 µg of pMD2.G (#12259 Addgene), 8.1 µg of pXPR-BRD016-PRDX2, 62 µL of 2M CaCl₂ (Clontech) are mixed to nuclease free water to a final volume of 500 µL. The mix was dripped on 500 µL of HEPES-Buffer Saline (Clontech) a polypropylene hemolysis tube. This mix was left 20 minutes at room temperature and homogeneously added on the HEK 293T cells. Two

days after transfection, the supernatants were harvested, filtered through 0.45 µm, aliquoted and stocked at -80°C until use. Huh7.5.1 stably expressing Cas-9 endonuclease (Huh7.5.1-Cas9) were generated by transduction of a lentiviral vector expressing Cas9 (pXPR_BRD111, Broad Institute). For *PRDX2* KO, Huh7.5.1-Cas9 cells were then transduced with lentiviruses expressing single guide RNA (sgRNA) CTRL targeting *GFP* (sgCTRL) or sgRNA targeting *PRDX2* designed by the Broad Institute. After 48 h, transduced cells were selected under hygromycin treatment (125 µg/ml). *PRDX2* KO was determined by Western blot analysis.

Proliferation assay: Huh-7.5.1 cells were reverse transfected with siRNA (siCTRL or si*PRDX2*) using Lipofectamine RNAi Max according to the manufacturer instructions. Three days later, cell proliferation was assessed using Click-iT® Edu Flow Cytometry kit according to the manufacturer instructions. Flow cytometry was performed using the CytoFLEX cytometer (Beckman Coulter) and analyses were performed with FlowJo Data analysis software (BD Biosciences).

Wound healing assay in Huh-7.5.1 and Hepa 1-6 cells: Huh-7.5.1-Cas9 and Hepa 1-6-Cas9 cells were seeded in complete DMEM at 37°C with 5% CO₂. Once attached the monolayer was scratched with a micropipette 1000µL tip. Cells were washed once with PBS to remove detached cells and incubated with DMEM supplemented with 1% heat-decomplemented FBS. Pictures were taken at 0 hour and 24 hours post-scratching with a camera-equipped microscope (Motic AE2000). Distance between wound edges was measured with Image J.

Invasion assay: Huh-7.5.1 cells were reverse transfected with siRNA against *PRDX2* or non-targeting siRNA using Lipofectamine RNAi Max according to the manufacturer instructions.

For invasion, 100 μ L of Cultrex Basement Membrane Extract at 3,33 mg/mL in serum free media was added to the upper chamber of transwell (Corning Costar Transwell cell culture inserts) and incubated at 37°C for 30 minutes. After the gel was formed, Huh-7.5.1 cells transfected with siCTRL or *siPRDX2* were suspended in serum free medium and 100 000 cells were transferred to transwell inserts. Then 600 μ L of complete medium was added to the lower chamber. After 24h of incubation at 37°C, the residual cells on the surface and the gel were removed. Then cells, were fixed in 70% ethanol and stained with 0,2% crystal violet. The invading cells were photographed with a camera-equipped microscope (Motic AE2000) and Colored Area was evaluated in five different fields using ImageJ.

Apoptosis assay: Huh-7.5.1-Cas9 and Hepa 1-6-Cas9 cells were seeded in complete DMEM at 37°C with 5% CO₂. Cells were then incubated with 300 μ M or 400 μ M H₂O₂ for 6h. Caspase-3 and 7 activation was detected by immunoblotting or using CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent following manufacturer's instructions and using Celigo Image Cytometer (Nexcelcom Biosciences).

Statistics.

For *in vivo* experiments, the sample size estimate was based on a p-value of 0.01 at 90% power assuming a 50% difference in means in tumor burden with 33% standard deviation between control and drug-treated animals. *In vitro* and *in vivo* data are presented with mean \pm SEM. Kruskal Wallis test, Mann-Whitney test or ANOVA test was performed after sample distribution was determined with Shapiro-Wilk normality test. All *in vitro* experiments were performed at least in triplicates and repeated 3 times. *In vivo* and *in vitro* experiments

considered as significant at $p < 0.05$. Statistical analyzes for in vitro and in vivo experiments were performed with GraphPad Prism 9 software.

Data Availability Statement

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within this Article and its Supplementary Information. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Dr Catherine Schuster (catherine.schuster@unistra.fr)

RESULTS

Peroxiredoxin 2 (PRDX2) is a molecular driver of the PLS predicting liver disease progression to cancer in patients.

To identify drivers of liver disease progression toward HCC development, we applied two complementary strategies (**Fig. 1a**). First, we used a genome-wide transcriptomic analyses of liver tissues of patient cohorts with advanced liver disease progressing to HCC¹⁰. Previously, a gene expression meta-analysis of 523 cirrhosis patients identified 31 co-regulatory gene modules associated with liver disease progression and HCC development¹⁰. Among these gene modules, we predicted 30 key drivers of HCC risk by using Key Driver Analysis (KDA) algorithm¹⁰ (**Table 1**).

Second, we applied our cPLS model system¹². DMSO-differentiated Huh7.5.1 (Huh7.5.1^{dif}) cells were subjected to persistent injury to model the clinical poor-prognosis PLS. Then, we performed integrative analyses of transcriptomes and proteomes and PLS driver prediction using AMARETTO algorithm (www.broadinstitute.org)^{16,24}. AMARETTO predicts disease driver genes by connecting known regulatory driver genes with co-expressed target genes that they control. Following computational and integrative pathway analyses, we identified 30 driver candidates of the cPLS predicting liver disease progression to HCC (**Table 2**).

The drivers were selected according to (1) high expression in liver tissues (2) association with liver disease in patients and (3) ability of the encoded protein to be targeted by drugs. We identified known pathways and drivers involved in liver disease progression toward HCC development such as the TNF α /NF κ B pathway (RELA, FOS, CREB5, TNF)^{25,26} the proto-oncogene C-Myc²⁷, histone modifiers (i.e., the Histone Deacetylase 9 (HDAC9))¹⁵, the IL6/STAT3 pathways¹⁶ and PPAR protein family (ACSL3, NR1H3, PPARA)²⁸, confirming

the validity of our approach (**Tables 1 and 2**). We also identified a previously unknown candidate driver for liver disease progression which is the peroxiredoxin 2 (PRDX2). PRDX2 is a soluble cellular and secreted enzyme which detoxifies peroxides, especially H₂O₂, generated during oxidative stress and regulates various physiological process and signaling pathways ²⁹. PRDX2 was also reported to promote tumor growth in colorectal and breast cancers ^{30,31}. Since its role in liver disease progression and HCC development is unknown, we further studied PRDX2 as a driver for hepatocarcinogenesis.

We investigated the clinical relevance of *PRDX2* in cancer development by expression analyses in patient cohorts. Analysis of PRDX2 expression at both transcriptomic and proteomic levels using publicly available data (Gene Expression Omnibus (GEO), The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Protein Atlas) revealed that PRDX2 expression is increased in tumor liver tissues (**Fig. 1b-c**). Interestingly, in previously identified 31 co-regulatory gene modules ¹⁰, *PRDX2* was identified as a key driver gene in the module n°8 ³², associated with HCC risk independent from cirrhosis, closely co-regulated with the central hub gene *HINT1* associated with HCC risk (**Fig. 1d**). Together, these results highlight a role of PRDX2 in carcinogenesis in patients ¹⁰.

We next investigated PRDX2 expression in the liver on the single cell level in two liver cell atlases ^{33,34}. We observed that *PRDX2* is expressed in different cell compartments, with the highest expression level in epithelial cells including hepatocytes, cholangiocytes and liver bipotent precursor cells (**Fig 1. e-g, Supplementary Fig. 1**). Of note, PRDX2 protein expression is increased in cancer cells compared to primary human hepatocytes (PHH), suggesting a functional role of PRDX2 in hepatocyte transformation and hepatocarcinogenesis (**Supplementary Fig. 2**) To further validate PRDX2 as a HCC driver, we performed loss of function studies using CRISPR/Cas9 technology in the cPLS model. Hepatocyte-like cells (DMSO-differentiated Huh7.5.1 cells) expressing the Cas9 endonuclease were injured using

persistent HCV infection, a well-described inducer of the poor-prognosis PLS associated with cancer risk¹². *PRDX2* was then knocked out using sgRNA transduction. As a readout, we used the reduced version of the PLS (**Supplementary Table 1**). The global induction or suppression of the PLS was determined by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using mock-infected cells as reference¹². As shown in **Fig. 1h**, *PRDX2* knock-out (KO) reversed the poor-prognosis cPLS associated with HCC risk (**Fig. 1h-i**), indicating a role of *PRDX2* in liver disease progression to cancer. Altogether, our results highlight a role of *PRDX2* in hepatocarcinogenesis.

***Prdx2* is a driver of metabolic liver disease progressing to cancer *in vivo*.**

To further investigate the functional role of *PRDX2* as a driver of carcinogenesis *in vivo*, we performed a liver-specific *Prdx2* KO in a Cas9 transgenic mouse model for hepatocarcinogenesis induced by a single dose of diethylnitrosamine (DEN) and a choline-deficient L-amino acid-defined high-fat diet (CDAHFD) (**Fig. 2a**).^{35–37} To generate the KO, we applied a single guide (sg) RNA validated for functional KO in mouse cell lines (**Supplementary Fig. 3**). *Prdx2* was specifically targeted in hepatocytes by combining a Cre-dependent expression of the Cas9 endonuclease in the liver and the hepatic delivery of sgRNA to hepatocytes using an adeno-associated virus 8 (AAV8) vector³⁸. *Prdx2* KO was confirmed by a decrease in total *PRDX2* protein expression (**Fig. 2b**) and a suppression of protein expression in hepatocytes (**Fig. 2c, Supplementary Fig. 4 for high magnification**). *PRDX2* positive islets are most likely untransduced cells (**Supplementary Fig. 4**). Immunostainings also showed an increase of total *PRDX2* expression in DEN/CDAHFD mouse livers, indicating a link with disease development (**Fig. 2b-c**). Liver weight and liver-to-body weight ratio were significantly decreased in *Prdx2* KO mice compared to sgCtrl mice (**Fig. 2d**). *Prdx2* KO had a marked effect on hepatocarcinogenesis: the KO decreased tumor burden, tumor size and cell

proliferation, as shown at macroscopic observations and by the decreased expression of the proliferation marker MCM2 (Minichromosome Maintenance Complex Component 2) (**Figs. 2c-d**). Importantly, *Prdx2* KO improved liver function as shown by serum albumin, liver enzymes and total bilirubin levels, confirming the absence of toxicity in mouse liver (**Fig. 2e**). The safety of *Prdx2* targeting in hepatocytes was also confirmed by the absence of toxicity in primary human hepatocyte, even under oxidative stress (**Supplementary Fig. 5**). We then assessed the effect of *Prdx2* KO on liver fibrosis and liver steatosis development. Collagen proportionate area (CPA), hydroxyproline quantification and assessment of fibrogenic gene expression (*Acta2*, *Coll1a*, *Tgfb-1* and *Timp1*) showed only a slight effect of *Prdx2* KO on liver fibrosis, indicating that targeting PRDX2 in hepatocyte has not major effect on fibrogenesis (**Figs. 2c and f**). Of note, *PRDX2* KD in LX2 hepatic stellate cells has no impact on fibrotic gene expression (**Supplementary fig. 6**). In contrast, we observed a marked decrease in liver lipid accumulation and lipid droplet size, indicating a key role of PRDX2 in steatosis development (**Figs. 2c and g**). High LDL cholesterol levels associated with hepatic steatosis were also decreased by *Prdx2* KO, further supporting a functional role for *Prdx2* in liver lipid metabolism (**Fig. 2h**). Taken together, these data demonstrate that targeting PRDX2 in vivo improves liver steatosis and prevent HCC development most likely independently from fibrosis.

***Prdx2* KO is involved in HCC development by regulating proliferative and pro-carcinogenic signaling pathways**

To decipher the mechanism of action, we performed RNA-Seq analysis of mouse liver tissues. GSEA analysis showed that *Prdx2* KO induces a significant suppression of pathways involved in carcinogenesis such as KRAS signaling, cell cycle, MAPK/ERK signaling, hypoxia, STAT3 and PI3K/AKT signaling (**Fig. 3a**)³⁹. Moreover, we observed a global decrease of inflammatory responses and an improvement of hepatic metabolism with a marked impact on bile acid and

lipid metabolism (**Fig. 3a**), in line with the decrease of liver steatosis observed in *Prdx2* KO mouse livers (**Fig. 2**). The impact of *Prdx2* KO on the key carcinogenic signaling pathways was confirmed at the protein level in mouse livers (**Fig. 3b**).

In accordance with our cell-based data (**Fig. 1**), analysis of the PLS in mouse livers showed that *Prdx2* KO reverses the PLS poor-prognosis status to a good-prognosis status, indicating that *Prdx2* KO reduces the HCC risk (**Fig. 3c**). HCC are usually classified into different subclasses, including proliferative and non-proliferative HCC^{40,41}. Interestingly, *Prdx2* KO induces a robust shift from HCC proliferative signatures to non-proliferative HCC signatures associated with a well-differentiated and less aggressive phenotype (**Fig. 3c**). In line with this finding, we observed a decrease in liver precursor cell markers in *Prdx2* KO mouse livers (**Supplementary Fig. 7**).

We therefore assessed the role of PRDX2 on hallmarks of cancer progression in hepatoma cell lines. As shown in **Fig. 3d-f**, *PRDX2* loss-of-function impairs cell proliferation (**Fig. 3d**) and is associated with reduced invasion (**Fig. 3e**) and migration (**Fig. 3f**) capacities of hepatoma cells. A less migrating cell phenotype was confirmed in the murine cancer cell line Hepa1.6 *Prdx2* KO (**Supplementary Fig. 8**). To further confirm the impact of PRDX2 on cancer cell proliferation *in vivo*, we assessed the effect of *PRDX2* KO on tumor growth in a cell line-derived xenograft (CDX) mouse model. Huh7.5.1 CTRL or Huh7.5.1 *PRDX2* KO cells were subcutaneously injected into non-obese diabetic Rag1^{-/-} IL2Rgc^{-/-} (NRG) mice. *PRDX2* KO markedly decreased tumor growth, with 3 out of 10 *PRDX2* KO mice not showing any tumor formation (**Fig. 3g**). Altogether, these data demonstrate that PRDX2 is a driver of hepatocarcinogenesis and cancer progression.

***PRDX2* KO restores apoptosis in cancer cells**

PRDX2 is known to be involved in the regulation of oxidative stress and apoptosis by detoxifying peroxides²⁹. We therefore hypothesized that targeting *PRDX2* in cancer cell may also restore cell sensitivity to oxidative stress and programmed cell death. Indeed, Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay on mouse livers also revealed a higher number of apoptotic cells in the tumor of *Prdx2* KO mice (**Fig. 4a-b**). Furthermore, Western blot analysis and fluorescent assay showed that *PRDX2* KO leads to an increase of activated caspase 3 levels induced by H₂O₂ (**Fig.4 c-d and Supplementary Fig. 9**). The results were confirmed in Hepa1.6 *Prdx2* KO cells (**Supplementary Fig. 10**). Together, these data indicate that *PRDX2* may prevent cancer cells apoptosis upon oxidative stress and that targeting *PRDX2* helps to restore programmed cell death in tumors.

***Prdx2* KO improves hepatic liver metabolism by restoring AMPK function.** Metabolic syndrome and fat accumulation are risk factors for HCC and several studies have suggested that improvement of lipid metabolism could be beneficial to cancer prevention and treatment⁴²⁻⁴⁴. RNA-Seq data showed that *Prdx2* KO improves bile acid and lipid metabolism and reduces inflammatory responses in the liver of the NASH/HCC mice, which may indicate another HCC preventive function of *PRDX2*. The AMP-Activated Protein Kinase (AMPK), the primary sensor of cellular energy, is the gatekeeper of hepatic metabolism and makes the bridge between inflammation and lipid metabolism. Moreover, AMPK function is often impaired in metabolic liver disease and liver cancer⁴⁵⁻⁴⁷. We therefore hypothesized that AMPK activity is impaired in DEN/CDAHFD, and that *Prdx2* KO may restore AMPK functions. Indeed, immunoblot analysis of mouse livers confirmed that activating phosphorylation of the AMPK α (the catalytic subunit), is decreased in CDAHFD *Ctrl* animals and restored in *Prdx2* KO mice (**Fig. 5a**). Mechanistic studies in Huh7.5.1 model showed that *PRDX2* KO increases AMPK α activation

upon lipid accumulation and oxidative stress mediated by oxidized LDL (oxLDL) compared to *CTRL* cells (**Fig. 5b**).

Activation of AMPK in mouse livers translates into an increase in beta oxidation of fatty acids associated with an increase in lipid export and transport (**Fig. 5c**). Moreover, *Prdx2* KO increases the expression of key genes involved in lipid transport and cholesterol efflux (the Scavenger Receptor Class B Member 1, *Scarb1*, and the ATP binding cassette *Abca1*) and biliary excretion of cholesterol (*Abcg8*, *Abcg5*)⁴⁸ (**Fig. 5d**) supporting the decreased lipid accumulation in hepatocytes (**Fig. 2**). Altogether, these results indicate that PRDX2 impairs liver metabolic functions in metabolic liver disease through the inhibition of the AMPK⁴⁹. Targeting PRDX2 may therefore be a candidate approach to improve liver function in NAFLD/NASH to prevent HCC development (**Fig. 5e**).

DISCUSSION

HCC is a major public health burden for which we have only unsatisfactory therapeutic options⁵⁰. In recent years, the incidence of metabolic liver diseases is exponentially increasing and changing the etiological landscape of HCC^{2,50,51}. Here, we identified PRDX2 as a candidate target for prevention of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease. This conclusion is supported by the following findings: (i) PRDX2 expression is involved in carcinogenesis and HCC development in patients (ii) PRDX2 is a driver of the poor-prognosis PLS associated with HCC risk and survival in patients (iii) targeting PRDX2 prevents HCC development by regulating proliferative and pro-carcinogenic pathways, and by restoring apoptosis in cancer cells (iv) targeting PRDX2 in vivo decreases liver steatosis and improves hepatic metabolic functions by restoring AMPK activity.

Previously, other in vitro studies have suggested that PRDX2 may have a pro-tumorigenic role in liver^{52,53}. However, the role of PRDX2 in HCC development is controversial⁵⁴. Here, by

combining transgenic mouse model, specific KO in hepatocytes and cell-based models, we demonstrated that PRDX2 mediates carcinogenesis through a dual mechanism of action. First, by regulating oxidative stress, PRDX2 is involved in activation of procarcinogenic signaling and protects cancer cells from apoptosis. Second, PRDX2 inhibits AMPK, a master regulator of multiple hepatic metabolic pathways including glucose and lipid metabolisms. Multiple studies have shown that AMPK function is impaired in obesity, metabolic syndromes, and NASH^{45,55,56}. Furthermore, activated AMPK is a negative regulator of oxidative stress and cell proliferation by activating transcription factor FOXO3⁵⁷ and promoting p53 activity⁵⁸. Multiple studies showed that AMPK impaired activity correlates with tumoral development in different cancers including lung, colorectal cancer and HCC^{59,60}. Restoring AMPK function has therefore been suggested as a HCC chemopreventive strategy^{45,46,61,62}. Here, we show that targeting PRDX2 in hepatocytes is safe, restores AMPK functions but also directly target cancer cells. It is of interest to note that *Prdx2* KO prevents HCC independently from liver fibrosis. Since 38% of HCCs develop on non-fibrotic liver in NAFLD patients³, this finding may open new perspectives for the development of HCC chemopreventive strategies in NAFLD patients. Our data also indicate that PRDX2 is directly involved in carcinogenesis and cancer progression. These data suggest that PRDX2 may be a candidate target for established HCC.

Collectively, PRDX2 is a previously undiscovered driver and therapeutic target for metabolic liver disease and prevention of HCC – a rising unmet medical need world-wide.

Acknowledgments:

We thank Prof. R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Germany) for providing plasmids for production of HCVcc Jc1 strains, Dr. F. Chisari (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) for the gift of Huh7.5.1 cells. We acknowledge the molecular biology and virus service of IGBMC (Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, France, for the construction and production of rAAV vectors, the histopathology, clinical chemistry and hematology platforms of ICS (Institut Clinique de la Souris), Illkirch, France for mouse analyses.

Author contributions:

T. F. B. and C.S initiated and coordinated the study. E.C., E.S., L.M., M.H, T.F.B, C.S. designed experiments and analyzed the data. E.C., E.S., L.M., M.A.O., C.P., N.B., M.P., D.H, and J.H, performed experiments, and/or analyzed data. H.E.S, F.J., J.M., N.F., S.Z. and F.A.R. performed bioinformatic analyses. N.P and Y.H performed and supervised the computational analyzes. L.M supervised animal experiments. E.F and P.P provided patient liver tissues. E.C, E.S, L.M., C.S, T.F.B wrote the manuscript.

Funding: This work was supported by the European Union (ERC-AdG-2014-671231-HEPCIR to T.F.B. and Y.H., EU H2020-667273-HEPCAR to T.F.B. and M.H., ANRS, Paris (2013/108 and ECTZ103701 to T.F.B), ARC Foundation Paris and IHU Strasbourg (TheraHCC2.0 IHUARC2019 to T.F.B.), the National Institutes of Health (DK099558 to Y. H. and CA233794 to Y.H. and T. F. B; CA209940, R21CA209940 and R03AI131066 to N.P. and T.F.B.), the Foundation of the University of Strasbourg (HEPKIN to T. F. B. and Y. H.) and the Institut Universitaire de France (IUF; T. F. B.). M.H. is supported by an ERC CoG grant

(HepatoMetaboPath) and EOS grant and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) –Project-ID 272983813 – TRR 179, and Project-ID 314905040 SFB TR209. This work has been published under the framework of the LABEX ANR-10-LABX-0028_HEPSYS and Inserm Plan Cancer and benefits from funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program.

Competing financial interests

The University of Strasbourg, Inserm, the IHU Strasbourg and Mount Sinai Hospital have filed a patent application on the clinical gene signature-based human cell culture model and uses thereof with Y. H. and T. F. B as inventors (WO 2016174130 A1) which has been licensed to Alentis Therapeutics, Basel, Switzerland. T. F. B is founder, advisor and equity holder in Alentis Therapeutics. Y. H. holds equity in Alentis Therapeutics. The other authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J. & Kamath, P. S. Burden of liver diseases in the world. *J. Hepatol.* **70**, 151–171 (2019).

2. Villanueva, A. Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **380**, 1450–1462 (2019).
3. Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O. & Heikenwalder, M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 411–428 (2019).
4. Finn, R. S. *et al.* Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **382**, 1894–1905 (2020).
5. Athuluri-Divakar, S. K. & Hoshida, Y. Generic chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1440**, 23–35 (2019).
6. Goossens, N. *et al.* Non-alcoholic Steatohepatitis is Associated with Increased Mortality in Obese Patients Undergoing Bariatric Surgery. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **14**, 1619–1628 (2016).
7. Hoshida, Y. *et al.* Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1995–2004 (2008).
8. Hoshida, Y. *et al.* Prognostic Gene-Expression Signature for Patients with Hepatitis C-Related Early-Stage Cirrhosis. *Gastroenterology* **144**, 1024–1030 (2013).
9. King, L. Y. *et al.* A genomic and clinical prognostic index for hepatitis C-related early-stage cirrhosis that predicts clinical deterioration. *Gut* **64**, 1296 (2015).
10. Nakagawa, S. *et al.* Molecular Liver Cancer Prevention in Cirrhosis by Organ Transcriptome Analysis and Lysophosphatidic Acid Pathway Inhibition. *Cancer Cell* **30**, 879–890 (2016).
11. Ono, A. *et al.* Persisting risk of hepatocellular carcinoma after HCV cure monitored by a liver transcriptome signature. *Hepatol. Baltim. Md* **66**, 1344–1346 (2017).
12. Crouchet, E. *et al.* A human liver cell-based system modeling a clinical prognostic liver signature for therapeutic discovery. *Nat. Commun.* **12**, 5525 (2021).
13. Crouchet, E., Schuster, C. & Baumert, T. F. Liver cell circuits and therapeutic discovery for advanced liver disease and cancer. *C. R. Biol.* **344**, 233–248 (2021).
14. Molecular Diagnostics Laboratory.
<https://www.utsouthwestern.edu/education/medical-school/departments/pathology/diagnostic-subspecialties/clinical-pathology/molecular-diagnostics-laboratory.html>.
15. Jühling, F. *et al.* Targeting clinical epigenetic reprogramming for chemoprevention of metabolic and viral hepatocellular carcinoma. *Gut* (2020) doi:10.1136/gutjnl-2019-318918.
16. Lupberger, J. *et al.* Combined Analysis of Metabolomes, Proteomes, and Transcriptomes of Hepatitis C Virus-Infected Cells and Liver to Identify Pathways Associated With Disease Development. *Gastroenterology* **157**, 537-551.e9 (2019).
17. Roessler, S. *et al.* A Unique Metastasis Gene Signature Enables Prediction of Tumor Relapse in Early Stage Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cancer Res.* **70**, 10202–10212 (2010).

18. Juehling, F. *et al.* Targeting clinical epigenetic reprogramming for chemoprevention of metabolic and viral hepatocellular carcinoma. *Gut* **70**, 157–169 (2021).
19. Pietschmann, T. *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7408–7413 (2006).
20. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).
21. Hoshida, Y. Nearest Template Prediction: A Single-Sample-Based Flexible Class Prediction with Confidence Assessment. *PLOS ONE* **5**, e15543 (2010).
22. Reich, M. *et al.* GenePattern 2.0. *Nat. Genet.* **38**, 500–501 (2006).
23. Zolotukhin, S. *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* **6**, 973–985 (1999).
24. Champion, M. *et al.* Module Analysis Captures Pancancer Genetically and Epigenetically Deregulated Cancer Driver Genes for Smoking and Antiviral Response. *EBioMedicine* **27**, 156–166 (2018).
25. Nakagawa, H. *et al.* ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* **26**, 331–343 (2014).
26. Park, E. J. *et al.* Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell* **140**, 197–208 (2010).
27. Liu, P. *et al.* A functional mTORC1 signaling is indispensable for c-Myc driven hepatocarcinogenesis. *Hepatology, Baltim. Md* **66**, 167–181 (2017).
28. Feng, J. *et al.* Simvastatin re-sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by inhibiting HIF-1 α /PPAR- γ /PKM2-mediated glycolysis. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **39**, 24 (2020).
29. Nicolussi, A., D’Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G. & Coppa, A. The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol. Clin. Oncol.* **6**, 139–153 (2017).
30. Peng, L. *et al.* Peroxiredoxin 2 is associated with colorectal cancer progression and poor survival of patients. *Oncotarget* **8**, 15057–15070 (2017).
31. Stresing, V. *et al.* Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene* **32**, 724–735 (2013).
32. Calvisi, D. F. *et al.* SKP2 and CKS1 promote degradation of cell cycle regulators and are associated with hepatocellular carcinoma prognosis. *Gastroenterology* **137**, 1816–1826.e1–10 (2009).
33. Aizarani, N. *et al.* A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* **572**, 199–204 (2019).

34. Ramachandran, P. *et al.* Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single cell level. *Nature* **575**, 512–518 (2019).
35. Li, S. *et al.* Pioglitazone Reduces Hepatocellular Carcinoma Development in Two Rodent Models of Cirrhosis. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* **23**, 101–111 (2019).
36. Pinyol, R. *et al.* Molecular characterisation of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **75**, 865–878 (2021).
37. Wolf, M. J. *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* **26**, 549–564 (2014).
38. Platt, R. J. *et al.* CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* **159**, 440–455 (2014).
39. Hoshida, Y., Fuchs, B. C. & Tanabe, K. K. Prevention of hepatocellular carcinoma: potential targets, experimental models, and clinical challenges. *Curr. Cancer Drug Targets* **12**, 1129 (2012).
40. Hoshida, Y. *et al.* Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **69**, 7385–7392 (2009).
41. Chiang, D. Y. *et al.* Focal Gains of Vascular Endothelial Growth Factor A and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **68**, 6779–6788 (2008).
42. Ioannou, G. N. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 84–95 (2016).
43. Snaebjornsson, M. T., Janaki-Raman, S. & Schulze, A. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab.* **31**, 62–76 (2020).
44. Alannan, M., Fayyad-Kazan, H., Trézéguet, V. & Merched, A. Targeting Lipid Metabolism in Liver Cancer. *Biochemistry* **59**, 3951–3964 (2020).
45. Zhao, P. *et al.* An AMPK–caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis. *Science* **367**, 652–660 (2020).
46. Garcia, D. *et al.* Genetic Liver-Specific AMPK Activation Protects against Diet-Induced Obesity and NAFLD. *Cell Rep.* **26**, 192–208.e6 (2019).
47. Li, Y. *et al.* AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice. *Cell Metab.* **13**, 376–388 (2011).
48. Van Rooyen, D. M. *et al.* Hepatic Free Cholesterol Accumulates in Obese, Diabetic Mice and Causes Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **141**, 1393–1403.e5 (2011).
49. Zmijewski, J. W. *et al.* Exposure to Hydrogen Peroxide Induces Oxidation and Activation of AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **285**, 33154–33164 (2010).

50. Younossi, Z. M. & Henry, L. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *JHEP Rep.* **3**, 100305 (2021).
51. Terrault, N. A. & Pageaux, G.-P. A changing landscape of liver transplantation: King HCV is dethroned, ALD and NAFLD take over! *J. Hepatol.* **69**, 767–768 (2018).
52. Kwon, T. *et al.* Peroxiredoxin II Is Essential for Maintaining Stemness by Redox Regulation in Liver Cancer Cells. *STEM CELLS* **34**, 1188–1197 (2016).
53. Han, Y.-H. *et al.* Peroxiredoxin II Inhibits Alcohol-induced Apoptosis in L02 Hepatocytes Through AKT/ β -Catenin Signaling Pathway. *Anticancer Res.* **40**, 4491–4504 (2020).
54. Bai, B. *et al.* Peroxiredoxin2 downregulation enhances hepatocellular carcinoma proliferation and migration, and is associated with unfavorable prognosis in patients. *Oncol. Rep.* **41**, 1539–1548 (2019).
55. Gauthier, M.-S. *et al.* Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 382–387 (2011).
56. Jeon, S.-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* **48**, e245 (2016).
57. Greer, E. L. *et al.* The Energy Sensor AMP-activated Protein Kinase Directly Regulates the Mammalian FOXO3 Transcription Factor *. *J. Biol. Chem.* **282**, 30107–30119 (2007).
58. Jones, R. G. *et al.* AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* **18**, 283–293 (2005).
59. Carretero, J. *et al.* Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer. *Oncogene* **26**, 1616–1625 (2007).
60. Cheng, J. *et al.* AMP-Activated Protein Kinase Suppresses the In Vitro and In Vivo Proliferation of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* **9**, e93256 (2014).
61. Esquejo, R. M. *et al.* Activation of Liver AMPK with PF-06409577 Corrects NAFLD and Lowers Cholesterol in Rodent and Primate Preclinical Models. *EBioMedicine* **31**, 122–132 (2018).
62. Fujiwara, N., Friedman, S. L., Goossens, N. & Hoshida, Y. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. *J. Hepatol.* **68**, 526–549 (2018).

FIGURES AND LEGENDS:

Fig. 1.

