



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie et Santé*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Julie PAJAUD**

Préparée à l'unité de recherche INSERM UMR 991  
Foie, Métabolismes et Cancer  
UFR Sciences de la vie et de l'environnement

---

Rôle modulateur de la  
Glutathion Transférase  
Pi dans la prolifération  
et la mort des cellules  
normales et  
transformées

**Thèse soutenue à Rennes  
le 16 décembre 2013**

devant le jury composé de :

**Dr Chantal DESDOUETS**

Directeur de recherche / *rapporteur*  
Institut Cochin – Inserm UMR 1016 - Paris

**Pr Xavier COUMOUL**

Professeur d'Université / *rapporteur*  
Paris Descartes – Inserm UMR 747

**Dr Nicolas FERRY**

Directeur de recherche / *examineur*  
ANSM - Paris

**Pr Vincent LAGENTE**

Professeur d'université / *examineur*  
Université de Rennes 1 – Inserm UMR 991

**Dr Anne CORLU**

Directeur de recherche / *Directeur de thèse*  
Université de Rennes 1 - Inserm UMR 991

**Dr Caroline ANINAT**

Maître de conférences des universités/  
*co-directeur de thèse*  
Université de Rennes 1 - Inserm UMR 991



# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Christiane Guillouzo et M. Bruno Clément de m'avoir accueillie dans l'unité INSERM U522, dans un premier temps, puis l'unité INSERM U991. Ces travaux de thèse m'ont permis d'acquérir des connaissances importantes dans un domaine que je ne maîtrisais pas, mais qui est le point d'étude central de l'unité, le foie.

Merci aux membres du jury, Chantal Desdouets, Xavier Coumoul, Nicolas Ferry et Vincent Lagente, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. J'espère que la lecture de cette thèse vous intéressera.

Je tiens ensuite à remercier mes directeurs de thèse les docteurs Fabrice Morel et Anne Corlu pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Je suis fière d'avoir contribué, à mon niveau, à faire avancer les travaux de l'équipe (Equipe 2 « Stress, Défenses et Régénération ») et j'ai apprécié travailler avec chacun d'entre vous dans vos domaines de prédilections. Je suis sûre que l'équipe 2 a des belles heures devant elle et de grandes découvertes à venir. Je voudrais aussi remercier le docteur Pascal Loyer pour sa disponibilité et ses conseils avisés, sur le cycle cellulaire en particulier, et Caroline Aninat.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont permis de m'intégrer rapidement dans l'équipe 2 : Catherine, Claudine, Ismaïl et Hélène. Hélène, merci pour le taxi improvisé le matin pour venir au travail. Je voudrais remercier tout particulièrement Catherine et Ismaïl pour l'aide fondamentale qu'ils m'ont apportée au cours de cette thèse. Merci pour les bons moments passés à l'animalerie comme à la paillasse, le réveil à 5h et le coucher à 23h pour faire des hépatectomies, les petits déjeuners... Merci à Maxime et Shogun pour leur accueil. En parlant d'animalerie, il ne faut pas que j'oublie les acteurs principaux de cette étude : Mimi 1, Mimi 2,... et les nombreuses autres, dont celles que je n'oublierais pas, la pendue et Quasimodo. Merci à Claudine pour son aide sur la partie *in vitro* de ce projet. J'espère que Rennes et surtout Guingamp feront mieux la saison prochaine. Continue de pérenniser la tradition bretonne comme tu le fais presque tous les week-ends. Kenavo ha ken emberr !!

Merci à tous les membres de l'unité pour leur gentillesse, leur aide et les petites discussions de tous les jours, Denise pour ses conseils et sa disponibilité ; Isabelle pour son entrain ; Marie-Laure, Patricia, Nadia et Mathilde pour la super ambiance dans le labo et les « déjeuners en paix ». La cohabitation avec mes voisins de bureau, Tuoi, Nadia et Edouard,

s'est bien passée, en tout cas de mon point de vue !!!

Les expatriés du bâtiment 8, Tatiana, Camille, Jacinthe, Laetitia, Nicolas, Pamela ; les petits nouveaux Anaïs, Ahmad, Florence, Sacha, Matthew, ... et surtout les traîtresses qui nous ont lâchées pour un avenir meilleur : Karine et Kathleen. Merci les filles pour vos sourires, votre joie de vivre et votre bonne humeur, mais attention au verglas !!

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce projet de recherche. Merci à Pascale et Roselyne pour les marquages immunohistochimiques et toute la mise au point (Plateforme H2P2) ; merci à Rémy et Myriam pour les formations « microscope » et analyse d'image et pour leur enthousiasme (Plateforme ImPACcell) ; les animaliers David, Charlène, Prudence et les autres pour avoir pris soin de mon outil de travail et pour leur aide (Animalerie ARCHE, Biosit) ; Régis pour son aide (Plateforme Génomique) ; Pierre-Antoine, Fanny et Catherine pour leur patience et leur aide (Plateforme PRISM).

Maintenant parlons de la « Dream Team » en commençant par la doyenne, Ghislaine. Si je devais choisir une « Maman » au laboratoire, ce serait toi. Je ne sais pas comment te remercier pour ton aide, ta disponibilité, ta bonne humeur au quotidien, etc... Je suis ta deuxième Juju et tu es ma deuxième Maman, je suis contente d'avoir fait ta connaissance. Ensuite, Starsky (Vincent) et Hutch (Karim) ça tient en quelques mots : porc, foot, muscu, programme, foot et basta basta. Merci à vous d'avoir apporté un peu de virilité dans ce monde de filles. Ce ne sera pas le parfum de la madeleine qui me permettra de me souvenir de vous, mais vos parfums !! Marie et Gaëlle, la cadette du groupe, merci pour la bonne humeur et les discussions à table au restaurant du CHU. Marie, sois prudente sur ta moto. Et enfin, Sihem, merci pour tout : la cohabitation pour la rédaction de cette thèse, les week-ends studieux, les repas et sorties improvisés, les boureks, le « poids de foulet » et les pétages de plomb. Je suis désolée, mais je t'avais prévenue, tu n'as pas réussi à me mettre au sport. Je crois que cette thèse aurait été moins enrichissante sans toi. Je te souhaite de réaliser tes rêves et de continuer à faire ce que tu aimes, mais n'oublies pas de me faire signe de temps en temps.

Je ne sais pas si je vais autant vous manquer que mes gâteaux au chocolat et autres gourmandises, mais ce que je sais c'est que ma vie va être un peu vide en attendant de retrouver un travail. Chacun de vous restera dans ma mémoire.

Enfin je vais remercier ceux qui paraissent les plus éloignés de cette thèse mais qui, dans le fond, en sont les plus proches puisque sans eux je ne serais pas là. Je voudrais remercier mes parents pour m'avoir soutenue depuis le début dans mes choix, surtout Maman. Merci de m'avoir laissé aller au bout de mon chemin. Il a été un peu long et il n'est pas encore terminé !! Je sais que vous êtes fiers de nous, vous n'avez pas besoin de le dire et je suis fier de vous aussi. Merci à mon frère pour les moments de détente qui sont nécessaires au cours de ce travail. Maintenant que j'ai un peu plus de temps, je descends goûter tes petites merveilles pleines de sucre. Merci à toute ma famille et mes amis pour avoir pris de mes nouvelles fréquemment et s'être intéressés à mon travail même si c'est vraiment abstrait pour vous. Merci aux anciens de la fac de La Rochelle, Kévin, Adrien, Lucie et Jérémy, on ne se voit pas souvent mais c'est toujours pour passer de très bons moments pleins de papiers d'emballages et de fous rires. Merci à Soizic, tes coups de téléphone m'ont permis d'arrêter de penser à la thèse en moyenne 1h par semaine !!

Je crois que j'ai fait le tour. Encore merci à tous. La thèse est une aventure scientifique intense mais c'est aussi une aventure humaine très riche et formatrice.

## Table des matières

Avant-Propos.....	1
INTRODUCTION.....	3
I. Le foie.....	5
A. Macro-anatomie .....	5
B. Histologie .....	7
1. Organisation morphologique générale.....	7
2. Composition cellulaire du foie.....	8
a) Les hépatocytes .....	8
b) Les cholangiocytes .....	10
c) Les cellules associées aux sinusoides.....	11
d) Les cellules ovales.....	13
3. Composition acellulaire .....	13
C. Fonctions hépatiques .....	14
1. Métabolisme des glucides .....	14
2. Métabolisme des protéines.....	15
3. Métabolisme des lipides.....	16
4. Fonctions vasculaires .....	16
5. Production de la bile .....	16
6. Fonction de stockage.....	16
7. Biotransformation .....	17
II. Les Glutathion Transférases (GSTs) .....	21
A. Classification et structure génique .....	21
B. Réaction de conjugaison du GSH et de S-glutathionylation .....	23
C. Rôles du glutathion (GSH).....	24
D. Interactions GST-Protéine et signalisation cellulaire.....	26
E. Description de la protéine GSTpi.....	38
1. Généralités .....	38
a) Comparaison Homme/Rat/Souris.....	38
b) Expression tissulaire basale chez l'Homme .....	40
c) Expression de GSTP1 dans les tissus cancéreux.....	40
d) Polymorphismes de hGSTP1 .....	41
e) Régulation de l'expression de la GSTpi.....	42

2.	Etudes sur les souris <i>Gstp1/2<sup>-/-</sup></i> .....	43
3.	Etude de l'expression de la GSTpi au cours de la régénération hépatique et rôle dans l'hépatocarcinogénèse .....	44
III.	La régénération hépatique .....	47
A.	Régénération hépatique : connaissance mythologique controversée .....	47
B.	Aspects cellulaire et moléculaire de la régénération hépatique .....	48
1.	Facteurs déclenchant .....	48
2.	Cycle cellulaire et capacité de prolifération des cellules hépatiques .....	49
3.	Mécanismes moléculaires de la régénération hépatique .....	55
a)	Signal « Start » et phase d'initiation .....	57
b)	Cytokines pro-inflammatoires .....	57
c)	Rôle de la matrice extracellulaire dans les premières étapes de la régénération .....	60
d)	Signaux mitogéniques .....	63
e)	Voies de signalisation .....	66
f)	Implication des facteurs de transcription .....	69
g)	Signalisation redox .....	72
4.	Signal « stop » et phase de terminaison .....	76
	CADRE ET BUT DU TRAVAIL .....	79
	RESULTATS .....	85
	Chapitre 1 : .....	87
	Etude du rôle des protéines GSTP1 et GSTP2 dans la prolifération cellulaire <i>in vivo</i> au cours de la régénération hépatique chez la souris .....	87
I.	Introduction .....	89
II.	Objectifs de l'étude .....	89
III.	Résultats et Discussion .....	89
	GSTP1/P2 is involved in the timing of signaling pathway activations and cell cycle regulator expressions for efficient and synchronous liver regeneration in mice .....	91
	Chapitre 2 : .....	125
	Etude du rôle de la protéine GSTP1 dans la prolifération des cellules transformées <i>in vitro</i> .....	125
I.	Introduction .....	127
II.	Objectifs de l'étude .....	128
III.	Matériel et Méthodes .....	129
IV.	Résultats .....	132
A.	Expression de la GSTP1 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses .....	132

B.	Impact de la GSTP1 sur la prolifération et la mort cellulaire dans les lignées HeLa et HT29.....	133
C.	Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur la prolifération et les voies de signalisation dans les cellules Huh7 .....	135
D.	Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur les voies de signalisation et la migration dans les cellules HeLa .....	137
E.	Etude de la surexpression de la GSTP1 sur la prolifération et la mort des cellules HepG2 .....	138
V.	Discussion.....	139
VI.	Conclusion.....	144
	Chapitre 3 : .....	145
	Etude de l'expression d'enzymes de biotransformation dans le carcinome hépatocellulaire	145
I.	Introduction .....	147
A.	Stéatose.....	147
B.	Cirrhose .....	147
C.	Le carcinome hépatocellulaire .....	148
D.	Le processus de biotransformation.....	150
II.	Objectifs de l'étude.....	150
III.	Matériel et Méthodes .....	152
IV.	Résultats .....	153
A.	Identification par méta-analyse d'enzymes de biotransformation différemment exprimées dans les CHC .....	153
B.	Expression de certaines enzymes de biotransformation dans une cohorte de CHC issue du Centre de Ressources Biologiques de Rennes.....	155
V.	Discussion et Conclusions .....	158
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	161
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	173
	ANNEXES .....	201
	LISTE DES PUBLICATIONS.....	203
	FORMATIONS .....	204
	COMMUNICATIONS AFFICHEES .....	204



## Liste des figures

Figure 1 : Représentation des faces supérieure et inférieure du foie.....	5
Figure 2 : Vascularisation hépatique .....	6
Figure 3: Le lobule hépatique = unité fonctionnelle du foie .....	7
Figure 4 : L'hépatocyte = cellule fonctionnelle du foie .....	9
Figure 5 : Représentation schématique du transport des ions par les cholangiocytes vers la bile .....	10
Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation cellulaire au sein du foie .....	11
Figure 7 : Image d'une coupe longitudinale de sinusoides dans un foie de rat .....	12
Figure 8 : Représentation du transport et du métabolisme du glucose dans les hépatocytes ...	15
Figure 9 : Représentation schématique des réactions de transamination .....	15
Figure 10 : Représentation schématique du processus de biotransformation .....	18
Figure 11 : Représentation des réactions de S-glutathionylation et de déglutathonylation .....	24
Figure 12: Structure moléculaire du glutathion (GSH).....	24
Figure 13 : Illustration du processus d'invalidation de <i>Gstp1/2</i> chez la souris.....	43
Figure 14 : Le supplice de Prométhée sur une coupe antique .....	47
Figure 15 : Représentation simplifiée .....	49
Figure 16 : Evénements moléculaires régissant la phase G1 .....	50
Figure 17 : Activation séquentielle des complexes cyclines/Cdks au cours du cycle cellulaire .....	52
Figure 18: Représentation des différentes vagues de prolifération des cellules hépatiques après hépatectomie partielle chez le rat .....	55
Figure 19 : Représentation schématique des événements qui sont impliqués au cours de la régénération hépatique .....	56
Figure 20 : Représentation schématique des voies dépendantes du TNF $\alpha$ (A) et de l'IL-6 (B) .....	59
Figure 21 : Représentation schématique des voies dépendantes de l'HGF (A) et des ligands d'EGFR (B).....	64
Figure 22 : Voies de signalisation dépendante des MAPK.....	66
Figure 23: Représentation schématique de la régulation de l'activité du facteur de transcription NF $\kappa$ B.....	71
Figure 24 : Formation et élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	73

Figure 25 : Mécanisme d'activation de Nrf2 par les produits du stress oxydant .....	74
Figure 26 : Modèle de régulation des protéines kinases JNK et TRAF2 par la GSTP1 en condition basale (gauche) et en condition de stress (droite). .....	128
Figure 27 : Niveau d'expression protéique de la GSTP1 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines .....	133
Figure 28 : Evaluation du rôle de la GSTP1 dans la prolifération cellulaire des cellules HT29 et HeLa 48h après transfection.....	134
Figure 29 : Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur la prolifération cellulaire et les voies de signalisation dans les cellules Huh7.....	136
Figure 30 : Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur l'activation des voies de signalisation et la migration des cellules HeLa.....	138
Figure 31: Effet de la surexpression de la GSTP1 sur l'activation des voies de signalisation, la prolifération et la mort cellulaire dans les cellules HepG2 .....	140
Figure 32 : Evolution des pathologies hépatiques chez l'Homme .....	147
Figure 33 : Système de classification BCLC et stratégies de traitement des CHC.....	149
Figure 34: Clustering hiérarchique des données de la méta-analyse de l'expression des gènes de détoxification dans des foies NT ainsi que dans des foies PT et T provenant de CHC.....	155
Figure 35 : Représentation des variations de l'abondance des transcrits des enzymes de détoxification .....	157
Figure 36 : Evénements moléculaires intervenant au cours de la régénération hépatique chez les souris <i>Gstp1/2<sup>+/+</sup></i> et <i>Gstp1/2<sup>-/-</sup></i> .....	166
Figure 37 : Représentation schématique de l'impact de la protéine GSTP1 dans les différentes voies de signalisation modulées au cours de la régénération hépatique. ....	167
Figure 38 : Rôle central de la protéine kinase JNK dans la signalisation cellulaire .....	170

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Listes des différentes isoformes de GST exprimées chez l'Homme, le rat et la souris .....	21
Tableau 2 : Synthèse des différences principales de la GSTpi entre Homme, Rat et Souris ...	39
Tableau 3 : Exemples de molécules cibles métabolisées par les différentes enzymes de biotransformation étudiées .....	151
Tableau 4 : Description des principales caractéristiques des patients et des échantillons .....	152
Tableau 5 : Séquences des amorces SybrGreen et références des amorces Taqman utilisées	153
Tableau 6 : Résultats de l'analyse non-supervisée PT vs. T .....	154
Tableau 7 : Résultats de l'analyse supervisée NT vs. PT vs. T.....	154

## ABBREVIATIONS

<b>1-Cys-Prx</b>	1-Cys Peroxiredoxine
<b>4-HNE</b>	4-Hydroxynonenal
<b>ASK1</b>	Apoptosis Signal regulated Kinase 1
<b>ARE</b>	Antioxidant Response Element
<b>ARNm</b>	Acide Ribonucléique messenger
<b>ATP</b>	Adénosine Tri-Phosphate
<b>BCLC</b>	Barcelona-Clinic Liver Cancer
<b>Cdk</b>	Cyclin dependent kinase
<b>C/EBP</b>	CCAAT/enhancer-binding protein
<b>CDNB</b>	1-chloro-2,4-dinitrobenzène
<b>CHC</b>	Carcinome Hépatocellulaire
<b>CKI</b>	Cdk inhibitor
<b>CO</b>	Carbon monoxide / Monoxyde de Carbone
<b>CYP</b>	Cytochrome P450
<b>DNDGIC</b>	Dinitrosyl-Diglutathionyl-Iron Complex
<b>DNIC</b>	Dinitrosyl Dithion Iron Complex
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>ERA</b>	Espèces réactives de l'azote
<b>ERK</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase
<b>ERO/ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène/Reactive oxygen species
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GST</b>	Glutathion transférases

<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$
<b>HO-1</b>	Hème Oxygénase
<b>Hsp</b>	Heat Shock Protein
<b>IL-6</b>	Interleukine-6
<b>iNOS</b>	inducible Nitric Oxide Synthase
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminale Kinase
<b>KO</b>	Knockout
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MCM</b>	Minichromosome Maintenance protein
<b>MEK</b>	MAP kinase kinase
<b>MnSOD</b>	Manganese Superoxide Dismutase
<b>MRP</b>	Multidrug-Resistance related Protein
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor- $\kappa$ B
<b>NO</b>	Nitric oxide / Monoxyde d'azote
<b>Rb</b>	Protéine du Rétinoblastome
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
<b>TRAF2</b>	TNF receptor-associated factor 2



## **Avant-Propos**

La prolifération cellulaire est un processus essentiel à la vie en permettant de renouveler le pool de cellules et en évitant le vieillissement cellulaire. Toutefois, la prolifération incontrôlée des cellules entraîne la formation de tumeurs qui impactent négativement sur le fonctionnement de l'organisme. L'étude des mécanismes et des voies de signalisation qui régulent cette prolifération est donc nécessaire pour développer des traitements anticancéreux efficaces.