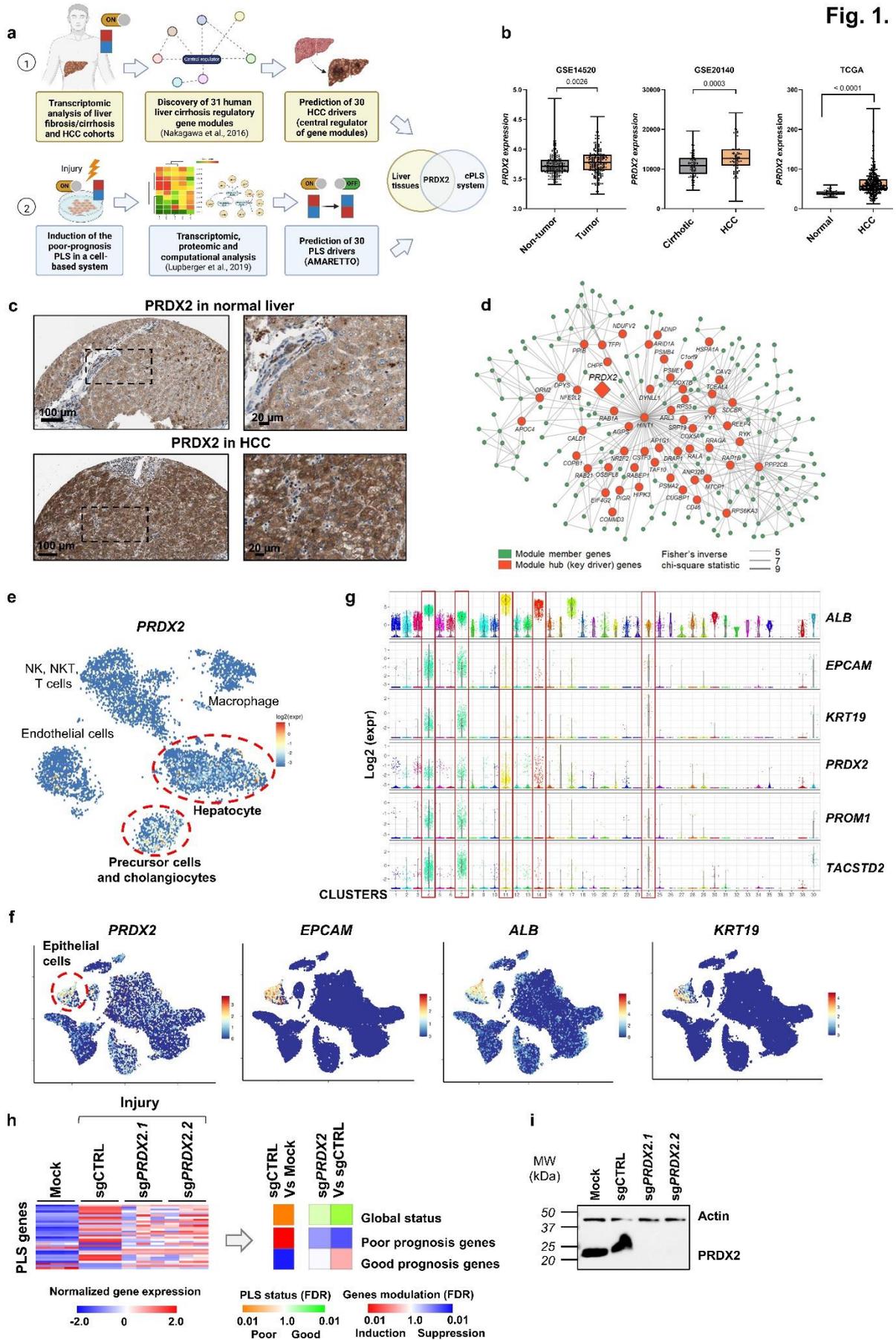


Fig. 1: Peroxiredoxin 2 (PRDX2) is a driver of liver disease progression and HCC. a. Drivers prediction. 1. Genome wide transcriptome studies of fibrotic/cirrhotic and HCC patient liver tissues. 2. Analysis of the cPLS system. **b-c.** Analysis of PRDX2 expression in liver tissues of clinical cohorts with various liver disease etiologies at transcriptomic (Gene Expression Omnibus, GEO; The Cancer Genome Atlas, TCGA) (b) and proteomic level (c) (The Human Protein Atlas). **d.** Co-regulatory cirrhosis gene module associated with elevated HCC risk in cirrhotic patients¹⁰. Gene co-regulatory networks are visualized for the module member. Width of the edges indicate magnitude of co-regulation (co-expression). **e-f.** t-SNE map of single-cell transcriptomes from patient liver tissue highlighting the main liver cell compartments. Data extracted from^{33,34}. Cells sharing similar transcriptome profiles are grouped by clusters and each dot represents one cell. The color bar indicates log₂ normalized expression. **g.** Violin plots showing PRDX2 in the different liver cell clusters (ALB = mature hepatocytes; EPCAM = marker of epithelial and progenitor cells; KRT19 = marker of cholangiocytes; PROM1 and TACSTD2 = marker of progenitor cells). **h.** KO of *PRDX2* in the cPLS system reverses the poor-prognosis PLS induced by persistent HCV infection. Left panel: **Detailed PLS gene expression profiles (32 gene signature) are shown.** Heatmaps show the mean expression of the genes normalized to housekeeping genes (z scores of log₂ normalized data). Right panel: simplified heatmaps showing the PLS global status (**top**) and the global variation of the PLS poor- and good-prognosis genes (**bottom**). **i.** Validation of *PRDX2* KO by Western blot analysis.

Fig. 2.

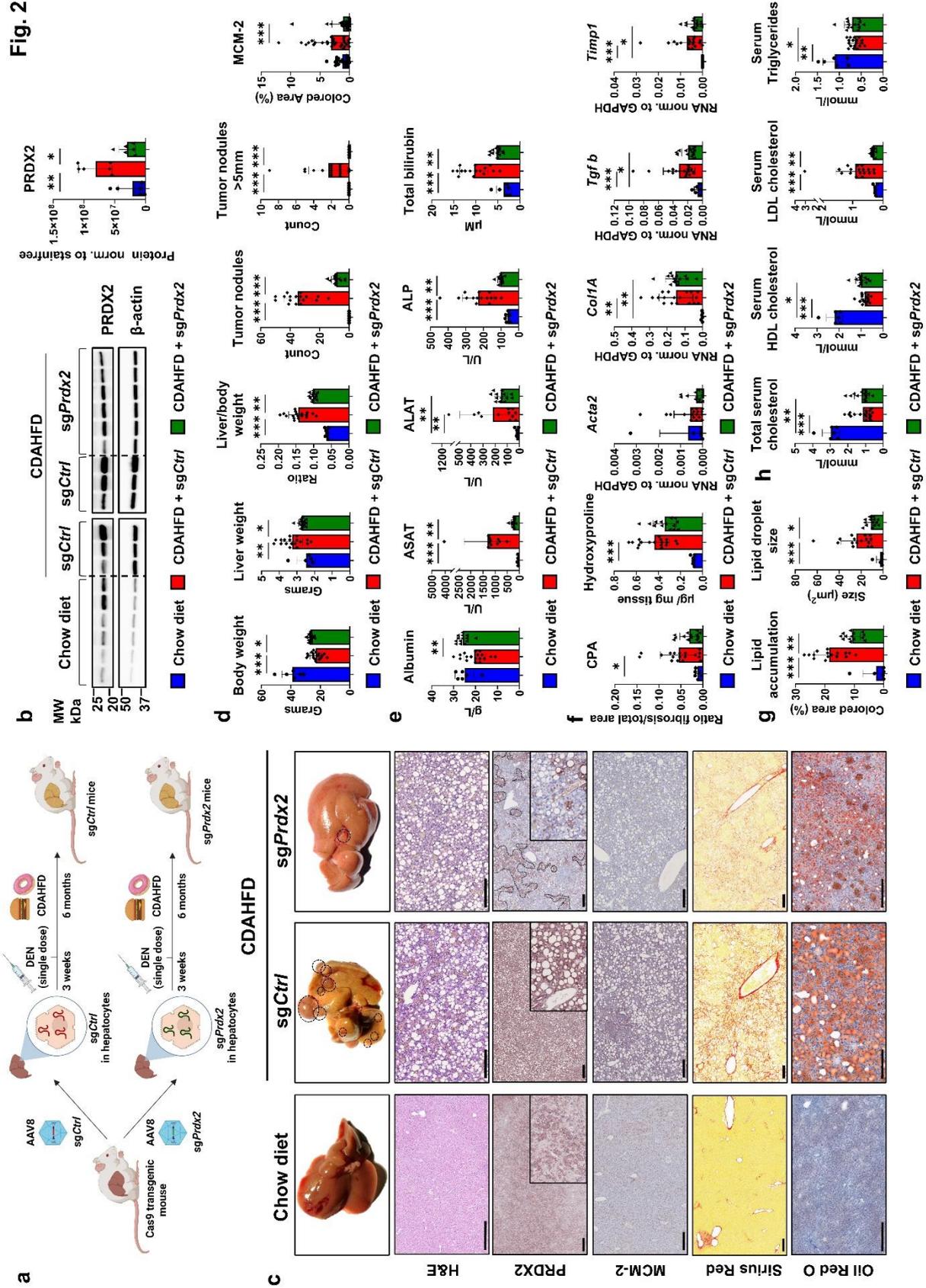


Fig. 2: *Prdx2* KO improves liver steatosis and prevents HCC development **a.** AlbCre-Cas9 mice were injected with an AAV8 vector coding for a *Ctrl* or a *Prdx2*-specific sgRNA (*sgPrdx2*). Liver disease was induced by single dose DEN injection and CDAHFD (Chow diet $n = 6$, *sgCtrl* $n = 18$, *sgPrdx2* $n = 14$). **b.** Western blot analysis of PRDX2 in mouse liver tissues. Graphs show means \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Kruskal Wallis). **c-d.** *Prdx2* KO prevents HCC development *in vivo*. (c) Representative morphometric analysis and H&E. Black dotted circles represent outlined tumor nodules. Body weight, liver weight and liver-to-body weight ratios, the number of surface tumor nodules were reported in (d). *Prdx2* KO in hepatocyte was validated by IHC and KO areas are depicted by a dotted line. Original magnification $\times 5$ and $\times 40$ (hepatocytes) Cell proliferation was assessed by the IHC evaluation of the proliferation marker MCM-2 and reported in (d). Graphs show means \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). Liver slices were stained with Sirius Red or Oil Red (Scale bar $200\mu\text{m}$). **e.** Analysis of liver function by measurement of ASAT, ALAT, ALP, and total bilirubin. Graphs show means \pm SD, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). **f.** Fibrosis stage was evaluated through quantification of CPA of Sirius red staining performed in (c), hydroxyproline quantification and by fibrotic gene expression (RT-qPCR). Graphs show means \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). **g.** Lipid accumulation and lipid droplet size were evaluated through quantification of Oil Red staining performed in (c). Graphs show means \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). **h.** Serum lipid profiles analysis. Graphs show means \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis).

Fig. 3.

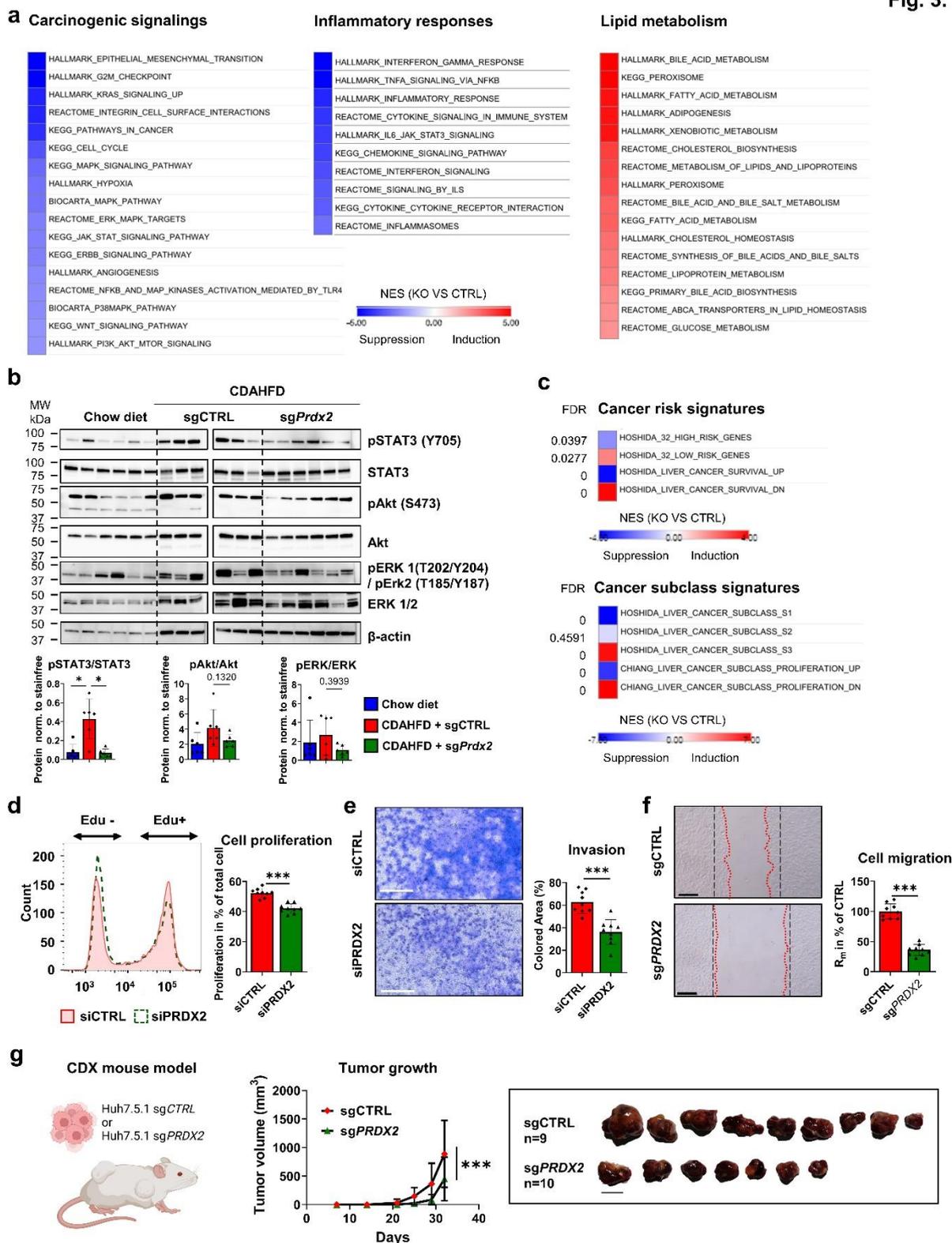


Fig. 3: Prdx2 KO is involved in HCC development by regulating proliferative and pro-carcinogenic signaling pathways **a.** *Prdx2* KO suppresses cancer-related pathways, decreases liver inflammation and improves liver metabolism. RNA-Seq analysis of mouse liver tissues. Heatmaps show NES for each key pathway in *Prdx2* KO mice (n=3) compared to CTRL mice (n=3) FDR < 0.05. **b.** Western-blot analysis of p-STAT3 (Y705), STAT3, phospho-Akt (S473), Akt, phospho-Erk1(T202/Y204) / Erk2 (T185/Y187) and Erk1/2 in mouse livers. Data integration was performed using Image Lab software. Graphs show means +/- SD, * p<0.05 (Kruskal Wallis). **c.** Heatmaps show NES for each signature in *Prdx2* KO mice (n=3) compared to CTRL mice (n=3) FDR are indicated for each panel. **d-f.** PRDX2 loss-of-function decreases cell proliferation, migration and invasion (d) Proliferation was assessed by Edu assay (e) Invasion was assessed using transwell inserts coated with Basement membrane extract. (f) Migration was assessed by wound healing assay. Graphs show means +/- SD, *** p<0.001 (Unpaired t-test). Scale bar: 200µm **g.** *Prdx2* KO inhibits tumor growth in a CDX mouse model. Huh-7.5.1 sgCTRL or sgPRDX2 cells were subcutaneously injected in immunodeficient NRG mice. Tumoral development was assessed by repeated measure of tumor size and representative morphometric analysis of the tumors is shown. Scale bar: 1cm. Graphs show means +/- SD in relation to time. *** p<0.001 (Repeated measure ANOVA)

Fig. 4.

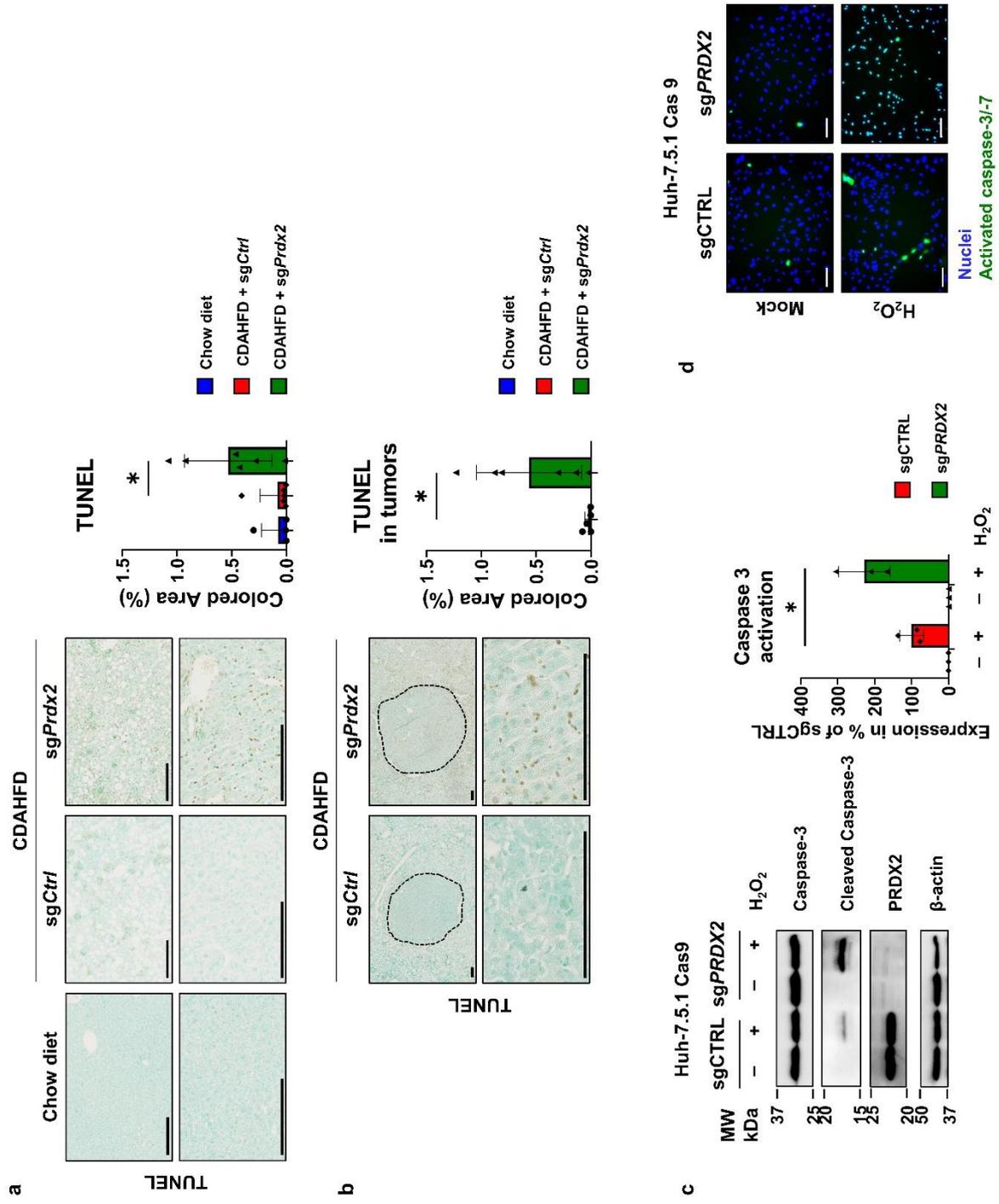


Fig. 4. PRDX2 protects cancer cell from apoptosis. a-b. Apoptosis was evaluated in mouse liver using TUNEL assay. Scale bar: 200 μ m. a. Apoptosis was evaluated in full liver slice using Image J. Graphs show mean \pm SD, * $p < 0.05$ (One way- ANOVA). b. Apoptosis was evaluated in each tumor using Image J and the mean of colored area in the tumors of each mouse was determined. Graphs show mean \pm SD, * $p < 0.05$ (Mann-Whitney). **c-d.** Huh-7.5.1 were treated with 300 μ M H_2O_2 . **c.** Western blot analysis of Caspase-3 and Cleaved Caspase-3. Data integration was performed using Image Lab software. Graph shows means \pm SD, * $p < 0.05$ (Student t-test). **d.** Activated caspase 3 and 7 were detected in cells using CellEvent® Caspase-3/7 detection reagent. Scale bar: 200 μ m.

Fig. 5.

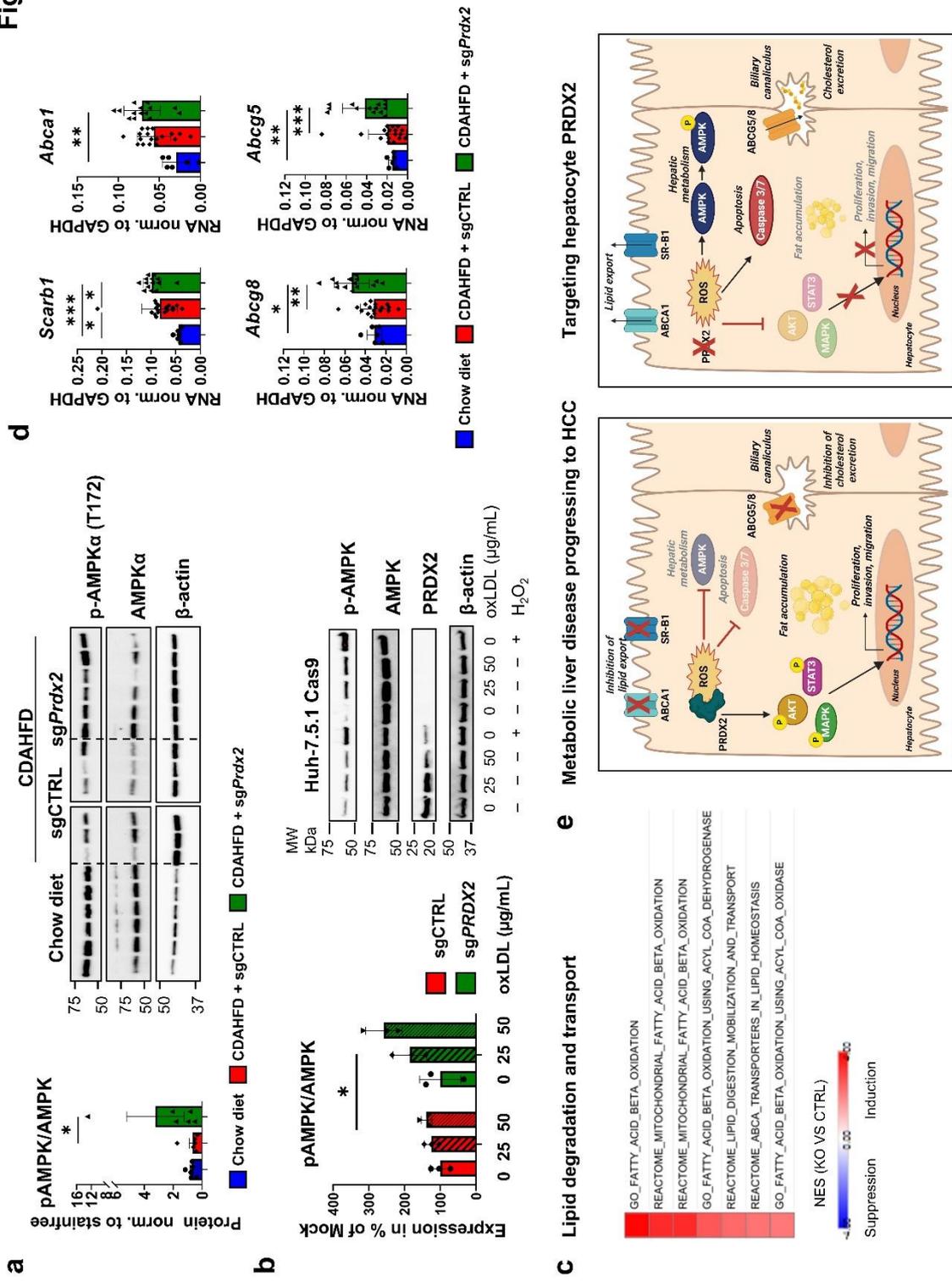


Fig. 5: PRDX2 KO improves lipid metabolism through restoration of AMPK functions. **a.** *Prdx2* KO induces AMPK α activation. Western-blot analysis of p-AMPK- α (T172) and total AMPK- α in mice liver tissues. Graph shows means \pm SD, * $p < 0.05$ (Kruskal Wallis) **b.** Huh-7.5.1 sgCTRL or sgPRDX2 were treated with oxLDL for 24 hours. Western-blot analysis of pAMPK- α (T172) and AMPK- α protein levels in Huh-7.5.1 *PRDX2* KO or *CTRL* cells treated with oxidated LDL (oxLDL) to mimick NASH. Data integration was performed using Image Lab software. Graph shows mean \pm SD * $p < 0.05$ (Student t-test). **c.** *Prdx2* KO increases lipid degradation and export in vivo. Heatmaps show NES for each key pathway in *Prdx2* KO mice (n=3) compared to CTRL mice (n=3) FDR < 0.05. **d.** Expression of genes involved in cholesterol uptake and efflux: *Scarb1*, *Abca1*, *Abcg5*, *Abcg8* (RT-qPCR). Graphs show means \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal Wallis). **e.** Mechanism of action: PRDX2 drives hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease by regulating key pathways involved in cell proliferation, migration and survival and impairing AMPK activity which drives lipid accumulation. Targeting PRDX2 in hepatocyte is therefore a novel target to prevent and treat HCC in metabolic liver disease.

Table 1:**HCC candidate drivers**

Gene ID	Gene Symbol	Description
2181	ACSL3	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
1050	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein alpha
8824	CES2	Carboxylesterase 2
8655	DYNLL1	Dynein light chain LC8-type 1
2064	ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
2167	FABP4	Fatty acid binding protein 4
10447	FAM3C	Family with sequence similarity 3 member C
2773	GNAI3	G protein subunit alpha i3
3162	HMOX1	Heme oxygenase 1
3586	IL10	Interleukin 10
3596	IL13	Interleukin 13
3553	IL1B	Interleukin 1 beta
3565	IL4	Interleukin 4
3569	IL6	Interleukin 6
3643	INSR	Insulin receptor
26227	PHGDH	Phosphoglycerate dehydrogenase
5465	PPARA	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
5479	PPIB	Peptidylprolyl isomerase B
5516	PPP2CB	Protein phosphatase 2 catalytic subunit beta
7001	PRDX2	Peroxiredoxin 2
5721	PSME2	Proteasome activator subunit 2
5898	RALA	RAS like proto-oncogene A
5970	RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit
6193	RPS5	Ribosomal protein S5
291	SLC25A4	Solute carrier family 25 member 4
4088	SMAD3	SMAD family member 3
6696	SPP1	Secreted phosphoprotein 1
6720	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
7035	TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
7124	TNF	Tumor necrosis factor

Table 1. HCC candidate drivers based on integrative computational analyses: Prediction of candidate drivers of liver disease and HCC using genome wide transcriptomic studies of liver tissues of patients with advanced liver disease. ⁴

Table 2:
cPLS candidate drivers

Gene ID	Gene Symbol	Description
197	AHSG	Alpha 2-HS glycoprotein
467	ATF3	Activating transcription factor 3
727	C5	Complement C5
1017	CDK2	Cyclin dependent kinase 2
1054	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein gamma
9586	CREB5	cAMP responsive element binding protein 5
1543	CYP1A1	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1
144455	E2F7	E2F transcription factor 7
2353	FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
3171	FOXA3	Forkhead box A3
9734	HDAC9	Histone deacetylase 9
3399	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, HLH protein
182	JAG1	Jagged 1
3716	JAK1	Janus kinase 1
9448	MAP4K4	Mitogen -activated protein kinase kinase kinase kinase 4
4282	MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
4609	MYC	V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
10062	NR1H3	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3
9971	NR1H4	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 4
10891	PPARGC1A	PPARG coactivator 1 alpha
7001	PRDX2	Peroxiredoxin 2
5915	RARB	Retinoic acid receptor beta
11186	RASSF1	Ras association domain family member 1
5971	RELB	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit
4093	SMAD9	SMAD family member 9
6594	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1
6659	SOX4	SRY-box 4
6774	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
7105	TSPAN6	Tetraspanin 6
79862	ZNF669	Zinc finger protein 669

Table 2. Cellular PLS candidate drivers: Prediction of candidate drivers of poor prognosis liver signature in Huh-7.5.1^{dif} cells using genome wide transcriptomic and proteomic studies followed by computational and integrative pathway analyses (AMARETTO) ^{5,6}.

Peroxiredoxin 2 is a driver of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease

Emilie Crouchet*¹, Eugénie Schaeffer*¹, Frank Jühling¹, Hussein El Saghire¹, Naoto Fujiwara⁵, Shija Zhu⁵, Fahmida Akter Rasha⁵, Julien Moehlin¹, Marine A Oudot¹, Clara Ponsolles¹, Nicolas Brignon¹, Sarah C Durand¹, Marie Parnot¹, Nourdine Hamdane¹, Danijela Heide², Jenny Hetzer², Mathias Heikenwälder², Emanuele Felli^{1,3,4}, Patrick Pessaux^{1,3,4}, Nathalie Pochet^{5,6}, Yujin Hoshida⁷, Laurent Maily¹, Thomas F. Baumert^{§1,3}, Catherine Schuster^{§1}.

¹Université de Strasbourg, Inserm, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques UMR_S1110, Strasbourg, France; ²Division of Chronic Inflammation and Cancer, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany; ³Service d'hépatogastroentérologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁴Institut hospitalo-universitaire (IHU), Institute for Minimally Invasive Hybrid Image-Guided Surgery, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ⁵Broad Institute of Harvard and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA; ⁶Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; ⁷Liver Tumor Translational Research Program, Simmons Comprehensive Cancer Center, Division of Digestive and Liver Diseases, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX

* These authors contributed equally

§ corresponding authors

Supplementary material

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS:

Primary human hepatocytes (PHH): PHH were isolated from patient liver obtained from liver disease patients undergoing liver resection with informed consent from all patients for de-identified use at the Center for Digestive and Liver Disease of the Strasbourg University Hospitals University of Strasbourg, France (DC-2016-2616 and RIPH2 LivMod IDRCB 2019-A00738-49, ClinicalTrial NCT04690972). The protocols were approved by the local Ethics Committee of the University of Strasbourg Hospitals. All material was collected during a medical procedure strictly performed within the frame of the medical treatment of the patient. Informed consent is provided according to the Declaration of Helsinki. Detailed patient information and informed consent procedures are implemented by the Strasbourg University Hospital Biological Resources Center (HUS CRB). Patients were given an information sheet which outlines that their left-over biological material that was collected during their medical treatment is requested for research purposes. PHH were isolated as described³³. Briefly, liver specimens were perfused for 15 minutes with calcium-free 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid buffer containing 0.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (Fluka) followed by perfusion with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid containing 0.5 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich) and 0.075% CaCl₂ at 37°C for 15 min. Then the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and nonviable cells were removed by Percoll® (Sigma-Aldrich) gradient centrifugation. PHH were then seeded on collagen type I coated plates (Corning®) in complete William Medium.

Cells: Hepa1.6 were purchased from ATCC and were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-decomplemented fetal bovine serum (FBS), gentamycin (0.05 mg/mL) and non-essential amino acids (complete DMEM) at 37°C with 5% CO₂ (complete DMEM). Hepa 1-6-Cas9 cells were cultured in complete Dulbecco's Modified

Eagle Medium (DMEM) supplemented with blasticidin (8 μ g/mL). All cell lines were certified mycoplasma free.

Cell viability assay: Primary human hepatocytes were reverse transfected with siRNA against *PRDX2* or non-targeting siRNA using Lipofectamine RNAi Max according to the manufacturer instructions. For cell viability assay, cells were treated with 300 μ M of H₂O₂ for 6 hours. Cell viability was assessed by an MTT test.

SUPPLEMENTARY TABLES:**Supplementary table 1:****Reduced PLS gene list**

Poor-prognosis genes		
Gene ID	Gene Symbol	Description
3983	ABLIM1	Actin binding LIM protein 1
1293	COL6A3	Collagen, type VI, alpha 3
9170	EDG4	Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-protein-coupled
1950	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogast)
2043	EPHA4	EPH receptor A4
2326	FMO1	Flavin containing monooxygenase 1
2488	FSHB	Follicle stimulating hormone beta polypeptide
2877	GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
3680	ITGA9	Integrin , alpha 9
4316	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
23397	NCAPH	Non-SMC condensin I complex, subunit H
4843	NOS2A	Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)
4922	NTS	Neurotensin
5593	PRKG2	Protein kinase, cGMP-dependent type II
23029	RBM34	RNA binding motif protein 34
5055	SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2
6456	SH3GL2	SH3-domain GFB2-like 2
6672	SP100	SP100 nuclear antigen
7204	TRIO	Triple functional domain (PTPRF interacting)
Good-prognosis genes		
6296	ACSM3	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
151	ADRA2B	Adrenergic, alpha-2B- receptor
223	ALDH9A1	Aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1
3612	IMPA1	Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1
5207	PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1
5313	PKLR	Pyruvate kinase, liver and RBC
5502	PPP1R1A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A
5691	PSMB3	Proteasome (promosome, macropain) subunit, beta type, 3
5771	PTPN2	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
6018	RLF	Rearranged L-myc fusion
9252	RPS6KA5	Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 5
27346	TMEM97	Transmembrane protein 97
7276	TTR	Transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I)
Housekeeping genes		
506	ATP5B	ATP synthase F1 subunit beta
7917	BAT3	BAG cochaperone 6
1351	COX8A	Cytochrome c oxidase subunit 8A
3094	HINT1	Histidine triad nucleotide binding protein 1
3181	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
4695	NDUFA2	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A2

Supplementary Table 1 (related to Fig. 1H). Reduced PLS gene list. The reduced version of the PLS comprising 32 genes bioinformatically defined and validated in multiple patient cohorts. Gene list was extracted from²⁵.

Supplementary Table 2: Reagent and resources

Oligonucleotides used for gene expression assay			
Species	Gene	5'-3' Sequence	
		Forward	Reverse
Mouse	<i>Abca1</i>	5'-AACAGTTTGTGGCCCTTTTG-3'	5'-AGTTCCAGGCTGGGGTACTT-3'
	<i>Gapdh</i>	5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG-3'
	<i>Prdx2</i>	5'-GGGCCACGCATAAAAGGTTC-3'	5'-CCATGACTGCGTGAGCAAGA-3'
	<i>Abcg5</i>	Mm00446241_m1 (ThermoFischer)	
	<i>Abcg8</i>	Mm00445980_m1 (ThermoFischer)	
	<i>Acat2</i>	Mm00782408_s1 (ThermoFischer)	
	<i>Acta2</i>	Mm00725412_s1 (ThermoFischer)	
	<i>ApoA1</i>	Mm00437569_m1 (ThermoFischer)	
	<i>ApoC3</i>	Mm00445670_m1 (ThermoFischer)	
	<i>ApoE</i>	Mm01307193_g1 (ThermoFischer)	
	<i>Colla1</i>	Mm00801666_g1 (ThermoFischer)	
	<i>Gapdh</i>	Mouse Gapdh Control Mix 4351309 (Life Technology)	
	<i>Hmgcr</i>	Mm01282499_m1 (ThermoFischer)	
	<i>Lxra</i>	Mm00443451_m1 (ThermoFischer)	
	<i>Scarb1</i>	Mm00450234_m1 (ThermoFischer)	
	<i>Tgfb1</i>	Mm01178820_m1 (ThermoFischer)	
<i>Timp1</i>	Mm01341361_m1 (ThermoFischer)		
Oligonucleotides for mouse <i>Prdx2</i> sgRNA cloning in pLenti-guide puro			
Target	5'-3' Sequence		
CTRL	5'-CACCGGTGAACCGCATCGAGCTGA-3'	5'-AAACTCAGCTCGATGCGGTTACC-3'	
<i>Prdx2-1</i>	5'-CACCGTCCGATTTGCGCGTTGCCGG-3'	5'-AAACCCGGCAACGCGCAAATCGGAC-3'	
<i>Prdx2-2</i>	5'-CACCGGCTCCGGCAACGCGCAAAT-3'	5'-AAACATTTGCGCGTTGCCGGAGGCC-3'	
<i>Prdx2-3</i>	5'-CACCGCAACGCGCAAATCGGAAAGT-3'	5'-AAACACTTCCGATTTGCGCGTTGC-3'	

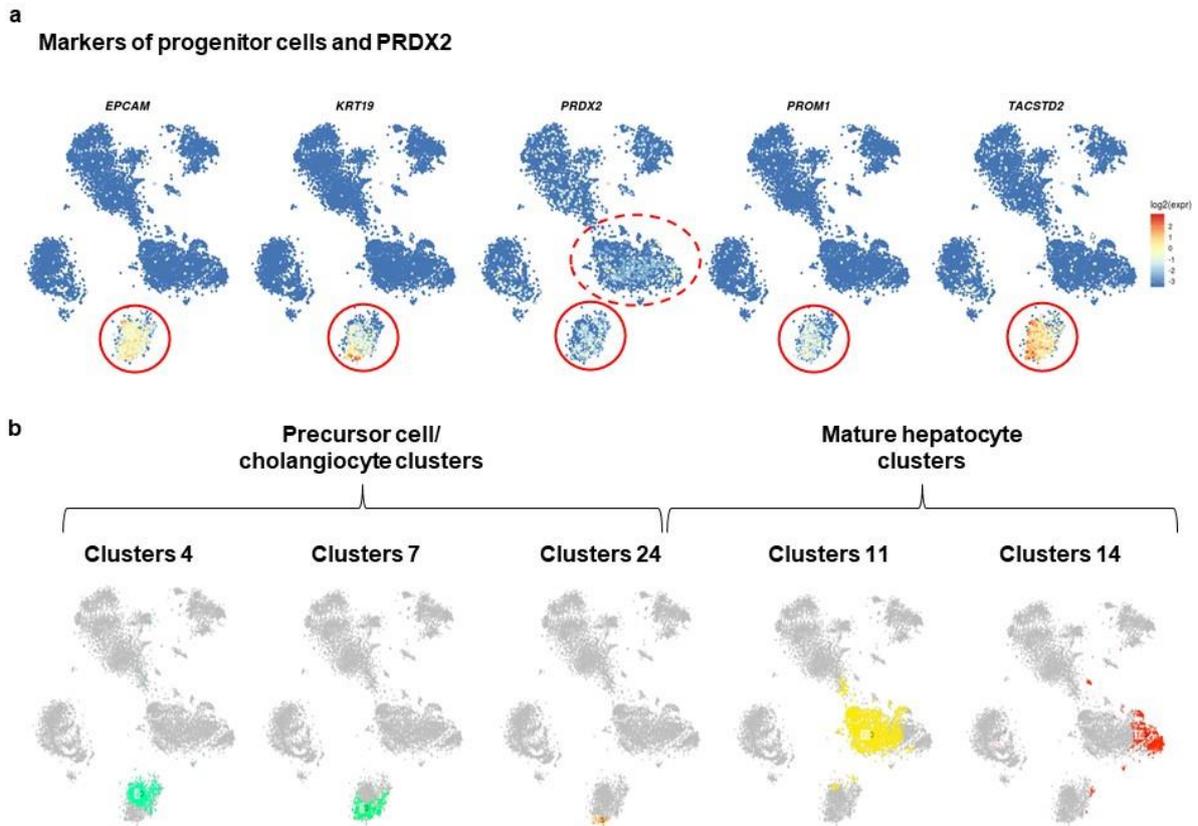
sgRNA sequence for <i>PRDX2</i> sgRNA cloning in pLenti-guide hygro			
Target	5'-3' Sequence		
CTRL	5'-GGTGAACCGCATCGAGCTGA-3'		
<i>PRDX2-1</i>	5'-GTGAAGCTGTCGGACTACAA-3'		
<i>PRDX2-2</i>	5'-GGCGCCATCAACCACCGCTG-3'		
siRNA used for silencing experiment			
Name	Source	Reference	
ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool	Dharmacon	Cat#D-001810-10-20	
ON-TARGETplus Human PRDX2 siRNA - SMARTpool,	Dharmacon	Cat#L-008178-01-0005	
Antibody used for immunohistochemistry			
Target	Host	Reference	Dilution
PRDX2	Rabbit	10545-2-AP ProteinTech	1:400
MCM-2	Rabbit	Ab240933 Abcam	1:500
Antibody used for immunoblotting			
Target	Host	Reference	Dilution
ACAT2	Rabbit	A304-293A Bethyl Laboratories	1:2000
Akt (pan)	Rabbit	4691 Cell Signaling	1:1000
AMPK α	Rabbit	2532 Cell signaling	1:1000
CRISPR/Cas9	Mouse	C15200216-100 Diagenode	1 :5000
Caspase 3	Rabbit	9662 Cell Signaling	1:1000
Cleaved caspase 3 (Asp175)	Rabbit	9661 Cell Signaling	1:1000
Erk (1/2)	Mouse	MAB1576 R&D systems	1:1000
Histone 3	Rabbit	Ab1791 Abcam	1:5000
HMGCR	Rabbit	Ab174830 Abcam	1:1000
Phospho Akt (Ser473)	Rabbit	4058 Cell Signaling	1:1000
Phospho AMPK α (Thr172)	Rabbit	2535 Cell Signaling	1:1000
Phospho Erk1(Thr202/Tyr204) /Erk2(Thr185/Tyr187)	Rabbit	AF1018 R&D systems	1:2000

Phospho STAT3 (Tyr705)	Rabbit	9145 Cell Signaling	1:2000
PRDX2	Rabbit	LS-C312979 LSBio	1:1000
STAT3	Rabbit	4904 Cell Signaling	1:2000
β -actin	Mouse	A5441 Sigma-Aldrich	1:2000
β -tubulin	Rabbit	GTX101279 GeneTex	1:1000
rabbit IgG conjugated to HRP	Goat	111-035-144 Jackson-immunoresearch	1:10 000
mouse IgG conjugated to HRP	Sheep	NA931 GE Healthcare	1:5000
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins			
Name	Source		Reference
Absolute Ethanol	VWR Chemicals		Cat#20821330
Cultrex Basement Membrane Extract	R&D systems		Cat# 3432-005-01
DMSO	Sigma-Aldrich		Cat#41640
H ₂ O ₂	Merck		Cat#1.07209.0250
Clarity WB ECL reagent	Biorad		Cat#170-5061
TRIzol	ThermoFischer Scientific		Cat#15596026
Lipofectamine RNAi Max	Invitrogen		Cat#13778-150
Protease inhibitor EDTA free	Roche		Cat#11873580001
Phosphatase inhibitor cocktail 2	Sigma-Aldrich		Cat#P5726
Phosphatase inhibitor cocktail 3	Sigma-Aldrich		Cat#P0044
Hematoxylin	Biognost		Cat#HEMH-OT
Hematoxylin QS	Vector		Cat#H-3404
Eosin	Merck		Cat#1.17081.1000
PicroSirusRed Direct Red 80	Sigma-Aldrich		Cat#365548
OilRed O	Merck		Cat#1.05230.0025
Oxidized LDL	Invitrogen		Cat#L34357
DEN	Sigma-Aldrich		Cat#N0756
iScript TM RT-qPCR Sample Preparation Reagent	Biorad		Cat#170-5061
Hoechst	Invitrogen		Cat#C10337G

Critical Commercial Assays		
Name	Source	Reference
Corning Costar Transwell cell culture inserts	Corning	Cat#CLS3464-48EA
CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent	Invitrogen	Cat#C10423
TUNEL Assay kit HRP-DAB	Abcam	Cat#ab206386
Bright Glo™ Luciferase Assay System	Promega	Cat#E2650
OptiMEM	Gibco	Cat#31985-062
Vectastain Mouse	Vector	Cat#PK-6102
Vectastain Rabbit	Vector	Cat#PK-6101
Cell fractionation Kit-Standard	Abcam	Cat#ab109719
Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit	Invitrogen	Cat#C10425
Hydroxyproline Assay kit	Sigma Aldrich	Cat#MAK-0008

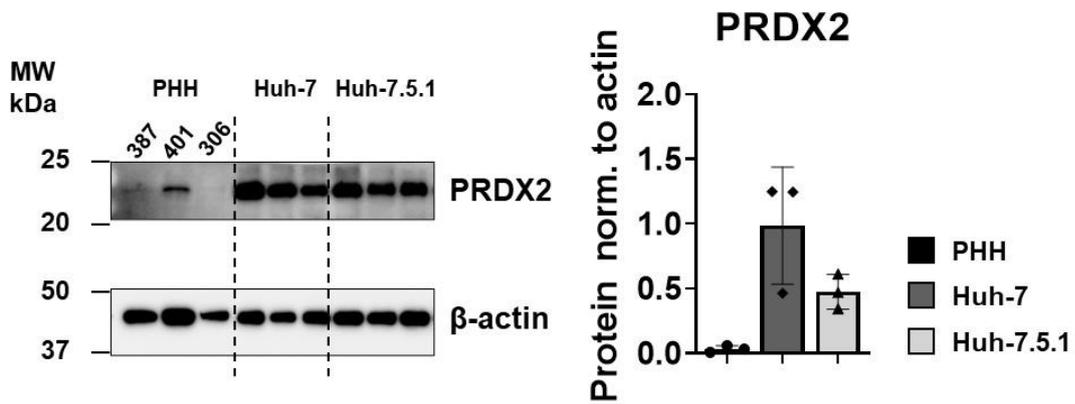
SUPPLEMENTARY FIGURES:

Supplementary Fig 1



Supplementary Fig1 (related to Fig 1g): **a.** t-SNE map of single-cell transcriptomes from patient liver tissue highlighting the main liver cell compartments. Data extracted from³³. Cells sharing similar transcriptome profiles are grouped by clusters and each dot represents one cell. Expression t-SNE map of EPCAM, KRT19, PRDX2, PROM1 and TACSTD2 are shown. The color bar indicates log₂ normalized expression. **b.** t-SNE map showing the different cell clusters presented in figure 1g.

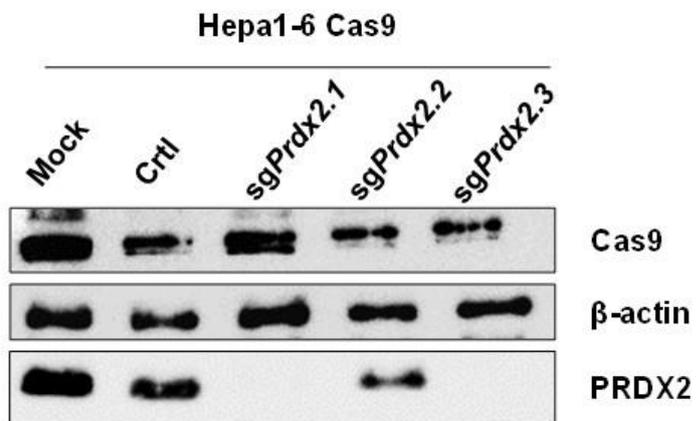
Supplementary Fig 2



Supplementary Fig. 2 (related to Fig. 1): PRDX2 expression in PHH and HCC cell line.

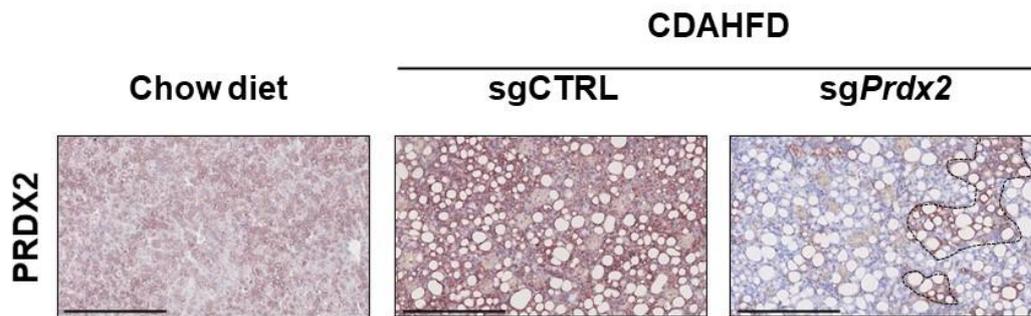
Western blot analysis of PRDX2 expression in PHH, Huh-7 and Huh-7.5.1 cells. Graph shows means \pm SD.

Supplementary Fig. 3



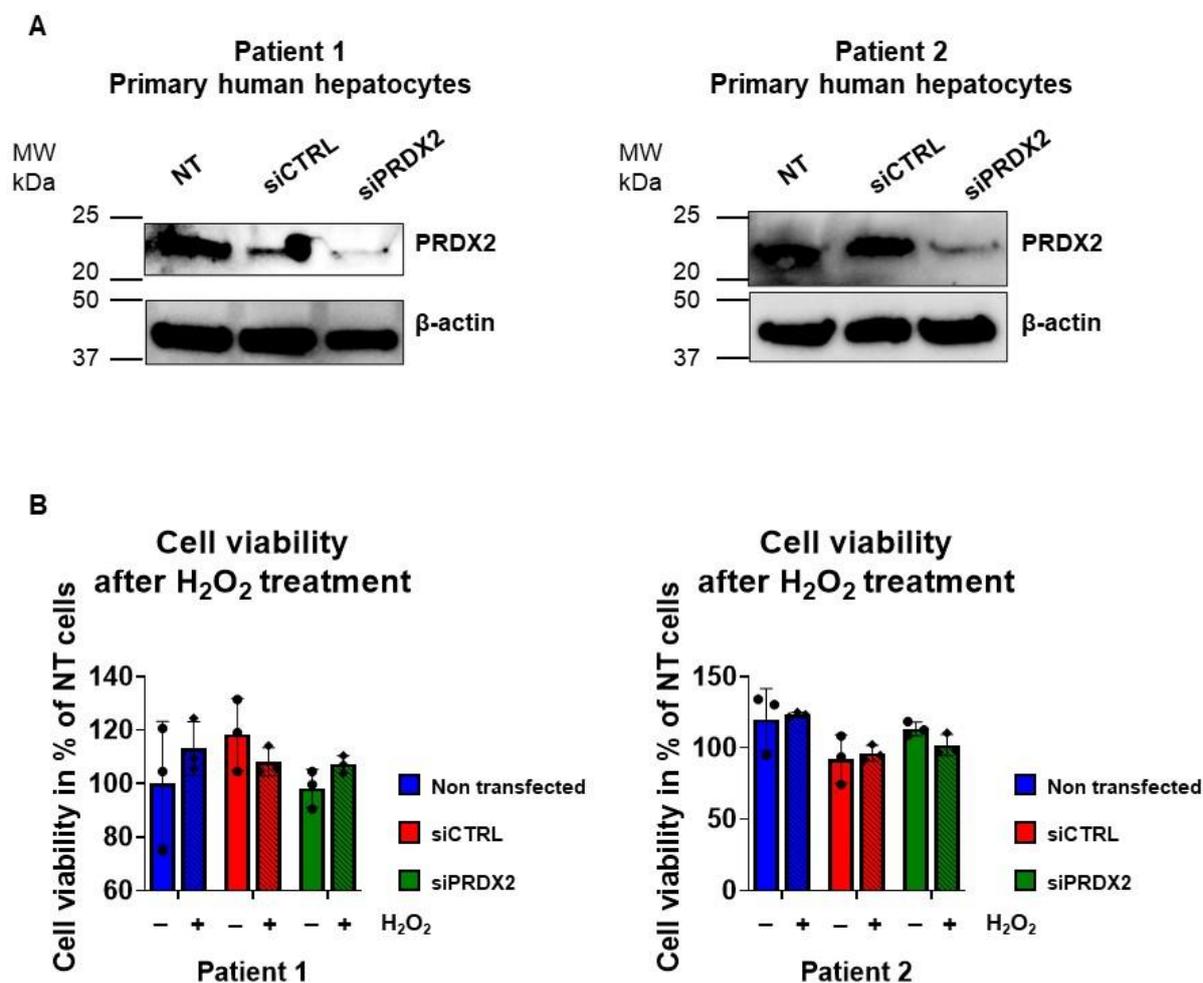
Supplementary Fig. 3 (related to Fig. 2A). *Prdx2* KO in Hepa 1-6 Cas9 cells. *Prdx2* KO was performed in Hepa 1-6 Cas9 cells using lentivirus coding for a control (sgCTRL) or a *Prdx2*-specific sgRNA (sg*Prdx2*-1, sg*Prdx2*-2, sg*Prdx2*-3). PRDX2 knock-out was verified by Western-blot analysis.

Supplementary Fig. 4



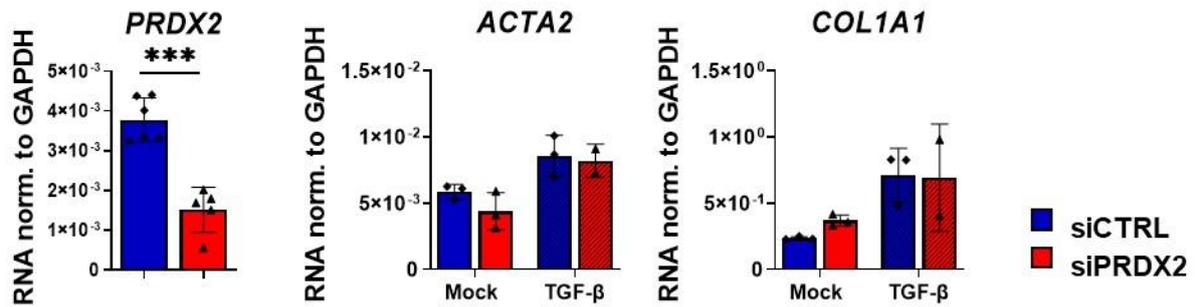
Supplementary Fig. 4 (related to Fig. 2C). *Prdx2* KO in mice hepatocytes. AlbCre-Cas9 mice were injected with an AAV8 vector coding for a control (sgCTRL) or a *Prdx2*-specific sgRNA (sg*Prdx2*). *Prdx2* KO in hepatocyte was validated by IHC. Dotted line delimits area non-transduced by the AAV8 on the corresponding panel. Pictures are magnified 4X compared to **Fig. 2C**. Scale bar 200 μ m

Supplementary Fig. 5



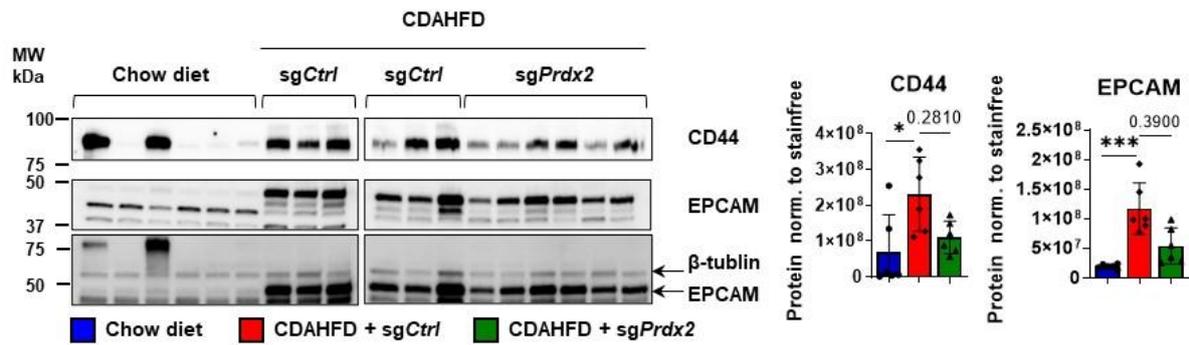
Supplementary Fig. 5 (related to Fig. 2). *PRDX2* knock-down in primary human hepatocytes has no cytotoxic effect. Primary human hepatocytes (PHH) were reverse transfected with siRNA against *PRDX2* or non-targeting siRNA using Lipofectamine RNAi Max according to the manufacturer instructions. For viability assay, PHH were treated with 300 μ M of H₂O₂ for 6 hours. **A.** Western blot analysis of *PRDX2* expression in PHH. **B.** Cell viability was assessed by an MTT test. Graph shows means \pm SD.

Supplemental Fig. 6



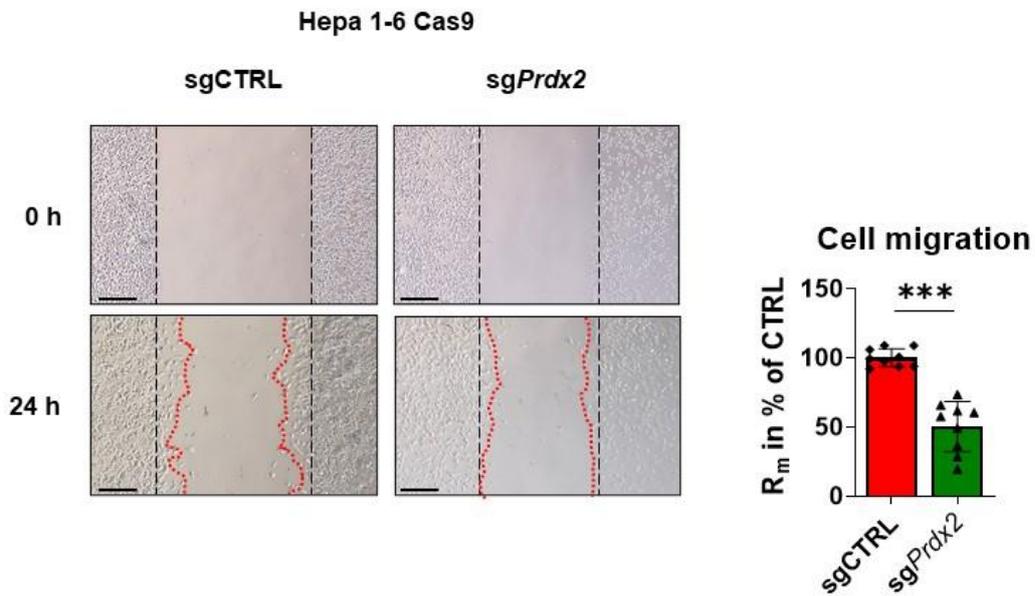
Supplementary Fig. 6 (related to Fig. 2): LX2 cells were reverse transfected with siRNA against *PRDX2* or non-targeting siRNA using Lipofectamine RNAi Max according to the manufacturer instructions. 72h post-transfection, LX2 cells were treated with 10 ng.mL⁻¹ of TGF-β for 24h. Expression of *PRDX2* and markers of LX2 activation *ACTA2* and *COL1A1* (RT-qPCR). Graphs show means +/- SD, * p>0.05 (Unpaired t-test)

Supplementary Fig. 7



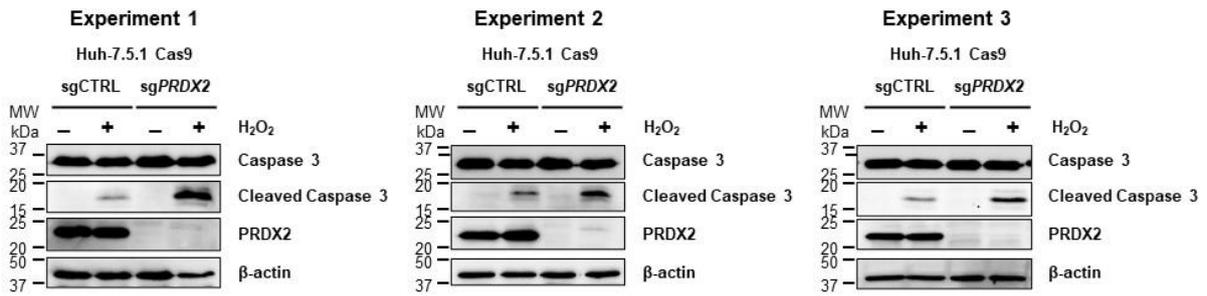
Supplementary Fig. 7 (related to Fig. 3): PRDX2 supports precursor markers expression *in vivo*. Western blot analysis of CD44 and EPCAM expression in mice liver tissues. Graphs show means \pm SD, * p < 0.05, *** p < 0.001 (Kruskal Wallis).

Supplementary Fig. 8



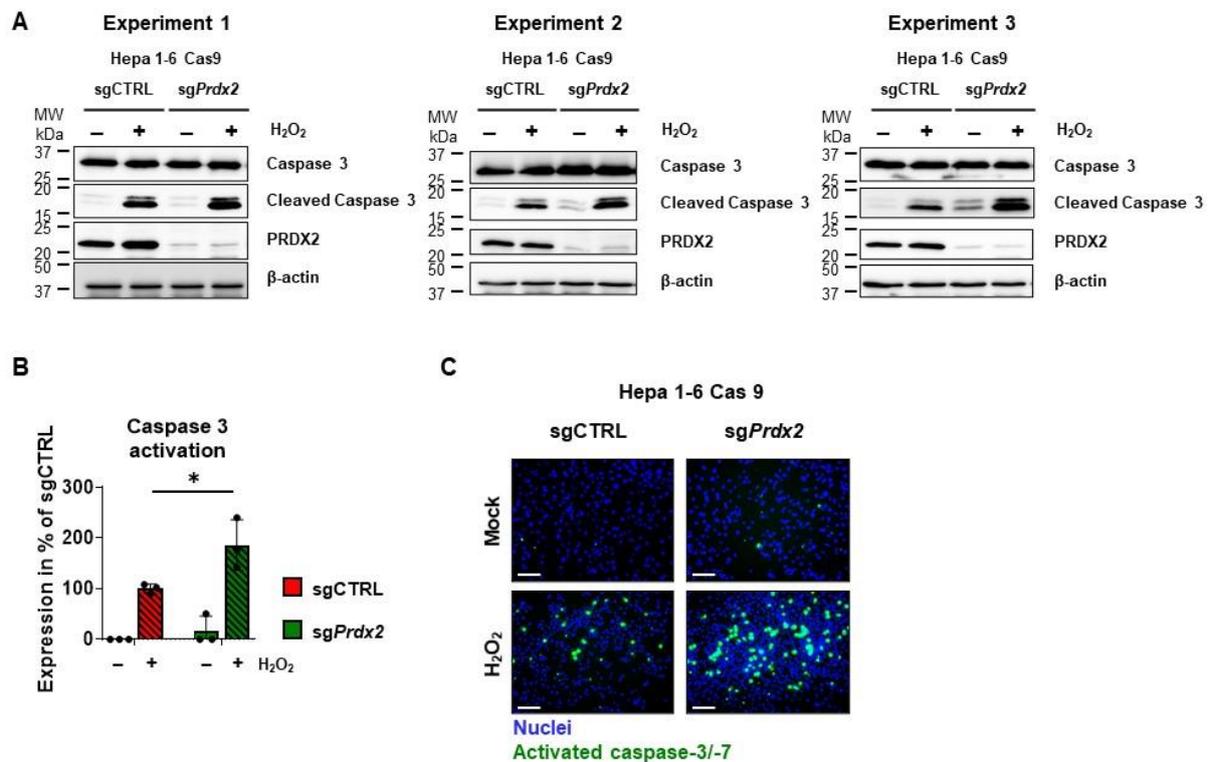
Supplementary Fig. 8 (related to Fig. 3E). *Prdx2* KO impairs Hepa 1-6 cell migration. Cell migration was assessed by wound healing assay. Scar width was measured after 24 hours using ImageJ and migration rate (R_m) was determined. Scale bar: 200 μm , black dotted lines show the limit of the initial scar, red dotted lines show edge of the wound after 24 hours. Graphs show means \pm SD, *** $p < 0.001$ (Unpaired t-test).

Supplementary Fig. 9



Supplementary Fig. 9 (related to Fig. 4C-D). *PRDX2* KO cells are more sensitive to oxidative stress. Huh-7.5.1 Cas9 sgCTRL or sgPRDX2 cells were treated with 300 μ M of H₂O₂ for 6 hours. Expression of caspase 3 and cleaved caspase 3 was verified by Western-blot analysis. Data integration was performed using Image Lab software. Three different experiments are showed.

Supplementary Fig. 10



Supplementary Fig. 10 (related to Fig. 4). *PRDX2* KO cells are more sensitive to oxidative stress **A.** Hepa 1-6 Cas9 sgCTRL or sgPrdx2 were treated with 400 μ M H₂O₂ for 6 hours. Expression of caspase 3 and cleaved caspase 3 was verified by Western-blot analysis. Data integration was performed using Image Lab software. Graph shows mean \pm SD of 3 independent experiments performed in triplicates, * $p < 0.05$ (Student t-test) in **(B)**. **C.** Activated caspase 3 and 7 were detected in cells using CellEvent® Caspase-3/7 detection reagent. Scale bar: 200 μ m

DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons identifié PRDX2 comme cible thérapeutique potentielle pour le traitement des maladies hépatiques chroniques et la prévention du CHC. De plus, nous avons confirmé dans le système cPLS, que l'extinction de l'expression de *PRDX2* dans les cellules hépatocytaires différenciées Huh-7.5.1^{diff} reverse la PLS de mauvais pronostic associée au risque de CHC et à la survie des patients. Par ailleurs, dans un modèle murin de maladie chronique du foie et de CHC induit par l'injection de DEN combiné à un régime CDAHFD (modèle murin de NASH), nous avons observé que l'inactivation de *Prdx2* permet de diminuer la stéatose, d'améliorer la fonction hépatique et de prévenir le développement du CHC en rétablissant en particulier l'activité de l'AMPK. Enfin, des expériences d'extinction de l'expression de PRDX2 dans des cellules hépatocytaires, révèle que PRDX2 est impliquée dans différents processus tumoraux tels que la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion et la résistance à l'apoptose induite par un stress oxydatif.