Le taux de mortalité imputé aux carcinomes hépatocellulaires est élevé et l'étude de la carcinogenèse hépatique est depuis longtemps un axe de recherche important de l'unité INSERM UMR 991 « Foie, Métabolismes et Cancer ». De même, l'étude de la prolifération des cellules hépatiques normales et transformées tient une place importante dans les projets de recherche menés par l'équipe « Stress, Défenses et Régénération » à laquelle j'appartiens.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à étudier le rôle d'une protéine de détoxification, GSTP1, au cours de la prolifération des hépatocytes normaux et transformés. Ce projet de thèse s'intègre dans les différents axes de recherche de l'équipe et j'ai ainsi pu bénéficier de l'expertise des différents membres de cette équipe, tant au niveau théorique en ce qui concerne l'étude de la prolifération et de la mort cellulaire, du cycle cellulaire et du processus de détoxification, qu'au niveau pratique en particulier dans la maîtrise de la technique de résection hépatique chez la souris.





# **INTRODUCTION**

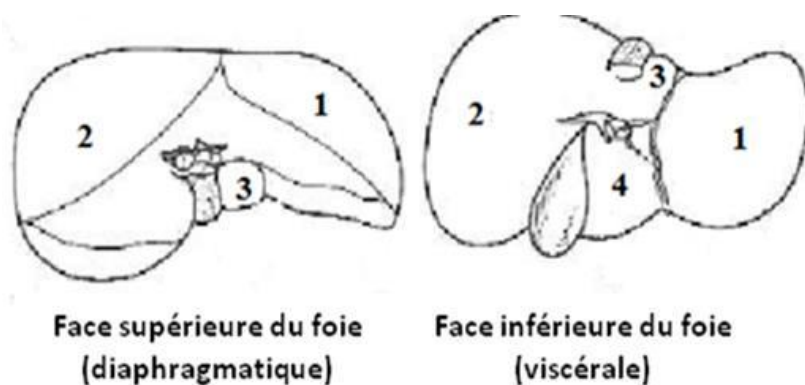


# I. Le foie

## A. *Macro-anatomie*

Avec une masse d'environ 1,5 kg chez l'adulte, le foie est le viscère le plus volumineux de l'organisme. Comme le cerveau, il représente 2% du poids corporel. Il s'agit d'un organe très complexe formé de types cellulaires variés. On y trouve des cellules épithéliales comme les hépatocytes ou les cellules biliaires ; des cellules endothéliales ; des cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes et les myofibroblastes ; des cellules lympho-histiocytaires comme les grands lymphocytes granulaires et les cellules de Kupffer. L'association de ces éléments sur le plan morphologique et fonctionnel crée différents systèmes (vasculaire, parenchymateux et biliaire) qui interagissent de façon permanente pour permettre au foie d'assurer pleinement ses fonctions. En effet, le foie intervient dans de nombreux processus comme la détoxification des xénobiotiques, le métabolisme du glucose, la biosynthèse des protéines plasmatiques, la synthèse et l'excrétion de la bile, la défense anti-tumorale et antivirale et possède de nombreuses autres fonctions (Bourel, 1991).

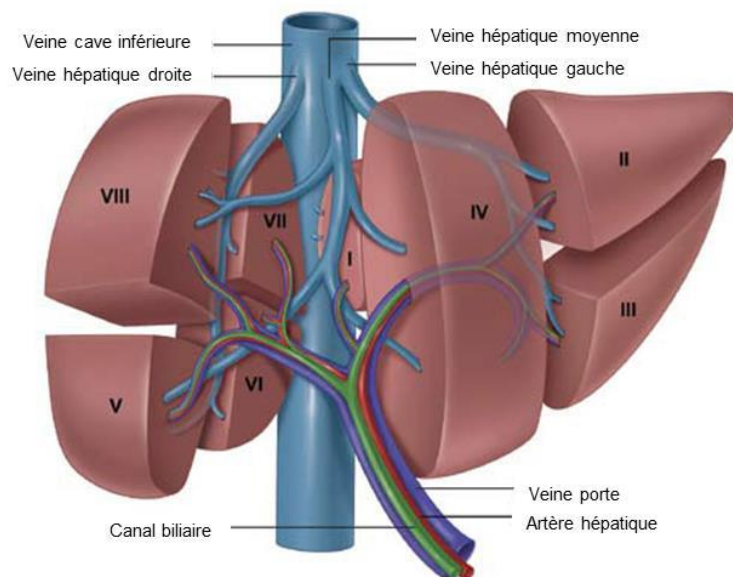
Chez l'homme, le foie se situe dans le quadrant supérieur droit de l'abdomen, sous la coupole diaphragmatique. Il s'étend plus loin à droite qu'à gauche de la ligne médiane du corps et se trouve presque entièrement derrière les côtes, sous le diaphragme, ce qui permet de le protéger. C'est un organe volumineux et plein, de teinte brunâtre, à surface lisse et qui est entouré par une capsule conjonctive : la capsule de Glisson (Walker, 1966). Deux lobes principaux, le lobe droit et le lobe gauche ainsi que deux lobes secondaires, le lobe caudé et le lobe carré, forment cet organe (Figure 1).



**Figure 1** : Représentation des faces supérieure et inférieure du foie (1 : lobe gauche ; 2 : lobe droit ; 3 : lobe caudé et 4 : lobe carré)

Le foie a la particularité d'avoir un double apport sanguin artériel et veineux. Ainsi, le sang afférent arrive dans le foie d'une part par la veine porte (75%), qui véhicule le sang du tube digestif et de la rate, et qui est donc riche en nutriments, et d'autre part par l'artère hépatique (25%), qui apporte l'oxygène (O<sub>2</sub>), nécessaire aux nombreuses activités hépatiques (Lautt *et al.*, 1987). L'artère hépatique et la veine porte accèdent au foie par sa partie inférieure, au niveau du hile hépatique ; elles s'y divisent chacune en deux branches principales droite et gauche. Leurs ramifications s'associent à une branche de division de l'arbre biliaire et à des vaisseaux lymphatiques pour cheminer dans le parenchyme et constituent les espaces portes (Figure 2).

Le drainage veineux se fait par les veines sus-hépatiques droite, gauche et moyenne, qui se déversent dans la veine cave inférieure à la partie supérieure et postérieure du foie. En revanche, le lobe caudé et les régions postéro-supérieures du lobe droit se drainent directement dans la veine cave inférieure, au-dessous de l'abouchement des veines sus-hépatiques. En ce qui concerne la circulation de la lymphe, les lymphatiques hépatiques se drainent principalement dans les ganglions lymphatiques situés le long de la veine porte et le long du tronc cœliaque.



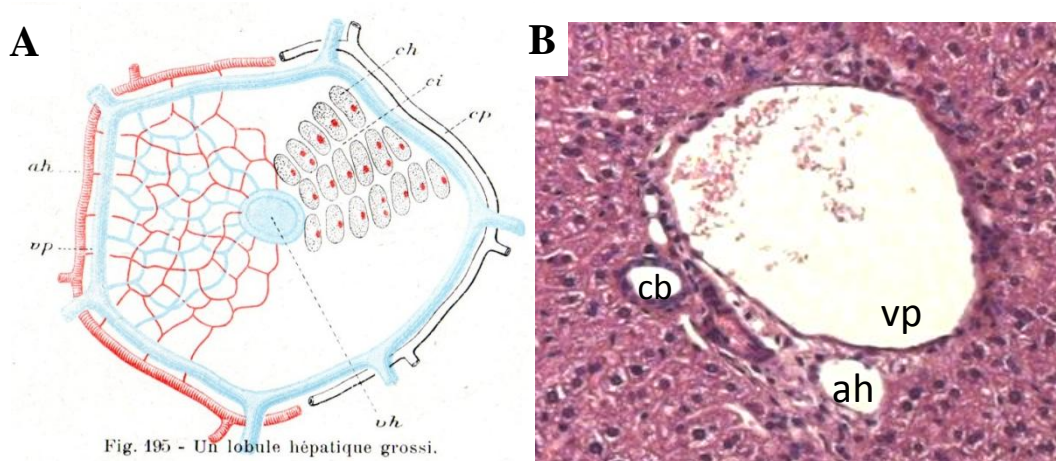
**Figure 2 : Vascularisation hépatique**

Représentation du système de vascularisation du foie avec le double apport sanguin artériel et veineux et de la segmentation du foie en 8 parties.

## B. Histologie

### 1. Organisation morphologique générale

Le modèle du lobule hépatique (Kiernan, 1833) est le modèle le plus utilisé pour décrire l'organisation morphologique du foie (Figure 3). Il se base sur l'agencement microscopique des hépatocytes, sur les structures biliaires et mésenchymateuses ainsi que sur les axes de vascularisation. Les espaces portes représentent les angles du lobule et les arêtes du prisme sont constituées par les vaisseaux d'apport contenu dans ces espaces. Le centre du prisme est occupé par une veinule, la veine sus-hépatique ou veine centro-lobulaire. Entre les espaces portes et la veine centro-lobulaire, les travées d'hépatocytes sont disposées de façon radiaire, séparées par les sinusoides qui confluent vers la veine centrale.



**Figure 3:** Le lobule hépatique = unité fonctionnelle du foie

**A :** Représentation schématique d'un lobule hépatique (ah, artère hépatique ; vp, veine porte ; vh, veine hépatique ; ci, canalicules intralobulaires ; cp, canalicules périlobulaires ; ch, cellules hépatiques) (D'après Pizon Antoine, 1930). **B :** espace porte (x40) (cb, canal biliaire)

Sur une coupe histologique, le tissu hépatique apparaît très homogène et très vascularisé, avec une dispersion régulière des espaces de vascularisation. Quarante-vingt dix pour cent du parenchyme hépatique est constitué de travées unicellulaires d'hépatocytes, séparées par des capillaires sinusoides. Ces capillaires se situent entre les vaisseaux d'apport des espaces portes et les vaisseaux de drainage centro-lobulaires. Ils forment un important réseau vasculaire où ont lieu les échanges entre le sang circulant et les hépatocytes. Les espaces portes ont une forme arrondie ou triangulaire et présentent des tailles différentes en fonction de leur position par rapport au hile hépatique. Ils sont formés par une branche de division de la veine porte, qui achemine le sang veineux riche en nutriments et métabolites

provenant des organes digestifs, une artériole issue de l'artère hépatique, qui achemine au foie le sang artériel riche en oxygène, un canal biliaire, des vaisseaux lymphatiques et des filets nerveux.

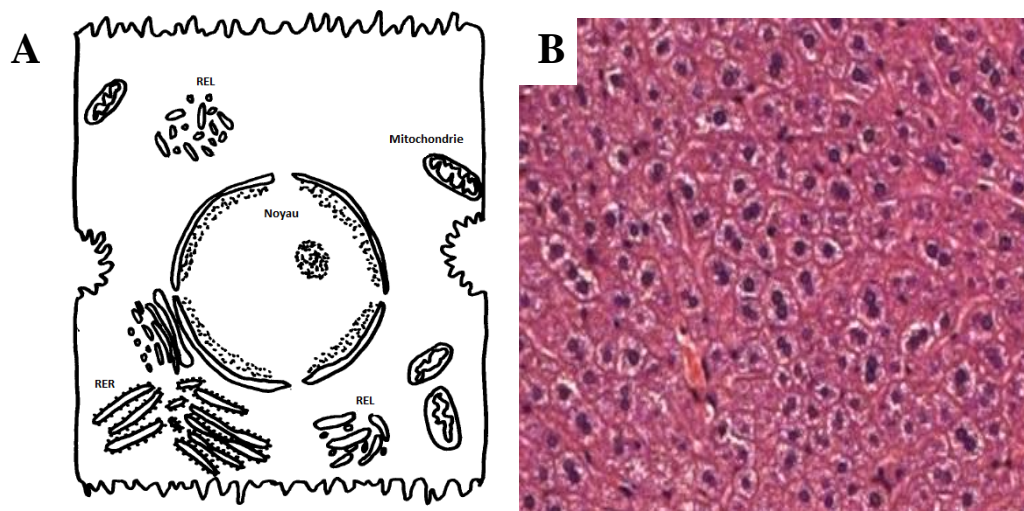
La bile, sécrétée par les hépatocytes, circule en sens inverse du flux sanguin, depuis les hépatocytes vers les espaces portes. Initialement excrétée dans les canalicules biliaires, la bile chemine dans les canalicules formés entre les hépatocytes de la travée et rejoint la zone péri-portale pour se déverser dans un canal biliaire, ou cholangiolo. A la jonction entre les derniers hépatocytes et les premières cellules biliaires se situe le canal de Hering (Saxena *et al.*, 2004). Les canaux convergent ensuite pour former les canaux septaux, puis les canaux segmentaires qui vont donner naissance aux canaux hépatiques droit et gauche.

L'espace de Disse (Haubrich, 2004) correspond à la zone étroite située entre les microvillosités de la membrane sinusoidale des hépatocytes et la barrière endothéliale. La lymphe formée dans l'espace de Disse circule vers la zone péri-portale puis dans l'espace de Mall, situé entre la lame bordante hépatocytaire et l'espace porte, pour accéder ensuite aux canaux lymphatiques. La lymphe est drainée dans des vaisseaux qui suivent le trajet des vaisseaux portes jusqu'au hile puis se jette dans le canal thoracique (Trutmann *et al.*, 1994).

## **2. Composition cellulaire du foie**

### **a) Les hépatocytes**

Les hépatocytes sont des cellules épithéliales volumineuses, agencées en travées unicellulaires (travées de Remak) séparées les unes des autres par les sinusoides. Ces cellules possèdent une forme polygonale (Figure 4). La richesse en réticulum endoplasmique et en mitochondries rend leur cytoplasme éosinophile et finement granulaire. Ce cytoplasme est également riche en glycogène et peut contenir des vacuoles lipidiques ainsi que des dépôts pigmentaires. Les hépatocytes ont pour fonction de transformer les nutriments transportés par le sang pour synthétiser du glycogène ou des protéines plasmatiques, d'emmagasiner les vitamines liposolubles et de détoxifier l'organisme. Ce sont les cellules les plus nombreuses dans le foie : elles représentent 60% du contenu cellulaire en nombre et 90% en volume. La demi-vie d'un hépatocyte se situe autour de 200 jours chez le rat et 400 jours chez l'Homme (MacDonald, 1961), ce qui explique le caractère « quiescent » du foie et le fait que l'indice mitotique soit extrêmement faible dans les conditions normales.



**Figure 4 :** L'hépatocyte = cellule fonctionnelle du foie

**A :** Structure d'un hépatocyte. REL : Réticulum endoplasmique lisse ; RER : Réticulum endoplasmique rugueux. **B :** Histologie du tissu hépatique majoritairement composé d'hépatocytes, mononucléés et binucléés.

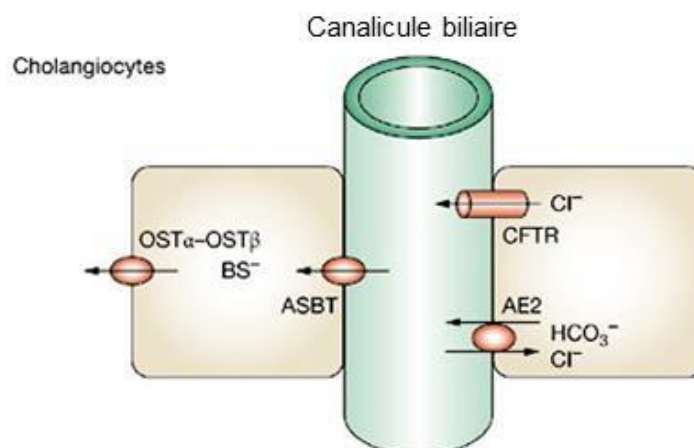
Le noyau des hépatocytes est généralement rond, occupe 5 à 10% du volume cellulaire total et peut contenir des quantités variables d'ADN (Acide Désoxyribonucléique). La polyploïdie apparaît dans les étapes terminales du développement fœtal et est un processus physiologique qui est finement régulé. Après la naissance, le foie est totalement diploïde (2n), puis des modifications de la polyploïdie vont avoir lieu avec l'apparition de cellules polyploïdes (4 et 8n) et binucléées (Seglen, 1997). Il existe cinq mécanismes à l'origine de l'apparition de cellules polyploïdes qui peuvent être pathologiques (dysfonction de protéines) ou physiologiques comme pour le foie et le cœur (Celton-Morizur *et al.*, 2010; Gentric *et al.*, 2012).

Chez le rat adulte, le foie compte 10% d'hépatocytes diploïdes, 70% d'hépatocytes tétraploïdes et 20% de cellules octoploïdes ; de plus 20 à 30% des hépatocytes sont binucléés (Toyoda *et al.*, 2005). Au sein de la chromatine homogène, on distingue un ou plusieurs nucléoles proéminents. L'importance de la polyploïdie au sein des hépatocytes peut s'expliquer par le fait que ces cellules sont directement touchées par les molécules chimiques qu'elles ont pour objectif de détoxifier. Or la plupart de ces toxiques peuvent induire des mutations génétiques délétères pour les hépatocytes. L'accroissement du nombre de copies d'un même gène permet donc de protéger les cellules des agressions qu'elles subissent (Duncan, 2013).

L'hépatocyte est la cellule fonctionnelle exocrine et endocrine du lobule hépatique. Chaque hépatocyte est en contact avec les sinusoides par ses deux faces sinusoidales, et avec les hépatocytes adjacents par le canalicule biliaire. Ces deux pôles assurent donc une fonction sécrétoire différente : la sécrétion endocrine à visée homéostatique au pôle sinusoidal et la sécrétion exocrine de la bile au pôle biliaire (Wang *et al.*, 2004). Au niveau du pôle sinusoidal, la membrane présente des microvillosités qui augmentent la surface d'échange entre le sang circulant et les hépatocytes, et représente 70% de la surface hépatocytaire. Ces échanges sont possibles grâce à des mécanismes d'exocytose et d'endocytose. Au pôle biliaire, la membrane présente une différenciation canaliculaire sous forme d'une gouttière. En s'associant à la membrane canaliculaire de l'hépatocyte adjacent, elle délimite un tunnel, le canalicule biliaire, isolé de l'espace de Disse par des jonctions serrées. La membrane latérale, située entre la membrane sinusoidal et la membrane canaliculaire, constitue les 15% de membrane restants.

## b) Les cholangiocytes

Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales des canaux biliaires qui se trouvent au niveau hépatique. Ces cellules, comme les hépatocytes, dérivent des hépatoblastes et ont pour fonction de contrôler le flux biliaire ainsi que le pH en sécrétant de l'eau et des ions bicarbonate dans la lumière du canal (Figure 5) (Fitz, 2002). Les cholangiocytes sont des cellules polarisées : le pôle basal est associé à la membrane basale et le pôle apical se trouve au niveau de la lumière du canal biliaire.

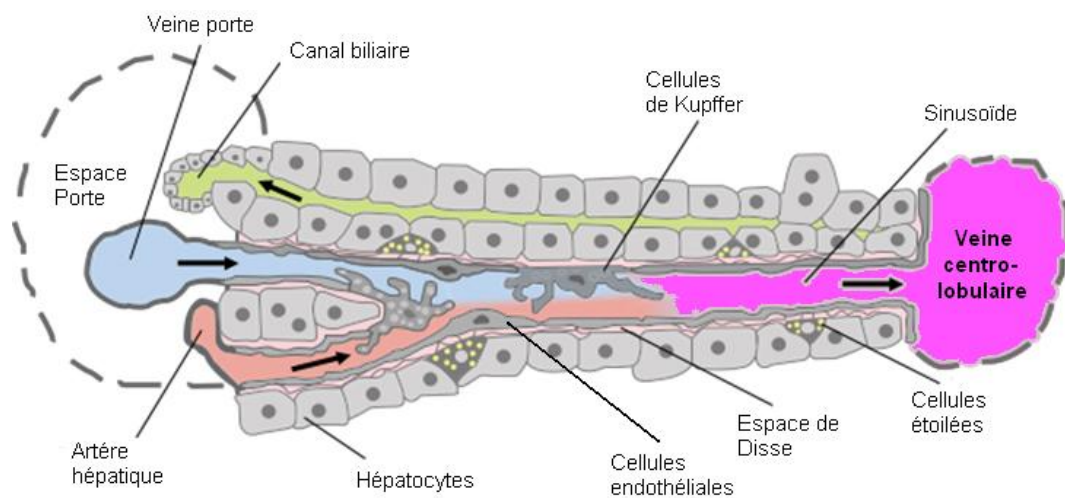


**Figure 5** : Représentation schématique du transport des ions par les cholangiocytes vers la bile. Les cholangiocytes expriment des transporteurs d'influx et d'efflux qui permettent de contrôler le flux et le pH de la bile. Abréviations : OST : organic solute transporter ; ASBT : apical sodium bile acid cotransporter ; CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. (Geier *et al.*, 2006)



### c) Les cellules associées aux sinusoides

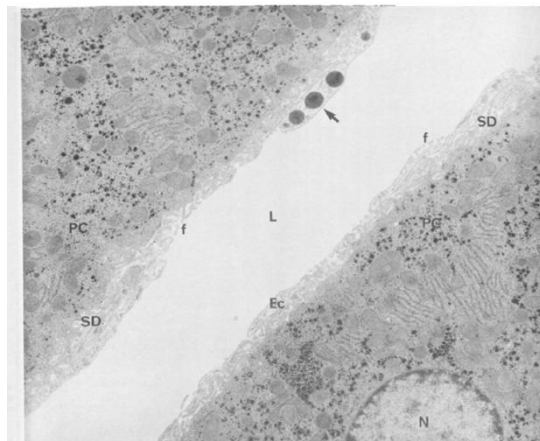
Les sinusoides sont des capillaires particuliers, de diamètre compris entre 6 et 10  $\mu\text{m}$ , mais avec une capacité de distension importante. Comme énoncé précédemment, le parenchyme est constitué à 90% par les travées hépatocytaires, les 10% restants correspondant à la lumière des sinusoides. Les fonctions de ces vaisseaux sont importantes : échanges entre le sang circulant et les hépatocytes, et participation aux mécanismes de défense immunologique. La paroi de ces capillaires comporte quatre types cellulaires et de la matrice extracellulaire (Figures 6-7).



**Figure 6 :** Représentation schématique de l'organisation cellulaire au sein du foie  
Les différentes entités cellulaires ainsi que les structures y sont illustrées.  
(D'après : [http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=2011\\_Lab\\_5\\_-\\_Late\\_Embryo](http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=2011_Lab_5_-_Late_Embryo))

- Les cellules endothéliales bordent la lumière des sinusoides et possèdent deux fenêtrages qui rendent la barrière poreuse et permettent de faciliter le passage de petites molécules. Ces cellules présentent une forte activité de pinocytose et d'endocytose.
- Les cellules de Kupffer sont présentes dans les sinusoides hépatiques, partiellement amarrées aux cellules endothéliales, elles flottent dans la lumière des sinusoides. Elles sont impliquées dans le métabolisme de divers composés ainsi que dans les réponses immunologiques et les réactions inflammatoires. Les cellules de Kupffer ont été identifiées comme des macrophages résidents des sinusoides hépatiques avec une capacité importante de phagocytose, une réactivité aux anticorps anti-macrophages, une capacité de prolifération et une activité peroxydase endogène (Naito *et al.*, 1997).

- Les grands lymphocytes granulaires (ou Pit cells) sont des lymphocytes résidents du foie, présents dans la lumière des sinusoides, qui sont souvent en contact avec les cellules de Kupffer et/ou les cellules endothéliales. Leur activité Natural Killer (NKT) leur permet de jouer un rôle dans la défense anti-tumorale et antivirale (Wisse *et al.*, 1997).
- Les cellules étoilées (ou cellules de Ito), apparentées aux péricytes, ont tout d'abord été décrites comme des cellules hépatiques étoilées par l'anatomiste Allemand Carl von Kupffer en 1876 puis ont été décrites comme des cellules de stockage de « gras » (fat-storing) par l'anatomiste japonais Toshio Ito en 1951. Les cellules de Ito sont situées dans l'espace de Disse et présentent un phénotype étoilé. Ces cellules représentent 8% des cellules hépatiques et contiennent 80% de la vitamine A présente dans le corps dans leurs gouttelettes cytoplasmiques (Senoo *et al.*, 2007). En réponse à un stress cellulaire, ces cellules se transdifférencient en myofibroblastes et produisent de la matrice extracellulaire, en particulier du collagène (Gressner, 1996). Ces cellules possèdent aussi un rôle immunologique important en activant les cellules NKT grâce à leur capacité présentatrice d'antigènes (Winau *et al.*, 2007).



**Figure 7 :** Image d'une coupe longitudinale de sinusoides dans un foie de rat

La paroi des sinusoides est composée d'une fine couche d'endothélium fenestré, qui couvre l'espace de Disse. Les cellules endothéliales contiennent des corps denses ou lysosomes (flèche). Les cellules parenchymateuses contiennent du glycogène et de nombreux organites. Abréviations : Ec = cellules endothéliales ; f = fenêtre ; L = lumière du sinusoides ; N = noyau ; PC = cellules parenchymateuses et SD = espace de Disse (D'après (Wisse *et al.*, 1996).

#### **d) Les cellules ovales**

Le foie adulte contient un compartiment de cellules souches potentielles localisé dans les petites branches de l'arbre biliaire intra-hépatique. Ces cellules sont des progéniteurs bipotents qui expriment des marqueurs d'hépatocytes fœtaux et de cellules biliaires et sont capables de générer des hépatocytes et des cellules biliaires (Forbes *et al.*, 2002). Ces cellules ne sont pas détectées dans le foie normal, mais prolifèrent abondamment en réponse à certains stimuli. Après hépatectomie, les cellules ovales prolifèrent seulement si le foie est endommagé par des agents chimiques (Fausto *et al.*, 2003).

### **3. Composition acellulaire**

La matrice extracellulaire est l'ensemble des macromolécules extracellulaires qui remplit les espaces entre les cellules et assure de nombreuses fonctions. Dans le foie, cette matrice est synthétisée par toutes les cellules avec un apport plus important des cellules étoilées, qui activent cette synthèse lors d'une inflammation ou d'une cirrhose (Martinez-Hernandez *et al.*, 1995). Elle est composée d'un nombre important de molécules qui jouent un rôle structurel ou non. Les composés les plus importants sont les protéines et les protéoglycanes. Parmi les protéines, les plus abondantes sont les collagènes ; il en existe 20 types différents et 10 d'entre eux ont été identifiés dans le foie, principalement les collagènes I, III et V. (Bedossa *et al.*, 2003).

Bien que la matrice représente un faible pourcentage du volume hépatique (3%), elle joue un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques, comme la migration cellulaire, la différenciation, la réparation ou encore le développement. En effet, les hépatocytes sont des cellules fonctionnellement et structurellement polarisées et cette polarisation implique des interactions cellulaires, ainsi que des interactions avec la matrice extracellulaire. Il a été montré que les hépatocytes primaires avaient besoin de matrice pour maintenir leurs fonctions et survivre (Bissell *et al.*, 1987). Ces matrices complexes permettent aussi de rétablir la polarité des cellules et induisent la formation de « cluster » cellulaire, ce qui confirme le rôle majeur de la matrice extracellulaire dans la différenciation et la polarisation des hépatocytes (Lindblad *et al.*, 1991). Ces effets sont contrôlés par les intégrines de surface, qui permettent la transduction du signal après liaison avec certaines protéines de la matrice extracellulaire et

jouent un rôle dans la régulation de la transcription de gènes cibles (Hansen *et al.*, 1994).

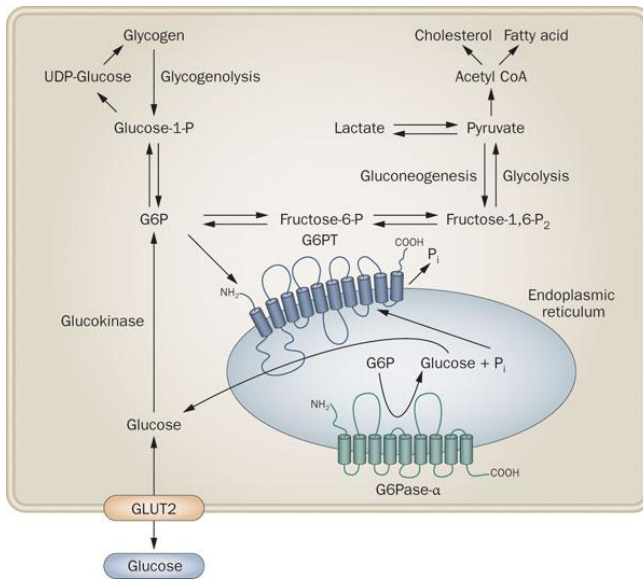
La matrice extracellulaire est aussi impliquée dans certaines pathologies hépatiques. En effet, cette matrice est fortement remodelée dans le foie pathologique, et en particulier dans le foie fibrotique, avec des modifications qualitatives et quantitatives. Ces modifications ont un impact important sur l'architecture du foie et les échanges entre le sang et les cellules hépatiques. Ainsi, le foie ne possède pas de membrane basale autour des sinusoides dans les conditions normales, mais celle-ci apparaît au cours du processus cirrhotique. Les foies cirrhotiques montrent une augmentation importante du contenu en collagène et en protéoglycanes (x4 à 7) entraînant des défaillances fonctionnelles au niveau des hépatocytes et favorisant le développement des carcinomes hépatocellulaires (CHC) (Iredale *et al.*, 2013).

### ***C. Fonctions hépatiques***

Les fonctions du foie sont très nombreuses et, pour certaines, essentielles au bon fonctionnement général de l'organisme. Cet organe participe au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, ainsi qu'au stockage de vitamines et d'oligo-éléments, comme le fer. Il possède aussi une fonction capitale de détoxification, ou biotransformation, qui permet à l'organisme d'être protégé des agents toxiques endogènes et exogènes.

#### **1. Métabolisme des glucides**

Le foie est un organe important dans le stockage du glucose sous forme de glycogène (Figure 8). Cette réaction, nommée glycogénèse, est stimulée par la production d'insuline par le pancréas et permet de stocker l'énergie jusqu'à la prochaine prise alimentaire. Le glucose traverse la membrane des hépatocytes grâce au transporteur GLUT-2 (Glucose transporter 2) par diffusion facilitée (Eisenberg *et al.*, 2005) : la concentration en glucose est donc la même dans le sang et dans les hépatocytes. Ceci permet au foie d'être un senseur de la glycémie (concentration plasmatique en glucose). Ainsi lorsque la glycémie est trop basse, afin de pallier au manque glucidique, le foie va produire du glucose à partir des stocks de glycogène, permettant aux autres organes de produire de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). Si les stocks de glycogène viennent à manquer, le foie est également capable de produire du glucose à partir d'acides aminés et de carbohydrates.



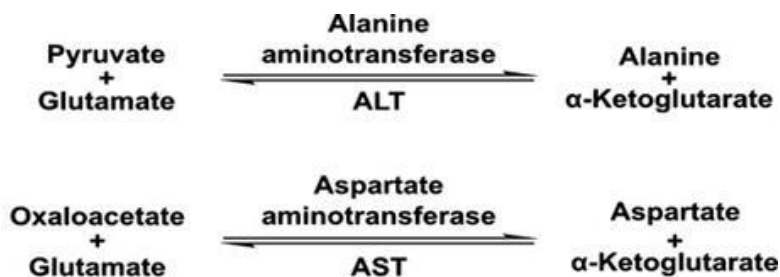
**Figure 8 :** Représentation du transport et du métabolisme du glucose dans les hépatocytes

Abréviations : G6P, glucose-6-phosphate ; G6Pase- $\alpha$ , glucose-6-phosphatase- $\alpha$  ; G6PT, glucose-6-phosphate transporter ; GLUT2, solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2 ; P, phosphate ; Pi, phosphate inorganique ; UDP, uridine diphosphate.

(Chou *et al.*, 2010)

## 2. Métabolisme des protéines

Les transaminases hépatiques sont capables de catalyser des réactions de transamination (Figure 9), qui vont entraîner le transfert des groupements amines des acides aminés sur des acides cétoniques ou des aldéhydes. Cette réaction permet la dégradation des protéines et la synthèse de glucose à partir de substances non glucidiques. La réaction de désamination, quant à elle, correspond à la perte d'une fonction amine d'un acide aminé sans transfert et a pour conséquence la libération d'ammoniac (NH<sub>3</sub>). Cette réaction est catalysée par la glutamate déshydrogénase. L'ammoniac produit par cette réaction est néfaste et est rapidement transformé en urée dans les hépatocytes afin d'être excrété par les reins. Le foie synthétise aussi des acides aminés non-essentiels, la plupart des protéines plasmatiques (albumine, alpha-fétoprotéine..), des facteurs de coagulation et des immunoglobulines (Charlton, 1996).



**Figure 9 :** Représentation schématique des réactions de transamination

Ces réactions sont catalysées par les transaminases ALT (Alanine Aminotransférase) et AST (Aspartate Aminotransférase).