I PRDX2 régulateur du métabolisme hépatique

1) PRDX2 inhibe l'activité de l'AMPK

Notre étude démontre que PRDX2 joue un rôle important dans le métabolisme hépatique. Nous avons observé que le KO de *Prdx2* améliore le métabolisme hépatique en restaurant l'expression et l'activité de l'AMPK. L'AMPK est le régulateur principal de plusieurs voies métaboliques hépatiques, notamment le métabolisme du glucose et des lipides. Les observations faites dans le modèle murin de maladie chronique du foie et de CHC induit par l'injection de DEN combiné à un régime CDAHFD sont cohérentes avec les différentes études qui démontrent que l'activité de l'AMPK est altérée chez les patients souffrant d'obésité, de diabète, de syndrome métabolique et de NASH (Gauthier *et al.*, 2011; Jeon, 2016; Zhao *et al.*, 2020). Chez les patients obèses l'altération de l'activité de l'AMPK est également impliquée dans la résistance hépatique à l'insuline qui participe au développement et à la progression de la NAFLD (Gauthier *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012). En plus de son rôle dans la maladie métabolique hépatique, l'AMPK est aussi impliquée dans le développement du CHC. En effet, Zheng *et al.*, 2013 ont observé dans une cohorte de plus de 250 patients ayant développé un CHC, qu'une faible activation de l'AMPK est corrélée à des caractéristiques clinico-pathologiques agressives et à un mauvais pronostic (Zheng *et al.*, 2013).

Par ailleurs, différentes études démontrent que l'AMPK semble être également une cible prometteuse pour le traitement de la NAFLD et de la NASH. Garcia et collaborateurs ont utilisé

un modèle murin d'obésité et de NAFLD induit par un régime HFD et démontré que l'activation de l'AMPK spécifiquement dans le foie permet de protéger de l'obésité, de diminuer la stéatose, de reprogrammer le métabolisme lipidique en inhibant la synthèse *de novo* de lipides et en favorisant la β -oxydation des acides gras, ainsi que de diminuer l'expression des gènes associés à la fibrose et à l'inflammation. De manière intéressante, ils démontrent que l'activation de l'AMPK permet non seulement de prévenir le développement de la NAFLD et l'obésité mais aussi de traiter et inhiber la progression de l'obésité et de la NAFLD induites par le régime alimentaire (Garcia *et al.*, 2019). Il est à noter que le modèle murin utilisé dans cette étude, le modèle HFD, est différent de celui que nous avons utilisé. L'une des caractéristiques de ce modèle est que les résultats varient en fonction de la souche murine utilisée et de la composition du régime. Les souris nourries avec un régime HFD de manière *ad libitum* développent les signes histopathologiques précoces de la maladie hépatique telle qu'une stéatose. Elles développent également une obésité ainsi qu'une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose. Cependant, le développement des caractéristiques plus sévères de la NASH, tels que le ballooning des hépatocytes ne sont pas observés et la fibrose hépatique ainsi que l'inflammation surviennent de manière limitée et tardivement aux alentours des 16 semaines de régime HFD (Ibrahim *et al.*, 2016; Santhekadur *et al.*, 2018). En comparaison, le régime CDAHFD, que nous avons utilisé, présente un développement rapide de la pathologie hépatique avec une stéatose dès la première semaine ainsi qu'une fibrose et une inflammation hépatique fortes aux alentours des 4 semaines ainsi qu'un score NAS élevé (≈ 4) après 2 semaines de ce régime (Abe *et al.*, 2019; Toita and Kang, 2020).

En parallèle, dans l'étude préclinique réalisée par Esquejo et collaborateurs, l'utilisation de la PF-06409577 *in vivo* qui cible et active la sous-unité régulatrice β de l'AMPK, permet de supprimer la synthèse *de novo* de lipides et d'acides gras ainsi que de réduire les taux de triglycérides et de cholestérol hépatiques et sériques ainsi que le taux de LDL sériques. Le PF-06409577 améliore la fonction hépatique et la dyslipidémie systémique chez les rongeurs par l'activation constitutive de l'AMPK hépatique (Esquejo *et al.*, 2018). Ces résultats renforcent l'intérêt de cibler l'AMPK pour prévenir et traiter les maladies hépatiques avancées (Garcia *et al.*, 2019).

L'activation de l'AMPK par différentes drogues, telles que la cryptotanshinone ou la 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) permet également de diminuer la survie et la prolifération des cellules de CHC en activant la voie p53 (Imamura *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014), la voie p27^{kip} (Liang *et al.*,

2013) ainsi qu'en régulant directement l'activité du facteur de transcription FOXO3 (Greer *et al.*, 2007). De plus, l'activation de l'AMPK par la metformine *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffe permet d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, de réduire l'inflammation médiée par la voie NF- κ B et de sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie anticancéreuse (Zheng *et al.*, 2013). Une étude plus récente, montre *in vitro* et *in vivo* que l'activation de l'AMPK par la metformine sensibilise les cellules de CHC résistantes au sorafénib en augmentant l'apoptose liée à l'autophagie (Lai *et al.*, 2021). Ces différents résultats bien que prometteurs, sont à prendre avec précaution car il ne s'agit pour la plupart que d'études *in vitro* ou de modèle de xénogreffe.

Pour aller plus loin :

Notre étude a démontré *in vivo* que cibler l'expression de *Prdx2* dans les hépatocytes corrèle avec une restauration de l'activité de l'AMPK. Cependant, le mécanisme d'action par lequel PRDX2 inhibe l'activité de l'AMPK reste non décrit. Afin de comprendre le mécanisme d'action, nous proposons d'étudier deux mécanismes différents : direct ou indirect. Il s'agit de vérifier l'hypothèse d'une interaction directe, par l'étude de l'interaction entre PRDX2 et les différentes sous-unités de l'AMPK par des expériences de co-immunoprécipitation. En effet, l'interaction entre PRDX2 et la sous-unité catalytique α permettrait d'expliquer que PRDX2 inhibe la phosphorylation activatrice de l'AMPK. Par ailleurs, il est possible que PRDX2 interagisse avec les sous-unités régulatrices β ou γ , ce qui pourrait également expliquer la diminution de l'activité de l'AMPK. Il est également possible que l'interaction entre PRDX2 et les sous-unités de l'AMPK résulte en une séquestration des différentes sous-unités, inhibant ainsi la formation et l'activation de l'AMPK. Il est également possible que le mécanisme d'action se fasse de façon indirecte. En effet, nous avons observé que l'extinction *in vivo* de *Prdx2* permet de réduire l'activation de la voie Akt qui régule l'activation de l'AMPK (Jeon, 2016). De plus, deux études suggèrent que l'AMPK peut être directement activée par l' H_2O_2 présent dans la cellule et que la perte de fonction de PRDX2 permet l'accumulation locale d' H_2O_2 , ce qui augmente encore l'activité de l'AMPK (Choi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2019). Dans la suite de nos travaux, il paraît opportun de vérifier également le rôle de PRDX2 dans l'expression et l'activité des différentes kinases activatrices de l'AMPK, à savoir LKB1, CAMMPK2, TAK et PP2C par exemple.

2) PRDX2 et le métabolisme lipidique

Au cours de cette étude, nous avons pu démontrer que PRDX2 est impliquée dans la dysrégulation du métabolisme hépatique et le développement de la stéatose en inhibant l'activité de l'AMPK. Par ailleurs, nous avons observé que cibler l'expression de *Prdx2* dans les hépatocytes *in vivo*, permet de rétablir l'activité de l'AMPK, mais aussi d'augmenter les voies de la β -oxydation des acides gras ainsi que le transport des lipides et l'efflux de cholestérol (voir **Résultats** *Peroxiredoxin 2 is a driver of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease* **Figure 5c-d**). De manière surprenante, nous avons également observé que la CDAHFD induisait la diminution importante de l'expression de deux enzymes clés du métabolisme du cholestérol HMGCR et ACAT2 et que ce phénomène était compensé par le KO hépatocyttaire de *Prdx2* (**Figure 25**).

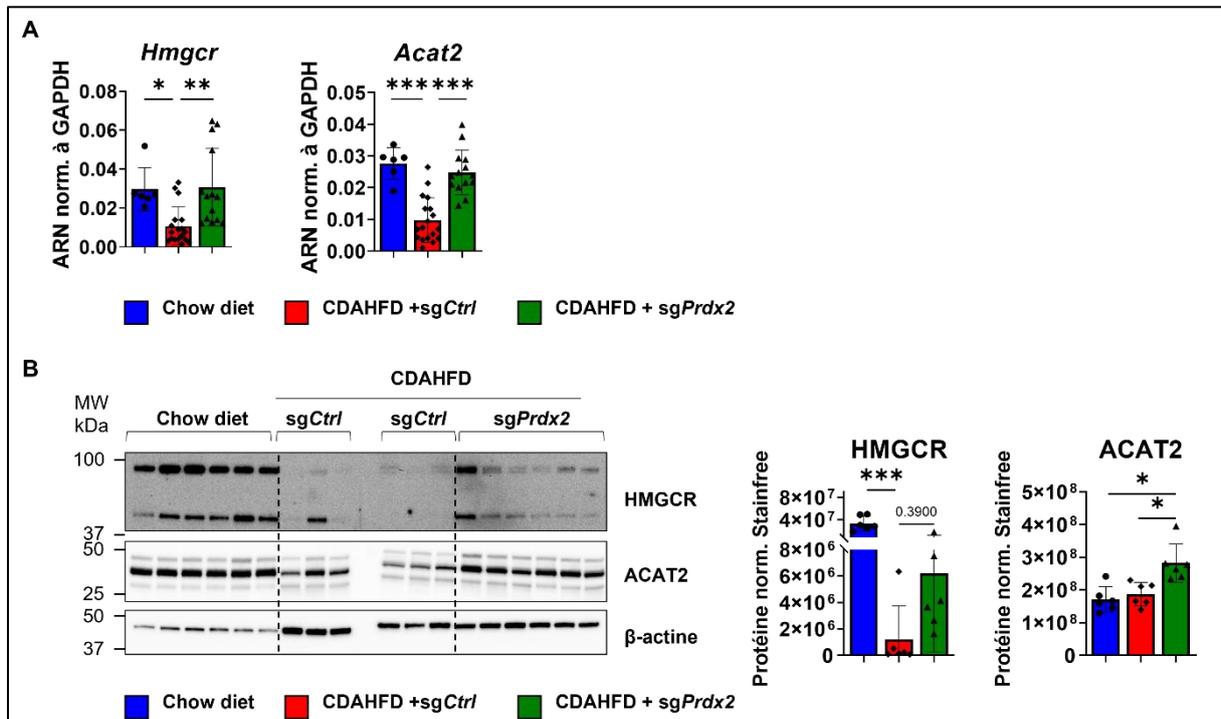


Figure 25 : Expression de facteurs clés du métabolisme du cholestérol dans les souris CDAHFD. A. L'expression des gènes du métabolisme du cholestérol *Hmgcr* et *Acat2* a été quantifiée par RT-qPCR. Données représentées avec la moyenne +/- SD, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 (Kruskal Wallis). **B.** Analyse par *western-blot* de l'expression de HMGCR et ACAT2 en foie de souris CDAHFD. Données représentées avec moyenne +/- SD, * p<0,05, *** p<0,001 (Kruskal Wallis).

Ces observations semblent en contradiction avec la diminution de la stéatose et l'amélioration du métabolisme hépatique observées chez les souris *Prdx2* KO. En effet, comme décrit précédemment dans l'**Introduction**, HMGCR et ACAT2 sont des enzymes clés respectivement de la synthèse et l'estérification du cholestérol (voir **II. Zoom sur la NAFLD et la NASH, 2. Physiopathologie de la NAFLD et de la NASH, a. Rappel du métabolisme lipidique**). De plus, des études *in vivo* suggèrent que cibler l'expression d'ACAT2 ou inhiber son activité permet de diminuer la stéatose hépatique et d'améliorer la fonction hépatique (Alger et al., 2010; Pramfalk et al., 2022). Par ailleurs, l'utilisation de statines, qui sont des inhibiteurs de l'HMGCR, telles que la simvastatin et l'atorvastatin, chez les patients souffrant de NAFLD permet d'améliorer la dyslipidémie (Paul et al., 2022). Il a également été observé dans des études *in vivo* que cibler HMGCR permet de prévenir l'hépatocarcinogenèse, de diminuer la stéatose hépatique, et de réduire l'inflammation ainsi que la résistance à l'insuline caractéristiques de la maladie métabolique (Dornbos *et al.*, 2019; Takei *et al.*, 2019; Che *et al.*, 2020).

Il faut également noter que la diminution de l'expression d'ACAT2 et d'HMGCR que nous avons observé dans les souris CDAHFD ne correspond pas aux dérégulations observées chez les patients souffrant de NAFLD et de NASH. En effet, il est observé chez ces patients une augmentation significative de l'*HMGCR* et pas ou peu de changement de l'expression d'*ACAT2* (Caballero *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2012; Musso *et al.*, 2013). De plus, il est observé dans les modèles murins de NAFLD induit par un régime HFD induit une augmentation de l'expression d'*HMGCR* (Van Rooyen *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Nous avons donc émis l'hypothèse que la diminution de l'expression d'HMGCR et d'ACAT2 que nous avons observé dans notre modèle est due au régime CDAHFD et à sa particularité de déficience en choline. Cette hypothèse est soutenue par l'étude des données de RNA-Seq d'une cohorte de souris nourries avec une CDAHFD (GSE137449), où une diminution de l'expression de *Hmgcr* et *Acat2* a été observée (**Figure 26**) (Heintz *et al.*, 2020).

L'ensemble de ces données nous permettent donc de suggérer que la diminution de l'expression de ces deux enzymes clés du métabolisme du cholestérol est due au régime CDAHFD et que la compensation de leur expression dans les souris *Prdx2* KO traduit l'amélioration des fonctions et du métabolisme hépatique.

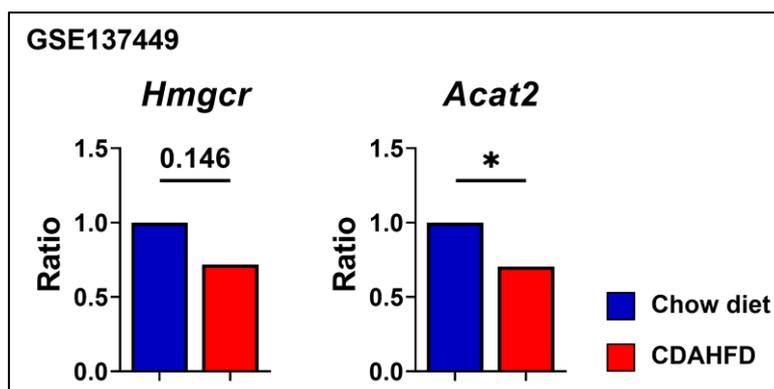


Figure 26 : Expression d'*Hmgcr* et *Acat2* dans une cohorte de souris avec une CDAHFD (GSE137449). L'expression d'*Hmgcr* et *Acat2* a été extraite des données de RNA-Seq des foies de souris CDAHFD publiquement disponibles sur le GeoDataset de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/gds/?term=GSE137449>). Données représentées en Ratio avec *p*-value.

Au cours de cette étude, nous avons également observé que le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes induisait une augmentation significative de l'expression du récepteur du cholestérol *LXRα* (**Figure 27**). Comme décrit précédemment, *LXRα* est un régulateur clef du métabolisme du cholestérol. Il induit notamment l'expression d'ABCA1, ABCG5 et ABCG8 dans les macrophages, les hépatocytes et les entérocytes, ce qui favorise le transport réverse du cholestérol (voir **II. Zoom sur la NAFLD et la NASH, 2. Physiopathologie de la NAFLD et de la NASH, a. Rappel du métabolisme lipidique**). Par ailleurs, *LXRα* favorise la formation d'acide biliaires en induisant l'expression de CYP7A1 et accélère la dégradation du LDL-R ce qui limite l'absorption de cholestérol par les hépatocytes.

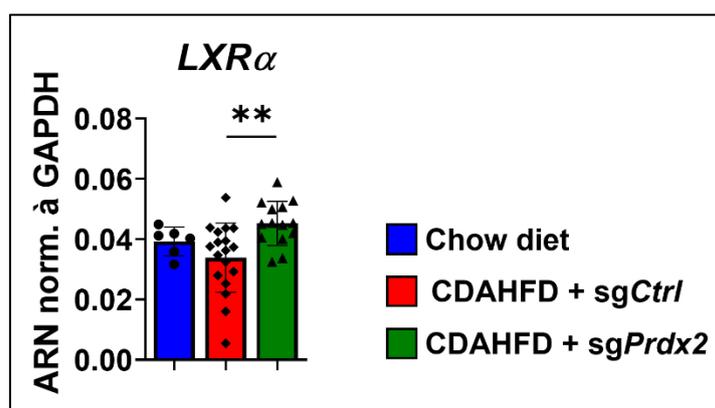


Figure 27 : Expression de *LXRα* chez les souris CDAHFD. L'expression de *LXRα* a été vérifiée par RTqPCR. Données représentées avec la moyenne +/- SD, ** $p < 0,01$ (Kruskal Wallis).

Cependant, malgré ces avantages, LXR α favorise également l'activation du SREBP-1c, ainsi que l'activation de FAS, de l'ACC et de SCD1 ce qui induit la synthèse *de novo* de lipides et favorise la stéatose. LXR α inhibe également le catabolisme des VLDL ce qui favorise la production de triglycérides VLDL et l'hyperlipidémie (Musso *et al.*, 2013). Par ailleurs, il est observé chez patients souffrant de NAFLD une augmentation de l'expression de LXR α qui corrèle avec la stéatose hépatique, l'inflammation et la fibrose et est associée avec le score NAS des patients (Ahn *et al.*, 2014). De plus, plusieurs études *in vivo* dans des modèles murins de NASH suggèrent que cibler LXR α permet de diminuer la stéatose hépatique ainsi que la fibrose et l'inflammation hépatique (Griffett *et al.*, 2013; Griffett *et al.*, 2015). De part, la dualité de son action dans le métabolisme des lipides, le rôle de LXR α dans la prévention ou le développement de la NASH est encore débattu (Cariello *et al.*, 2021). L'ensemble de ces données laissent donc à suggérer que l'augmentation de l'expression de LXR α que nous observons dans les souris *Prdx2* KO est en contradiction avec la diminution de la stéatose, l'amélioration de la dyslipidémie ainsi qu'avec l'activité de l'AMPK qui entre autre inhibe le LXR α (Hwahng *et al.*, 2009). Cependant, nous pouvons avancer l'hypothèse que comme pour l'expression de l'HMGCR et d'ACAT2, l'augmentation de l'expression de LXR α reflète avant tout l'amélioration de l'état générale du foie ainsi que l'amélioration du métabolisme hépatique, plutôt qu'un mécanisme d'action lié au KO de *Prdx2*.

Pour aller plus loin :

Les résultats présentés ici ne permettent pas de conclure clairement quant au mécanisme d'action qui mène à l'augmentation du LXR α chez les souris *Prdx2* KO. Par ailleurs, il semble important de vérifier dans notre modèle *in vivo* les rôles de l'association de l'activation de l'AMPK et l'expression de LXR α dans les souris *Prdx2* KO. Il est certain que l'augmentation de la sécrétion de lipides contribue à la baisse de la stéatose observée chez les souris *Prdx2* KO. Cependant, le rôle de LXR α sur la synthèse *de novo* de lipides est en contradiction avec la diminution de l'accumulation de lipides dans le foie des souris *Prdx2* KO. De manière intéressante, il est connu que l'AMPK s'oppose à l'effet du LXR α dans cette synthèse de lipides en induisant la phosphorylation inhibitrice d'HMGCR, SREBP1c et ACC (Jeon, 2016; Garcia and Shaw, 2017). Par conséquent, il serait intéressant de caractériser l'activation d'HMGCR, SREBP1c et ACC dans les souris CDAHFD. Ceci permettra de comprendre la relation entre les voies de l'AMPK et du LXR α dans le foie des souris CDAHFD. De plus, ceci permettra de décrire plus précisément le mécanisme d'action par lequel le KO de *Prdx2* permet d'améliorer le métabolisme lipidique hépatique.

II PRDX2 et les maladies hépatiques chroniques

1) PRDX2 et la fibrose hépatique

Notre étude a montré que cibler *in vivo* PRDX2 permet de prévenir le CHC sans avoir d'impact significatif sur la fibrose hépatique, indiquant que l'effet préventif de PRDX2 sur le cancer pourrait être indépendant de la fibrose. Ces résultats sont d'un intérêt notable, car la fibrose et la cirrhose qui en découle sont considérées comme les facteurs de risques les plus importants du CHC (Schuppan and Afdhal, 2008; Roehlen *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2022). Cependant, plusieurs études suggèrent qu'une proportion non négligeable de patients atteints de NAFLD ou de NASH développent un CHC sans développer de fibrose ni de cirrhose hépatique significatives. En effet, une première étude de Paradis et collaborateurs a montré que parmi les cas de CHC associés aux syndromes métaboliques 65 % des cas ne présentaient pas de fibrose (Paradis *et al.*, 2009). De plus, une étude rétrospective a démontré que parmi les patients ayant développé un CHC induit par la NAFLD ou la NASH, seul 46 % souffraient de cirrhose (Sanyal *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude allemande et une étude japonaise, dans lesquelles 41,7 % et 49 % des cas de CHC associés à la NAFLD sont apparus dans un contexte non cirrhotique, respectivement (Anstee *et al.*, 2019). Enfin, toutes étiologies confondues, il est estimé que 20 % des cas de CHC apparaissent dans un foie non cirrhotique (Desai *et al.*, 2019). Ces études indiquent que des mécanismes indépendants de la fibrose sont en jeu, tels que des prédispositions génétiques (maladie de Wilson, hémochromatose héréditaire, mutations *hTERT*, ...), les effets de substances génotoxiques (aflatoxine, fer, nitrosamines ...), les pathologies liées à la NAFLD (obésité, hypertension, dyslipidémie, diabète ...). Par conséquent, il apparaît que cibler PRDX2 chez les patients souffrant de NAFLD est une stratégie prometteuse pour prévenir le développement du CHC non associés à la fibrose hépatique.

Il est également important de souligner que, dans notre étude, l'induction de la maladie hépatique par l'injection de DEN et le régime CDAHFD est « agressive ». De plus, nous avons vérifié l'impact du KO de *Prdx2* sur la fibrose uniquement en *endpoint* de l'expérience, soit après 6 mois. Par conséquent, nous avons observé un stade avancé de la maladie hépatique dans les souris et ce pourrait être une des raisons pour lesquelles nous n'avons pas observé d'impact du KO de *Prdx2* hépatocytaire sur le développement de la fibrose. Il serait donc opportun d'étudier l'effet du KO de *Prdx2* sur le développement de la fibrose au cours du temps en utilisant le même modèle murin et en ajoutant plusieurs *timepoint* intermédiaires afin de vérifier si le KO de *Prdx2* peut ralentir le développement et la progression de la fibrose. L'activation

des HSC peut être médiée par l'activation des voies de signalisation mitogéniques STAT3 et MAPK, l'inhibition des récepteurs nucléaires LXR α et FXR et par l'accumulation de cholestérol libre dans le foie (Tsuchida and Friedman, 2017). Or, nous avons observé que le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes permet d'améliorer le métabolisme hépatique, en inhibant les voies de signalisation STAT3 et des MAPK, en améliorant l'expression des récepteurs nucléaires LXR α et FXR et en diminuant l'accumulation de lipides dans le foie, en favorisant notamment l'efflux de cholestérol. Par conséquent, il est à supposer que l'amélioration du métabolisme des hépatocytes inhibe les mécanismes d'activation des HSC et ainsi contribuerait à freiner le développement de la fibrose hépatique.

D'autre part, nous avons réalisé le KO de *Prdx2* spécifiquement dans les hépatocytes et ne connaissons pas l'effet du KO de *Prdx2* étendu à l'ensemble des cellules du parenchyme hépatique, ni le rôle que joue PRDX2 sur le métabolisme de ces cellules en particulier les cellules stellaires (HSC) qui sont impliquées dans le dépôt de matrice extracellulaire et dans le développement de la fibrose. Des expériences préliminaires que nous avons réalisées permettent d'apporter un début de réponse à cette question. En effet, nous avons réalisé une extinction de l'expression de PRDX2 par ARN interférence, dans des cellules stellaires humaines LX2, puis induit leur activation par un stress au TGF- β et vérifié l'expression des gènes caractéristiques des cellules stellaires activées, *ACTA2* et *COL1A1*. Ces expériences ne nous ont pas permis d'observer d'effet de l'extinction de PRDX2 sur l'activation des LX2, ce qui laisse à supposer que PRDX2 dans les cellules stellaires ne régule pas leur activation (voir **Résultats Peroxiredoxin 2 is a driver of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease Supplementary Figure 6**). Il est également possible que ce modèle *in vitro* ne récapitule pas exactement les événements liés à l'activation des cellules stellaires dans la fibrose hépatique et que ce soit la raison pour laquelle nous n'observons pas ici d'effet de l'extinction de PRDX2 sur l'activation des LX2.

Pour aller plus loin :

Les expériences *in vitro* que nous avons réalisées ne montrent pas l'effet de l'extinction de PRDX2 sur l'activation des LX2. Cependant, deux études ont démontré que l'activation des HSC par le glucose ou la taurine induisait une diminution de l'expression de PRDX2 dans ces cellules (Kim *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2013), ce qui suggère que les HSC régulent également la disponibilité des ROS en modifiant l'expression des enzymes et que potentiellement PRDX2 joue un rôle plus complexe dans la régulation de l'activation des HSC. De plus, comme exposés dans l'introduction, d'autres cellules hépatiques tels que les macrophages et les cellules de

Kupffer jouent un rôle important dans le développement de la fibrose. Certaines études suggèrent le rôle de la PRDX2 sécrétées par les cellules endommagées de manière libre ou des exosomes comme des DAMP menant à l'activation des cellules immunitaires et à leur différenciation vers un profil pro-inflammatoire (Salzano *et al.*, 2014; Mullen *et al.*, 2015; Sadvakassova *et al.*, 2021). Par ailleurs, comme nous le décrivons plus bas, il semble que PRDX2 joue un rôle dans l'inflammation hépatique et la différenciation phénotypique des macrophages. Par conséquent, dans la suite du projet, notre laboratoire prévoit de réaliser l'extinction conditionnelle de *Prdx2* dans les HSC ou les macrophages en utilisant la technologie Cre-lox dans notre modèle murin et en analysant au cours du temps l'évolution de la maladie hépatique. Ceci permettra d'étudier *in vivo* le rôle de PRDX2 dans les HSC et les macrophages et de décrypter plus précisément le rôle PRDX2 dans les différents types cellulaires hépatiques sur l'établissement d'un micro-environnement favorisant l'inflammation et le développement de la fibrose.

2) PRDX2 et la NASH

Dans notre étude, nous avons observé que le KO de *Prdx2 in vivo* dans les hépatocytes permet d'améliorer les fonctions hépatiques, réduire la stéatose et améliorer la dyslipidémie ce qui peut être interprété comme un signe d'amélioration de la NAFLD. Il est intéressant de noter que le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes a diminué de façon prononcée la stéatose et par conséquent l'accumulation de lipides dans le foie ce qui permet de ralentir la progression de la maladie hépatique et de prévenir le risque de CHC. En effet, il existe un risque non négligeable de CHC chez les patients atteints de NAFLD même à un stade précoce et l'accumulation de lipides dans les hépatocytes contribue grandement à la progression de la maladie *via* les phénomènes de lipotoxicité, la formation de macrophages *foam cell*,... (Musso *et al.*, 2009; Pirillo *et al.*, 2013; Anstee *et al.*, 2019). Par ailleurs, nous avons observé que le KO de *Prdx2* permet de réduire les taux de LDL sériques à un niveau comparable à celui des souris nourries avec un régime contrôle. Il s'agit là d'un point intéressant car, les LDL sont la principale source de lipides des hépatocytes dans la NASH et participent activement au développement de la maladie hépatique. Les LDL peuvent également être oxydées pour former des oxLDL qui participent à la progression de la fibrose, à l'inflammation et aux dommages hépatocytaires. De plus, les LDL sont impliquées dans le développement des manifestations extra-hépatiques de la NAFLD telle que l'athérosclérose. Il est intéressant de noter que différentes études démontrent le rôle de PRDX2 dans l'athérosclérose. En effet, Park et collaborateurs ont observé dans un modèle murin transgénique *ApoE^{-/-}* d'athérosclérose que PRDX2 est fortement exprimée dans

les cellules endothéliales et immunitaires des lésions athérosclérotiques et que cibler l'expression de *Prdx2* dans ces cellules aggravait la formation des plaques après une activation accrue de p65, c-Jun, JNKs et p38 MAPK (Park *et al.*, 2011). De plus, Li et collaborateurs ont démontré que PRDX2 a un rôle protecteur, en détoxifiant les ROS, dans la progression de l'athérosclérose en inhibant l'altération du phénotype et de la fonction des cellules musculaires lisses vasculaires *via* la voie de signalisation MAPK (Li *et al.*, 2021). Ces études tendent à démontrer que l'expression de PRDX2 dans ces cellules est importante pour prévenir le développement de l'athérosclérose. De plus, ces études suggèrent que le rôle de PRDX2 est différent selon les organes et soulignent l'importance pour nos travaux futurs de cibler PRDX2 spécifiquement dans le foie des patients, afin d'éviter le développement de pathologies telle que l'athérosclérose chez des patients souffrant de NAFLD ou de NASH et présentant par conséquent des risques de développer des maladies cardiovasculaires.

De manière surprenante, nous n'avons pas observé chez les souris *Prdx2* KO d'augmentation significative des HDL, alors que l'expression des transporteurs ABCA1 et SRB1 est augmentée. Ceci laisse supposer que l'efflux de lipides pourrait se faire *via* d'autres mécanismes que les HDL ou qu'il y aurait une réabsorption accrue des HDL par différents types cellulaires. En effet, nous avons observé que cibler l'expression de *Prdx2* dans les hépatocytes permet d'augmenter l'expression de transporteurs favorisant l'excrétion directement dans les voies biliaires, ABCG5 et ABCG8 (voir **Résultats** *Peroxiredoxin 2 is a driver of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease* **Figure 5D**), ce qui démontre que l'excrétion *via* les voies biliaires est favorisée. Par ailleurs, nous avons également observé que, contrairement à nos attentes, le régime CDAHFD induisait une diminution de la triglycéridémie et de la cholestérolémie des souris. Or il est observé chez les patients atteints de NAFLD et de NASH, une forte augmentation de la triglycéridémie et de la cholestérolémie. Il semblerait que cette différence soit due au régime CDAHFD car les études de (Toita and Kang, 2020) et (Yasuda *et al.*, 2020) ont également observé la diminution du cholestérol et des triglycérides dans le sérum des souris nourries avec un régime CDAHFD. Cependant, il est également important de noter que (Toita and Kang, 2020), ainsi que (Abe *et al.*, 2019) ont quantifié en parallèle les concentrations intrahépatique de cholestérol et observé une accumulation de triglycérides et de cholestérol dans le foie des souris nourries avec le régime CDAHFD, ce qui correspond à la maladie humaine. Malgré ce point qui reste à éclaircir, le modèle murin utilisé dans notre étude reste un modèle pertinent et robuste pour modéliser la NASH. En effet, Wolf et collaborateurs ont démontré que ce modèle récapitule les principales caractéristiques du

syndrome métabolique humain, de la NASH et du CHC. Notamment, le régime CDAHFD induit l'activation des cellules T CD8⁺ intrahépatiques, des cellules NKT et des cytokines inflammatoires, comme chez les patients atteints de NASH (Wolf *et al.*, 2014). Une autre étude de Matsumoto et collaborateurs a démontré que ce modèle est fiable pour étudier le développement et la progression de la fibrose hépatique dans le contexte de la NASH (Matsumoto *et al.*, 2013).