### **3. Métabolisme des lipides**

La formation d'acides gras à partir d'acétyl-Coenzyme A (CoA), ou lipogénèse, est une réaction qui se déroule principalement dans le foie et le tissu adipeux (Nguyen *et al.*, 2008). Lorsque l'organisme a besoin d'énergie, le foie va hydrolyser les triglycérides pour former des acides gras libres et du glycérol. Ces acides gras vont ensuite être oxydés en acétyl-CoA et produire de l'énergie grâce au cycle de Krebs. De même, la molécule de glycérol va permettre la production d'ATP ou va participer à la gluconéogenèse. Le foie synthétise les phospholipides et le cholestérol, qui vont se lier aux lipoprotéines : LDL (Low-Density Lipoprotein), HDL (High-Density Lipoprotein) et VLDL (Very Low-Density Lipoprotein), afin d'être transportés dans la circulation sanguine vers les autres organes, excrétés dans la bile ou encore convertis en acides biliaires. Ces lipoprotéines sont elles aussi synthétisées dans le foie.

### **4. Fonctions vasculaires**

10 à 15% du volume sanguin est contenu dans le foie. Cette capacité importante permet un stockage, mais aussi un relargage si une perte de sang conséquente se produit. Le foie synthétise 50% de la lymphe, et la présence des cellules de Kupffer dans le parenchyme hépatique confère une fonction immunologique majeure à cet organe.

### **5. Production de la bile**

Le foie est l'organe producteur de la bile. Ce liquide contient de la bilirubine (produit de dégradation des globules rouges), de l'eau, des électrolytes, des phospholipides, du cholestérol et des acides biliaires ; ces derniers sont importants pour la digestion et facilitent l'absorption des graisses par l'intestin. Ce liquide peut aussi contenir des substances endogènes ou exogènes qui vont être excrétées par les reins. La vésicule biliaire est l'organe de stockage de cette bile, qu'elle va relarguer dans l'intestin après un repas.

### **6. Fonction de stockage**

En plus du glucose et du sang, le foie est le lieu de stockage de plusieurs autres molécules, indispensables à l'organisme, comme les vitamines et les oligo-éléments. En

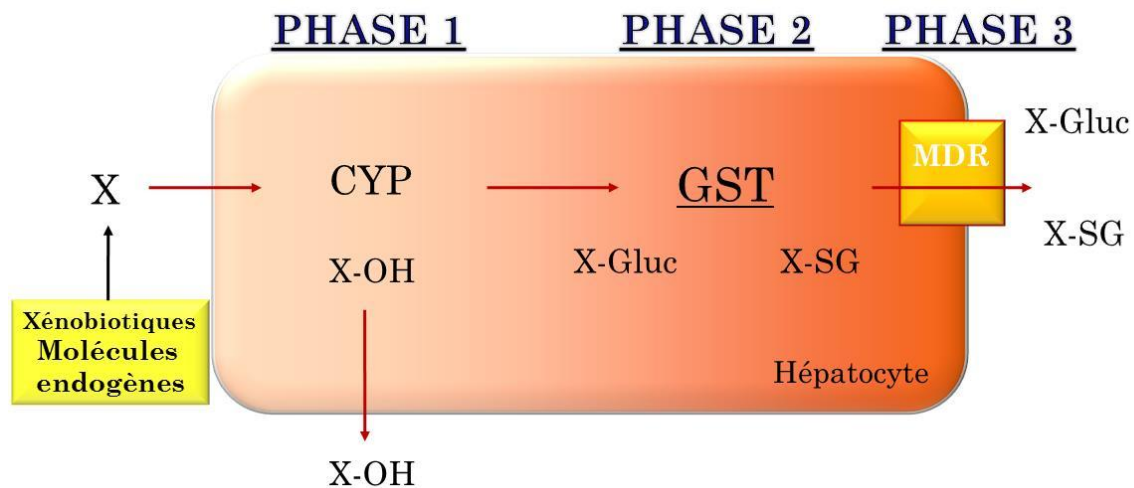
particulier, le foie contient 80% du stock en vitamine A au sein des cellules étoilées. Il joue aussi un rôle important dans le stockage, le transport et la régulation du métabolisme du fer. Environ 40% du stock de fer est situé dans le foie, en majorité dans les hépatocytes (Anderson *et al.*, 2005).

## 7. Biotransformation

La biotransformation est un processus enzymatique qui se déroule en majorité dans le foie, mais aussi dans d'autres tissus (poumons, estomac, intestin, peau et reins). Ce procédé permet de modifier la structure chimique des molécules pour les rendre solubles, augmenter leur élimination, et diminuer leur demi-vie et leur toxicité. Toutefois dans certains cas, ces réactions produisent une molécule plus toxique que la molécule « mère » : ces réactions sont qualifiées de « bioactivation ». Certains facteurs, tels que l'espèce, la souche, l'âge ou l'exposition à d'autres xénobiotiques, entraînent des différences de réponse face à un toxique.

Le processus de biotransformation comporte trois phases distinctes qui se complètent et font intervenir des enzymes spécifiques pour faciliter l'excrétion des molécules cibles via des transporteurs membranaires tels que les MRP (Multidrug-Resistance related Protein) (Figure 10).

1. Les enzymes de biotransformation de phase I vont avoir pour rôle d'exposer ou d'ajouter des groupements fonctionnels sur la molécule à éliminer. Cette phase fait intervenir des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Les enzymes principales qui interviennent dans les réactions de biotransformation des xénobiotiques sont les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP) (75% CYP + 25% estérases, époxyde hydrolases et autres). Celles-ci sont des hémoprotéines réalisant de nombreuses réactions (hydroxylation, époxydation, oxygénation, ...) et sont localisées principalement au niveau hépatique dans le réticulum endoplasmique (RE). Les CYP3A (CYP3A4 et 3A5) et CYP2C (CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19) sont les plus abondantes et elles représentent respectivement 30 et 20% du contenu hépatique en CYP (Iyanagi, 2007).



**Figure 10 :** Représentation schématique du processus de biotransformation

Après l'entrée de la molécule toxique dans l'hépatocytes, les enzymes de phase I vont exposer un groupement réactif, qui va être utilisé par les enzymes de phase II afin de faciliter le transport de ces molécules vers la bile ou l'urine. MDR : Multidrug Resistance ; CYP : cytochrome P450 ; GST : Glutathion transférases.

2. Les enzymes de phase II vont utiliser les groupements réactifs exposés par les enzymes de phase I pour catalyser des réactions de conjugaison comme la glucuronidation, la sulfonation, la méthylation, et la glutathionylation, catalysées par diverses transférases. Ces différentes réactions ont pour but de faciliter l'excrétion des molécules modifiées via les transporteurs membranaires ou de diminuer l'activité des substances actives. Parmi les transférases impliquées, on retrouve des UDP-glucuronosyltransférases (UGTs), sulfotransférases (SULTs), N-acétyltransférases (NATs), glutathion transférases (GSTs) et diverses méthyltransférases (thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) et catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (Jancova *et al.*, 2010).

Les enzymes qui vont nous intéresser dans ce travail sont les GSTs, et, en particulier la GSTP1. Ces enzymes font partie d'une famille multigénique qui compte 7 classes (Alpha, Mu, Pi, Sigma, Thêta, Zêta et Oméga) (Mannervik *et al.*, 2005). Celles-ci catalysent la conjugaison du glutathion sur des molécules électrophiles pour faciliter leur élimination. Parmi leurs substrats, on retrouve des molécules endogènes (produits de la peroxydation lipidique, monoxyde d'azote,...) et des molécules exogènes (xénobiotiques, cancérigènes environnementaux, polluants,...) (Olvera-Bello *et al.*, 2010). Elles possèdent aussi d'autres activités qui sont décrites dans la revue que vous retrouverez en page 27 de ce manuscrit (Pajaud *et al.*, 2012). En effet, elles



participent à la synthèse des hormones stéroïdes (Johansson *et al.*, 2001) et des prostaglandines (Beuckmann *et al.*, 2000; Bogaards *et al.*, 1997) ; au stockage du monoxyde d'azote (Suryo Rahmanto *et al.*, 2012) ; aux réactions de S-glutathionylation (Townsend *et al.*, 2009) et à la régulation de l'activité de certaines protéines, comme les protéines kinases, JNK et TRAF2 (Adler *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2006).

3. Les enzymes qui participent à la première et à la dernière phase du processus de biotransformation sont des transporteurs membranaires qui vont permettre l'absorption des molécules à métaboliser dans le sang, puis l'excrétion, dans la bile ou dans l'urine, des molécules transformées par les enzymes de phase I et II. Une analyse de l'expression des gènes codant pour des transporteurs d'influx et d'efflux a été menée sur 36 gènes différents par Hilgendorf *et al.* (Hilgendorf *et al.*, 2007). Cette étude a montré que sur ces 36 gènes, 34 étaient exprimés dans le foie. Tous ces transporteurs créent une formidable barrière contre les xénobiotiques et jouent un rôle crucial dans l'absorption, la distribution et l'excrétion de ces molécules. Il est maintenant admis que la modulation d'activité de ces transporteurs a un effet sur l'élimination des substances nuisibles tout aussi important que la modulation de l'activité des enzymes de phase I et II (Nakanishi *et al.*, 2012).

La plupart des transporteurs d'efflux appartiennent à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette), comme P-glycoprotéine (MDR1, Multidrug resistance-1) (Chan *et al.*, 2004) et les protéines MRP (Multidrug resistance protein). MDR1 est présent en grande quantité au niveau de la membrane de canalicules biliaires des hépatocytes. Il possède de nombreux substrats et prend plus particulièrement en charge les agents thérapeutiques et les polluants environnementaux (Schinkel *et al.*, 2003). La déficience en MDR1 rend les souris 50 à 100 fois plus sensibles à l'ivermectine, une molécule antiparasitaire (Schinkel *et al.*, 1994). MRP2, quant à lui, est exprimé dans le foie, les intestins et les tubules rénaux, et, comme MDR1, est localisé à la membrane apicale de ces tissus. MRP2 permet l'excrétion de la bilirubine, des sels biliaires et des carcinogènes conjugués par les enzymes de phase II, GST, UGT et SULT (Norimizu *et al.*, 2003).



## II. Les Glutathion Transférases (GSTs)

Les glutathion transférases sont des enzymes majeures dans la phase II du processus de détoxification. Ainsi, leur activité catalytique permet la formation de composés thioether entre le glutathion (GSH) et la molécule électrophile à éliminer. Cependant, certaines d'entre elles peuvent également intervenir dans des réactions de substitutions, d'additions, d'isomérisations ou de réductions et prendre part à la synthèse de composés endogènes tels que des prostaglandines et des stéroïdes. Outre ces différentes fonctions, les GSTs jouent un rôle important dans la protection des cellules contre le stress oxydant. Enfin, elles sont également capables de catalyser des modifications post-traductionnelles sur les protéines appelées S-glutathionylation.

### A. Classification et structure génique

**Tableau 1 :** Listes des différentes isoformes de GST exprimées chez l'Homme, le rat et la souris

Classes	Alpha	Mu	Pi	Thêta	Omega	Sigma	Zêta
<b>Espèces</b>							
<b>Homme</b>	hGSTA1	hGSTM1	hGSTP1	hGSTT1	hGSTO1	hGSTS1	hGSTZ1
	hGSTA2	hGSTM2		hGSTT2	hGSTO2		
	hGSTA3	hGSTM3					
	hGSTA4	hGSTM4					
	hGSTA5	hGSTM5					
<b>Rat</b>	rGSTA1	rGSTM1	rGSTP1	rGSTT1	rGSTO1	rGSTS1	rGSTZ1
	rGSTA2	rGSTM2		rGSTT2			
	rGSTA3	rGSTM3					
	rGSTA4	rGSTM4					
	rGSTA5	rGSTM5					
		rGSTM6					
<b>Souris</b>	mGSTA1	mGSTM1	mGSTP1	mGSTT1	mGSTO1		mGSTZ1
	mGSTA2	mGSTM2	mGSTP2	mGSTT2			
	mGSTA3	mGSTM3					
	mGSTA4	mGSTM4					
		mGSTM5					

Les GSTs sont divisées en trois grandes familles, les GSTs cytosoliques, les GSTs mitochondriales (GST kappa), qui ont fait l'objet de différentes recherches au sein de notre équipe (Morel *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 2009) et les MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoïd and Glutathione metabolism). Au sein de la superfamille des GSTs cytosoliques, les enzymes sont divisées en sept classes (Alpha, Mu, Pi, Sigma, Thêta, Zêta et Oméga) (Mannervik *et al.*, 2005). Chaque classe peut contenir plusieurs isozymes qui s'associent en dimère d'environ 50 kDa pour exercer leur activité catalytique. Les sous-unités sont classées en fonction de leur pourcentage d'homologie et pour figurer dans la même classe, deux formes doivent avoir plus de 60% de similitude. Seules deux sous-unités d'une même famille peuvent s'associer pour donner un homodimère ou un hétérodimère actif. Ceci permet de former un plus grand nombre d'enzymes à partir d'un nombre limité de gènes. Ainsi en présence de deux sous-unités d'une même classe, on pourra obtenir trois dimères différents : deux homodimères et un hétérodimère. Les GSTs possèdent deux sites distincts : un site de liaison au GSH, très conservé entre les différentes classes, et un site de liaison au substrat électrophile qui varie entre les classes et leur permet d'acquérir des spécificités différentes. Ainsi, certains substrats pourront réagir avec les enzymes d'une classe mais pas d'une autre. Ces enzymes sont localisées en majorité dans le cytosol mais peuvent être retrouvées dans le noyau et les peroxysomes. Au niveau de l'organisme, les GSTs sont exprimées de façon ubiquitaire, avec cependant des niveaux d'expression différents entre les types cellulaires.

Comme énoncé précédemment, les GSTs font partie d'une famille multigénique importante qui compte 48 gènes chez le nématode *C. elegans*, 26 chez le moustique *A. aegypti* et 18 chez l'Homme. Chez l'Homme, les GST des classes Alpha, Mu, Thêta et Oméga, sont codés par un groupe de gènes paralogues (Alpha 6p12 ; Mu 1p13 ; Thêta 22q11.2 et Oméga 10q24.3) (Josephy, 2010). Les GSTs constituent une superfamille de protéines anciennes qui semblent avoir évolué à partir d'un ancêtre « thioredoxin-like » en réponse au développement du stress oxydant. Les différentes classes sont la conséquence d'une amplification génique suivie par des mécanismes de divergence.

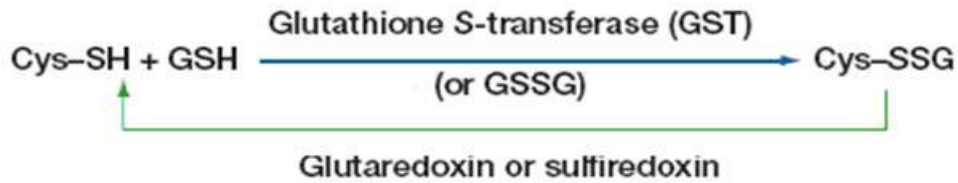
## **B. Réaction de conjugaison du GSH et de S-glutathionylation**

Les GSTs catalysent l'attaque nucléophile de l'atome de soufre du GSH sur un composé électrophile pour donner des conjugués X-SG. Cette réaction est la première étape de la formation des acides mercapturiques (Habig *et al.*, 1974), qui sont des composés N-acétylés dérivés de composés électrophiles. Cette voie permet la détoxification des composés chimiques en les rendant plus hydrophiles.

Les GSTs détoxifient un grand nombre de composés électrophiles, comme les époxydes, les cétones  $\alpha$ - $\beta$ -insaturés, les quinones, les esters ou les peroxydes. Et parmi ces substrats, certains sont spécifiques d'une isoforme de GST. Par exemple, l'acide éthacrynique est un substrat spécifique de la GSTP1, de même que l'oxyde trans-stilbène est spécifique de la GSTM1. D'un autre côté, certains substrats comme le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène), sont qualifiés de substrats universels des GSTs.

Le substrat des GSTs peut aussi être une protéine et la réaction catalysée se nomme S-glutathionylation. Celle-ci est une modification post-traductionnelle et peut entraîner l'inhibition de l'activité de la protéine cible ou, au contraire, son activation. Par exemple, le transfert d'un glutathion sur la caspase-3 inhibe son action et donc limite l'exécution du processus d'apoptose (Huang *et al.*, 2008), et à l'inverse la glutathionylation de la 1-Cys Peroxiredoxine (1-Cys-Prx) est nécessaire à son activation (Manevich *et al.*, 2004). La réaction de glutathionylation est réversible et la déglutathionylation peut être catalysée par une glutaredoxine ou une sulfiredoxine (Figure 11).

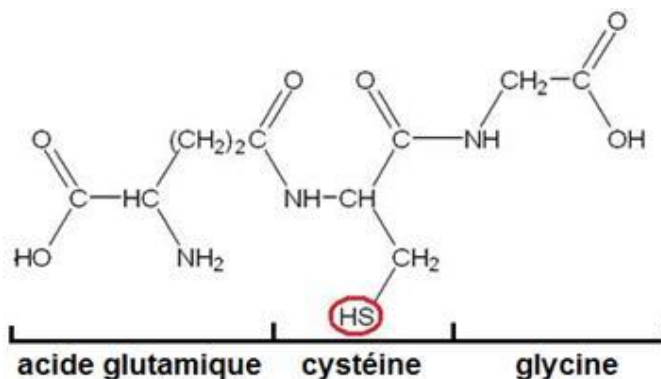
Les cibles de la glutathionylation peuvent être réparties en 6 grandes classes : protéines du cytosquelette, protéines du métabolisme énergétique, protéines des voies de signalisation (ex : kinases et phosphatases), protéines du repliement, protéines impliquées dans l'homéostasie calcique et celles impliquées dans l'homéostasie redox (Townsend *et al.*, 2009). De façon intéressante, comparé au protéome, le nombre de protéines qui peuvent être potentiellement S-glutathionylées est faible, comme le montrent Fratelli *et al.* (Fratelli *et al.*, 2003) dans les hépatocytes après induction d'un stress oxydant. De plus amples études sont cependant nécessaires pour comprendre l'impact des GSTs sur cette modification post-traductionnelle et leur rôle dans la régulation des voies de signalisation induites par le stress oxydant.