Bien que notre étude ait permis de décrire le rôle de PRDX2 dans le métabolisme hépatique et lipidique lié à la progression des maladies hépatiques, nous ne sommes pas parvenus à décrire le rôle de PRDX2 dans l'inflammation hépatique. L'analyse en RNA-seq des foies de souris CDAHFD montre que le KO de *Prdx2* permet d'inhiber les voies de STAT3 et de NF- κ B et de diminuer l'expression des gènes de l'inflammasome *Nlrp3* et *Pycard* (**Figure 28 A**). Cependant, lorsque nous avons voulu confirmer cela au niveau histologique en détectant le marqueur CD68 des macrophages nous n'avons pas observé de différence significative sur le recrutement des macrophages dans le foie des souris *Prdx2* KO (**Figure 28 B**). De plus, nous avons vérifié l'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires *Il-6*, *Tnf- α* , *Ccl2* et *Cxcl5* (**Figure 28 C**) et l'activation de la voie NF- κ B par immunodétection des formes phosphorylées de p65 et I κ B α (**Figure 28 D**) et n'avons pas observé de différences significatives entre les souris *Ctrl* et *Prdx2* KO. Enfin, grâce à notre collaboration avec le Dr. Hugues Jacob de l'Institut Clinique de la Souris, nous avons cherché à déterminer le score NAS des souris CDAHFD, qui permet de donner un aperçu du stade de stéatose, de fibrose et d'inflammation dans le tissu hépatique (Kleiner *et al.*, 2005), mais ne sommes pas parvenus à observer d'effet du KO de *Prdx2*. Comme pour la fibrose hépatique, il est possible que puisque nous avons observé un stade très avancé de la maladie hépatique dans les souris, nous n'ayons pas été en mesure de vérifier d'impact du KO de *Prdx2* hépatocytaire sur le développement et la progression de l'inflammation caractéristique de la NASH dans le foie. De plus, il n'est pas exclus qu'en reproduisant ces analyses dans des souris à un stade plus précoce du développement de la maladie hépatique nous puissions caractériser le rôle de PRDX2 dans l'inflammation.

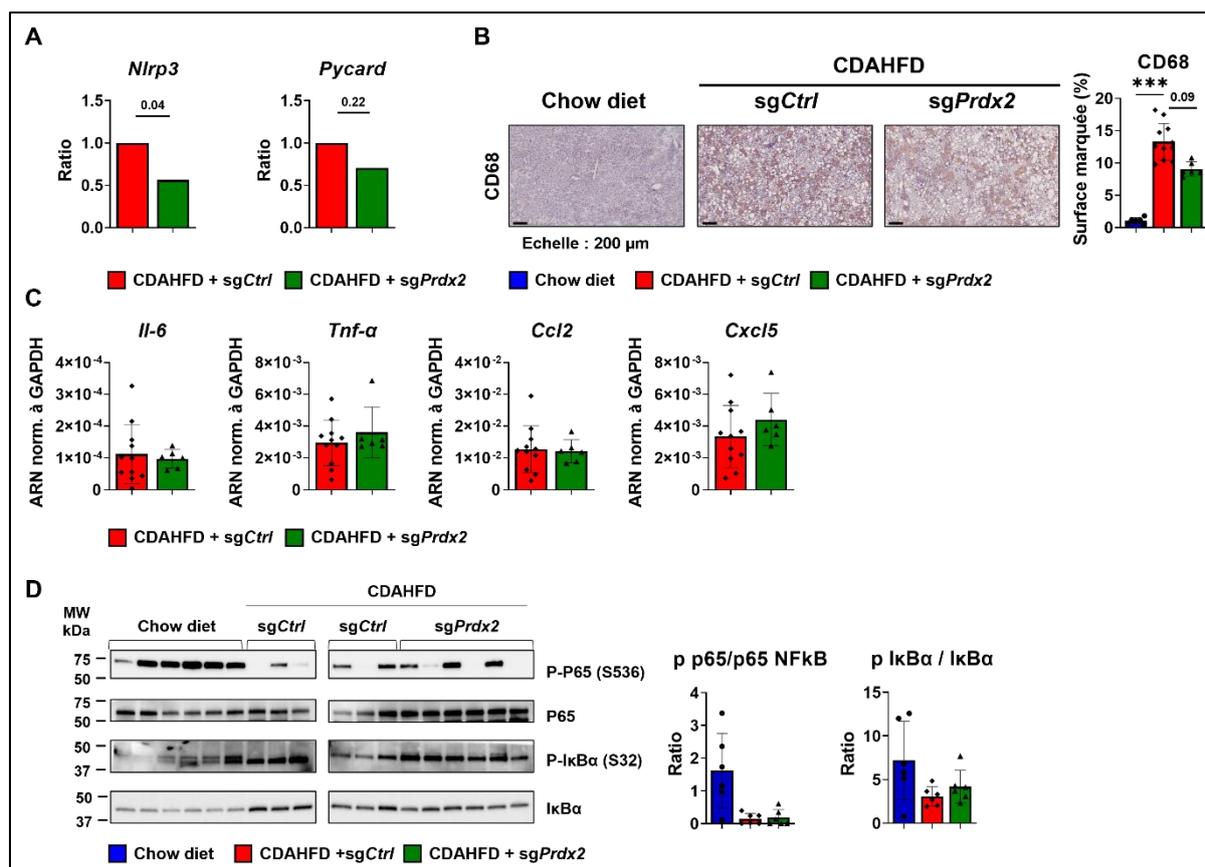


Figure 28 : Marqueurs de l'inflammation chez les souris CDAHFD. **A.** L'expression des marqueurs de l'inflammasome *Nlrp3* et *Pycard* a été extraite des données de RNA-Seq des foies de souris CDAHFD. Données représentées en Ratio avec *p-value*. **B.** L'infiltration des macrophages dans les foies des souris a été évaluée par marquage immunohistochimique du marqueur CD68. Données représentées avec moyenne +/- SD, *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis). **C.** L'expression des gènes clés de l'inflammation *Il-6*, *Tnf-α*, *Ccl2*, *Cxcl5* a été quantifiée par RT-qPCR. Données représentées avec la moyenne +/- SD. **D.** Analyse par *western-blot* de l'expression de phospho-p65 (S536), p65, phospho-IκBα (S32) et IκBα. Données représentées avec moyenne +/- SD.

Enfin, notre étude s'est focalisée sur la caractérisation du rôle de PRDX2 dans la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC. Cependant, comme discuté dans l'**Introduction II. 2) v. Les peroxydases et les peroxyrédoxines**, il existe différentes isotypes de PRDX. Afin, de vérifier si l'extinction de *Prdx2* avait un impact sur les autres isotypes de PRDX, nous avons vérifié l'expression de celles-ci dans les tissus de foie des souris (**Figure 29**). Nous avons constaté que le régime CDAHFD induit une augmentation de l'expression des différentes PRDX. De manière intéressante, nous avons également observé que le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes induisait une augmentation significative de

l'expression des *Prdx4* et *Prdx5* ainsi qu'une augmentation de l'expression de *Prdx1*. Bien que nous ne connaissions pas les mécanismes exacts, permettant d'expliquer l'augmentation de l'expression des PRDX dans les souris *Prdx2* KO, nous pouvons supposer que ceci est dû à un phénomène compensatoire, afin de palier à le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes.

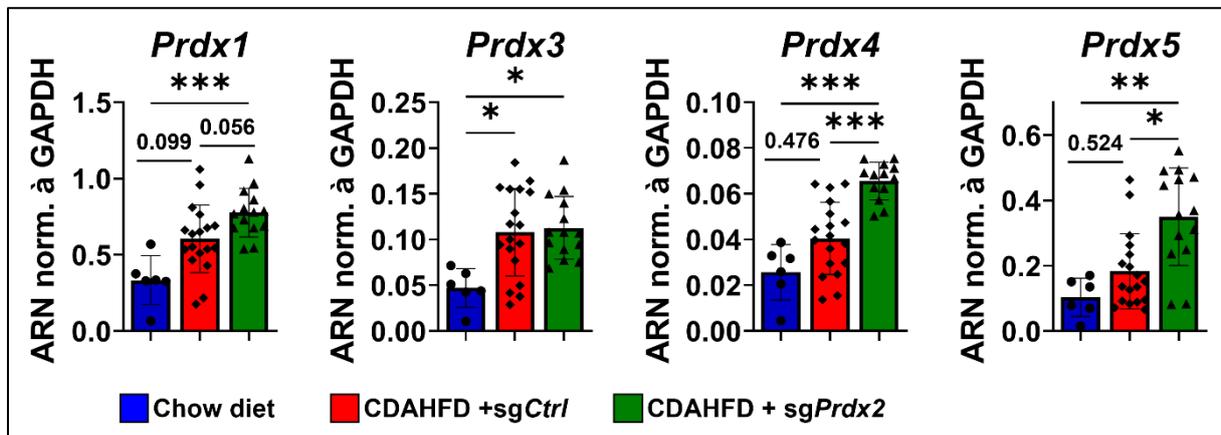


Figure 29 : Expression des isotopes de PRDX dans le foie des souris CDAHFD. Analyse de l'expression hépatique des *Prdx1*, -3, -4 et -5 (RT-PCR). Les données sont représentées avec la moyenne +/-SD, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 (Kruskal Wallis).

Comme décrit dans l'**Introduction II. 2) v. Les peroxydases et les peroxyrédoxines**, différentes études ont démontré que les différentes PRDX jouent un rôle dans la progression de la NASH et le développement du CHC. Notamment, plusieurs études *in vivo* démontrent que les PRDX3, PRDX4 et PRDX5 permettent de protéger les animaux contre le développement du diabète de type 2, de limiter l'inflammation et de réduire la progression de la NASH (Nabeshima *et al.*, 2013; Nawata *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2020; Geng *et al.*, 2021). Par ailleurs, une étude *in vitro* démontre que la PRDX1 inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales de CHC, ce qui confère à PRDX1 des propriétés anti-tumorales (Fang *et al.*, 2018). Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'il existe un phénomène synergique entre le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes murin et l'augmentation de l'expression des *Prdx1*, -4 et -5 qui peut en partie expliquer l'amélioration de l'état du foie, la diminution de la stéatose et la prévention de l'hépatocarcinogénèse.

Pour aller plus loin :

Bien que notre étude décrive le rôle de PRDX2 sur la stéatose hépatique et la dyslipidémie, certains points restent à explorer. En effet, il serait intéressant de décrire plus en détail le rôle de PRDX2 dans le métabolisme lipidique. Nous avons observé que le KO de *Prdx2* chez les

souris ne rétablit pas le taux d'HDL plasmatique, mais que l'expression des transporteurs vers les voies biliaires, ABCG5 et ABCG8 est augmentée, ce qui laisse supposer que l'excrétion des lipides vers les voies biliaires est favorisée plutôt que sous forme d'HDL. Or, un résultat préliminaire issu de l'analyse RNAseq réalisée dans les foies des souris CDAHFD montre que la LCAT est plus exprimée dans les souris *Prdx2* KO ce qui suppose que le KO de *Prdx2* favorise la maturation des HDL. Cependant, il faut noter que contrairement aux humains, les souris ainsi que les rats n'expriment pas la CETP et ont de ce fait un métabolisme des HDL différent. D'autres modèles, tels que des modèles murins transgéniques qui expriment la CETP humaine pourraient être nécessaires afin de comprendre le rôle de PRDX2 dans le métabolisme des HDL et se rapprocher d'un métabolisme lipidique humain. Par ailleurs, une quantification de l'excrétion des acides biliaires permettrait également d'obtenir plus d'informations sur les mécanismes d'excrétion des lipides, qui ont lieu dans le foie des souris *Prdx2* KO. De plus, une quantification des taux de triglycérides et de cholestérol dans les tissus hépatiques des souris CDAHFD permettra de décrire encore plus précisément le rôle de PRDX2 dans la dyslipidémie et la progression de la NAFLD.

Par ailleurs il semble nécessaire de décrypter le rôle de PRDX2 dans la mise en place de l'inflammation caractéristique de la NASH. L'étude de notre modèle murin à un stade plus précoce de la pathologie permettra de déterminer si cibler PRDX2 dans les hépatocytes permet de réduire l'inflammation, de ralentir la formation de macrophages *foam cells*, de diminuer l'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'inhiber l'activation des voies de signalisations pro-inflammatoires. L'étude de l'évolution du score NAS au cours du temps chez les souris permettra également d'obtenir un aperçu global du rôle de PRDX2 dans la progression de la pathologie. De plus, l'extinction du gène *Prdx2* après l'induction de la maladie hépatique à un stade précoce permettra également de vérifier si cibler PRDX2 peut inhiber la progression de la réponse inflammatoire caractéristique de la NASH, voire induire une amélioration du score NAS.

3) PRDX2 et les réponses immunitaires

Les réponses immunitaires impliquées dans la NASH impliquent l'activation accrue des macrophages résidents (cellules de Kupffer), ainsi que le recrutement de leucocytes, de monocytes, de cellules NK et NKT et lymphocytes B et T vers le foie. Ces réponses immunitaires impliquent aussi l'acquisition par les cellules immunitaires de différents

phénotypes qui favorisent la NASH, telles que l'activation et la différenciation des cellules de Kupffer et des monocytes vers un profil pro-inflammatoire qui favorise le développement de la fibrose, la progression de la stéatose et l'inflammation. Les revues des Dr Krenkel et Tacke en particulier décrivent le rôle important des macrophages dans les maladies hépatiques chroniques et en particulier la NAFLD et la NASH (Krenkel and Tacke, 2017a; Tacke, 2017; Krenkel and Tacke, 2017b).

Afin de vérifier si cibler PRDX2 dans les hépatocytes permet de moduler le phénotype des macrophages dans le foie, nous avons réalisé des expériences *in vitro* de coculture en transwell entre des cellules hépatocytaires Huh-7.5.1 *PRDX2* KO dans lesquelles nous avons induit un stress grâce à un traitement aux FFA, et des macrophages M0, dérivés de cellules monocytaires THP1 grâce à un traitement au phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Nous avons ensuite analysé dans les macrophages, l'expression de cytokines caractéristiques d'un phénotype pro-inflammatoire (TNF- α , IL-6) ou tolérogène (IL-10) (**Figure 30**). Malheureusement, cette expérience ne nous a pas permis d'observer d'impact du KO de *PRDX2* dans les hépatocytes sur le phénotype des macrophages. Or, plusieurs études montrent que PRDX2, par son activité antioxydante, est impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire et module l'activation de différentes cellules immunitaires, telles que les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques. En effet, les travaux du Dr. Eun-Yi Moon et collaborateurs se sont intéressés au rôle de PRDX2 dans la réponse immunitaire. Elle a notamment démontré que dans un modèle murin transgénique, le KO ubiquitaire de *Prdx2* induit une augmentation de la taille du thymus, une accumulation de ROS dans les thymocytes et une prolifération accrue des lymphocytes T suite à un traitement à la concanavaleine A (Moon *et al.*, 2004). De plus, dans une deuxième étude, elle a observé que le KO ubiquitaire de *Prdx2* induit une prolifération des splénocytes et permet l'activation accrue des cellules T et des cellules dendritiques (Moon *et al.*, 2006b). Enfin, elle a observé que le KO de *Prdx2* induit une plus forte expression du facteur d'activation des lymphocytes B (BAFF), une cytokine produite par les macrophages et les cellules dendritiques et impliquée dans l'activation et la survie des lymphocytes B ainsi que dans l'activation non-canonique de la voie NF- κ B (Moon *et al.*, 2006a). Tous ces résultats indiquent que dans les cellules immunitaires, l'expression de PRDX2 régule leur activation, maturation et prolifération et ainsi permet de moduler la réponse immunitaire.

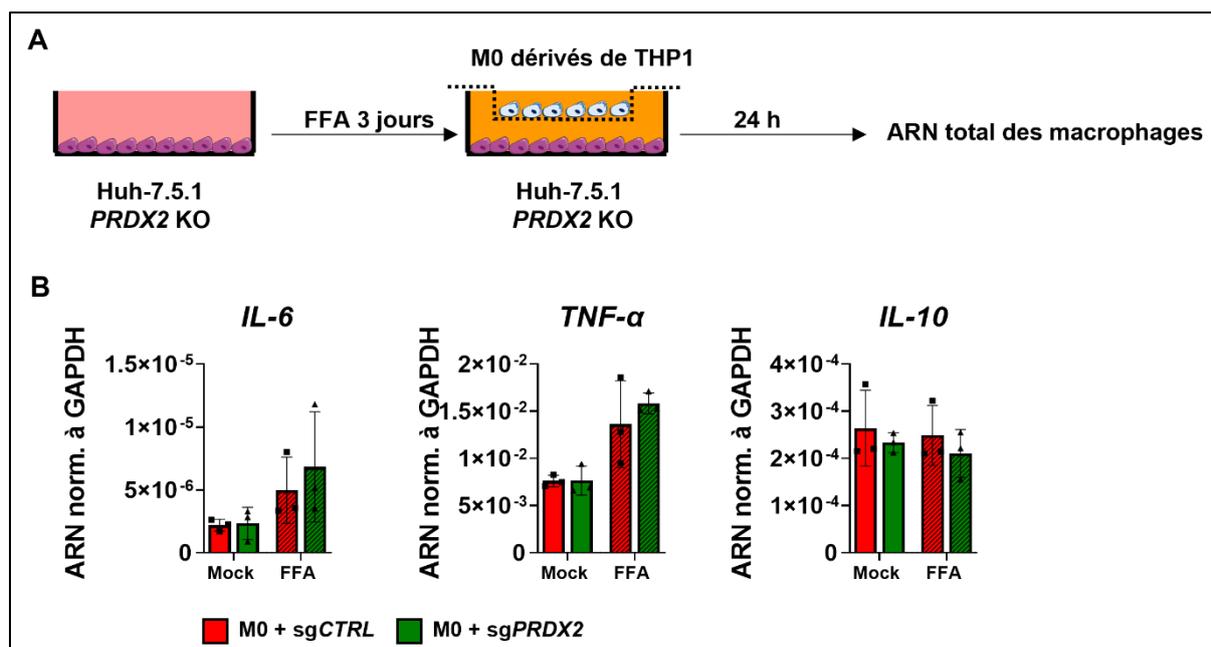


Figure 30 : Rôle de PRDX2 hépatocytaire sur la différenciation des macrophages A. Schéma expérimental. Les cellules Huh-7.5.1 sgCTRL ou sgPRDX2 ont été traitées avec des FFA pendant 3 jours, puis ont été mises en co-culture avec des macrophages M0 dérivées de THP1 en transwell pendant 24 heures. **B.** L'expression de *IL-6*, *TNF-α* et *IL-10* a été quantifiée par RT-qPCR. Données représentées avec moyenne +/- SD.

Par ailleurs, l'étude d'un modèle transgénique murin de colonite induite par l'administration de sulfate de dextran sodique montre que le KO ubiquitaire de *Prdx2* atténue l'inflammation du côlon, en stabilisant la protéine FoxO1, qui sert ensuite de médiateur au développement des cellules Treg Foxp3+, atténuant ainsi l'inflammation colique (Won *et al.*, 2013). Enfin, dans un modèle murin transgénique de choc septique induit par l'injection de lipopolysaccharides (LPS), Yang et collaborateurs démontrent que PRDX2 est un régulateur négatif de la réponse inflammatoire induite par les LPS dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse (Yang *et al.*, 2007). Cette dernière étude est en contradiction avec des résultats préliminaires *in vitro* que nous avons obtenus en réalisant l'extinction de *PRDX2* dans des THP1 qui ont ensuite été traitées avec des LPS et de l'IFN- γ afin de les différencier vers un profil pro-inflammatoire M1 (**Figure 31 A**). En effet, cette expérience ne nous a pas permis de conclure quant au rôle de PRDX2 dans les macrophages sur le développement d'un phénotype pro-inflammatoire à la suite d'un stress. Cependant, de manière intéressante, il apparaît dans cette expérience *in vitro* que la différenciation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire M1 conduit à la diminution significative de l'expression de *PRDX2*, laissant supposer que PRDX2 module la réponse inflammatoire dans ces cellules (**Figure 31 B**). Ces différents résultats suggèrent que

l'implication de PRDX2 dans les macrophages sur la réponse inflammatoire est complexe et reste encore à approfondir. De plus, il est possible que nos modèles d'étude *in vitro* soient trop simples et ne reflètent pas suffisamment la complexité du tissu hépatique pour pouvoir observer le rôle de PRDX2 dans la réponse inflammatoire. Le rôle de PRDX2 dans les autres types cellulaires du foie reste donc à élucider.

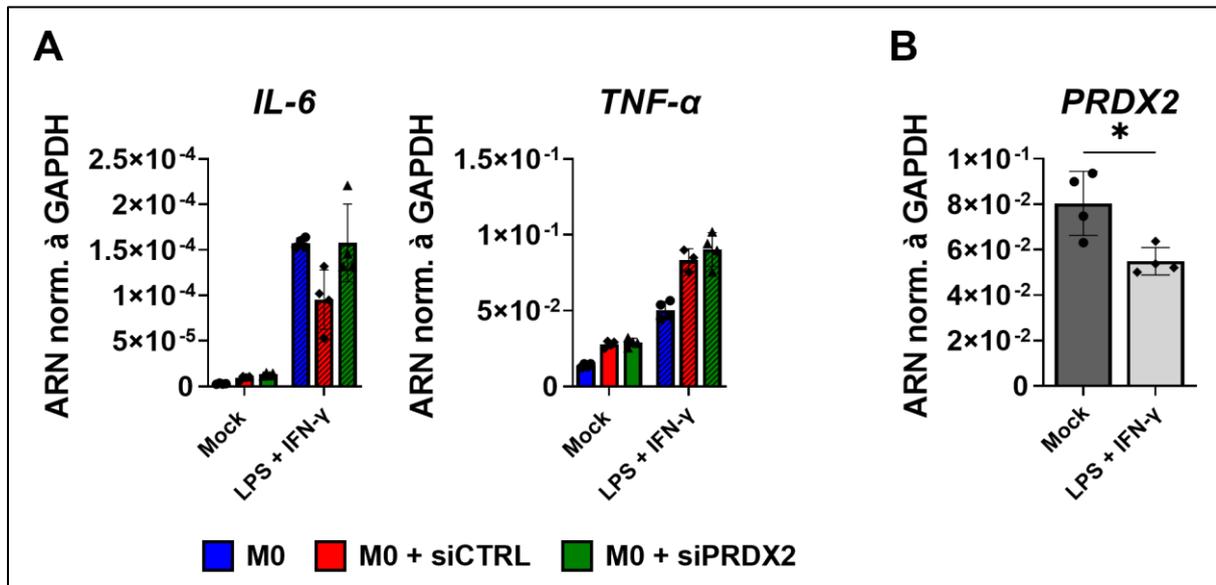


Figure 31 : Rôle de PRDX2 sur la différenciation des macrophages dans les cellules THP1. A. L'extinction de PRDX2 a été réalisée dans des cellules THP1 par reverse-transfection d'un siRNA ciblant l'expression de PRDX2. Les cellules ont ensuite été traitées avec 100 ng.mL^{-1} de LPS et 20 ng.mL^{-1} d'IFN- γ pendant 24h. L'expression des gènes *IL-6* et *TNF- α* a été évaluée par RT-qPCR. Données représentées avec moyenne +/-SD. **B.** L'expression de *PRDX2* a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules M0. Données représentées avec moyenne +/-SD.

Pour aller plus loin :

Une étude plus approfondie du micro-environnement hépatique mais aussi tumoral *via* des analyses de *single cell RNA sequencing* (scRNA-Seq), permettrait de caractériser la réponse immunitaire dans le foie des souris et de comprendre le rôle de PRDX2 dans l'établissement d'un micro-environnement pro-tumoral. En effet, dans notre étude nous avons réalisé une analyse de *bulk RNA-seq*, ce qui nous a permis d'étudier l'impact du KO de *Prdx2* dans les hépatocytes sur le transcriptome du foie en analysant un mélange de cellules, ce qui ne permet pas de dissocier les signaux provenant des hépatocytes de ceux issus des cellules immunitaires. En réalisant, une analyse en scRNA-Seq nous pourrions comprendre si le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes murins a un impact indirect sur le phénotype des cellules immunitaires et sur la réponse inflammatoire caractéristique de la maladie hépatique.

Par ailleurs, la poursuite des études *in vitro* de perturbation de l'expression de PRDX2 dans des macrophages dérivés de monocytes et de cellules de Kupffer permettra de vérifier le rôle de PRDX2 sur l'activation des cellules immunitaires et le développement des phénotypes pro ou anti-inflammatoire, ainsi que sur leurs propriétés chimiotactiques. En effet, bien que traditionnellement les fonctions des macrophages aient été classées en deux catégories : inflammatoire ou "M1" et anti-inflammatoire ou "M2", ce modèle est beaucoup trop simpliste pour décrire la polarisation des macrophages du foie, en particulier dans le contexte des maladies hépatiques. Les macrophages sont hautement plastiques et répondent à de multiples signaux (microbes, signaux de danger, ...) pour façonner leur réponse. L'exposition des macrophages humains dérivés de monocytes à divers signaux d'activation (cytokines, acides gras, prostaglandines, LPS, ...) révèle un large spectre d'états d'activation transcriptomique des macrophages, mais pas une simple polarisation M1 ou M2. Dans le foie lésé, les macrophages expriment souvent simultanément des marqueurs d'inflammation ou de résolution et peuvent rapidement changer de phénotype en fonction du microenvironnement hépatique. Ainsi, au lieu du paradigme M1/M2, la source des macrophages, la définition des activateurs et un ensemble consensuel de marqueurs pour décrire l'activation des macrophages devraient être précisés lorsque l'on se réfère à un état spécifique de polarisation des macrophages (Tacke, 2017). Par conséquent, réaliser une analyse transcriptomique des macrophages et des cellules de Kupffer dans lesquels nous aurons réalisé une extinction ou une surexpression de *PRDX2* et soumis à un stress nous permettra de comprendre le rôle de PRDX2 sur la plasticité de ces cellules. De plus, des expériences de transmigration permettront d'étudier leurs capacités chimiotactiques.

III PRDX2 favorise le développement du CHC

1) PRDX2 chez les patients atteints de CHC

Les travaux réalisés dans cette étude ont démontré que PRDX2 favorise le développement des tumeurs en stimulant la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion ainsi qu'en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose induite par le stress oxydatif. De plus, nous avons observé que PRDX2 est impliquée dans l'activation de différentes voies de signalisation pro-carcinogéniques, telles que les voies de l'EGFR, de PI3K/Akt et des MAPK. Nos observations corrélerent avec l'étude de Park et collaborateurs qui montre que PRDX2 est impliquée *in vivo* et *in vitro* dans la tumorigenèse dans le foie en favorisant la prolifération des cellules tumorales de CHC et en induisant la voie de signalisation *Rat sarcoma virus*

(Ras)/Forkhead box M1 (Park *et al.*, 2016b). Il est cependant à noter que cette étude a été réalisée dans un modèle murin transgénique de CHC induit par l'expression hétérologue de la forme activée de Ras humaine sous le contrôle du promoteur de l'albumine. Il faut donc considérer ces résultats avec précaution, car les modèles transgéniques murins présentent des inconvénients en termes de biologie tumorale, d'intégration aléatoire du transgène et ne reproduisent pas fidèlement la pathologie humaine.

Par ailleurs, il a été observé dans des modèles organoïdes et de xénogreffes que PRDX2 est impliquée dans le développement des tumeurs et la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales de CHC (Kwon *et al.*, 2016). L'étude de Han et collaborateurs montre *in vitro* que PRDX2 protège les cellules tumorales hépatiques de l'apoptose induite par le stress oxydatif (Han *et al.*, 2020). Enfin, l'étude de Zhang et collaborateurs montre dans une lignée cellulaire de cholangiocarcinome intrahépatique (HuCC-T1) que PRDX2 stimule la prolifération et l'invasion des cellules tumorales en activant la voie de signalisation PI3K/Akt (Zhang *et al.*, 2021). Cependant, il est à noter qu'une autre étude contredit les observations que nous avons faites. En effet, il a été observé dans un modèle *in cellulo* que la perte de fonction de PRDX2 favorise la prolifération et la migration des cellules tumorales de CHC (Bai *et al.*, 2019). Il faut cependant signaler que cette étude compare des cellules tumorales de CHC, les HCCLM3, à des cellules L-02 sensées être des cellules saines de foie fœtal. Or, les cellules L-02 sont une lignée de cellules dérivées d'un foie fœtal et immortalisée. De plus, une étude de Liang et collaborateurs a démontré que cette lignée présente des propriétés tumorales *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe (Liang *et al.*, 2016). De plus, une recherche dans les données de Cellosaurus, montre que cette lignée a été mal identifiée et est en réalité contaminée (Ye *et al.*, 2015). En effet, il s'agirait de cellules HeLa, par conséquent infectée par le papillomavirus et il a été démontré que l'infection par le papillomavirus humain induit une augmentation de l'expression de PRDX2 dans ces cellules (Chuerduangphui *et al.*, 2020), ce qui peut expliquer en partie pourquoi Bai et collaborateurs ont observé la surexpression de PRDX2 dans cette lignée, ainsi qu'une meilleure prolifération et une meilleure migration.

Notre étude s'inscrit dans la lignée de plusieurs études qui montrent le rôle de PRDX2 dans le développement et la progression de différents cancers. En effet, plusieurs études se sont intéressées au rôle de PRDX2 dans le cancer colorectal (CCR). Des études de pertes de fonction de PRDX2 ont démontré que PRDX2 médie la prolifération des cellules de CCR en activant la voie Wnt/ β -caténine et en favorisant la dégradation médiée par l'ubiquitination de p53 (Lu *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2021). De plus, PRDX2 est un médiateur de l'autophagie et de la

prolifération des cellules de CCR *via* la régulation de la voie p38 MAPK/FOXO (Zheng *et al.*, 2020). PRDX2 contribue à la survie des cellules tumorales en les protégeant du stress oxydatif (Lu *et al.*, 2014a). Enfin, il a été démontré que les différents états d'oxydation de PRDX2 régulent l'expression de la cycline D1 et le cycle cellulaire (Phalen *et al.*, 2006). Les auteurs ont suggéré que l'hydroxydation de PRDX2 induit son inactivation et des modifications structurales qui interrompent son activité de modulateur des processus rédox ainsi que les interactions avec différents facteurs de régulation. De plus, PRDX2 hydroxydée pourrait être également reconnue comme un signal interne prévenant la cellule d'une perturbation dans le métabolisme rédox ce qui participerait à l'arrêt du cycle cellulaire médié par le stress oxydatif. Le rôle de PRDX2 dans le cancer du poumon (NSCLC) est également bien documenté. En effet, les études de (Chen *et al.*, 2020) et de (Jing *et al.*, 2020) démontrent que PRDX2 soutient la prolifération, l'invasion et la migration des cellules tumorales de NSCLC. PRDX2 joue également un rôle important dans les carcinomes des cellules squameuses de l'œsophage, en régulant la voie Wnt- β -caténine (Feng *et al.*, 2020), ainsi que dans les carcinomes des cellules squameuses orales (Chuerduangphui *et al.*, 2020). De plus, un rôle de PRDX2 dans le développement de métastases du cancer du sein dans les poumons (Stresing *et al.*, 2013) et dans le développement du cancer gastrique en promouvant la prolifération ainsi que la survie des cellules tumorales (Zhang *et al.*, 2020a) ont également été décrits.

Les études de cohortes de patients à partir de données publiquement accessibles nous ont permis d'observer que PRDX2 est surexprimée dans les tissus de foie de patients souffrant de CHC. De plus, nous avons observé que l'expression de PRDX2 est plus importante dans des lignées cellulaires hépatocytaires dérivées de CHC Huh-7 et Huh-7.5.1 que dans les hépatocytes primaires humains (voir **Résultats** *Peroxiredoxin 2 is a driver of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease* **Figure 1B** et **Supplementary Figure 2**). Cette première observation corrèle avec les études de (Zhang *et al.*, 2020b) et (Xu *et al.*, 2021) qui observent par des études de cohortes que PRDX2 est surexprimée dans le tissu hépatique des patients souffrant de CHC. Nos observations sont également en corrélation avec plusieurs études qui démontrent que l'expression de PRDX2 est augmentée dans différents cancers. En effet, on peut citer les études de (Lu *et al.*, 2014a), (Zhang *et al.*, 2020a) et (Feng *et al.*, 2020) qui ont observé l'augmentation de l'expression de PRDX2 chez les patients atteints de cancer colorectal, gastrique ou de carcinome épidermoïde œsophagien respectivement.

Nous avons également observé que l'expression de PRDX2 dans les cellules hépatocytaires Huh-7.5.1 est associée à la cPLS de mauvais pronostic prédisant le risque de CHC et la survie

des patients. De manière surprenante, les études de cohortes que nous avons réalisé ne nous ont pas permis de corrélérer l'expression de PRDX2 à la survie des patients, ni au risque de récurrence du CHC (**Figure 32**). Ces résultats semblent d'autant plus surprenants que Zhang et collaborateurs démontrent que la surexpression de PRDX2 chez les patients atteints de CHC est associée à une moins bonne survie des patients (Zhang *et al.*, 2020b). Par ailleurs, dans les cancers de l'œsophage, du poumon et colorectaux, la surexpression de PRDX2 est corrélée à un mauvais pronostic et à une survie plus faible (Peng *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2020). Cette différence d'observation peut probablement s'expliquer par l'échantillonnage des cohortes. En effet, les études citées ci-dessus s'appuient sur de grandes cohortes issues de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ou du *Kaplan-Meier plotter* (<http://kmplot.com/analysis/>) qui regroupent les informations issues des bases de données du *Gene Expression Omnibus* (GEO), *The European Genome-phenome Archive* (EGA), et *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), ce qui leur permet d'obtenir des cohortes robustes et puissantes. Dans cette étude, les cohortes que nous étudions sont plus restreintes (83 patients), ce qui peut expliquer la différence que nous observons. A l'inverse, il est à noter qu'une étude de cohorte (Bai *et al.*, 2019) suggère que la faible expression de PRDX2 est associée à la plus faible survie des patients atteints de CHC. Ces observations sont à l'opposé de ce que nous avons observé et de ce qui est démontré dans les études citées ci-dessus. A nouveau, nous pouvons argumenter que la différence peut s'expliquer par l'échantillonnage de la cohorte. En effet, l'étude de Bai et collaborateurs s'appuie sur des patients d'une ethnie bien précise qui est la population Han. De plus, la cohorte analysée est principalement composée de patients infectés par le VHB et présentant des tumeurs bien différenciées. Il est probable dans ce cas, que la sélection bien spécifique de cette population explique en partie cette différence d'observation.

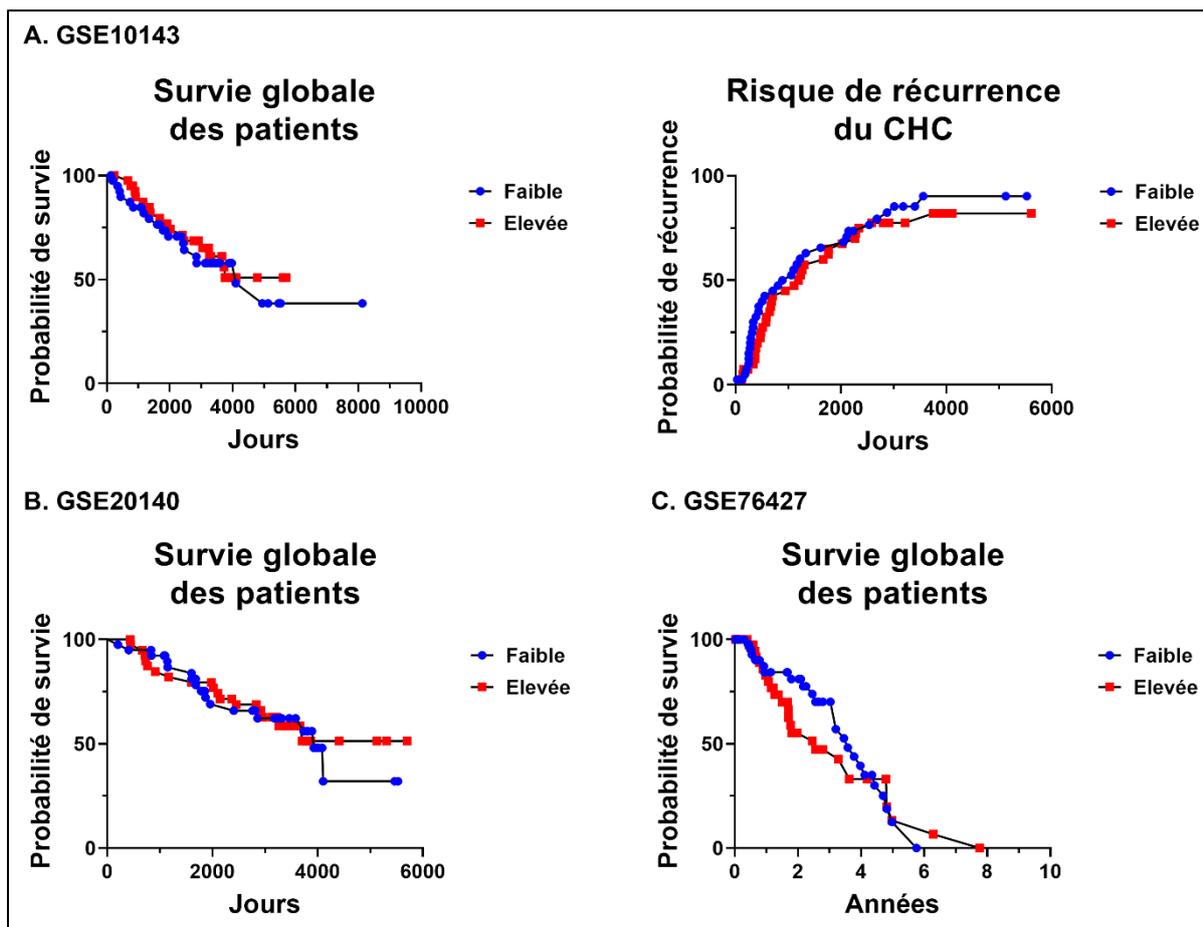


Figure 32 : Survie et risque de récurrence chez des patients atteints de CHC en fonction de l'expression de PRDX2. L'expression de PRDX2 a été analysée dans la cohorte A. GSE10143 B. GSE20140 C. GSE76427 et les patients ont été divisés en deux groupes selon l'expression faible ou élevée de PRDX2.

Pour aller plus loin :

Bien que notre étude observe la surexpression de PRDX2 dans les tissus de foie de patients atteints de CHC, nous n'avons pas pu mettre en évidence la surexpression de PRDX2 chez les patients souffrant de maladies chroniques hépatiques. Des études de cohortes de patients souffrant de maladies chroniques à différents stades permettront d'observer si l'expression de PRDX2 corrèle avec la progression de la maladie hépatique vers le CHC.

Nous avons démontré que l'expression hépatocytaire de PRDX2 *in vitro* et *in vivo* favorise l'hépatocarcinogénèse et est associée à la PLS de mauvais pronostic prédisant le risque de CHC et la survie des patients. Il serait donc judicieux de pouvoir étudier des cohortes de scRNA-Seq et de snRNA-Seq alliées aux données de survie des patients afin de pouvoir relier l'expression de PRDX2 dans les hépatocytes à la survie des patients et au risque de récurrence du CHC. Il faut noter que la disponibilité des données risque potentiellement d'être un frein. Cependant, la récente étude d'Alvarez et collaborateurs intègre des données de scRNA-Seq, de

snRNA-Seq et un ensemble de données de *bulk* RNA-Seq provenant de plusieurs cohortes. Grâce à cette méthode, ils ont identifié un type de cellule proliférante enrichi dans les tumeurs du CHC, associé à une survie globale réduite et lié aux mutations somatiques de *TP53* et *RBI* (Alvarez *et al.*, 2022). L'analyse des données disponibles de cette étude nous permettront peut-être d'apporter une réponse à notre question.

2) **PRDX2 et le caractère précurseur des cellules de CHC**

L'ensemble des résultats préliminaires présentés ici, soutient l'hypothèse selon laquelle le rôle de PRDX2 est différent selon les types cellulaires hépatiques. En effet, notre étude *in vivo* s'est focalisée sur le rôle de PRDX2 au sein des hépatocytes et sur l'effet indirect de l'extinction de PRDX2 dans les hépatocytes sur le phénotype des macrophages et des cellules stellaires. Les résultats de cette étude ont démontré que l'augmentation de l'expression de PRDX2 dans les hépatocytes favorise l'hépatocarcinogénèse. Par ailleurs, nos expériences *in vitro* laissent supposer que PRDX2 pourrait moduler la réponse inflammatoire dans les macrophages. Le rôle de PRDX2 dans les autres types cellulaires du foie reste donc à élucider.

Les méthodes de scRNA-Seq permettent l'étude de mélanges complexes de cellules, en mettant en exergue les fonctions cellulaires à l'échelle d'une seule cellule. Dans le domaine de la biologie des tumeurs, le scRNA-seq contribue à élucider l'hétérogénéité tumorale, qui est couramment observée au niveau moléculaire et clinique dans le CHC et permet d'identifier et de caractériser les différents types cellulaires, contrairement au *bulk* RNA-Seq. Cette technique a notamment permis l'étude des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (Pfister *et al.*, 2021). L'étude de Pfister et collaborateurs a mis en lumière l'importance de comprendre l'hétérogénéité tumorale dans les cas de CHC liés à la NAFLD, car ils peuvent être plus résistants aux nouvelles immunothérapies systémiques.

Dans cette étude, l'étude de l'expression de *PRDX2* à partir de données de scRNAseq issues du *Single cell liver atlas* (Aizarani *et al.*, 2019), démontre que *PRDX2* est plus exprimée dans les cellules épithéliales incluant les hépatocytes, les cholangiocytes et les cellules hépatiques précurseurs bipotentes, qui expriment notamment les marqueurs EPCAM, TROP2 et KRT19 (voir **Résultats** *Peroxiredoxin 2 is a driver of hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease* **Figure 1E-G**). Par ailleurs, nous avons pu observer dans le modèle murin que l'extinction de l'expression de *Prdx2* induisait une diminution de l'expression des marqueurs du caractère précurseur EPCAM et CD44 (voir **Résultats** *Peroxiredoxin 2 is a driver of*

hepatocarcinogenesis in metabolic liver disease **Supplementary Figure 7**). Tout ceci tend à démontrer que PRDX2 joue un rôle dans le caractère précurseur des cellules tumorales. Cette hypothèse est soutenue par deux études. En effet, l'étude (Kwon *et al.*, 2016) observe une corrélation entre l'expression de PRDX2 et celle des marqueurs EPCAM et K19 dans des tissus de patients atteints de CHC. De plus, leur étude de perturbation de l'expression de PRDX2 dans des cellules hépatocytaires Huh-7 montre une association de l'expression de PRDX2 avec les marqueurs SOX2 et CD133. Par ailleurs, l'étude décrite dans (Zhao *et al.*, 2017) montre que l'expression de PRDX2 est augmentée dans les tumeurs de CHC peu différenciées, caractérisées par l'abondance de cellules précurseurs par rapport aux tumeurs de CHC bien différenciées. Par conséquent, cela soutient l'hypothèse selon laquelle l'expression de PRDX2 dans les hépatocytes participe à la dédifférenciation des cellules en précurseurs et indique un mauvais pronostic des patients atteints de CHC

Pour aller plus loin :

Afin de comprendre plus profondément le rôle de PRDX2 dans le caractère précurseur des cellules tumorales de CHC, des études de perturbations de l'expression de PRDX2 à la fois dans le modèle murin et dans le modèle cellulaire, nous permettrons de vérifier le rôle de PRDX2 dans les voies de signalisation mTor, Notch1 et GSK-3 β / β -caténine impliquées dans le maintien du caractère précurseurs des cellules tumorales.

La lignée cellulaire HepaRG est une lignée de cellules progénitrices bipotentes humaines capables de se différencier en deux phénotypes cellulaires différents : des cellules de type biliaire, *cholangiocyte-like* et des cellules de type hépatocytaire, *hepatocyte-like*. Une étude de perturbation de l'expression de *PRDX2* dans ces cellules avant d'induire leur différenciation permettra de vérifier grâce à la technique de cytométrie en flux si l'expression de *PRDX2* favorise la différenciation des précurseurs vers un phénotype hépatocyte, cholangiocyte ou si PRDX2 permet le maintien du caractère précurseur de ces cellules.

Par ailleurs, d'autres aspects du rôle de PRDX2 dans le CHC sont encore à adresser. Si nous avons démontré dans notre étude que cibler PRDX2 permet d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, nous n'en connaissons pas le mécanisme. Nous avons précédemment cité l'étude de Phalen et collaborateurs démontrant le rôle de PRDX2 dans la régulation du cycle cellulaire (Phalen *et al.*, 2006). Il serait opportun de vérifier dans notre modèle cellulaire comment PRDX2 est impliqué dans la régulation cycle cellulaire, en vérifiant l'expression des différentes cyclines et des kinases dépendantes des cyclines, par exemple. Des expériences de

cytométrie en flux permettront également de vérifier si cibler PRDX2 dans le modèle cellulaire arrête la progression du cycle cellulaire à une phase particulière du cycle.

Il faut également noter que dans notre étude *in vivo*, le KO de *Prdx2* dans les hépatocytes murins a été réalisé avant d'induire la maladie hépatique. Il serait donc intéressant de vérifier si une extinction de *Prdx2* après l'induction des dommages hépatiques par le régime CDAHFD et/ou l'injection de DEN permet également de ralentir ou stopper la progression de la maladie et prévenir le développement du CHC.

IV Cibler PRDX2 pour traiter les maladies hépatiques chroniques et prévenir le CHC

Actuellement, il existe un besoin médical non satisfait pour traiter et prévenir le CHC. De plus, il n'existe pas de méthode fiable et approuvée pour détecter et diagnostiquer le CHC à un stade précoce chez les patients, car cette pathologie ne présente pas ou peu de symptômes spécifiques. Nos travaux ont démontré l'intérêt de cibler PRDX2 afin de prévenir le développement du CHC et améliorer la maladie hépatique métabolique. Cette hypothèse est soutenue par deux études qui montrent que la parvifoline AA ou l'adénanthine permettent de sensibiliser les cellules tumorales de CHC pour induire leur apoptose, en ciblant entre autres l'activité PRDX1 et PRDX2 (Hou *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2019). Par ailleurs, une étude a démontré que cibler par ARN interférence l'expression de PRDX2 dans des cellules de CCR permet de resensibiliser ces cellules à la chimiothérapie par 5' fluorouracil en inhibant l'activation de la voie PI3K/ Akt (Xu *et al.*, 2017). Enfin, l'utilisation du S-nitrosoglutathione (GSNO) *in vitro* a permis de démontrer que le GSNO est capable de cibler PRDX2 dans les cellules tumorales de poumon, induire l'apoptose des cellules tumorales en activant la voie AMPK/SIRT1 (Zhang *et al.*, 2019) et inhiber la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Jing *et al.*, 2020). Les inhibiteurs de PRDX2 cités précédemment, telles que la parvifoline AA, l'adénanthine, issues de la pharmacopée de la médecine traditionnelle chinoise, et le GSNO ne sont pas spécifiques de PRDX2 et interviennent dans d'autres voies de signalisation. Le GSNO par exemple est un donneur d'oxyde nitrique et intervient dans de nombreuses voies de signalisation (NF- κ B, Trx...) en induisant la S-nitrosylation ou la S-glutathiolation de différentes protéines. De même, l'adénanthine cible la voie NF- κ B en liant p65 et IKK β (Yin *et al.*, 2013) et la parvifoline AA, dont la structure est semblable à la

colchicine, présente une activité inhibitrice de la polymérisation de la tubuline en se liant à la tubuline- α (Silva-García *et al.*, 2019).

Il existe des inhibiteurs de PRDX2, tels que la conoïdine A et ses dérivés. Cependant, celle-ci présente une cytotoxicité non négligeable et est un inhibiteur allostérique de PRDX2 qui agit à de fortes doses avec une IC50 de 23 μ M. Dans le futur, il sera d'intérêt médical de découvrir et développer de petites molécules ciblant spécifiquement PRDX2 pour traiter les maladies hépatiques chroniques, ainsi que de prévenir et traiter le CHC.

Il faut souligner que, bien que cibler PRDX2 dans le cadre des maladies hépatiques chroniques et le CHC pourrait permettre d'améliorer la gestion des patients, cette amélioration ne pourra se faire sans méthode de diagnostic fiable permettant de stratifier de manière efficace les patients. Il est nécessaire d'améliorer la surveillance des populations à risque de développer un CHC pour favoriser l'efficacité de la mise en place de thérapies ciblant PRDX2. Pour cela, la systématisation de l'utilisation des outils de diagnostic que nous avons présentés dans l'introduction : la PLS, la PLS-NAFLD et leurs dérivés PLS-Sec et PLS-Sec NAFLD permettront un diagnostic précoce des maladies chroniques hépatiques et la stratification des patients.

Notre étude est innovante, car nous avons démontré *in vivo* et *in vitro* que cibler spécifiquement PRDX2 dans les hépatocytes, pourrait prévenir le développement du CHC. De plus, les données de notre modèle murin de CHC induit par la NASH suggèrent que cibler PRDX2 dans les hépatocytes permettrait peut-être de traiter les maladies hépatiques chroniques, en particulier la NASH pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement clinique approuvé. Nous proposons que cibler PRDX2 chez des patients souffrant de maladies chroniques hépatiques telles que la NAFLD ou la NASH permettrait à la fois de traiter la maladie et d'éviter le développement du CHC. Le CHC est très réfractaire aux thérapies proposées actuellement aux patients et ceci même après une résection chirurgicale. En effet, 70% des patients présentent une récurrence tumorale dans les 5 ans. De plus, une fois que les tumeurs atteignent un stade avancé, les thérapies systémiques actuellement disponibles n'apportent que des bénéfices marginaux sur la survie des patients, de l'ordre de quelques mois. Nous avons démontré que cibler PRDX2 dans les hépatocytes a un effet anticancer direct. En effet, cibler PRDX2 dans des cellules de CHC permet d'inhiber les processus tumoraux et d'induire l'apoptose médiée par le stress oxydatif. Par conséquent PRDX2 semble être une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement du CHC ainsi que pour prévenir la récurrence du CHC chez les patients.

Nos travaux démontrent également que cibler *Prdx2* de manière spécifique dans les hépatocytes n'est pas hépatotoxique, les taux d'albumine dans le plasma des souris restant stables. Ces résultats sont corroborés par nos tests de survie *in vitro*, où le *silencing* de PRDX2 dans des hépatocytes primaires humains n'est pas cytotoxique. Ces éléments renforcent l'intérêt de considérer PRDX2 comme cible thérapeutique potentielle pour traiter et prévenir le CHC. Cependant, il ne faut pas négliger que PRDX2 est une protéine exprimée de façon ubiquitaire et que la cibler pourrait avoir un impact sur d'autres organes et structures. En effet, dans l'étude de Lee et collaborateurs, un KO ubiquitaire de *Prdx2* a été induit dans des souris afin de comprendre l'importance physiologique de PRDX2. Bien que les souris KO pour *Prdx2* soient saines et fertiles, ils ont observé que celles-ci présentaient une splénomégalie, des corps de Heinz dans leur sang périphérique, des cellules érythrocytaires morphologiquement anormales qui contenaient des niveaux nettement plus élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et que les souris souffraient d'anémie hémolytique (Lee *et al.*, 2003). Ils ont ainsi démontré que PRDX2 joue un rôle majeur dans la protection des globules rouges contre le stress oxydatif chez la souris. Cette étude souligne l'importance de cibler PRDX2 spécifiquement dans le foie, et nous met en garde sur d'éventuels effets secondaires indésirables de drogues ciblant PRDX2 chez des patients souffrant de NAFLD ou de NASH, ces deux maladies étant liées à d'autres pathologies.

Il sera donc intéressant par la suite de se pencher sur la possibilité de délivrer des drogues ciblant PRDX2 de façon spécifique dans le foie, grâce à la technologie des nanoparticules par exemple. Plusieurs études démontrent que cibler les cellules tumorales de CHC à l'aide de nanoparticules pour délivrer des molécules thérapeutiques est une approche prometteuse pour la gestion du CHC. L'encapsulation de molécules thérapeutiques dans des nanoparticules leur permet de s'accumuler de manière spécifique au site de la tumeur en reconnaissant des récepteurs spécifiques surexprimés par les cellules tumorales. De plus, les nanoparticules permettent aux molécules thérapeutiques de circuler plus longtemps dans le corps. Par ailleurs, certains matériaux utilisés pour la formation des nanoparticules, tels que les pectines et le chitosan présentent une activité cytotoxique et agissant de manière synergique avec les molécules thérapeutiques (Turato *et al.*, 2017; Elnaggar *et al.*, 2021). Plusieurs études et essais cliniques de phase I sont actuellement en cours pour valider l'utilisation des nanoparticules dans les cas de CHC (NCT02716012 et NCT04682847). Cependant, il faut prendre en compte que malgré des résultats prometteurs, la recherche clinique sur les nanomédicaments pour le

traitement du CHC est encore confrontée à de nombreux défis, notamment des problèmes de spécificités, de stabilité, de sécurité d'utilisation chez l'Homme (Elnaggar *et al.*, 2021).

Pour aller plus loin :

Afin de découvrir de nouvelles drogues non toxiques ciblant spécifiquement PRDX2, nous avons décidé de réaliser un criblage de petites molécules déjà approuvées par la *Food and Drugs Administration* (FDA) et l'EMA (*European Medicines Agency*) pour leur qualité curative et leur biosécurité basé sur l'utilisation de la chimiothèque de molécules bioactives Prestwick®, qui contient 1520 molécules. Nous avons établi une collaboration avec la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (Dr Pascal Villa, spécialiste en criblage de petites molécules, Illkirch Graffenstaden), la Plateforme IMPReSs (Dr Renaud Wagner, spécialiste dans la production de protéines recombinantes) et le Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (Dr Dominique Bonnet, spécialiste en chimie et structure des molécules). PRDX2 a été produite dans un système eucaryote (levure *Pichia pastoris*) pour garantir une conformation la plus proche possible de la PRDX2 humaine par l'équipe du Dr Wagner. La séquence codante de PRDX2 humaine a été clonée dans un vecteur de la levure *Pichia* qui permet l'intégration de plusieurs copies et contient une séquence de sécrétion de la protéine permettant l'excrétion de la PRDX2 dans le milieu de culture. En parallèle, nous avons mis au point un test enzymatique basé sur les propriétés oxydoréductrices de PRDX2 pour mesurer son activité, dans le but de quantifier l'efficacité de molécules inhibant l'activité de PRDX2, identifiées lors d'un criblage de banque de molécules bioactives. Grâce à l'équipe du PCBIS du Dr Villa nous avons pu mettre au point une stratégie de criblage par anisotropie de la fluorescence (**Figure 33**). Cette technique repose sur la détection de la polarisation de la fluorescence émise par une molécule sonde, lorsque celle-ci est exposée à une lumière polarisée. Si la sonde est libre, son mouvement dans l'espace est libre et la polarisation de la fluorescence est faible, une fois la sonde liée à la protéine cible, son mouvement est réduit et la polarisation de la fluorescence augmente. Lorsque le couple protéine-sonde est mis en présence de molécules candidates, si ces molécules fixent la protéine cible, on observe une modification de la polarisation de la fluorescence. Les candidats liant PRDX2 sont identifiés par la variation de la polarisation de la fluorescence qu'ils induisent. Dans cette étude le fluorophore couplés à la sonde est la lissamine, dont l'équipe du Dr Villa a vérifié qu'elle ne liait pas PRDX2. Afin d'identifier un sonde fluorescente capable de lier PRDX2, l'équipe du Dr Villa a réalisé le criblage de deux banques de sondes fluorescentes JF-Fluo et FD-F, qui contiennent 1280 molécules couplées à la lissamine. Ce premier criblage leur a permis d'identifier 37 sondes candidates, dont 3 ont été sélectionnées

pour déterminer leur affinité avec PRDX2 et ainsi sélectionner la sonde la plus affine pour PRDX2. De cette manière, la sonde JF-Fluo-06-G10 a été sélectionnée pour la suite du criblage de petites molécules liant PRDX2.

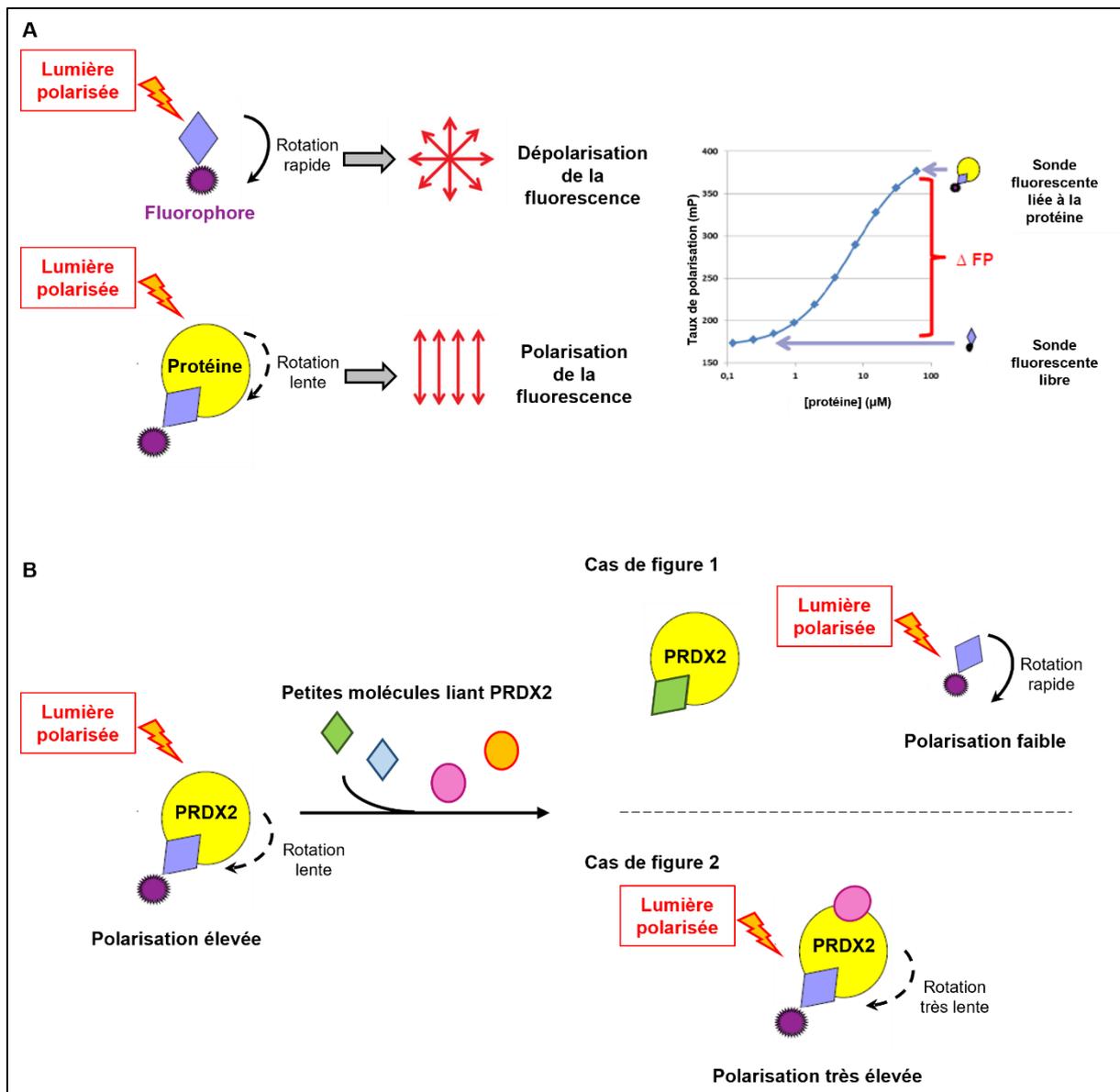


Figure 33 : Principe expérimental du criblage par anisotropie de la fluorescence. **A.** Une lumière polarisée est projetée sur la sonde fluorescente. Si celle-ci est libre, alors sa rotation est rapide et l'émission de la fluorescence se fait de manière non polarisée. On observe donc une dépolarisation de la fluorescence. Cependant, si la sonde est liée à une protéine, alors son mouvement est ralenti et se restreint ce qui entraîne une polarisation de la fluorescence. **B.** Lors du criblage de petites molécules liant PRDX2, si une molécule peut lier PRDX2, deux cas de figures se présentent : 1) Compétition entre la drogue et la sonde. La molécule lie PRDX2 et déplace la sonde fluorescente. La rotation de la sonde libre est élevée et la polarisation de la fluorescence diminue. 2) Allostérie. La molécule lie PRDX2 sans déplacer la sonde. La conformation de la

protéine est modifiée et son affinité pour la sonde augmente. Le mouvement du groupement sonde-PRDX2-molécules est encore plus restreint et est ralenti. La polarisation de la fluorescence augmente.

Par la suite, l'utilisation de cette sonde et du principe d'anisotropie de la fluorescence pour le criblage de la banque Prestwick[©], nous a permis d'identifier 26 molécules candidates liant PRDX2 et pour lesquelles nous avons poursuivi la validation. Grâce à notre test enzymatique nous avons pu identifier 6 drogues capables d'inhiber l'activité de PRDX2 avec une efficacité comparable à celle de la conoïdine A qui sert de contrôle dans nos essais. Il est intéressant de noter que parmi les 6 drogues inhibitrices identifiées, trois sont déjà connues pour leur activité anti-tumorale : la mitoxantrone dihydrochloride, le Zafirlukast et l'Alexidine dihydrochloride (**Figure 34**). Nous avons ensuite déterminé la cytotoxicité de ces molécules sur des cellules hépatocytaires Huh-7.5.1. Les résultats préliminaires, montrent que dans les Huh-7.5.1 seul le Zafirlukast présente une cytotoxicité plus faible que la conoïdine A. Ces résultats doivent encore être confirmés dans les hépatocytes primaires humains.

Le criblage de la banque de Prestwick[©] démontre que la méthode de criblage par anisotropie de fluorescence est pertinente pour identifier des molécules liant PRDX2 et ayant une activité inhibitrice sur PRDX2. Cependant, il est à noter que parmi les 6 drogues inhibitrices identifiées, toutes agissent à des concentrations élevées de l'ordre du μM . De plus, les tests de viabilité montrent qu'à part le Zafirlukast, toutes ces drogues ont une cytotoxicité plus élevée ou comparable à celle de la conoïdine A. De ce fait, elles ne présentent pas d'avantage sur la conoïdine A et leur utilisation sur le modèle murin et à fortiori sur l'humain semble compromise. Par ailleurs, il est à noter que les drogues identifiées présentent des effets secondaires non négligeables, qui compromettent leur utilisation chez l'Homme. Par exemple, l'utilisation du Zafirlukast est déconseillée chez les patients souffrant de maladies hépatiques avancées, telles que la cirrhose. L'utilisation de la mitoxantrone présente des risques non négligeables d'anémie. Le dithiazanine iodide est un antihelminthique très toxique pour l'Homme. Par conséquent, l'identification d'autres molécules liant PRDX2 est nécessaire dans la suite de cette étude.