**Figure 11 :** Représentation des réactions de S-glutathionylation et de déglutathonylation  
 De façon spontanée ou catalysée par des enzymes comme les GSTs, le glutathion peut se lier aux cystéines présentes dans les protéines. Cette réaction de S-glutathionylation est réversible grâce à l'activité d'enzymes comme les glutaredoxines ou les sulfiredoxines.

### C. Rôles du glutathion (GSH)

Le glutathion, ou  $\gamma$ -glutamylcysteinylglycine, est un tripeptide ubiquitaire retrouvé dans la plupart des plantes et des micro-organismes, ainsi que dans tous les tissus des mammifères (Figure 12). Le glutathion existe sous une forme réduite (GSH) et une forme oxydée (GSSG). Les cellules eucaryotes possèdent trois réservoirs majeurs de GSH : 90% dans le cytosol, 10% dans la mitochondrie et un petit pourcentage dans le réticulum endoplasmique (RE). Le ratio GSH/GSSG est de 3 : 1 dans le RE (Bass *et al.*, 2004) et de plus de 100 : 1 dans la mitochondrie (Garcia *et al.*, 2010). Dans le foie de rat, le GSH cytosolique a une demi-vie courte, entre 2 et 3 heures. La liaison entre les résidus glutamate et cystéine se fait par le groupement  $\gamma$ -carboxyl du glutamate, plutôt qu'avec le groupement  $\alpha$ -carboxyl, plus conventionnel. Cette liaison peu commune permet une meilleure résistance aux peptidases intracellulaires et ne peut être hydrolysée que par une enzyme, la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT). De plus, la fonction carboxylique terminale de la glycine protège la molécule du clivage catalysé par la  $\gamma$ -glutamylcyclotransférase intracellulaire. En conséquence, le GSH résiste à la dégradation intracellulaire et n'est métabolisé que dans le milieu extracellulaire (Lu, 1999).



**Figure 12:** Structure moléculaire du glutathion (GSH)

Celui-ci est composé de trois acides aminés, acide glutamique, cystéine et glycine. A partir de la cystéine, deux enzymes sont nécessaires pour synthétiser le glutathion : la glutamate-cystéine ligase (GCL) et la glutathione synthetase (GS).

Le glutathion possède différents rôles au sein de l'organisme :

- La détoxification des xénobiotiques ou de leurs métabolites est un des rôles principaux du GSH. Ces composés électrophiles forment des conjugués avec le GSH de façon spontanée ou avec l'aide d'enzymes comme les GSTs. Ces conjugués sont ensuite excrétés de la cellule et, dans le cas des hépatocytes éliminés dans la bile. Les molécules conjuguées au glutathion sont métabolisées pour former des acides mercapturiques. La première étape fait intervenir le clivage du résidu glutamyl par la GGT. Puis la liaison entre les résidus glycine et cystéine est clivée par la dipeptidase. Le résidu cystéine restant subit une N-acétylation pour former un acide mercapturique. Ces réactions débutent dans la bile, les intestins et les reins, mais la réaction de N-acétylation n'a lieu que dans les reins. Certaines molécules endogènes, comme les leucotriènes et les prostaglandines, peuvent aussi subir ces réactions. La conjugaison du GSH consomme irréversiblement le GSH intracellulaire.

- Le GSH est essentiel dans le maintien de la balance redox intracellulaire et des groupements thiol (-SH) des protéines. Pour assurer ces fonctions, le glutathion subit un échange de groupements thiols au cours d'une réaction catalysée par une transférase. Cette réaction étant réversible, le statut redox est déterminé par le ratio GSH/GSSG. Cet équilibre régule de nombreux processus métaboliques.

- Le métabolisme aérobie a pour conséquence la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme l'anion superoxide ( $O_2^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui cause la peroxydation lipidique et des dommages cellulaires. Le peroxyde d'hydrogène endogène est réduit par le GSH grâce à une peroxydase dépendante du sélénium. Le GSH est ainsi oxydé en GSSG, avant d'être réduit en GSH par une réductase et du NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase). Dans le cas d'un stress oxydant sévère, le GSSG ne peut plus être réduit en GSH et s'accumule dans le cytoplasme avant d'être exporté de la cellule, impliquant une diminution importante du GSH intracellulaire.

- L'une des fonctions principales du GSH est le stockage de la cystéine. En effet, cet acide aminé est très instable dans le milieu extracellulaire et s'auto-oxyde rapidement. Le GSH intervient dans le cycle du  $\gamma$ -glutamyl et sert de source continue en cystéine (Meister *et al.*, 1986).

- Le glutathion possède aussi un rôle dans la régulation de la croissance et la mort cellulaire. L'augmentation du niveau de GSH est associée à une réponse proliférative plus

précoce et est essentielle pour l'entrée des cellules en phase S. En effet, il a été montré que les niveaux de GSH et de cystéine étaient augmentés après hépatectomie chez le rat. De plus, si cette induction est inhibée, le foie montre des défauts de régénération (Huang *et al.* 1998). Le GSH influence aussi les voies de mort cellulaire, nécrose et apoptose, en particulier en modulant le niveau d'ERO mitochondriales. Une importante déplétion en GSH peut entraîner la déviation de la mort cellulaire de l'apoptose vers la nécrose (Hall, 1999).

#### ***D. Interactions GST-Protéine et signalisation cellulaire***

La revue qui suit décrit les interactions GSTs-Protéine et l'implication des GSTs dans la signalisation cellulaire et le métabolisme (Pajaud *et al.*, 2012).

Les GSTs sont essentiellement connues comme les enzymes qui catalysent la conjugaison du GSH sur divers composants électrophiles comme les cancérigènes chimiques, les polluants environnementaux et les agents anticancéreux. Cependant, cette famille de protéines est aussi impliquée dans le métabolisme de composés endogènes qui jouent des rôles critiques dans la régulation des voies de signalisation. Par exemple, le produit de peroxydation lipidique 4-hydroxynonanal (4-HNE) et la prostaglandine 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandine J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) sont métabolisées par les GSTs et ces composés sont connus pour influencer l'activité de facteurs de transcription et de protéines kinases impliqués dans la réponse au stress, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose. De plus, plusieurs études ont démontré que les GSTs étaient capables d'interagir avec différents partenaires protéiques comme JNK et ASK1, qui sont impliqués dans la signalisation cellulaire. De nouvelles fonctions des GSTs, dont la S-glutathionylation et le transport du monoxyde d'azote (NO), ont été décrites. Toutes ces observations suggèrent fortement que les GSTs peuvent jouer un rôle crucial dans la prolifération ou l'apoptose des cellules normales comme cancéreuses.



## ***E. Description de la protéine GSTpi***

### **1. Généralités**

#### **a) Comparaison Homme/Rat/Souris**

La protéine GSTpi est très conservée entre les espèces. La première GSTpi murine décrite présente en effet 85% d'homologies avec la protéine humaine et 92% avec la protéine de rat (Hatayama *et al.* 1990). Toutefois, il existe une différence importante entre ces espèces, car la souris exprime deux GSTs de la classe Pi différentes, mGSTP1 et mGSTP2, alors que l'homme (hGSTP1) et le rat (rGSTP1) n'en expriment qu'une (Bammler *et al.*, 1994). La mGSTP2 possède 98% d'homologie avec la mGSTP1. Les séquences régulatrices en 5' des gènes codant pour les protéines GSTpi chez ces espèces présentent de fortes homologies, mais ne sont pas totalement identiques, ce qui laisse penser que la régulation de ces gènes est différente entre les espèces (Tableau 2).

La présence de deux boîtes GC au sein du promoteur de la *mGstp2* suggère qu'il existe une différence de régulation avec la mGSTP1 qui n'en possède qu'une (Bammler *et al.*, 1994). Cette différence se répercute au niveau de l'expression protéique. En effet, la protéine mGSTP1 est plus exprimée que la mGSTP2 dans le foie de souris. Une différence d'expression est aussi observée entre mâles et femelles, et celle-ci serait la conséquence d'une régulation hormonale différente entre les sexes (Hatayama *et al.*, 1986). L'expression protéique des GSTpi est variable en fonction des organes et présente des différences entre les espèces. Ainsi, l'isoforme Pi est difficilement détectable dans le foie humain, alors qu'elle est fortement exprimée chez la souris. De même, la protéine GSTpi est une des isoformes majoritairement retrouvées dans les tissus extra-hépatiques chez l'Homme et la souris, mais pas chez le rat.

**Tableau 2 :** Synthèse des différences principales de la GSTpi entre Homme, Rat et Souris

	<b>HOMME</b> <b>hGSTP1</b>	<b>RAT</b> <b>rGSTP1</b>	<b>SOURIS</b> <b>mGSTP1 et 2</b>
<b>Nombre de gènes</b>	1	1	2
<b>Position chromosomique</b>	Chromosome 11q13	Chromosome 1q42	Chromosome 19
<b>ARN immature</b>	7 exons-6 introns ; 2,8 kb	7 exons-6 introns ; 3 kb	7 exons-6 introns ; <b>mGSTP1</b> = 2,7 kb ; <b>mGSTP2</b> = 2,1 kb
<b>Séquences régulatrices en 5'</b>	1 TATA box ; 2 GC boxes (reconnues par Sp1) ; 1 séquence TRE (reconnue par AP-1) ; 1 région riche en GC avec un pourcentage élevé d'ilots CpG (9,2%) ; une région riche en AT (110pb)	1 TATA box ; 1 GC box (reconnue par Sp1) ; 1 séquence TRE (reconnue par AP-1) ; A région riche en GC ; 2 séquences inductrices GPEI et GPEII (GST-P enchancer I et II) ; 1 séquence inhibitrice (entre -400 et -140 pb)	<b>mGSTP1</b> = 1 TATA box ; 1 élément CCAAT ; 1 GC box (reconnue par Sp1) ; 1 séquence TRE (reconnue par AP-1) ; <b>mGSTP2</b> = 1 TATA box ; 1 élément CCAAT ; 2 GC box (reconnue par Sp1) ; 1 séquence TRE (reconnue par AP-1)
<b>Protéine</b>	210 acides aminés ; 23,224 kDa	210 acides aminés ; 23,307 kDa	210 acides aminés ; <b>mGSTP1</b> = 23,6 kDa ; <b>mGSTP2</b> = 23,5 kDa
<b>Expression tissulaire</b>	++ = cerveau ; nombreux cancers et tissus résistants aux anticancéreux + = poumon ; cœur ; testicules ; rein ; pancréas ; - = foie	++ = foie fœtal ; lésions prénéoplasiques ; tumeurs hépatiques ; rein, muscle squelettique ; + = testicule, épидидyme, poumon ; - = foie	++ = épithélium des tubules proximaux du rein ; bronchioles pulmonaires ; muscle lisse de l'intestin grêle ; villosités de l'intestin grêle ; estomac ; vessie ; épithélium de l'estomac distal ; hépatocytes ; +/- = estomac antérieur ; urothélium de la vessie
<b>Références</b>	(Cowell <i>et al.</i> , 1988) (Morrow <i>et al.</i> , 1989) (Eaton <i>et al.</i> , 1999) (Vaughn <i>et al.</i> , 2011)	(Meyer <i>et al.</i> , 1985) (Okuda <i>et al.</i> , 1987) (Sakai <i>et al.</i> , 1988)	(Hatayama <i>et al.</i> , 1990) (Bammler <i>et al.</i> , 1994) (Conklin <i>et al.</i> , 2009)

## **b) Expression tissulaire basale chez l'Homme**

Chez l'homme, l'expression tissulaire de la protéine hGSTP1 est ubiquitaire et très hétérogène dans le tissu normal. Au sein d'un même organe, en fonction du type cellulaire ou de la localisation, le niveau d'expression de la hGSTP1 est très variable (Terrier *et al.*, 1990). Par exemple, au niveau du système nerveux, la hGSTP1 est présente dans les cellules de Schwann (entourant et myélinisant les axones), les noyaux des neurones et les cellules gliales, alors qu'elle est absente des axones. Elle est aussi largement exprimée dans les systèmes reproducteurs masculin et féminin : épithélium des tubules séminifères, de l'épididyme et du sein, couche basale des glandes prostatiques, vagin, endomètre, col utérin, ... En général, le tissu conjonctif est dépourvu de hGSTP1, exception faite des fibroblastes digestifs et de la vessie, ainsi que de l'endomètre et du cortex ovarien. Dans le rein, les structures tubulaires corticales et médullaires expriment la protéine hGSTP1, alors que le tissu conjonctif et la capsule ne l'expriment pas. Cette protéine est aussi présente dans la peau, la glande thyroïde, la vessie, le cœur, le pancréas, l'estomac et bien d'autres structures. L'expression de cette protéine varie aussi en fonction de la localisation. En effet, la couche basale de l'épithélium stratifié squameux de l'œsophage exprime la hGSTP1, alors que la couche superficielle ne l'exprime pas. Si on s'intéresse au foie, on constate une expression importante de la protéine hGSTP1 dans l'épithélium biliaire et une absence d'expression dans les hépatocytes adultes. Il existe aussi une variation d'expression de cette protéine en fonction du stade de développement. En effet, les hépatocytes adultes n'expriment pas la hGSTP1 mais les hépatocytes fœtaux expriment des quantités importantes de cette protéine. Chez le fœtus, la protéine hGSTP1 est fortement exprimée dans tous les organes, sauf dans le rein (Raijmakers *et al.*, 2001), puis les niveaux d'expression évoluent avec le développement.

## **c) Expression de GSTP1 dans les tissus cancéreux**

L'expression de GSTP1 varie aussi de façon importante dans les tissus cancéreux. Par exemple, il existe une corrélation positive entre le niveau d'expression de GSTP1 et le grade tumoral dans les gliomes du système nerveux central (Ali-Osman *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été observés dans les cancers invasifs du col de l'utérus (Shiratori *et al.*, 1987), dans les cancers de l'estomac (Tsutsumi *et al.*, 1987) et plus récemment dans les cancers du poumon non à petites cellules (Xu *et al.*, 2010). Alors que la GSTP1 n'est pas détectée dans la muqueuse dans un côlon normal, 88% des carcinomes du côlon montrent un marquage

important de la GSTP1 (Kodate *et al.*, 1986). Cette augmentation d'expression est aussi corrélée à une résistance accrue des cellules aux traitements anticancéreux (Su *et al.*, 2003). A l'inverse, la plupart des cancers de la prostate montre une inhibition de l'expression de la GSTP1 par rapport au tissu normal, conséquence d'une hyperméthylation du promoteur du gène *Gstp1* (Lee *et al.*, 1994). En ce qui concerne le foie, les résultats sont divergents. Plusieurs études mettent en avant une expression plus importante de la GSTP1 dans les CHC par rapport aux cirrhoses (Niu *et al.*, 2005) ou, dans les CHC, les cirrhoses et les hépatites B par rapport aux foies normaux (Yusof *et al.*, 2003). Cependant, Hayes *et al.* (Hayes *et al.* 1991) observent une augmentation d'expression dans seulement 25% des CHC étudiés. Une autre étude a montré que, comme pour les cancers de la prostate, le promoteur de *gstp1* est hyperméthylé dans les CHC, ce qui entraîne une inhibition de l'expression de la GSTP1 (Bakker *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2004; Tchou *et al.*, 2000). Ceci participe à la carcinogénèse en diminuant la protection cellulaire.

#### **d) Polymorphismes de hGSTP1**

Chez l'Homme, la surexpression de la hGSTP1 est fréquemment observée dans les cancers et elle est associée à une augmentation de la résistance aux chimiothérapies, à des échecs de traitement et à un mauvais pronostic (Townsend *et al.*, 2003). Le gène *hgstp1* possède quatre allèles différents, hGSTP1\*A, hGSTP1\*B, hGSTP1\*C et hGSTP1\*D, qui sont la conséquence de deux polymorphismes génétiques aux positions 105 (Ile > Val) et 114 (Ala > Val). hGSTP1\*A : Ile105 Ala114 ; hGSTP1\*B : Val105 Ala114 ; hGSTP1\*C : Val105 Val114 ; hGSTP1\*D : Ile105 Val114. Comme pour les hGSTM1 et hGSTT1, la fréquence des polymorphismes de la hGSTP1 est très variable en fonction des populations (14 à 20% chez les Africains ; 28 à 32% chez les Caucasiens et 14 à 18% chez les Asiatiques) (Li *et al.*, 2010). Il a ainsi été montré que l'activité métabolique de ces allèles envers divers agents anticancéreux était différente. En effet, le thiotepa et le chlorambucil sont métabolisés plus rapidement par la hGSTP1\*A (Pandya *et al.*, 2000; Srivastava *et al.*, 1999) alors que le cisplatine et le carboplatine le sont par la hGSTP1\*C (Ishimoto *et al.*, 2002). Des études ont montré une association entre les polymorphismes de la hGSTP1 et la réponse aux traitements ou la survie des patients atteints de cancers ; toutefois de nombreuses études ont aussi montré l'absence d'association significative entre ces facteurs (Lo *et al.*, 2007).