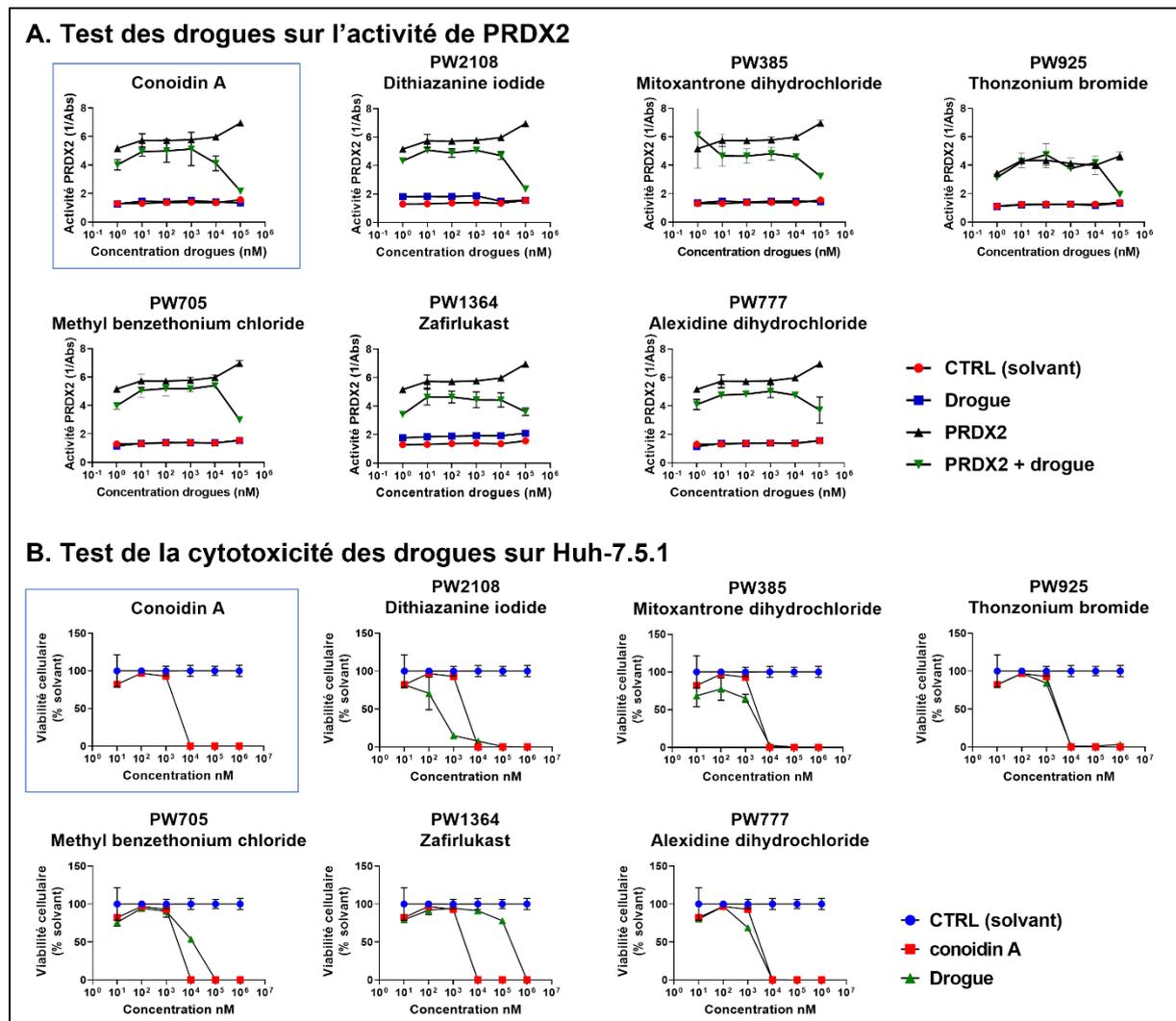


Figure 34 : Test des drogues candidates sur l'activité de la PRDX2 et détermination de la cytotoxicité des drogues en Huh-7.5.1. A. Effet des drogues candidates sur l'activité de PRDX2. PRDX2 a été mise en présence de concentrations croissantes de drogues liant PRDX2 afin d'évaluer sa capacité à détoxifier 1 nmole d' H_2O_2 , grâce à notre test enzymatique. Données représentées avec l'activité en fonction de la concentration de drogues. La conoïdine A sert de témoin d'inhibition et les 6 drogues présentant les meilleures capacités inhibitrices sont représentées. Empiriquement, l'activité de PRDX2 a été déterminée comme 1/absorbance. La courbe du solvant seul (●) ou de la drogue seule (■) sont des contrôles négatifs de l'activité de PRDX2. La courbe de PRDX2 (▲) représente le contrôle positif d'activité de la PRDX2. La courbe de PRDX2 en présence de drogue (▼) permet d'observer l'ordre de concentration de drogue à partir duquel l'activité de PRDX2 diminue. **B. Cytotoxicité des drogues candidates.** Les Huh-7.5.1 ont été traitées avec des concentrations croissantes des drogues candidates pendant 48 heures. La viabilité des cellules a été évaluée par la quantification de l'ATP cellulaire grâce au CellTiter-Glo®. Données représentées en pourcentage de viabilité des cellules traitées avec le solvant seul en fonction de la concentration de drogues. La courbe de survie des cellules en présence de concentrations croissantes de conoïdine A (■) sert de témoin de mortalité des cellules. La courbe du solvant seul (●) est un contrôle positif de viabilité des cellules. La

courbe représentant la viabilité des cellules en fonction des concentrations de drogues (▲) permet d'observer l'ordre de concentration de drogue à partir duquel la viabilité des cellules diminue.

La suite de ces travaux de criblages de banques de drogues se poursuivra avec le criblage des banques de la chimiothèque nationale (CNE), de Strasbourg et de Sherbrooke ce qui représente plus de 8500 molécules candidates. Ceci permettra de trouver d'autres molécules liant PRDX2, dont l'activité inhibitrice pourrait être plus intéressante. Parmi les molécules liant PRDX2 lors des criblages, il s'agira dans un premier temps de vérifier leur efficacité inhibitrice sur l'activité enzymatique de PRDX2, comme nous l'avons déjà fait pour les molécules issues du criblage de la banque Prestwick©. Ceci nous permettra de déterminer les doses les plus efficaces pour inhiber l'activité de PRDX2 *in vitro*. Il sera également important et nécessaire de vérifier l'absence de toxicité des molécules pour les hépatocytes primaires humains. L'efficacité des meilleurs hits pour leur capacité à inverser la signature de mauvais pronostic (cPLS) liée à la progression de la maladie hépatique et au développement du CHC sera ensuite testée. La suite de cette étude se fera en collaboration avec la plateforme de chimie et pharmacologie TechMedIII (Dr. J.L Galzi, Illkirch Graffenstaden) qui étudiera la structure des molécules identifiées et améliorera les propriétés pharmacologiques *in vivo* des molécules les plus prometteuses ainsi que la délivrabilité de ces molécules dans le foie.

CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette thèse, l'étude du rôle de PRDX2 à l'aide de modèles murins et cellulaires a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC et ainsi de proposer un nouveau paradigme dans le domaine de la cancérologie.

Les travaux réalisés, ont permis de mettre en évidence un rôle fonctionnel important de PRDX2 dans l'hépatocarcinogénèse et la maladie hépatique métabolique. Nous avons notamment démontré que PRDX2 favorise l'hépatocarcinogénèse et la progression du cancer en induisant des voies de signalisation pro-carcinogéniques et en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose médiée par le stress oxydatif. De plus, nos travaux ont également démontré que PRDX2 participe au maintien des caractéristiques des cellules tumorales et favorise l'expression de marqueurs des cellules hépatiques précurseurs. Cette étude permet également de démontrer que cibler l'expression de *Prdx2 in vivo* dans les hépatocytes améliore la fonction hépatique et réduit la stéatose hépatique en rétablissant l'activité de l'AMPK. Enfin, nos résultats préliminaires montrent que PRDX2 pourrait moduler la réponse inflammatoire dans la NASH.

En outre, ces travaux démontrent que cibler PRDX2 dans le foie pourrait représenter une stratégie sûre et efficace de prévenir le développement du CHC et de traiter les maladies hépatiques chroniques. De plus, les résultats préliminaires de criblage de drogues montrent que nous sommes en mesure d'identifier de petites molécules inhibant l'activité de PRDX2. Par conséquent, le développement de composés ciblant PRDX2 pourraient constituer la base d'une nouvelle approche thérapeutique pour prévenir le CHC, ce qui contribuera à une meilleure gestion de l'offre de soins aux patients.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abe, N., Kato, S., Tsuchida, T., Sugimoto, K., Saito, R., Verschuren, L., *et al.* (2019) Longitudinal characterization of diet-induced genetic murine models of non-alcoholic steatohepatitis with metabolic, histological, and transcriptomic hallmarks of human patients. *Biol Open* **8**: bio041251.

Ahn, S.B., Jang, K., Jun, D.W., Lee, B.H., and Shin, K.J. (2014) Expression of Liver X Receptor Correlates with Intrahepatic Inflammation and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* **59**: 2975–2982.

Airaghi, L., Rango, M., Maira, D., Barbieri, V., Valenti, L., Lombardi, R., *et al.* (2018) Subclinical cerebrovascular disease in NAFLD without overt risk factors for atherosclerosis. *Atherosclerosis* **268**: 27–31.

Aizarani, N., Saviano, A., Sagar, Mailly, L., Durand, S., Herman, J.S., *et al.* (2019) A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* **572**: 199–204.

Alannan, M., Fayyad-Kazan, H., Trézéguet, V., and Merched, A. (2020) Targeting Lipid Metabolism in Liver Cancer. *Biochemistry* **59**: 3951–3964.

Albhaisi, S., Chowdhury, A., and Sanyal, A.J. (2019) Non-alcoholic fatty liver disease in lean individuals. *JHEP Rep* **1**: 329–341.

Alger, H.M., Brown, J.M., Sawyer, J.K., Kelley, K.L., Shah, R., Wilson, M.D., *et al.* (2010) Inhibition of Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase 2 (ACAT2) Prevents Dietary Cholesterol-associated Steatosis by Enhancing Hepatic Triglyceride Mobilization *. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 14267–14274.

Alvarez, M., Benhammou, J.N., Darci-Maher, N., French, S.W., Han, S.B., Sinsheimer, J.S., *et al.* (2022) Human liver single nucleus and single cell RNA sequencing identify a hepatocellular carcinoma-associated cell-type affecting survival. *Genome Med* **14**: 50.

Anstee, Q.M., Darlay, R., Cockell, S., Meroni, M., Govaere, O., Tiniakos, D., *et al.* (2020) Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort☆. *Journal of Hepatology* **73**: 505–515.

Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O., and Heikenwalder, M. (2019) From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **16**: 411–428.

Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., and Zanlungo, S. (2015) Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1852**: 1765–1778.

Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A.M., and Feldstein, A.E. (2016) Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci* **61**: 1294–1303.

Arroyave-Ospina, J.C., Wu, Z., Geng, Y., and Moshage, H. (2021) Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants* **10**: 174.

Asrani, S.K., Devarbhavi, H., Eaton, J., and Kamath, P.S. (2019) Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology* **70**: 151–171.

Athuluri-Divakar, S.K., and Hoshida, Y. (2019) Generic chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1440**: 23–35.

B

Baffy, G. (2015) MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Med* **4**: 1977–1988.

Bai, B., Lin, Y., Hu, J., Wang, H., Li, L., Zhao, S., *et al.* (2019) Peroxiredoxin2 downregulation enhances hepatocellular carcinoma proliferation and migration, and is associated with unfavorable prognosis in patients. *Oncol Rep* **41**: 1539–1548.

Barbara, M., Scott, A., and Alkhouri, N. (2018) New insights into genetic predisposition and novel therapeutic targets for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr* **7**: 372–381.

Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* **115**: 209–218.

Baumert, T.F., Jühling, F., Ono, A., and Hoshida, Y. (2017) Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals. *BMC Medicine* **15**: 52.

Beier, J.I., and Banales, J.M. (2018) Pyroptosis: An inflammatory link between NAFLD and NASH with potential therapeutic implications. *J Hepatol* **68**: 643–645.

Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.-C., and Roudot-Thoraval, F. (2013) The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology* **58**: 593–608.

Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q.-H., Jia, H.-L., He, P., Zanetti, K.A., *et al.* (2006) Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* **10**: 99–111.

Byrne, C.D., and Targher, G. (2015) NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology* **62**: S47–S64.

C

Caballero, F., Fernández, A., De Lacy, A.M., Fernández-Checa, J.C., Caballería, J., and García-Ruiz, C. (2009) Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *Journal of Hepatology* **50**: 789–796.

Cao, Z., and Lindsay, J.G. (2017) The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story. In *Macromolecular Protein Complexes: Structure and Function*. Harris, J.R., and Marles-Wright, J. (eds). Springer International Publishing, Cham. pp. 127–147 https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_5. Accessed January 14, 2022.

Cariello, M., Piccinin, E., and Moschetta, A. (2021) Transcriptional Regulation of Metabolic Pathways via Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* **11**: 1519–1539.

Champion, M., Brennan, K., Croonenborghs, T., Gentles, A.J., Pochet, N., and Gevaert, O. (2018) Module Analysis Captures Pancancer Genetically and Epigenetically Deregulated Cancer Driver Genes for Smoking and Antiviral Response. *EBioMedicine* **27**: 156–166.

Chatrath, H., Vuppalanchi, R., and Chalasani, N. (2012) Dyslipidemia in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in liver disease* **32**: 22.

Che, L., Chi, W., Qiao, Y., Zhang, J., Song, X., Liu, Y., *et al.* (2020) Cholesterol biosynthesis supports the growth of hepatocarcinoma lesions depleted of fatty acid synthase in mice and humans. *Gut* **69**: 177–186.

Chen, Y., Yang, S., Zhou, H., and Su, D. (2020) PRDX2 Promotes the Proliferation and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo. *Biomed Res Int* **2020** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7474358/>. Accessed May 27, 2021.

Chen, Z.-A., Tian, H., Yao, D.-M., Zhang, Y., Feng, Z.-J., and Yang, C.-J. (2021) Identification of a Ferroptosis-Related Signature Model Including mRNAs and lncRNAs for Predicting Prognosis and Immune Activity in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol* **11**: 738477.

Cheng, A.-L., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P.R., Ducreux, M., Kim, T.-Y., *et al.* (2022) Updated efficacy and safety data from IMbrave150: Atezolizumab plus bevacizumab vs. sorafenib for unresectable hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **76**: 862–873.

Choi, M.H., Lee, I.K., Kim, G.W., Kim, B.U., Han, Y.-H., Yu, D.-Y., *et al.* (2005) Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* **435**: 347–353.

Choi, S.-L., Kim, S.-J., Lee, K.-T., Kim, J., Mu, J., Birnbaum, M.J., *et al.* (2001) The Regulation of AMP-Activated Protein Kinase by H₂O₂. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **287**: 92–97.

Chuerduangphui, J., Ekalaksananan, T., Heawchaiyaphum, C., Vatanasapt, P., and Pientong, C. (2020) Peroxiredoxin 2 is highly expressed in human oral squamous cell carcinoma cells and is upregulated by human papillomavirus oncoproteins and arecoline, promoting proliferation. *PLoS One* **15** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7746188/>. Accessed January 6, 2021.

Chusri, P., Kumthip, K., Hong, J., Zhu, C., Duan, X., Jilg, N., *et al.* (2016) HCV induces transforming growth factor β 1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Sci Rep* **6**: 22487.

Coughlan, K.A., Valentine, R.J., Ruderman, N.B., and Saha, A.K. (2013) Nutrient Excess in AMPK Downregulation and Insulin Resistance. *J Endocrinol Diabetes Obes* **1**: 1008.

Craig, A.J., Felden, J. von, Garcia-Lezana, T., Sarcognato, S., and Villanueva, A. (2020) Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **17**: 139–152.

Crouchet, E., Bandiera, S., Fujiwara, N., Li, S., El Saghire, H., Fernández-Vaquero, M., *et al.* (2021) A human liver cell-based system modeling a clinical prognostic liver signature for therapeutic discovery. *Nat Commun* **12**: 5525.

Crouchet, E., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2017) Hepatitis C virus-apolipoprotein interactions: molecular mechanisms and clinical impact. *Expert Rev Proteomics* **14**: 593–606.

D

D'Ambrosio, R., Aghemo, A., Rumi, M.G., Ronchi, G., Donato, M.F., Paradis, V., *et al.* (2012) A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology* **56**: 532–543.

Dashe, J.S., McIntire, D.D., and Twickler, D.M. (2009) Effect of Maternal Obesity on the Ultrasound Detection of Anomalous Fetuses. *Obstetrics & Gynecology* **113**: 1001–1007.

Day, E.A., Ford, R.J., and Steinberg, G.R. (2017) AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **28**: 545–560.

DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* **2** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928883/>. Accessed July 1, 2020.

Desai, A., Sandhu, S., Lai, J.-P., and Sandhu, D.S. (2019) Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol* **11**: 1–18.

Diehl, A.M., and Day, C. (2017) Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *New England Journal of Medicine* **377**: 2063–2072.

Dornbos, P., Jurgelewicz, A., Fader, K.A., Williams, K., Zacharewski, T.R., and LaPres, J.J. (2019) Characterizing the Role of HMG-CoA Reductase in Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Liver Injury in C57BL/6 Mice. *Sci Rep* **9**: 15828.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., *et al.* (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* **464**: 1357–1361.

Duval, C., Touche, V., Tailleux, A., Fruchart, J.-C., Fievet, C., Clavey, V., *et al.* (2006) Niemann–Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**: 1259–1263.

E

EASL (2018) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **69**: 182–236.

El-Khoueiry, A.B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T.S., Kudo, M., Hsu, C., *et al.* (2017) Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* **389**: 2492–2502.

Elnaggar, M.H., Abushouk, A.I., Hassan, A.H.E., Lamloom, H.M., Benmelouka, A., Moatamed, S.A., *et al.* (2021) Nanomedicine as a putative approach for active targeting of hepatocellular carcinoma. *Seminars in Cancer Biology* **69**: 91–99.

Eslam, M., Sanyal, A.J., George, J., Sanyal, A., Neuschwander-Tetri, B., Tiribelli, C., *et al.* (2020) MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **158**: 1999-2014.e1.

Esquejo, R.M., Salatto, C.T., Delmore, J., Albuquerque, B., Reyes, A., Shi, Y., *et al.* (2018) Activation of Liver AMPK with PF-06409577 Corrects NAFLD and Lowers Cholesterol in Rodent and Primate Preclinical Models. *EBioMedicine* **31**: 122–132.

Estes, C., Anstee, Q.M., Arias-Loste, M.T., Bantel, H., Bellentani, S., Caballeria, J., *et al.* (2018) Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *Journal of Hepatology* **69**: 896–904.

F

Fang, Y., He, J., Janssen, H.L.A., Wu, J., Dong, L., and Shen, X.Z. (2018) Peroxiredoxin 1, restraining cell migration and invasion, is involved in hepatocellular carcinoma recurrence. *Journal of Digestive Diseases* **19**: 155–169.

Fasano, R., Shadbad, M.A., Brunetti, O., Argentiero, A., Calabrese, A., Nardulli, P., *et al.* (2021) Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma: New Prospects for the Cancer Therapy. *Life (Basel)* **11**: 1355.

Feng, A.L., Han, X., Meng, X., Chen, Z., Li, Q., Shu, W., *et al.* (2020) PRDX2 plays an oncogenic role in esophageal squamous cell carcinoma via Wnt/ β -catenin and AKT pathways. *Clin Transl Oncol* **22**: 1838–1848.

Finn, R.S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P.R., Ducreux, M., Kim, T.-Y., *et al.* (2020) Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* **382**: 1894–1905.

Forshaw, T.E., Holmila, R., Nelson, K.J., Lewis, J.E., Kemp, M.L., Tsang, A.W., *et al.* (2019) Peroxiredoxins in Cancer and Response to Radiation Therapies. *Antioxidants (Basel)* **8** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356878/>. Accessed March 25, 2019.

Fuchs, B.C., Hoshida, Y., Fujii, T., Wei, L., Yamada, S., Lauwers, G.Y., *et al.* (2014) EGFR inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **59**: 1577–1590.

Fujita, N., Miyachi, H., Tanaka, H., Takeo, M., Nakagawa, N., Kobayashi, Y., *et al.* (2009) Iron Overload Is Associated with Hepatic Oxidative Damage to DNA in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **18**: 424–432.

Fujiwara, N., Friedman, S.L., Goossens, N., and Hoshida, Y. (2018) Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. *J Hepatol* **68**: 526–549.

Fujiwara, N., Kobayashi, M., Fobar, A.J., Hoshida, A., Marquez, C.A., Koneru, B., *et al.* (2021) A blood-based prognostic liver secretome signature and long-term hepatocellular carcinoma risk in advanced liver fibrosis. *Med* **2**: 836-850.e10.

Fujiwara, N., Kubota, N., Crouchet, E., Koneru, B., Marquez, C.A., Jajoriya, A.K., *et al.* (2022) Molecular signatures of long-term hepatocellular carcinoma risk in nonalcoholic fatty liver disease. *Science Translational Medicine* **14**: eabo4474.

G

Gabbia, D., Cannella, L., and De Martin, S. (2021) The Role of Oxidative Stress in NAFLD–NASH–HCC Transition—Focus on NADPH Oxidases. *Biomedicines* **9**: 687.

Galbraith, J.W., Franco, R.A., Donnelly, J.P., Rodgers, J.B., Morgan, J.M., Viles, A.F., *et al.* (2015) Unrecognized chronic hepatitis C virus infection among baby boomers in the emergency department. *Hepatology* **61**: 776–782.

Garcia, D., Hellberg, K., Chaix, A., Wallace, M., Herzig, S., Badur, M.G., *et al.* (2019) Genetic Liver-Specific AMPK Activation Protects against Diet-Induced Obesity and NAFLD. *Cell Reports* **26**: 192-208.e6.

Garcia, D., and Shaw, R.J. (2017) AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell* **66**: 789–800.

Garcia-Lezana, T., Lopez-Canovas, J.L., and Villanueva, A. (2021) Chapter Two - Signaling pathways in hepatocellular carcinoma. In *Advances in Cancer Research*. Sarkar, D., and Fisher, P.B. (eds). Academic Press, pp. 63–101 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X20300683>. Accessed February 17, 2022.

Gauthier, M.-S., O'Brien, E.L., Bigornia, S., Mott, M., Cacicedo, J.M., Xu, X.J., *et al.* (2011) Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun* **404**: 382–387.

Geng, Y., Wang, Y., Sun, R., Kang, X., Zhao, H., Zhu, M., *et al.* (2021) Carnosol alleviates nonalcoholic fatty liver disease by inhibiting mitochondrial dysfunction and apoptosis through targeting of PRDX3. *Toxicology and Applied Pharmacology* **432**: 115758.

Global status report on alcohol and health 2018 <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565639>. Accessed March 29, 2022.

González, A., Hall, M.N., Lin, S.-C., and Hardie, D.G. (2020) AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metabolism* **31**: 472–492.

Goossens, N., Sun, X., and Hoshida, Y. (2015) Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepat Oncol* **2**: 371–379.

Gorrini, C., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 931–947.

Govaere, O., Cockell, S., Tiniakos, D., Queen, R., Younes, R., Vacca, M., *et al.* (2020) Transcriptomic profiling across the nonalcoholic fatty liver disease spectrum reveals gene signatures for steatohepatitis and fibrosis. *Science Translational Medicine* **12**: eaba4448.

Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., and Brunet, A. (2007) The Energy Sensor AMP-activated Protein Kinase Directly Regulates the Mammalian FOXO3 Transcription Factor *. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 30107–30119.

Griffett, K., Solt, L.A., El-Gendy, B.E.-D.M., Kamenecka, T.M., and Burris, T.P. (2013) A Liver-Selective LXR Inverse Agonist That Suppresses Hepatic Steatosis. *ACS Chem Biol* **8**: 559–567.

Griffett, K., Welch, R.D., Flaveny, C.A., Kolar, G.R., Neuschwander-Tetri, B.A., and Burris, T.P. (2015) The LXR inverse agonist SR9238 suppresses fibrosis in a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Metab* **4**: 353–357.

Grohmann, M., Wiede, F., Dodd, G.T., Gurzov, E.N., Ooi, G.J., Butt, T., *et al.* (2018) Obesity Drives STAT-1-Dependent NASH and STAT-3-Dependent HCC. *Cell* **175**: 1289-1306.e20.

H

Hamdane, N., Jühling, F., Crouchet, E., Saghire, H.E., Thumann, C., Oudot, M.A., *et al.* (2019) HCV-Induced Epigenetic Changes Associated With Liver Cancer Risk Persist After Sustained Virologic Response. *Gastroenterology* **156**: 2313-2329.e7.

Han, Y.-H., Li, W.-L., Jin, M.-H., Jin, Y.-H., Zhang, Y.-Q., Kong, L.-Z., *et al.* (2020) Peroxiredoxin II Inhibits Alcohol-induced Apoptosis in L02 Hepatocytes Through AKT/ β -Catenin Signaling Pathway. *Anticancer Research* **40**: 4491–4504.

He, Y., Li, S., Tang, D., Peng, Y., Meng, J., Peng, S., *et al.* (2019) Circulating Peroxiredoxin-1 is a novel damage-associated molecular pattern and aggravates acute liver injury via promoting inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **137**: 24–36.

Heintz, M.M., McRee, R., Kumar, R., and Baldwin, W.S. (2020) Gender differences in diet-induced steatotic disease in Cyp2b-null mice. *PLOS ONE* **15**: e0229896.

Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011) Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* **6**: 425–456.

Hirsova, P., and Gores, G.J. (2014) Death Receptor-Mediated Cell Death and Proinflammatory Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **1**: 17–27.

Hoshida, Y., Fuchs, B.C., Bardeesy, N., Baumert, T.F., and Chung, R.T. (2014) Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **61**: S79–S90.

Hoshida, Y., Nijman, S.M.B., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.-P., Chiang, D.Y., *et al.* (2009) Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* **69**: 7385–7392.

Hoshida, Y., Villanueva, A., Kobayashi, M., Peix, J., Chiang, D.Y., Camargo, A., *et al.* (2008) Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine* **359**: 1995–2004.

Hoshida, Y., Villanueva, A., Sangiovanni, A., Sole, M., Hur, C., Andersson, K.L., *et al.* (2013) Prognostic Gene-Expression Signature for Patients with Hepatitis C-Related Early-Stage Cirrhosis. *Gastroenterology* **144**: 1024–1030.

Hou, J.-K., Huang, Y., He, W., Yan, Z.-W., Fan, L., Liu, M.-H., *et al.* (2014) Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* **5**: e1400.

Houben, T., Oligschlaeger, Y., Bitorina, A.V., Hendrikx, T., Walenbergh, S.M.A., Lenders, M.-H., *et al.* (2017) Blood-derived macrophages prone to accumulate lysosomal lipids trigger oxLDL-dependent murine hepatic inflammation. *Scientific Reports* **7**: 12550.

Hu, B., Yang, X., and Sang, X. (2020) Construction of a lipid metabolism-related and immune-associated prognostic signature for hepatocellular carcinoma. *Cancer Med* **9**: 7646–7662.

Hudson, K., Cross, N., Jordan-Mahy, N., and Leyland, R. (2020) The Extrinsic and Intrinsic Roles of PD-L1 and Its Receptor PD-1: Implications for Immunotherapy Treatment. *Front Immunol* **11**: 568931.

Hwahng, S.H., Ki, S.H., Bae, E.J., Kim, H.E., and Kim, S.G. (2009) Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase–p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha–dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones. *Hepatology* **49**: 1913–1925.

I

Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Malhi, H., and Gores, G.J. (2016) Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammate. *Dig Dis Sci* **61**: 1325–1336.

Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., and Esumi, H. (2001) Cell Cycle Regulation via p53 Phosphorylation by a 5'-AMP Activated Protein Kinase Activator, 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- β -D-Ribofuranoside, in a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **287**: 562–567.

Ioannou, G.N. (2016) The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **27**: 84–95.

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., Landis, C.S., Jin, G., Haigh, W.G., Farrell, G.C., Kuver, R., *et al.* (2019) Cholesterol Crystals in Hepatocyte Lipid Droplets Are Strongly Associated With Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun* **3**: 776–791.

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.

J

Jeon, S.-M. (2016) Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* **48**: e245.

Jing, X., Du, L., Niu, A., Wang, Y., Wang, Y., and Wang, C. (2020) Silencing of PRDX2 Inhibits the Proliferation and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Biomed Res Int* **2020** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157786/>. Accessed May 27, 2020.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., *et al.* (2005) AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* **18**: 283–293.

Jühling, F., Hamdane, N., Crouchet, E., Li, S., El Saghire, H., Mukherji, A., *et al.* (2021) Targeting clinical epigenetic reprogramming for chemoprevention of metabolic and viral hepatocellular carcinoma. *Gut* **70**: 157–169.

Jung, H.I., Jeong, D., Ji, S., Ahn, T.S., Bae, S.H., Chin, S., *et al.* (2017) Overexpression of PD-L1 and PD-L2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res Treat* **49**: 246–254.

K

Kakisaka, K., Cazanave, S.C., Fingas, C.D., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., *et al.* (2012) Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **302**: G77–G84.

Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C.J., and Tuma, F. (2021) Physiology, Liver. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>. Accessed January 6, 2022.

Kang, D.H., Lee, D.J., Lee, K.W., Park, Y.S., Lee, J.Y., Lee, S.-H., *et al.* (2011) Peroxiredoxin II Is an Essential Antioxidant Enzyme that Prevents the Oxidative Inactivation of VEGF Receptor-2 in Vascular Endothelial Cells. *Molecular Cell* **44**: 545–558.

Kawaguchi, T., Tsutsumi, T., Nakano, D., and Torimura, T. (2022) MAFLD: Renovation of clinical practice and disease awareness of fatty liver. *Hepatology Research* **52**: 422–432.

Kim, J., Kim, J., and Bae, J.-S. (2016) ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy. *Exp Mol Med* **48**: e269.

Kim, M.H., Park, S.-J., Kim, J.-H., Seong, J.B., Kim, K.-M., Woo, H.A., and Lee, D.-S. (2018) Peroxiredoxin 5 regulates adipogenesis-attenuating oxidative stress in obese mouse models induced by a high-fat diet. *Free Radical Biology and Medicine* **123**: 27–38.

Kim, M.H., Seong, J.B., Huh, J.-W., Bae, Y.C., Lee, H.-S., and Lee, D.-S. (2020) Peroxiredoxin 5 ameliorates obesity-induced non-alcoholic fatty liver disease through the regulation of oxidative stress and AMP-activated protein kinase signaling. *Redox Biology* **28**: 101315.

Kim, P.-K., Kim, M.-R., Kim, H.-J., Yoo, H.-S., Kim, J.-S., Cho, E.-H., and Kim, C.-W. (2007) Proteome analysis of the rat hepatic stellate cells under high concentrations of glucose. *PROTEOMICS* **7**: 2184–2188.

Kim, S.-J., Syed, G.H., Khan, M., Chiu, W.-W., Sohail, M.A., Gish, R.G., and Siddiqui, A. (2014) Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 6413–6418.

King, L.Y., Canasto-Chibuque, C., Johnson, K.B., Yip, S., Chen, X., Kojima, K., *et al.* (2015) A genomic and clinical prognostic index for hepatitis C-related early-stage cirrhosis that predicts clinical deterioration. *Gut* **64**: 1296–1302.

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Natta, M.V., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., *et al.* (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**: 1313–1321.

Klopotowska, M., Bajor, M., Graczyk-Jarzynka, A., Kraft, A., Pilch, Z., Zhylko, A., *et al.* (2022) PRDX-1 Supports the Survival and Antitumor Activity of Primary and CAR-Modified NK Cells under Oxidative Stress. *Cancer Immunol Res* **10**: 228–244.

Krenkel, O., and Tacke, F. (2017a) Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* **17**: 306–321.

Krenkel, O., and Tacke, F. (2017b) Macrophages in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Role Model of Pathogenic Immunometabolism. *Semin Liver Dis* **37**: 189–197.

Kulik, L., and El-Serag, H.B. (2019) Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **156**: 477-491.e1.

Kwon, T., Bak, Y., Park, Y.-H., Jang, G.-B., Nam, J.-S., Yoo, J.E., *et al.* (2016) Peroxiredoxin II Is Essential for Maintaining Stemness by Redox Regulation in Liver Cancer Cells. *STEM CELLS* **34**: 1188–1197.

L

Lai, H.-Y., Tsai, H.-H., Yen, C.-J., Hung, L.-Y., Yang, C.-C., Ho, C.-H., *et al.* (2021) Metformin Resensitizes Sorafenib-Resistant HCC Cells Through AMPK-Dependent Autophagy Activation. *Front Cell Dev Biol* **8**: 596655.

Lara-Guzmán, O.J., Gil-Izquierdo, Á., Medina, S., Osorio, E., Álvarez-Quintero, R., Zuluaga, N., *et al.* (2017) Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages. *Redox Biol* **15**: 1–11.

Lazarus, J.V., Mark, H.E., Anstee, Q.M., Arab, J.P., Batterham, R.L., Castera, L., *et al.* (2021) Advancing the global public health agenda for NAFLD: a consensus statement. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 1–19.

Lee, C.-W., Wong, L.L.-Y., Tse, E.Y.-T., Liu, H.-F., Leong, V.Y.-L., Man-Fong, J., *et al.* (2012) AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer Res* **72**: 4394–4404.

Lee, D.H., Jung, Y.S., Yun, J., Han, S.B., Roh, Y.S., Song, M.J., and Hong, J.T. (2020) Peroxiredoxin 6 mediates acetaminophen-induced hepatocyte death through JNK activation. *Redox Biol* **32**: 101496.

Lee, T.-H., Kim, S.-U., Yu, S.-L., Kim, S.H., Park, D.S., Moon, H.-B., *et al.* (2003) Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* **101**: 5033–5038.

Lee, T.K.-W., Guan, X.-Y., and Ma, S. (2022) Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma — from origin to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **19**: 26–44.

Lee, Y.J. (2020) Knockout Mouse Models for Peroxiredoxins. *Antioxidants (Basel)* **9**: 182.

Lennicke, C., and Cochemé, H.M. (2021) Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Molecular Cell* **81**: 3691–3707.

Li, C., Yang, W., Zhang, J., Zheng, X., Yao, Y., Tu, K., and Liu, Q. (2014) SREBP-1 Has a Prognostic Role and Contributes to Invasion and Metastasis in Human Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* **15**: 7124–7138.

Li, J., Wang, C., Wang, W., Liu, L., Zhang, Q., Zhang, J., *et al.* (2021) PRDX2 Protects Against Atherosclerosis by Regulating the Phenotype and Function of the Vascular Smooth Muscle Cell. *Front Cardiovasc Med* **8**: 624796.

Li, S., Ghoshal, S., Sojoodi, M., Arora, G., Masia, R., Erstad, D.J., *et al.* (2019) Pioglitazone Reduces Hepatocellular Carcinoma Development in Two Rodent Models of Cirrhosis. *J Gastrointest Surg* **23**: 101–111.

- Li, S., Saviano, A., Erstad, D.J., Hoshida, Y., Fuchs, B.C., Baumert, T., and Tanabe, K.K. (2020) Risk Factors, Pathogenesis, and Strategies for Hepatocellular Carcinoma Prevention: Emphasis on Secondary Prevention and Its Translational Challenges. *J Clin Med* **9**: 3817.
- Li, W., Febbraio, M., Reddy, S.P., Yu, D.-Y., Yamamoto, M., and Silverstein, R.L. (2010) CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *J Clin Invest* **120**: 3996–4006.
- Li, W., Saud, S.M., Young, M.R., Chen, G., and Hua, B. (2015) Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget* **6**: 7365–7378.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., *et al.* (2011) AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice. *Cell Metab* **13**: 376–388.
- Liang, J., Deng, X., Wu, F.-S., and Tang, Y.-F. (2013) Transcriptomic and proteomic analysis of human hepatic stellate cells treated with natural taurine. *Molecular Medicine Reports* **7**: 1442–1452.
- Liang, J., Wang, D., Lin, H., Chen, X., Yang, H., Zheng, Y., and Li, Y. (2020) A Novel Ferroptosis-related Gene Signature for Overall Survival Prediction in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Biol Sci* **16**: 2430–2441.
- Liang, J., Zhi, Y., Deng, W., Zhou, W., Li, X., Cai, Z., *et al.* (2021) Development and validation of ferroptosis-related lncRNAs signature for hepatocellular carcinoma. *PeerJ* **9**: e11627.
- Liang, X., Xu, G., Gao, Q., and Tao, X. (2016) LKB1 expression reverses the tumorigenicity of L02 cells. *Oncology Reports* **36**: 1055–1061.
- Lillich, F.F., Imig, J.D., and Proschak, E. (2021) Multi-Target Approaches in Metabolic Syndrome. *Frontiers in Pharmacology* **11**
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.554961>. Accessed July 10, 2022.
- Llovet, J.M., Castet, F., Heikenwalder, M., Maini, M.K., Mazzaferro, V., Pinato, D.J., *et al.* (2021a) Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* 1–22.
- Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., *et al.* (2021b) Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **7**: 1–28.

Llovet, J.M., Montal, R., Sia, D., and Finn, R.S. (2018) Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* **15**: 599–616.

Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., *et al.* (2008) Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine* **359**: 378–390.

Llovet, J.M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., and Gores, G. (2016) Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **2**: 1–23.

Lu, W., Fu, Z., Wang, H., Feng, J., Wei, J., and Guo, J. (2014a) Peroxiredoxin 2 is upregulated in colorectal cancer and contributes to colorectal cancer cells' survival by protecting cells from oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry* **387**: 261–270.

Lu, W., Fu, Z., Wang, H., Feng, J., Wei, J., and Guo, J. (2014b) Peroxiredoxin 2 knockdown by RNA interference inhibits the growth of colorectal cancer cells by downregulating Wnt/ β -catenin signaling. *Cancer Letters* **343**: 190–199.

Lupberger, J., Croonenborghs, T., Roca Suarez, A.A., Van Renne, N., Jühling, F., Oudot, M.A., *et al.* (2019) Combined Analysis of Metabolomes, Proteomes, and Transcriptomes of Hepatitis C Virus-Infected Cells and Liver to Identify Pathways Associated With Disease Development. *Gastroenterology* **157**: 537-551.e9.

M

Machado, M.V., and Diehl, A.M. (2016) Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **150**: 1769–1777.

Manns, M.P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J.-M., Razavi, H., Terrault, N., and Younossi, Z. (2017) Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers* **3**: nrdp20176.

Marquardt, J.U., Andersen, J.B., and Thorgeirsson, S.S. (2015) Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer* **15**: 653–667.

Marrero, J.A., Kulik, L.M., Sirlin, C.B., Zhu, A.X., Finn, R.S., Abecassis, M.M., *et al.* (2018) Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **68**: 723–750.

Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., *et al.* (2013) An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* **94**: 93–103.

Matsuzawa, N., Takamura, T., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Ando, H., *et al.* (2007) Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* **46**: 1392–1403.

McGlinchey, A.J., Govaere, O., Geng, D., Ratziu, V., Allison, M., Bousier, J., *et al.* (2022) Metabolic signatures across the full spectrum of non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep* **4**: 100477.

Medrikova, D., Jilkova, Z.M., Bardova, K., Janovska, P., Rossmeisl, M., and Kopecky, J. (2012) Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. *Int J Obes* **36**: 262–272.

Michalopoulos, G.K., and Bhushan, B. (2021) Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**: 40–55.

Michelotti, G.A., Machado, M.V., and Diehl, A.M. (2013) NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**: 656–665.

Min, H.-K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., *et al.* (2012) INCREASED HEPATIC SYNTHESIS AND DYSREGULATION OF CHOLESTEROL METABOLISM IS ASSOCIATED WITH THE SEVERITY OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Cell Metab* **15**: 665–674.

Moeini, A., Torrecilla, S., Tovar, V., Montironi, C., Andreu-Oller, C., Peix, J., *et al.* (2019) An Immune Gene Expression Signature Associated With Development of Human Hepatocellular Carcinoma Identifies Mice That Respond to Chemopreventive Agents. *Gastroenterology* **157**: 1383-1397.e11.

Mohar, I., Stamper, B.D., Rademacher, P.M., White, C.C., Nelson, S.D., and Kavanagh, T.J. (2014) Acetaminophen-induced liver damage in mice is associated with gender-specific adduction of peroxiredoxin-6. *Redox Biol* **2**: 377–387.

Monserrat-Mesquida, M., Quetglas-Llabrés, M., Abbate, M., Montemayor, S., Mascaró, C.M., Casares, M., *et al.* (2020) Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Status in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Antioxidants* **9**: 759.

Montironi, C., Castet, F., Haber, P.K., Pinyol, R., Torres-Martin, M., Torrens, L., *et al.* (2022) Inflamed and non-inflamed classes of HCC: a revised immunogenomic classification. *Gut* <https://gut-bmj-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/content/early/2022/03/01/gutjnl-2021-325918>. Accessed December 2, 2022.

Moon, A.M., Singal, A.G., and Tapper, E.B. (2020) Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **18**: 2650–2666.

Moon, E.-Y., Han, Y.H., Lee, D.-S., Han, Y.-M., and Yu, D.-Y. (2004) Reactive oxygen species induced by the deletion of peroxiredoxin II (PrxII) increases the number of thymocytes resulting in the enlargement of PrxII-null thymus. *European Journal of Immunology* **34**: 2119–2128.

Moon, E.-Y., Lee, J.-H., Oh, S.-Y., Ryu, S.-K., Kim, H.-M., Kwak, H.-S., and Yoon, W.-K. (2006a) Reactive oxygen species augment B-cell-activating factor expression. *Free Radical Biology and Medicine* **40**: 2103–2111.

Moon, E.-Y., Noh, Y.-W., Han, Y.-H., Kim, S.-U., Kim, J.-M., Yu, D.-Y., and Lim, J.-S. (2006b) T lymphocytes and dendritic cells are activated by the deletion of peroxiredoxin II (Prx II) gene. *Immunology Letters* **102**: 184–190.

Mullen, L., Hanschmann, E.-M., Lillig, C.H., Herzenberg, L.A., and Ghezzi, P. (2015) Cysteine Oxidation Targets Peroxiredoxins 1 and 2 for Exosomal Release through a Novel Mechanism of Redox-Dependent Secretion. *Mol Med* **21**: 98–108.

Muri, J., and Kopf, M. (2021) Redox regulation of immunometabolism. *Nat Rev Immunol* **21**: 363–381.

Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2009) Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research* **48**: 1–26.

Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2013) Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in Lipid Research* **52**: 175–191.

N

Nabeshima, A., Yamada, S., Guo, X., Tanimoto, A., Wang, K.-Y., Shimajiri, S., *et al.* (2013) Peroxiredoxin 4 Protects Against Nonalcoholic Steatohepatitis and Type 2 Diabetes in a Nongenetic Mouse Model. *Antioxid Redox Signal* **19**: 1983–1998.

Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., *et al.* (2014) ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* **26**: 331–343.

Nakagawa, S., Wei, L., Song, W.M., Higashi, T., Ghoshal, S., Kim, R.S., *et al.* (2016) Molecular Liver Cancer Prevention in Cirrhosis by Organ Transcriptome Analysis and Lysophosphatidic Acid Pathway Inhibition. *Cancer Cell* **30**: 879–890.

Nawata, A., Noguchi, H., Mazaki, Y., Kurahashi, T., Izumi, H., Wang, K.-Y., *et al.* (2016) Overexpression of Peroxiredoxin 4 Affects Intestinal Function in a Dietary Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One* **11**: e0152549.

Nguyen, T.T.T., Ishida, C.T., Shang, E., Shu, C., Bianchetti, E., Karpel-Massler, G., and Siegelin, M.D. (2019) Activation of LXR Receptors and Inhibition of TRAP1 Causes Synthetic Lethality in Solid Tumors. *Cancers* **11**: 788.

Nicolussi, A., D’Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G., and Coppa, A. (2017) The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol* **6**: 139–153.

O

Olmos, Y., Sánchez-Gómez, F.J., Wild, B., García-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S., and Monsalve, M. (2013) SirT1 Regulation of Antioxidant Genes Is Dependent on the Formation of a FoxO3a/PGC-1 α Complex. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**: 1507–1521.

P

Pais, R., Barritt, A.S., Calmus, Y., Scatton, O., Runge, T., Lebray, P., *et al.* (2016) NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *Journal of Hepatology* **65**: 1245–1257.

- Pang, Q., Xiong, J., Hu, X.-L., He, J.-P., Liu, H.-F., Zhang, G.-Y., *et al.* (2015) UFM1 Protects Macrophages from oxLDL-Induced Foam Cell Formation Through a Liver X Receptor α Dependent Pathway. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **22**: 1124–1140.
- Paradis, V., Zalinski, S., Chelbi, E., Guedj, N., Degos, F., Vilgrain, V., *et al.* (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., *et al.* (2010) Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell* **140**: 197–208.
- Park, I.-J., Yang, W.K., Nam, S.-H., Hong, J., Yang, K.R., Kim, J., *et al.* (2014) Cryptotanshinone induces G1 cell cycle arrest and autophagic cell death by activating the AMP-activated protein kinase signal pathway in HepG2 hepatoma. *Apoptosis* **19**: 615–628.
- Park, J.-G., Yoo, J.-Y., Jeong, S.-J., Choi, J.-H., Lee, M.-R., Lee, M.-N., *et al.* (2011) Peroxiredoxin 2 Deficiency Exacerbates Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Circ Res* **109**: 739–749.
- Park, M.H., Jo, M., Kim, Y.R., Lee, C.-K., and Hong, J.T. (2016a) Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics* **163**: 1–23.
- Park, Y.-H., Kim, S.-U., Kwon, T.-H., Kim, J.-M., Song, I.-S., Shin, H.-J., *et al.* (2016b) Peroxiredoxin II promotes hepatic tumorigenesis through cooperation with Ras/Forkhead box M1 signaling pathway. *Oncogene* **35**: 3503–3513.
- Parthasarathy, G., Revelo, X., and Malhi, H. (2020) Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatology Communications* **4**: 478–492.
- Paul, B., Lewinska, M., and Andersen, J.B. (2022) Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer. *JHEPReport* **4** [https://www.jhep-reports.eu/article/S2589-5559\(22\)00051-9/fulltext](https://www.jhep-reports.eu/article/S2589-5559(22)00051-9/fulltext). Accessed October 22, 2022.

- Pei, C., Zhang, Y., Wang, P., Zhang, B., Fang, L., Liu, B., and Meng, S. (2019) Berberine alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage activation by downregulating galectin-3 via the NF- κ B and AMPK signaling pathways. *Phytother Res* **33**: 294–308.
- Peng, L., Wang, R., Shang, J., Xiong, Y., and Fu, Z. (2017) Peroxiredoxin 2 is associated with colorectal cancer progression and poor survival of patients. *Oncotarget* **8**: 15057–15070.
- Peng, L., Xiong, Y., Wang, R., Xiang, L., Zhou, H., and Fu, Z. (2021) The critical role of peroxiredoxin-2 in colon cancer stem cells. *Aging (Albany NY)* **13**: 11170–11187.
- Pfister, D., Núñez, N.G., Pinyol, R., Govaere, O., Pinter, M., Szydlowska, M., *et al.* (2021) NASH limits anti-tumour surveillance in immunotherapy-treated HCC. *Nature* **592**: 450–456.
- Phalen, T.J., Weirather, K., Deming, P.B., Anathy, V., Howe, A.K., Vliet, A. van der, *et al.* (2006) Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *J Cell Biol* **175**: 779–789.
- Piazzolla, V.A., and Mangia, A. (2020) Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells* **9**: 1005.
- Pimpin, L., Cortez-Pinto, H., Negro, F., Corbould, E., Lazarus, J.V., Webber, L., and Sheron, N. (2018) Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies. *Journal of Hepatology* **69**: 718–735.
- Pinyol, R., Torrecilla, S., Wang, H., Montironi, C., Piqué-Gili, M., Torres-Martin, M., *et al.* (2021) Molecular characterisation of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* **75**: 865–878.
- Pinzani, M., Rombouts, K., and Colagrande, S. (2005) Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *Journal of Hepatology* **42**: S22–S36.
- Pirillo, A., Norata, G.D., and Catapano, A.L. (2013) LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm* **2013**: 152786.
- Pokhrel, R.H., Acharya, S., Ahn, J.-H., Gu, Y., Pandit, M., Kim, J.-O., *et al.* (2021) AMPK promotes antitumor immunity by downregulating PD-1 in regulatory T cells via the HMGC/p38 signaling pathway. *Mol Cancer* **20**: 133.

Pramfalk, C., Ahmed, O., Pedrelli, M., Minniti, M.E., Luquet, S., Denis, R.G., *et al.* (2022) Soat2 ties cholesterol metabolism to β -oxidation and glucose tolerance in male mice. *Journal of Internal Medicine* **292**: 296–307.

Q

Qian, T., Fujiwara, N., Koneru, B., Ono, A., Kubota, N., Jajoriya, A.K., *et al.* (2022) Molecular Signature Predictive of Long-Term Liver Fibrosis Progression to Inform Antifibrotic Drug Development. *Gastroenterology* **162**: 1210–1225.

Qureshi, K., and Neuschwander-Tetri, B.A. (2020) The molecular basis for current targets of NASH therapies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **29**: 151–161.

R

Ratziu, V., Guevara, L. de, Safadi, R., Poordad, F., Fuster, F., Flores-Figueroa, J., *et al.* (2021) Aramchol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Nat Med* **27**: 1825–1835.

Rhee, S.G. (2016) Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells* **39**: 1–5.

Riddell, J.R., Wang, X.-Y., Minderman, H., and Gollnick, S.O. (2010) Peroxiredoxin 1 Stimulates Secretion of Pro-Inflammatory Cytokines by Binding to Toll-like Receptor 4. *J Immunol* **184**: 1022–1030.

Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., and Heikenwalder, M. (2018) The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol* **19**: 222–232.

Robinson, M.W., Hutchinson, A.T., Dalton, J.P., and Donnelly, S. (2010) Peroxiredoxin: a central player in immune modulation. *Parasite Immunology* **32**: 305–313.

Roede, J.R., Orlicky, D.J., Fisher, A.B., and Petersen, D.R. (2009) Overexpression of Peroxiredoxin 6 Does Not Prevent Ethanol-Mediated Oxidative Stress and May Play a Role in Hepatic Lipid Accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* **330**: 79–88.

Roehlen, N., Crouchet, E., and Baumert, T.F. (2020) Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells* **9**: 875.

Rudalska, R., Harbig, J., Snaebjornsson, M.T., Klotz, S., Zwirner, S., Taranets, L., *et al.* (2021) LXR α activation and Raf inhibition trigger lethal lipotoxicity in liver cancer. *Nat Cancer* **2**: 201–217.

Russo-Savage, L., and Schulman, I.G. (2021) Liver X receptors and liver physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 166121.

S

Sadvakassova, G., Tiedemann, K., Steer, K.J.D., Mikolajewicz, N., Stavnichuk, M., In-Kyung Lee, I., *et al.* (2021) Active hematopoiesis triggers exosomal release of PRDX2 that promotes osteoclast formation. *Physiol Rep* **9**: e14745.

Salzano, S., Checconi, P., Hanschmann, E.-M., Lillig, C.H., Bowler, L.D., Chan, P., *et al.* (2014) Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 12157–12162.

Santhekadur, P.K., Kumar, D.P., and Sanyal, A.J. (2018) PRECLINICAL MODELS OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *J Hepatol* **68**: 230–237.

Sanyal, A., Poklepovic, A., Moyneur, E., and Barghout, V. (2010) Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Current Medical Research and Opinion* **26**: 2183–2191.

Schneiderhan, W., Schmid-Kotsas, A., Zhao, J., Grünert, A., Nüssler, A., Weidenbach, H., *et al.* (2001) Oxidized low-density lipoproteins bind to the scavenger receptor, CD36, of hepatic stellate cells and stimulate extracellular matrix synthesis. *Hepatology* **34**: 729–737.

Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L.B., Calderaro, J., Rebouissou, S., *et al.* (2015) Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* **47**: 505–511.

Schulze, K., Nault, J.-C., and Villanueva, A. (2016) Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *Journal of Hepatology* **65**: 1031–1042.

Schuppan, D., and Afdhal, N.H. (2008) Liver Cirrhosis. *Lancet* **371**: 838–851.

Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M., and Feldstein, A.E. (2018) Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **15**: 349–364.

Scorletti, E., and Carr, R.M. (2021) A new perspective on NAFLD: focusing on lipid droplets. *Journal of Hepatology* **0** [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(21\)02181-4/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(21)02181-4/fulltext). Accessed November 23, 2021.

Seitz, H.K., Bataller, R., Cortez-Pinto, H., Gao, B., Gual, A., Lackner, C., *et al.* (2018) Alcoholic liver disease. *Nat Rev Dis Primers* **4**: 1–22.

Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S.L., and Llovet, J.M. (2017) Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology* **152**: 745–761.

Sies, H., and Jones, D.P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* <http://www.nature.com/articles/s41580-020-0230-3>. Accessed June 23, 2020.

Silva-García, E.M., Cerda-García-Rojas, C.M., Río, R.E. del, and Joseph-Nathan, P. (2019) Parvifoline Derivatives as Tubulin Polymerization Inhibitors. *J Nat Prod* **82**: 840–849.

Singal, A.K., Bataller, R., Ahn, J., Kamath, P.S., and Shah, V.H. (2018) ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol* **113**: 175–194.

Snaebjornsson, M.T., Janaki-Raman, S., and Schulze, A. (2020) Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metabolism* **31**: 62–76.

Sobotta, M.C., Liou, W., Stöcker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., *et al.* (2015) Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. *Nature Chemical Biology* **11**: 64–70.

Stresing, V., Baltziskueta, E., Rubio, N., Blanco, J., Arriba, M., Valls, J., *et al.* (2013) Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene* **32**: 724–735.

Sunami, Y. (2020) NASH, Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma: Lipid Synthesis and Glutamine/Acetate Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 6799.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **71**: 209–249.

Sureau, C., and Negro, F. (2016) The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *Journal of Hepatology* **64**: S102–S116.

T

Tacke, F. (2017) Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of Hepatology* **66**: 1300–1312.

Tacke, F., and Weiskirchen, R. (2021) Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH)-related liver fibrosis: mechanisms, treatment and prevention. *Ann Transl Med* **9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8106094/>. Accessed May 17, 2021.

Taherkhani, R., and Farshadpour, F. (2017) Global elimination of hepatitis C virus infection: Progresses and the remaining challenges. *World J Hepatol* **9**: 1239–1252.

Takei, A., Nagashima, S., Takei, S., Yamamuro, D., Murakami, A., Wakabayashi, T., *et al.* (2019) Myeloid HMG-CoA Reductase Determines Adipose Tissue Inflammation, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* **69**: 158–164.

Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015) Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **15**: 104–116.

Tang, L.S.Y., Covert, E., Wilson, E., and Kottlil, S. (2018) Chronic Hepatitis B Infection: A Review. *JAMA* **319**: 1802–1813.

Terrault, N.A., and Pageaux, G.-P. (2018) A changing landscape of liver transplantation: King HCV is dethroned, ALD and NAFLD take over! *Journal of Hepatology* **69**: 767–768.

Toita, R., and Kang, J.-H. (2020) Long-term profile of serological biomarkers, hepatic inflammation, and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *Toxicology Letters* **332**: 1–6.

Toyoda, Y., Takada, T., Yamanashi, Y., and Suzuki, H. (2019) Pathophysiological importance of bile cholesterol reabsorption: hepatic NPC1L1-exacerbated steatosis and decreasing VLDL-TG secretion in mice fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis* **18**: 234.

Trefts, E., Gannon, M., and Wasserman, D.H. (2017) The liver. *Current Biology* **27**: R1147–R1151.

Trefts, E., and Shaw, R.J. (2021) AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time. *Molecular Cell* **81**: 3677–3690.

Tsuchida, T., and Friedman, S.L. (2017) Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**: 397–411.

Turato, C., Balasso, A., Carloni, V., Tiribelli, C., Mastrotto, F., Mazzocca, A., and Pontisso, P. (2017) New molecular targets for functionalized nanosized drug delivery systems in personalized therapy for hepatocellular carcinoma. *Journal of Controlled Release* **268**: 184–197.

V

Van Rooyen, D.M., Larter, C.Z., Haigh, W.G., Yeh, M.M., Ioannou, G., Kuver, R., *et al.* (2011) Hepatic Free Cholesterol Accumulates in Obese, Diabetic Mice and Causes Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **141**: 1393-1403.e5.

Verrier, E.R., Colpitts, C.C., Bach, C., Heydmann, L., Zona, L., Xiao, F., *et al.* (2016) Solute Carrier NTCP Regulates Innate Antiviral Immune Responses Targeting Hepatitis C Virus Infection of Hepatocytes. *Cell Reports* **17**: 1357–1368.

Villanueva, A. (2019) Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine* **380**: 1450–1462.

Vuppalanchi, R., Noureddin, M., Alkhouri, N., and Sanyal, A.J. (2021) Therapeutic pipeline in nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**: 373–392.

W

Wang, W., Wei, J., Zhang, H., Zheng, X., Zhou, H., Luo, Y., *et al.* (2021) PRDX2 promotes the proliferation of colorectal cancer cells by increasing the ubiquitinated degradation of p53. *Cell Death Dis* **12**: 605.

WHO | Global hepatitis report, 2017 *WHO* <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>. Accessed June 6, 2018.

Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., *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.

Won, H.Y., Jang, E.J., Lee, K., Oh, S., Kim, H.K., Woo, H.A., *et al.* (2013) Ablation of Peroxiredoxin II Attenuates Experimental Colitis by Increasing FoxO1-Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* **191**: 4029–4037.

Wouters, K., Bilsen, M. van, Gorp, P.J. van, Bieghs, V., Lütjohann, D., Kerksiek, A., *et al.* (2010) Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS Letters* **584**: 1001–1005.

Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Johnson, C.D., Canbay, A., *et al.* (2014) NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* **59**: 898–910.

Wu, N., Sarna, L.K., Hwang, S.-Y., Zhu, Q., Wang, P., Siow, Y.L., and O, K. (2013) Activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase during high fat diet feeding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832**: 1560–1568.

X

Xu, B., Jiang, M., Chu, Y., Wang, W., Chen, D., Li, X., *et al.* (2018) Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *Journal of Hepatology* **68**: 773–782.

Xu, J., Zhang, S., Wang, R., Wu, X., Zeng, L., and Fu, Z. (2017) Knockdown of PRDX2 sensitizes colon cancer cells to 5-FU by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway. *Biosci Rep* **37** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5426286/>. Accessed March 25, 2019.

Xu, M., Xu, J., Zhu, D., Su, R., Zhuang, B., Xu, R., *et al.* (2021) Expression and prognostic roles of PRDXs gene family in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* **19**: 126.

Xu, S., Ogura, S., Chen, J., Little, P.J., Moss, J., and Liu, P. (2013) LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cell Mol Life Sci* **70**: 2859–2872.

Xu, X.J., Gauthier, M.-S., Hess, D.T., Apovian, C.M., Cacicedo, J.M., Gokce, N., *et al.* (2012) Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue. *Journal of Lipid Research* **53**: 792–801.

Y

Yamada, S., and Guo, X. (2018) Peroxiredoxin 4 (PRDX4): Its critical in vivo roles in animal models of metabolic syndrome ranging from atherosclerosis to nonalcoholic fatty liver disease. *Pathology International* **68**: 91–101.

Yang, C.-S., Lee, D.-S., Song, C.-H., An, S.-J., Li, S., Kim, J.-M., *et al.* (2007) Roles of peroxiredoxin II in the regulation of proinflammatory responses to LPS and protection against endotoxin-induced lethal shock. *J Exp Med* **204**: 583–594.

Yasuda, D., Torii, H., Shimizu, R., Hiraoka, Y., and Kume, N. (2020) Reduced Serum Cholesterol and Triglyceride Levels in a Choline-Deficient L-Amino Acid-Defined High-Fat Diet (CDAHFD)-Induced Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Biol Pharm Bull* **43**: 616–618.

Ye, F., Chen, C., Qin, J., Liu, J., and Zheng, C. (2015) Genetic profiling reveals an alarming rate of cross-contamination among human cell lines used in China. *The FASEB Journal* **29**: 4268–4272.

Yewdall, N.A., Venugopal, H., Desfosses, A., Abrishami, V., Yosaatmadja, Y., Hampton, M.B., *et al.* (2016) Structures of Human Peroxiredoxin 3 Suggest Self-Chaperoning Assembly that Maintains Catalytic State. *Structure* **24**: 1120–1129.

Yimin, Furumaki, H., Matsuoka, S., Sakurai, T., Kohanawa, M., Zhao, S., *et al.* (2012) A novel murine model for non-alcoholic steatohepatitis developed by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein. *Laboratory Investigation* **92**: 265–281.

Yin, Q.-Q., Liu, C.-X., Wu, Y.-L., Wu, S.-F., Wang, Y., Zhang, X., *et al.* (2013) Preventive and Therapeutic Effects of Adenanthin on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting NF- κ B Signaling. *The Journal of Immunology* **191**: 2115–2125.

Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., *et al.* (2018) 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., *et al.* (2019) Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **69**: 2672–2682.

Younossi, Z.M. (2019) Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *Journal of Hepatology* **70**: 531–544.

Younossi, Z.M., and Henry, L. (2021) Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *JHEP Rep* **3**: 100305.

Z

Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009) LXR Regulates Cholesterol Uptake through Idol-dependent Ubiquitination of the LDL Receptor. *Science* **325**: 100–104.

Zhang, S., He, J., Tang, M., and Sun, H. (2020a) Prdx2 Upregulation Promotes the Growth and Survival of Gastric Cancer Cells. *Pathol Oncol Res* **26**: 1869–1877.

Zhang, Y., Sun, C., Xiao, G., Shan, H., Tang, L., Yi, Y., *et al.* (2019) S-nitrosylation of the Peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosoglutathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway. *Cell Death Dis* **10**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6465399/>. Accessed July 2, 2020.

Zhang, Y., Ying, X., Zhao, Q., Ma, J., Zhang, D., He, C., and Han, S. (2020b) Identification of Protein Expression Changes in Hepatocellular Carcinoma through iTRAQ. *Dis Markers* **2020**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7008262/>. Accessed May 27, 2020.

Zhang, Y., Zhang, L., Lu, S., Xiang, Y., Zeng, C., He, T., *et al.* (2021) Long Non-coding RNA CASC15 Promotes Intrahepatic Cholangiocarcinoma Possibly through Inducing PRDX2/PI3K/AKT Axis. *Cancer Res Treat* **53**: 184–198.

Zhao, P., Sun, X., Chaggan, C., Liao, Z., Wong, K. in, He, F., *et al.* (2020) An AMPK–caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis. *Science* **367**: 652–660.

Zhao, S., Su, G., Yang, W., Yue, P., Bai, B., Lin, Y., *et al.* (2017) Identification and Comparison of Differentiation-Related Proteins in Hepatocellular Carcinoma Tissues by Proteomics. *Technol Cancer Res Treat* **16**: 1092–1101.

Zheng, L., Yang, W., Wu, F., Wang, C., Yu, L., Tang, L., *et al.* (2013) Prognostic Significance of AMPK Activation and Therapeutic Effects of Metformin in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* **19**: 5372–5380.

Zheng, X., Wei, J., Li, W., Li, X., Wang, W., Guo, J., and Fu, Z. (2020) PRDX2 removal inhibits the cell cycle and autophagy in colorectal cancer cells. *Aging (Albany NY)* **12**: 16390–16409.

Zhu, H., Wang, B., Kong, L., An, T., Li, G., Zhou, H., *et al.* (2019) Parvifoline AA Promotes Susceptibility of Hepatocarcinoma to Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis by Targeting Peroxiredoxin. *Cell Chemical Biology* **26**: 1122-1132.e6.

Zmijewski, J.W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E.R., and Abraham, E. (2010) Exposure to Hydrogen Peroxide Induces Oxidation and Activation of AMP-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* **285**: 33154–33164.

Zoulim, F., Lebossé, F., and Levrero, M. (2016) Current treatments for chronic hepatitis B virus infections. *Current Opinion in Virology* **18**: 109–116.

La peroxyrédoxine 2 est un acteur majeur de l'hépatocarcinogénèse dans les maladies métaboliques du foie

Résumé : Les maladies hépatiques chroniques et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont un problème de santé publique majeur pour lequel les solutions thérapeutiques sont limitées. L'infection chronique par les virus de l'hépatite C et B (VHC/VHB) et les syndromes métaboliques graves tel la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) sont des causes majeures de CHC. Les mécanismes moléculaires menant à la carcinogénèse sont communs à l'ensemble des étiologies conduisant à la cirrhose. Une signature génétique spécifique du foie (PLS), étroitement liée au risque de CHC, a été décrite chez des patients cirrhotiques infectés par le VHC. Basé sur ces études, notre laboratoire a développé un modèle cellulaire récapitulant *in vitro* la PLS. Grâce à ce modèle, nous avons identifié une protéine impliquée dans la progression de la pathologie et le développement du CHC, la peroxyrédoxine 2 (PRDX2). Durant cette thèse, l'étude du rôle de PRDX2 a permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du CHC et ainsi de proposer un nouveau paradigme dans le domaine de la cancérologie. Nous avons pu démontrer que PRDX2 est impliqué dans l'hépatocarcinogénèse et la progression du cancer en régulant les voies de signalisations pro-carcinogéniques et en protégeant les cellules cancéreuses de l'apoptose. Par ailleurs, PRDX2 est impliquée dans le développement de la stéatose et la dysrégulation du métabolisme hépatique en inhibant la fonction de la protéine kinase activée par l'AMP. Ces travaux pourraient constituer la base d'une nouvelle approche thérapeutique pour prévenir le CHC, ce qui contribuera à une meilleure gestion de l'offre de soins aux patients.

Mots clefs : carcinome hépatocellulaire, PRDX2, chimioprévention, maladies hépatiques chroniques, métabolisme hépatique

Abstract : Chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC) are a global health burden with limited therapeutic solutions. Chronic hepatitis C or B virus (HCV/HBV) infection and severe metabolic syndromes such as nonalcoholic steatohepatitis (NASH) are major causes of HCC. The molecular mechanisms leading to carcinogenesis are common to all etiologies leading to cirrhosis. A prognosis liver signature (PLS), closely related to the risk of HCC, has been described in HCV-infected cirrhotic patients. Based on these studies, our laboratory developed a cell-based model recapitulating *in vitro* the PLS. Using this model, we identified a protein involved in the disease progression and the development of HCC, the peroxiredoxin 2 (PRDX2). During this PhD work, the study of PRDX2 allowed us to progress in the understanding of the molecular mechanisms involved in the progression of liver disease and the development of HCC and thus to propose a new paradigm in the field of cancerology. We demonstrated that PRDX2 is involved in hepatocarcinogenesis and cancer progression by regulating pro-carcinogenic signaling pathways and protecting cancer cells from apoptosis. Furthermore, PRDX2 mediates steatosis development and dysregulation of liver metabolism by impairing the function of AMP-activated protein kinase. This work will form the basis of new therapeutic approaches to prevent HCC, which will contribute to better management of patient care.

Keywords: hepatocellular carcinoma, PRDX2, chronic liver disease, liver metabolism, chemoprevention