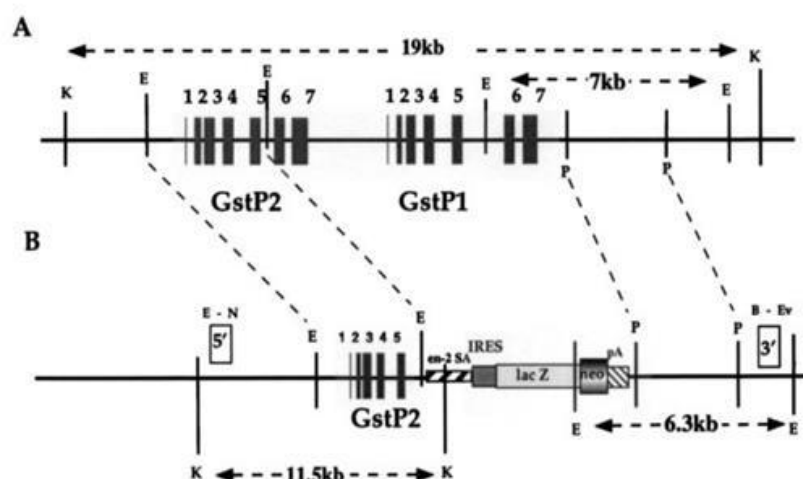
## e) Régulation de l'expression de la GSTpi

La protéine GSTpi est induite par presque tous les carcinogènes chimiques, sauf les carcinogènes non-génotoxiques (Sakai *et al.*, 2007). De nombreuses études ont montré que l'expression de la rGSTP1 était augmentée dans les lésions pré-néoplasiques chez le rat après induction de l'hépatocarcinogénèse par le diéthylnitrosamine (DEN). L'utilisation de rats transgéniques a permis de définir que la séquence inductrice GPE1 (GST-P enhancer 1) était le régulateur majeur de l'expression de la rGSTP1 au cours de l'hépatocarcinogénèse (Morimura *et al.*, 1993). L'expression de cette protéine dans les cellules rGSTP1 positives est régulée positivement par le complexe Nrf2/MafK qui se fixe sur la séquence GPE1 (Ikeda *et al.*, 2004). A l'inverse, dans le foie normal, le facteur de transcription C/EBP $\alpha$  régule négativement l'expression de la rGSTP1. La liaison de ces deux éléments, Nrf2/MafK et C/EBP $\alpha$ , sur GPE1 est mutuellement exclusive et permet de réguler l'expression de la rGSTP1 (Sakai *et al.*, 2007). A l'inverse, l'élément GPE1 est absent du promoteur des gènes *Gstp1* et *Gstp2* chez la souris permettent une expression basale de ces protéines. De plus, le promoteur de *Gstp1* chez la souris contient des éléments ARE (Antioxidant Response Element) sur lesquels se fixent le facteur de transcription Nrf2 (Ikeda *et al.*, 2002). Ceci suggère que l'expression de ce gène est régulée par le stress oxydant. Chez l'Homme, le promoteur du gène GSTP1 contient des séquences de liaison aux facteurs de transcription AP-1, Sp1 et NF $\kappa$ B qui participent à la régulation de son expression (Schnekenburger *et al.*, 2004).

Chez l'Homme comme chez le rat, la méthylation joue un rôle important dans l'expression de la GSTP1 en modifiant la compaction de la chromatine. Cette méthylation a ainsi un impact sur le développement de certains cancers. D'autres modifications de la chromatine ont aussi une influence sur l'expression de la GSTP1. En effet, il a été observé que les histones H3 et H4 présentes au niveau de l'élément GPE1 étaient fortement acétylées dans les cellules dérivées d'hépatomes et que cette acétylation étaient corrélée à une induction de l'expression de la rGSTP1. Le facteur MafK, présent dans le complexe d'activation Nrf2/MafK, se lie à une acétyltransférase qui induit l'acétylation des histones. L'expression de la rGSTP1 est donc régulée par des facteurs différents en fonction du statut normal ou tumoral des cellules. De plus, une diminution de C/EBP $\alpha$  a été observée dans différents cancers et en particulier dans le cancer du foie (Sakai *et al.*, 2007).

## 2. Etudes sur les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons utilisé des souris invalidées pour les gènes *Gstp1* et *Gstp2* (*Gstp1/2<sup>-/-</sup>*), qui ont été générées par Henderson *et al.* (Henderson *et al.*, 1998) (Figure 13). Ces souris nous ont permis de déterminer l'impact de l'expression des protéines GSTP1 et GSTP2 sur la prolifération des hépatocytes après hépatectomie partielle.



**Figure 13 :** Illustration du processus d'inactivation de *Gstp1/2* chez la souris

**A :** Organisation des gènes *mGSTP1* et *mGSTP2*

**B :** Remplacement des exons 6 et 7 de *mGstP2* et du gène *mGstP1* complet par une construction contenant le gène LacZ.

(Henderson *et al.*, 1998)

Depuis la génération de ces souris en 1998, plusieurs études ont été réalisées. Les premiers travaux utilisant ces souris avaient pour but d'étudier leur sensibilité aux cancers cutanés induits par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Aucune compensation par les autres GSTs n'est observée chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* et cette invalidation n'a pas d'impact sur l'homéostasie du GSH en condition normale. Par contre, ces souris sont plus sensibles au traitement par les HAP et développent plus de tumeurs cutanées (Henderson *et al.*, 1998). Au niveau pulmonaire, ces souris sont plus sensibles aux agents chimiques (benzo-a-pyrène, 3-méthylcholanthrene et urethane) et développent un nombre plus important d'adénomes pulmonaires. Il semble que l'inactivation de ces gènes entraîne la création d'un environnement inflammatoire et pro-tumorigénique dans les poumons (Ritchie *et al.*, 2007). Grâce à l'utilisation d'un modèle murin de tumorigenèse gastro-intestinale (souris *Apc<sup>Min</sup>*), Ritchie *et al.* (Ritchie *et al.*, 2009) ont démontré que l'absence d'expression des GSTP1 et GSTP2 entraîne une augmentation du nombre d'adénomes du côlon.

La hGSTP1 est connue pour participer à la détoxification du NAPQI (N-acétyl-p-benzoquinoneimine), qui est produit après métabolisation du paracétamol par les CYPs, et

facilite son élimination. Une étude de la toxicité du paracétamol a donc été conduite chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* et, de façon surprenante, les auteurs ont mis en évidence une protection plus importante de la toxicité hépatique chez les souris dépourvues des protéines GSTP1 et GSTP2. Il semble que l'absence de ces protéines ne modifie pas l'homéostasie du GSH face au stress oxydant (Henderson *et al.*, 2000). Une étude similaire a été menée sur la toxicité du cyclophosphamide (CY) au niveau de la vessie. L'inactivation de *Gstp1* et *Gstp2* chez la souris entraîne une augmentation du nombre et de la sévérité des ulcérations de la vessie. Les GSTP1/2 ont donc un rôle dans la protection de l'urotoxicité induite par la CY (Conklin *et al.*, 2009).

La contribution des protéines GSTP1/2 dans le contrôle de la prolifération cellulaire a été mise en évidence par Ruscoe *et al.* (Ruscoe *et al.*, 2001). En effet, cette étude a montré une diminution du temps de doublement des fibroblastes embryonnaires de souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules immunitaires circulantes. Ces effets sont la conséquence d'une augmentation de l'activité de JNK et de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Gate *et al.*, 2004).

En effet, comme attendu, une activation plus importante de JNK est observée chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* par rapport aux souris sauvages (*Gstp1/2<sup>+/+</sup>*). De même, une augmentation de l'activité de liaison d'AP-1 à l'ADN ainsi qu'une induction de l'expression génique d'HO-1 et d'UGT1A6, protéine antioxydante et protéine de détoxification respectivement, sont aussi observées (Elsby *et al.*, 2003). Cette activation constitutionnelle de JNK rend les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* plus sensibles au neurotoxique MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) et accroît la dégénération dopaminergique (Castro-Caldas *et al.*, 2012). En effet, l'induction de l'apoptose observée après traitement au MPTP est médiée par une activation de JNK et c-jun.

### **3. Etude de l'expression de la GSTpi au cours de la régénération hépatique et rôle dans l'hépatocarcinogénèse**

Chez l'homme, une étude visant à déterminer l'existence d'un lien entre les niveaux sériques de hGSTP1 et le processus de régénération après transplantation LDLT (Living Donor Liver Transplantation) a permis de mettre en évidence, de façon intéressante, que le niveau élevé de la hGSTP1 prédit un devenir favorable du receveur (Jochum *et al.*, 2011).

Ces résultats suggèrent que les cellules ovales ont un rôle important dans le processus régénératif chez l'homme, car dans le foie adulte, la hGSTP1 est exprimée dans les cellules biliaires et les cellules ovales, mais pas dans les hépatocytes (Lowes *et al.*, 1999).

Dans le foie de rat, Mori *et al.* (Mori *et al.*, 1995) ont observé que la rGSTP1, qui est une enzyme cytosolique, se concentre dans le cytosol des hépatocytes au niveau des membranes des canalicules biliaires après hépatectomie partielle. Les expérimentations *in vitro* montrent une diminution d'expression des GSTs des classes Alpha et Mu et une augmentation de l'expression de la rGSTP1 dans les cultures primaires d'hépatocytes de rat au cours du temps (Abramovitz *et al.*, 1989). La détermination du niveau d'expression des GSTs dans le foie régénérant est importante pour comprendre comment le foie fait face à l'exposition aux composés toxiques au cours de ce processus. Ainsi, l'hépatectomie partielle a des effets significatifs sur les niveaux d'ARNm, de protéines et l'activité des GSTs, avec une diminution des GST de la classe Alpha mais aucune variation apparente de la rGSTP1 chez le rat (Lee *et al.* 1993). Ces résultats ne concordent pas avec la diminution d'expression de la rGSTP1 mise en évidence chez le rat par Diehl *et al.* (Diehl *et al.*, 1991) et le profil d'expression retrouvé dans les cultures d'hépatocytes. La divergence de ces résultats sur l'expression des GSTs durant la régénération hépatique a encouragé Desmots *et al.* (Desmots *et al.*, 2002) à examiner l'expression et les activités des GSTs chez la souris. Pour la première fois, ils ont montré une régulation de l'expression des GSTs par les cytokines pro-inflammatoires, avec un profil d'induction biphasique pour plusieurs GSTs, et en particulier, la mGSTA4. Ces inductions concordent avec l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire et la synthèse d'ADN.

Dans les modèles animaux, la GSTP1 a depuis longtemps été utilisée comme un marqueur de lésions préneoplasiques dans la carcinogenèse induite par les composants chimiques. Parmi un grand nombre de marqueurs protéiques, la rGSTP1 est utilisée préférentiellement car son expression n'est pas influencée par les traitements expérimentaux (Ogiso *et al.*, 1985). De nombreuses études montrent une augmentation de prolifération des cellules rGSTP1 positives par rapport aux cellules rGSTP1 négatives (Short *et al.*, 1997) (Tsuchiya *et al.*, 2012). En ce qui concerne l'apoptose, en fonction du carcinogène hépatique utilisé, certaines études montrent une diminution (TAA thioacetamide) et d'autres une augmentation (DEN diethylnitrosamine) de la mort cellulaire dans les cellules rGSTP1 positives. Des études précédentes ont montré un marquage cytoplasmique et non nucléaire de p53 dans les hépatocytes rGSTP1 positives par rapport aux cellules environnantes. L'absence



de p53 au niveau nucléaire empêche son activité de facteur de transcription, ce qui est confirmé par les niveaux plus faibles de p21 dans les cellules rGSTP1 positives. En conséquence, ces cellules incorporent plus de BrdU et présentent plus d'aberrations génétiques causées par un défaut de protection de l'intégrité génomique. L'accumulation cytoplasmique de Mdm2 dans les cellules rGSTP1 positives peut expliquer l'absence de p53 dans le noyau, car cette protéine est une ubiquitinase qui entraîne la dégradation de p53 dans le cytoplasme (Van Gijssel *et al.*, 2000).

Afin d'évaluer le rôle des protéines GSTP1 et GSTP2 au cours de la prolifération cellulaire, nous nous sommes basés sur une méthode chirurgicale d'hépatectomie des 2/3 chez la souris, qui est maîtrisée par les membres de l'équipe dans laquelle j'ai réalisé cette thèse. En effet, l'étude de la régénération hépatique et de ses mécanismes est un thème important développée par l'équipe (Desmots *et al.*, 2002; Duval *et al.*, 2010; Garnier *et al.*, 2009; Loyer *et al.*, 1994).

### III. La régénération hépatique

#### A. Régénération hépatique : connaissance mythologique controversée

Chez l'Homme, le foie possède la capacité de se « régénérer » à partir des cellules hautement différenciées qui le composent, les hépatocytes. Ces cellules se trouvent dans un état quiescent dans le foie normal, mais possèdent une capacité importante de prolifération. Si les hépatocytes sont fonctionnels, les cellules souches hépatiques n'interviennent pas dans le processus de régénération hépatique (Fausto *et al.*, 2003). A l'inverse, d'autres organes, comme la peau, les muscles, les nerfs, etc., se renouvellent à partir de cellules souches et non à partir de cellules différenciées (Baddour *et al.*, 2012).

Cette capacité unique de « régénération » a été décrite dans la mythologie grecque par l'intermédiaire du mythe de Prométhée (Figure 14).



Théogonie d'Hésiode [521-525] (VIII siècle av. J.-C. )  
« Et il [Zeus] lia d'infrangibles entraves Prométhée au vouloir toujours divers, de liens douloureux (il fit passer une colonne au milieu). Et sur lui, il lâcha aussi un aigle aux longues ailes – et l'aigle mangeait le foie immortel, mais celui-ci s'accroissait d'une quantité en tout point égale, pendant la nuit, à ce que, durant le jour, mangeait l'oiseau aux longues ailes »

Figure 14 : Le supplice de Prométhée sur une coupe antique

Toutefois de nombreux scientifiques et historiens doutent de la connaissance réelle des Grecs en ce qui concerne la régénération hépatique (Power *et al.*, 2008). Le foie étant considéré par les Grecs comme le siège des passions, cet organe et sa restitution sont des métaphores plutôt qu'une description réelle du processus de régénération hépatique. De plus, la mythologie grecque met en avant l'immortalité des Dieux et est pleine d'histoire de régénération, comme celle de Dionysos. Si on prend en compte les croyances mythologiques et culturelles de l'époque, on peut donc fortement douter du fait que les Grecs aient eu conscience de la réalité physiologique du mythe de Prométhée.

Cependant, cette capacité est bien réelle et a clairement été mise en évidence depuis, dans les années 30, grâce aux travaux de Higgins et Anderson (1931) qui se basent sur un modèle d'hépatectomie des deux-tiers chez le rat. Ce modèle est ainsi devenu l'un des plus utilisés pour étudier la prolifération hépatocytaire et les aspects moléculaires qui y prennent part.

## ***B. Aspects cellulaire et moléculaire de la régénération hépatique***

### **1. Facteurs déclenchant**

Chez l'homme, le foie est le seul organe qui a la capacité de réguler sa croissance et sa taille chez l'Homme. Cette particularité est d'autant plus surprenante que les cellules différenciées qui composent cet organe, les hépatocytes, se trouvent dans un état de quiescence et ne se divisent que très rarement. Plusieurs causes peuvent être à l'origine d'altérations de la masse hépatique :

- La perte tissulaire après résection induit la mise en place du processus de régénération hépatique. Il existe plusieurs techniques d'hépatectomie partielle qui sont utilisées pour étudier le processus de régénération hépatique. La résection des lobes médian et latéral gauche du foie entraîne la perte d'environ 70% de la masse hépatique totale. Ce modèle est le plus couramment employé et a été utilisé dans le travail qui va suivre (Chapitre 1). Les rongeurs peuvent supporter des résections allant jusqu'à 97% de la masse totale du foie (Martins *et al.*, 2008).

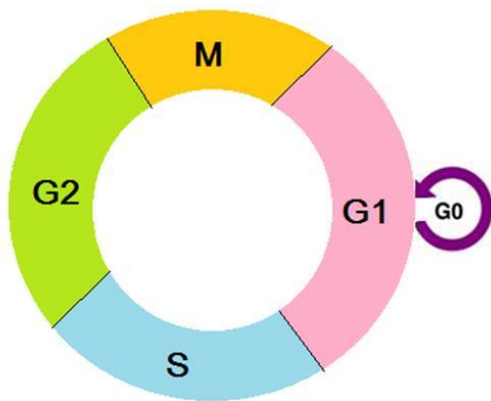
- Les pertes de fonctionnalités qui ne sont pas reliées directement à une perte de masse hépatique. Ces dernières peuvent être la conséquence d'une exposition à des xénobiotiques ou d'une infection virale entraînant une nécrose cellulaire et tissulaire massive, et par conséquent des défauts hépatiques aigus.

Dans tous ces cas, les hépatocytes qui se trouvent dans un état quiescent vont entrer dans un état prolifératif et ainsi restaurer la fonctionnalité et la masse hépatique. En effet, le paramètre qui va contrôler le déroulement de ce processus est le ratio entre la masse du foie et

le poids corporel, car celui-ci traduit la capacité du foie à exécuter les fonctions métaboliques nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. A l'inverse, lorsque le foie atteint une masse trop importante par rapport au poids corporel, des mécanismes de perte tissulaire, tels que l'apoptose, vont se mettre en place pour atteindre le ratio optimal.

## 2. Cycle cellulaire et capacité de prolifération des cellules hépatiques

Le cycle cellulaire est le processus qui aboutit à la formation de deux cellules filles identiques (Schafer, 1998). Les complexes cycline/cdk (cyclin-dependent kinase) sont au cœur de ce mécanisme et vont permettre la progression des cellules dans le cycle et le passage des quatre étapes successives qui le constituent : G1, S, G2 et M (Figure 15). Du point de vue morphologique, les trois premières phases (G1, S, G2) constituent l'interphase, et la phase de mitose (M) se décompose en prophase, métaphase, anaphase et télophase. Les phases G (G1 et G2) sont des étapes intermédiaires qui servent à préparer la cellule aux deux étapes majeures : la synthèse d'ADN (phase S) et la mitose (phase M). Il existe aussi une phase G0, en amont de G1, dans laquelle les cellules sont quiescentes mais peuvent potentiellement entrer dans le cycle, ce qui est le cas pour les hépatocytes en particulier.

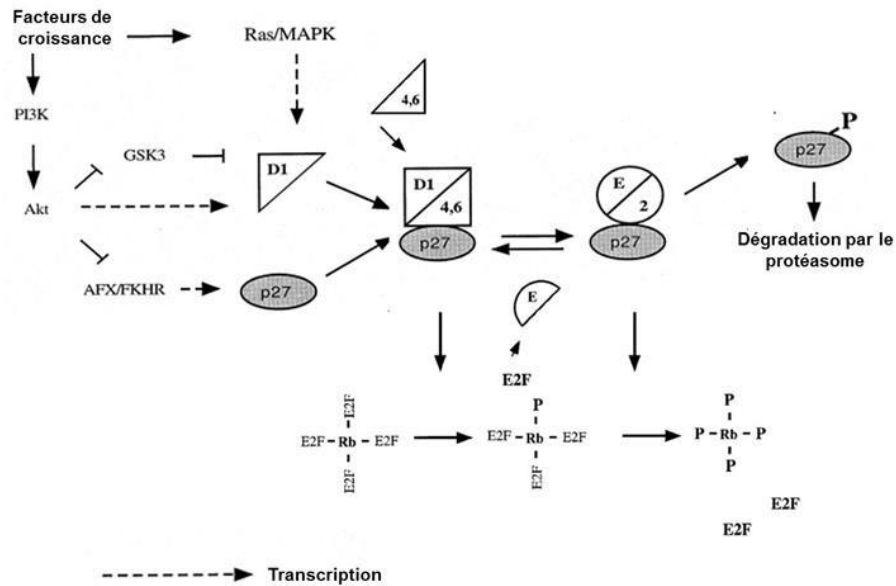


**Figure 15 :** Représentation simplifiée du cycle cellulaire

Lorsque les cellules sont en phase G0, elles sont quiescentes. La phase G1 permet aux cellules de se préparer à la réplication de l'ADN (phase S) et la phase G2 permet de préparer la mitose (M).

La prolifération des cellules est dépendante de facteurs de croissance (Epidermal Growth Factor : EGF ; Fibroblasts Growth Factor : FGF ; Hepatocyte Growth Factor : HGF ; Platelet-Derived Growth Factor : PDGF,...) qui vont se fixer sur leurs récepteurs transmembranaires. Cette liaison va entraîner la dimérisation du récepteur et la phosphorylation de son domaine intracellulaire. Cette modification va permettre une

reconfiguration de la boucle d'activation et va induire l'activité kinase du récepteur (Jones *et al.*, 2000). Ceci va avoir pour effet de recruter et d'activer des enzymes de signalisation, comme Ras ou PI3K. Ces enzymes vont ensuite activer des cascades de phosphorylation, qui vont aboutir à l'induction ou la répression de la transcription de gènes cibles, comme les gènes cycline D1 ou p27, et permettre aux cellules de progresser dans le cycle cellulaire. En effet, les facteurs de croissance régulent l'activité des Cdks en induisant la synthèse et la stabilisation des cyclines et en réduisant l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire. L'activation des Cdks permet de catalyser la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), ce qui permet la libération des facteurs de transcription E2F indispensables pour franchir le point de restriction mitogénique (R) et permettre la synthèse d'ADN (Figure 16). Les agents mitogènes, comme les facteurs de croissance, sont nécessaires jusqu'au point R et ne le sont plus après. Lorsque les cellules ont dépassé le point R, le cycle cellulaire est coordonné par l'activation des kinases (Cdks, Wee1,...) et des phosphatases (Cdc25,...), ainsi que par la synthèse et la dégradation des cyclines. La phase G1 peut être divisée en 2 parties, G1 précoce et G1 tardif, qui ne sont pas régulées de la même façon et qui ne font pas intervenir les mêmes enzymes de signalisation.

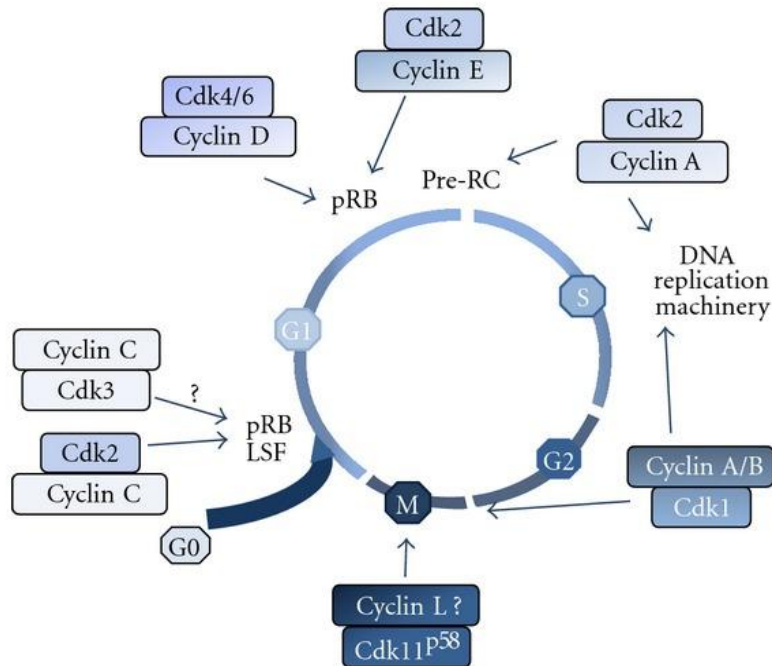


**Figure 16 :** Événements moléculaires régissant la phase G1

La phosphorylation complète de Rb nécessite l'action de deux complexes cyclines/cdks (cycline D1/cdk4,6 et cycline E/cdk2) et aboutit à la libération des facteurs de transcription de la famille E2F. L'activation de la cycline D1 est dépendante des facteurs de croissance et des voies de signalisation Ras/MAPK et PI3K/Akt. p27 facilite la formation du complexe cycline D1/cdk4,6 et inhibe l'activité kinase des deux complexes cyclines/cdks. (adapté de Jones *et al.*, 2000).

Comme mentionné précédemment, le cycle cellulaire est régulé par les complexes cyclines/Cdks. Ces dernières sont des sérine/thréonine kinases, qui sont activées à différents moments du cycle cellulaire pour réguler sa progression. On en compte 20 dans les cellules animales qui ne participent pas exclusivement au contrôle du cycle cellulaire (Malumbres *et al.*, 2009). Parmi celles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, Cdk4 et Cdk6 interviennent en G1, Cdk2 en G1 et S, et Cdk1 en G2 et en M. Cdk7, quant à lui, agit avec la cycline H pour former le complexe CAK (cdk-activating kinase). Les cdk ont été très conservées au cours de l'évolution. Ainsi, il a été montré que la substitution de Cdk1 chez la levure *S. cerevisiae* par la Cdk1 humaine permet une prolifération cellulaire normale (Wittenberg *et al.*, 1989). Ces protéines agissent sur le cycle cellulaire en phosphorylant de nombreuses protéines cellulaires et leur activité est elle-même régulée par des phosphorylations qui ont, soit un rôle activateur, soit un rôle inhibiteur. Par exemple, la kinase Wee1 phosphoryle Cdk1 avant l'entrée du complexe Cdk1/cycline dans le noyau pour le protéger d'une phosphorylation activatrice catalysée par les kinases mitotiques. Puis quand la cellule est prête à se diviser, la phosphatase Cdc25C déphosphoryle les Tyr 15 et Thr 14, ce qui entraîne l'activation de Cdk1 (Hu *et al.* 2011). De la même façon, Wee1 et Cdc25C sont régulées par phosphorylation, Cdk1 étant l'une des kinases impliquées dans ces réactions, permettant ainsi de créer des boucles de contrôle positif et négatif. Une étude réalisée au sein de notre équipe a mis en évidence que Cdk1, qui a été décrite comme une kinase mitotique, intervient aussi au cours de la phase S dans les hépatocytes (Garnier *et al.*, 2009).

En plus de se trouver dans le bon état de phosphorylation, les Cdks doivent s'associer à des cyclines pour être totalement actives. Cette association permet aux complexes cyclines/Cdks d'être transloqués dans le noyau, grâce au signal de localisation nucléaire des cyclines. Une Cdk peut se lier à différentes cyclines et l'expression cyclique de ces dernières implique une activation séquentielle des Cdks qui leur sont associées. L'expression cyclique des cyclines est majoritairement régulée par leur dégradation via leur ubiquitination ; cette dégradation intervient à la fin de chaque phase du cycle. Comme pour les différentes Cdks, les cyclines interviennent au sein du cycle cellulaire dans des phases spécifiques (Figure 17).



**Figure 17 :** Activation séquentielle des complexes cyclines/Cdks au cours du cycle cellulaire  
 Les différents complexes cyclines/Cdks sont activés pour permettre aux cellules de progresser dans le cycle cellulaire. Au sein de chaque phase, on retrouve un couple cycline/cdk spécifique. (D'après Corlu *et al.*, 2012).

Ainsi, les cyclines de la famille D (D1, D2 et D3) en association avec Cdk4 ou 6 vont permettre l'entrée des cellules en phase G1. Ces cyclines, contrairement aux autres, vont répondre à une stimulation induite par des facteurs de croissance et vont être exprimées jusqu'à la disparition de ce stimulus. La progression de la phase G1 vers la phase S est régulée par le complexe cycline E-Cdk2, puis Cdk2 va s'associer à la cycline A pour entraîner la progression des cellules en phase S et engager la réplication de l'ADN. En fin de phase G2 et en début de phase M, le complexe cycline A-Cdk1 permet l'entrée en phase G2 et l'association de Cdk1 avec la cycline B régule ensuite la mitose. 16 cyclines ont été identifiées chez l'homme, mais comme leurs partenaires, elles ne jouent pas toutes un rôle dans le cycle cellulaire.

Au sein de la phase G1, la cible majeure des complexes cyclines/Cdks est la protéine Rb. Sous sa forme hypophosphorylée, cette protéine se lie au facteur de transcription E2F, le rendant inactif. Ses phosphorylations séquentielles, catalysées par les complexes cyclines/Cdks, permettent la libération d'E2F. La première phosphorylation, médiée par le complexe cycline C/Cdk3, permet le passage de la phase G0 à la phase G1 ; la deuxième

phosphorylation, impliquant les complexes cycline D1/Cdk 4 ou cyclineD1/Cdk6, entraîne le relargage de HDAC1 (Histone Désacétylase) et l'induction de la transcription de la cycline E, par exemple. De plus, cette deuxième phosphorylation permet un changement conformationnel laissant apparaître un nouveau site de phosphorylation qui va devenir une cible du complexe cycline E1/Cdk2. Cette dernière phosphorylation permet la libération du facteur E2F. Celui-ci active ensuite la transcription de protéines nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire, comme Cdk2 et cycline E. E2F participe aussi à l'activation transcriptionnelle des protéines MCM (Minichromosome Maintenance protein) et Cdc6, impliquées dans l'initiation de la réplication. En effet, les protéines MCM2 à MCM7 forment un complexe qui se fixe sur l'ADN au niveau des origines de réplication, grâce au complexe ORC (Origin Recognition Complex) et à la kinase Cdc6 (Lei *et al.*, 2001). Le complexe MCM est ensuite activé par le complexe Cdc7-Dbf4 et acquiert son activité hélicase avant d'être dissocié pour laisser la place aux enzymes nécessaires à la réplication : l'ADN polymérase  $\alpha$  et la primase.

Au cours du cycle cellulaire, il existe des points de contrôles qui permettent d'éviter la prolifération de cellules endommagées. Le premier, le point de restriction mitogénique, se situe dans la phase G1 et coïncide avec la phosphorylation de Rb par les complexes cycline/cdk. Il a été mis en évidence comme le point permettant aux cellules animales de passer d'un état quiescent à un état prolifératif (Pardee, 1974). Au-delà de ce point, les cellules sont capables de progresser dans le cycle cellulaire sans signal mitogénique externe, alors qu'elles n'en sont pas capables avant. Si ce point de contrôle est défaillant, les cellules sont insensibles aux signaux anti-mitogéniques et prolifèrent de façon incontrôlée, comme par exemple les cellules cancéreuses. Un deuxième point de contrôle dans la phase G2 compense les défauts du premier point de contrôle. Il ne fait pas intervenir les mêmes acteurs protéiques, mais possède de fortes similitudes avec le point de restriction mitogénique : réversibilité, présence de mitogènes indispensables, ... (Fojer *et al.*, 2006).

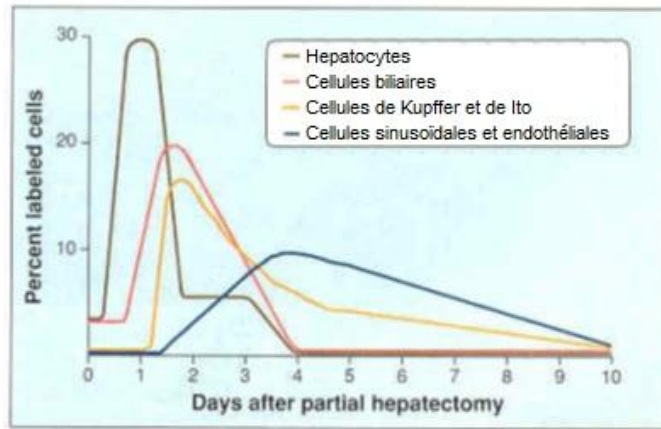
L'activité des Cdks peut aussi être régulée par des protéines inhibitrices, les CKI (cdk inhibitors), qui se fixent sur les Cdks seuls ou sur les complexes cyclines/Cdks. Il existe deux familles de CKI distinctes, INK4 et Cip/Kip. Les inhibiteurs de la famille INK4 (p15, p16, p18 et p19) inactivent les Cdks de la phase G1 (Cdk4 et Cdk6), en formant des complexes stables avant la fixation de la cycline D1, alors que les membres de la famille Cip/Kip (p21, p27 et



p57) inactivent les complexes cyclines/Cdks de la phase G1, ainsi que le complexe cycline B-Cdk1.

Les hépatocytes, bien que quiescents dans le foie normal (phase G0), possèdent une capacité importante de prolifération. En effet, après une hépatectomie des deux-tiers, les hépatocytes vont se diviser une ou deux fois, avant de retrouver leur état quiescent au moment où le foie à regagner sa masse initiale. En culture, ces cellules vont répliquer leur ADN seulement en présence de facteurs de croissance. Ces observations nous montrent que la prolifération des hépatocytes n'est pas spontanée mais requiert la présence de signaux mitogéniques. De plus, cette capacité de prolifération est limitée *in vitro*. Mais certaines investigations (Overturf *et al.*, 1997; Rhim *et al.*, 1994, 1995; Sandgren *et al.*, 1991) ont démontré que les hépatocytes avaient la capacité de repeupler un foie à 90% et que cette capacité était maintenue après plusieurs transplantations. Dans la dernière étude citée, les auteurs ont montré que les hépatocytes étaient capables de réaliser au moins 69 divisions, si on considère que tous les hépatocytes participent au repeuplement du foie (Overturf *et al.*, 1997). Cette activité proliférative excède celle des précurseurs hématopoïétiques et ne semblent pas être différente en fonction de l'âge des souris donneuses, de la ploïdie des cellules ou de leur localisation lobulaire. Cette capacité importante de prolifération a aussi été mise en évidence dans un modèle d'hépatectomie chez le rat. En effet, en 1963, Simpson et Finckh ont montré que le foie des rats retrouvait une taille normale même après cinq hépatectomies successives (Simpson *et al.*, 1963).

La restauration finale de la structure et des fonctions hépatiques suggèrent que la capacité de division n'est pas restreinte aux hépatocytes, mais peut être étendue aux autres types cellulaires du foie. Ceci est confirmé par l'observation des différentes « vagues » de division : tout d'abord les hépatocytes, de façon très synchrone, puis les cellules biliaires, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées et enfin les cellules endothéliales (Michalopoulos *et al.* 1997) (Figure 18). Lorsque les hépatocytes sont dans l'incapacité de proliférer, la population de cellules multipotentes présente dans le foie, les cellules ovales, est activée. Ces cellules constituent un compartiment de cellules progénitrices/souches et envahissent le foie à partir de la région périportale en réponse aux mêmes signaux que les hépatocytes : TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), IL-6 (Interleukine-6), EGF, HGF (Lowes *et al.*, 2003).

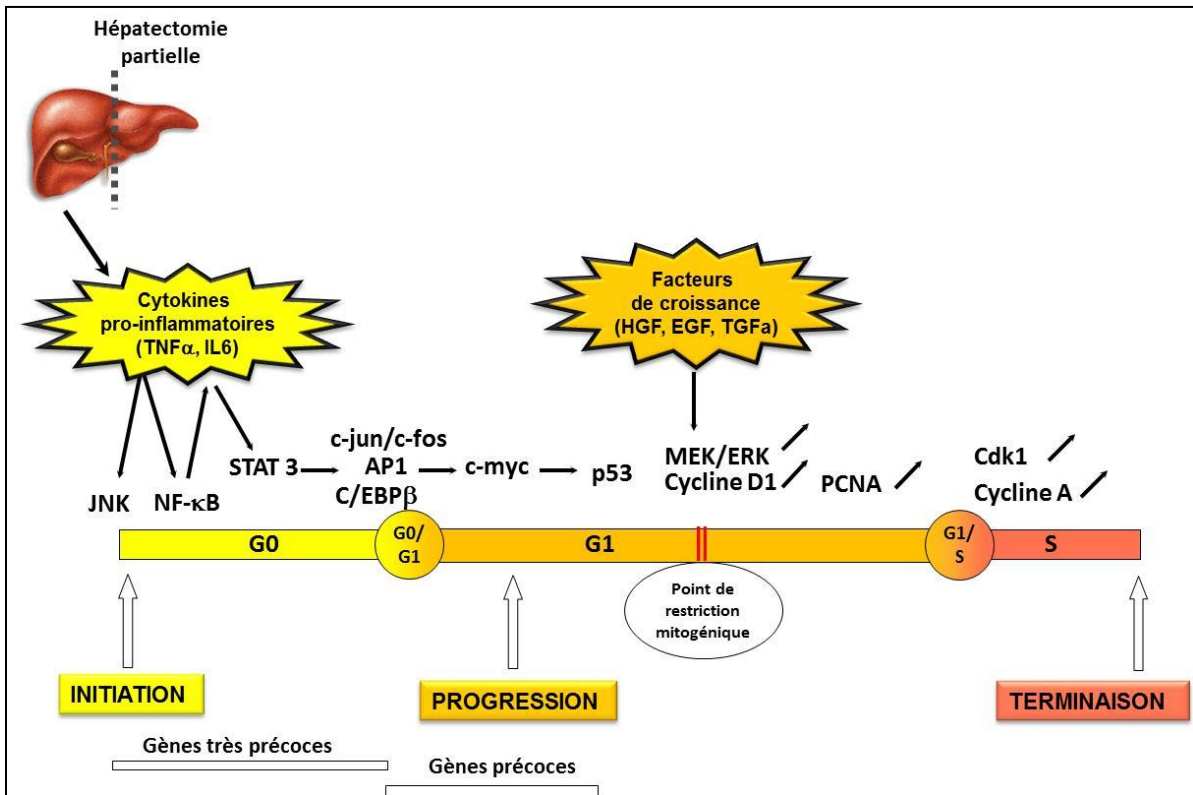


**Figure 18:** Représentation des différentes vagues de prolifération des cellules hépatiques après hépatectomie partielle chez le rat

La première phase de prolifération, synchrone, implique les hépatocytes suivie par les cellules biliaires, les cellules de Kupffer et les cellules de Ito et, enfin, les cellules endothéliales sinusoidales. Contrairement aux hépatocytes, les phases de prolifération des autres cellules est moins synchrone. (D'après Michalopoulos *et al.*, 1997).

### 3. Mécanismes moléculaires de la régénération hépatique

La compréhension des événements qui participent à la régénération hépatique a débuté il y a plus d'un siècle et a été précipitée par la mise au point d'une technique reproductible d'hépatectomie partielle chez le rat (Higgins and Anderson, 1931). L'évolution des découvertes est fortement liée à l'évolution des techniques et à la capacité d'étudier de plus en plus finement les processus cellulaires et moléculaires. L'étude de la régénération hépatique ne déroge pas à cette observation et a connu plusieurs phases : approches physiologiques, biochimiques, morphologiques, moléculaires et génétiques. Toutes ces approches sont complémentaires et les résultats doivent être mis en commun pour étudier ce processus complexe intervenant dans un organe tout aussi complexe.



**Figure 19 :** Représentation schématique des événements qui sont impliqués au cours de la régénération hépatique

La perte tissulaire (résection, infection,...) entraîne la sécrétion de TNF $\alpha$  par les cellules de Kupffer. Cette cytokine va activer le facteur de transcription NF $\kappa$ B au sein des hépatocytes et permettre ainsi la production d'IL-6. Cette seconde cytokine va activer le facteur de transcription STAT3 et la transcription de proto-oncogènes précoces (c-jun, c-fos, c-myc). Au niveau du point de restriction de la phase G1, les facteurs de croissance (EGF, HGF, TGF $\alpha$ ,...) vont activer les voies des MAPK et l'entrée dans la phase de synthèse d'ADN (S).

Le processus de régénération est compliqué et fait intervenir de nombreux acteurs. Pour simplifier les choses, il peut être divisé en phases : la phase de « priming », suivie par la phase de progression et enfin la phase de terminaison. La phase de « priming » est la combinaison de la réponse générale au stress et des changements dans la réponse inflammatoire (cytokines) (0-1h) ; la phase de progression voit l'apparition des facteurs de croissance qui vont induire l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Enfin la phase de terminaison entraîne l'arrêt de la prolifération et le retour des cellules dans un stade quiescent. De nombreuses voies de signalisation et de nombreux acteurs moléculaires prennent part à tout ce processus avec des redondances d'activités et des « dialogues » entre les différentes voies impliquées (Figure 19).

### a) Signal « Start » et phase d'initiation

La régénération hépatique nécessite un signal qui va initier toutes les cascades de signalisation nécessaires ensuite à la prolifération des cellules, au maintien de la structure et des fonctions et finalement à la terminaison du processus. Ce signal « start » n'est pas très bien connu, mais il semble que les modifications hémodynamiques induites par la perte de tissu entraînent la mise en place de cascades de signalisation similaires à celles retrouvées au cours de la cicatrisation. Une étude a montré que la ligature sélective d'une branche de la veine porte permettait d'induire l'expression de c-fos, proto-oncogène précoce, de façon similaire à une hépatectomie partielle (Schoen *et al.*, 2001). L'augmentation de la pression sanguine et du stress de « cisaillement » à la surface des cellules a pour effet le relargage du monoxyde d'azote (NO) qui joue un rôle important dans l'initiation de la régénération hépatique. Toutefois, l'augmentation du flux sinusoidal à lui seul ne permet pas d'initier le processus de régénération (Mortensen *et al.*, 2010).

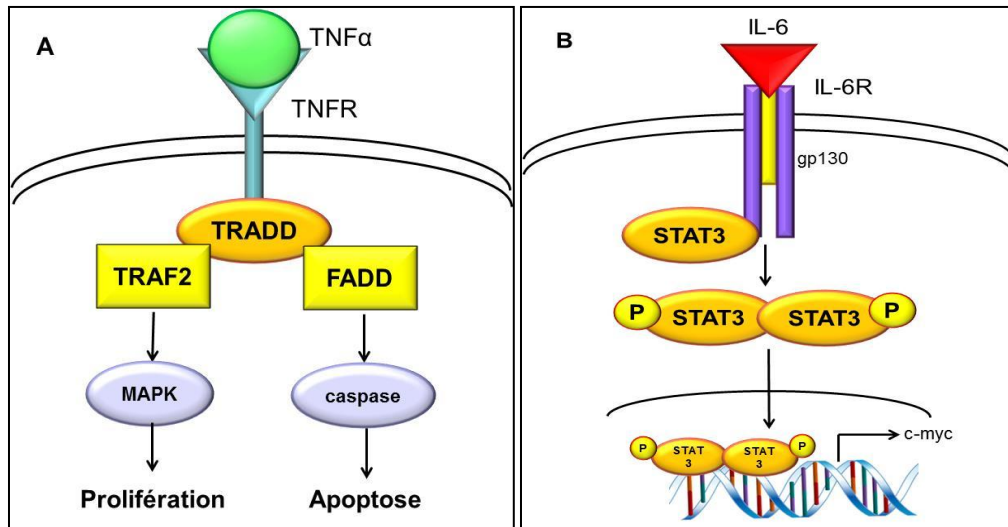
### b) Cytokines pro-inflammatoires

L'initiation de la régénération hépatique, ou phase de « priming », permet aux hépatocytes quiescents de proliférer en devenant réceptifs aux facteurs de croissance. Cette phase est associée à l'induction des proto-oncogènes précoces, c-jun, c-fos et c-myc, et des cytokines pro-inflammatoires. Peu après hépatectomie, une forte induction de l'expression du TNF $\alpha$  (protéine et ARNm) est observée, suivie par l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B) et la synthèse d'IL-6. L'activation de STAT3 qui en découle permet d'induire la transcription des proto-oncogènes cités précédemment. Ces événements ne sont pas restreints à la régénération hépatique et cette voie de signalisation est fréquemment observée. Il semble que le lipopolysaccharide (LPS) soit l'agent stimulateur de la production des cytokines pro-inflammatoires au cours de la régénération hépatique (Cornell, 1985).

**TNF $\alpha$**  : Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire, majoritairement sécrétée par les cellules de Kupffer, et qui intervient dans la physiopathologie des hépatites virales, des maladies alcooliques du foie et des lésions d'ischémie / reperfusion (Schwabe *et al.*, 2006).

Les signaux dépendants du TNF $\alpha$  sont transmis par deux récepteurs de surface, TNFR1 et TNFR2 (TNFReceptor). TNFR1 est associé à des protéines qui vont permettre la transmission du signal au niveau intracellulaire. Parmi ces protéines, TRADD (TNF Receptor-Associated with Death Domain) interagit directement avec TNFR1 et est indispensable pour transmettre les signaux apoptotiques comme anti-apoptotiques en fonction des facteurs qui vont interagir avec lui. En effet, la liaison de TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) induira les voies anti-apoptotiques, alors que la fixation de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) aura pour conséquence l'induction des voies pro-apoptotiques dépendantes des caspases (Figure 20A).

La forte implication du TNF $\alpha$  dans le processus de régénération a été mise en évidence dans des études où le récepteur au TNF $\alpha$ , TNFR1, a été invalidé (Yamada *et al.*, 1997) et dans des études utilisant des anticorps anti-TNF $\alpha$  (Akerman *et al.*, 1992). Ces défauts de régénération sont probablement la conséquence des diminutions d'activité de STAT3 et de NF $\kappa$ B qui sont observées. Le TNF $\alpha$  a de multiples autres rôles qui sont en lien avec la régénération. En effet, il est impliqué dans l'induction de la protéase TACE (TNF $\alpha$ -converting enzyme), qui permet l'activation du TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor). C'est aussi un régulateur de iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), qui est impliqué dans la régénération hépatique comme le démontrent les défauts de prolifération cellulaire observés chez les souris *iNOS*<sup>-/-</sup> après hépatectomie (Rai *et al.*, 1998). Cependant, une étude plus récente a montré que l'inhibition du TNF $\alpha$  lui-même n'avait pas d'effet sur la régénération hépatique (Fujita *et al.*, 2001). Ces différentes études ayant été réalisées sur des modèles différents (rat ou souris), il est toutefois difficile de comparer directement les résultats obtenus.



**Figure 20 :** Représentation schématique des voies dépendantes du TNF $\alpha$  (A) et de l'IL-6 (B)  
La liaison de ces cytokines pro-inflammatoires sur leurs récepteurs respectifs entre l'induction de différentes voies de signalisation qui vont aboutir à la prolifération ou la mort cellulaire.

Contrairement à l'EGF et à l'HGF, le TNF $\alpha$  ne possède pas d'activité mitogénique directe, car il ne permet pas d'induire la prolifération des hépatocytes *in vivo* ou *in vitro* à lui seul. Mais il a la capacité d'augmenter les effets des mitogènes précédemment cités. Le TNF $\alpha$  n'est pas un initiateur de la régénération, mais possède un rôle important dans les événements précoces de ce processus.

**IL-6 :** IL-6 est une cytokine pléiotropique qui agit sur de nombreux types cellulaires. En association avec le TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , elle induit la réponse inflammatoire aiguë qui comprend la fièvre, le relargage des corticostéroïdes et la production hépatique des protéines de la phase aiguë, qui pour la plupart sont des inhibiteurs de protéases. En plus de sa participation dans l'inflammation, cette cytokine intervient dans la prolifération cellulaire et possède un rôle important dans la régénération hépatique. En effet, l'absence de cette protéine entraîne un défaut de régénération qui est caractérisé par une nécrose et des défaillances hépatiques (Cressman *et al.*, 1996).

Le récepteur à l'IL-6 est composé de deux sous-unités : gp80 et gp130. La fixation de l'IL-6 sur la sous-unité gp80 entraîne l'homodimérisation de gp130 dans le domaine intracellulaire. Cette dimérisation active les tyrosines kinases de la famille JAK (Janus kinase) qui entraîne son autophosphorylation et la phosphorylation de la protéine transmembranaire

gp130. Ceci permet le recrutement des protéines STAT, en particulier STAT1 et STAT3, ou l'activation de la voie de signalisation Ras/Map. Les protéines STAT forment ensuite des homo ou des hétérodimères, grâce à leur domaine SH2. Ces dimères vont ensuite être transloqués dans le noyau où ils vont pouvoir se fixer à des séquences spécifiques (5'-TTCnnn(n)GAA-3') de l'ADN et induire la transcription de gènes impliqués, entre autres, dans la phase aiguë de l'inflammation (Figure 20B).

Au cours de la régénération hépatique, IL-6 joue un rôle décisif dans l'initiation du processus et l'activation des facteurs de transcription STAT3 et C/EBP $\beta$ . Les niveaux sériques d'IL-6 sont élevés durant les premières heures après hépatectomie, avant la synthèse d'ADN. Cette cytokine joue un rôle important dans la transition G0/G1 et les souris *IL-6*<sup>-/-</sup> montrent une phase G1 anormale après hépatectomie. Cette observation est corrélée à la diminution d'activité de STAT3 et la diminution d'expression génique d'AP-1, de c-myc et de la cycline D1. Ces effets peuvent être compensés grâce à l'injection d'IL-6 ce qui confirme le rôle majeur de cette cytokine dans la régénération hépatique (Cressman *et al.*, 1996). De plus, il a été mis en évidence qu'une dose trop élevée d'IL-6 après hépatectomie augmentait l'expression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire, comme p21 et p27, sous l'effet de l'activation prolongée de STAT3, entraînant une diminution de la prolifération des hépatocytes (Wüstefeld *et al.*, 2000).

L'injection d'IL-6 compense le défaut de régénération observé chez les souris *TNFR1*<sup>-/-</sup> après hépatectomie. Il semble que l'expression élevée du TNF $\alpha$  après hépatectomie induise l'expression de l'IL-6 et que cette induction soit indispensable à la prolifération des hépatocytes (Yamada *et al.*, 1997). Comme le TNF $\alpha$ , l'IL-6 n'est pas un mitogène direct, mais contrairement à celui-ci, l'IL-6 ne potentialise pas les effets des mitogènes.

### **c) Rôle de la matrice extracellulaire dans les premières étapes de la régénération**

La prolifération importante des hépatocytes au cours de la régénération hépatique induit de forts remodelages de la matrice extracellulaire, qui interviennent très précocement. Chez le

rat, la diminution de la distribution de fibrinogène dans les régions péri-portales est observée dès 15 min et se poursuit jusqu'à 24h après hépatectomie. Les modifications d'expressions protéiques et géniques ne touchent pas tous les composants de la matrice extracellulaire. Ainsi des variations sont observées pour la laminine, l'entactine et la fibronectine, alors que les expressions de la vitronectine et de l'intégrine  $\alpha$  ne varient pas au cours de la régénération (Kim *et al.*, 1997).

Les composants de la matrice extracellulaire peuvent être dégradés par des protéases spécifiques, les MMPs (Matrix Metalloproteinases). Ces dernières sont régulées négativement par les TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Après hépatectomie chez le rat, la phase de synthèse d'ADN est précédée par une induction de TIMP-1, qui est un inhibiteur important de la dégradation de la matrice. De plus, peu de MMP voient leur expression modifiée au cours de la régénération (Rudolph *et al.*, 1999). Ceci a été confirmé par une analyse transcriptomique chez la souris (Su *et al.* 2002). En plus de l'absence d'inhibition de la dégradation de la matrice, plusieurs études montrent une augmentation de la synthèse de collagène pendant la régénération hépatique (Rudolph *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1995) pour permettre de maintenir l'architecture du tissu. Une étude *in vitro*, impliquant les hépatocytes de rat, a permis de mettre en évidence l'importance de la dégradation de la matrice extracellulaire dans la prolifération des hépatocytes et en particulier à la transition G1/S (Sérandour *et al.*, 2005).

La sérine protéase uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) joue un rôle important dans la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire. Elle catalyse en effet la conversion du plasminogène en plasmine, qui est une sérine-protéase à large spectre. Celle-ci est capable de dégrader de nombreux composants du tissu conjonctif directement, mais aussi par l'intermédiaire de l'activation des MMPs (Ramos-DeSimone *et al.*, 1999). Au cours de la régénération hépatique, l'activation d'uPA est un des événements les plus précoces (1 min) et cette activation est suivie par la conversion du plasminogène en plasmine (15 min), la dégradation du fibrinogène (15-30 min) et l'activation de protéines de dégradation de la matrice extracellulaire, comme MMP-9 (3-6h). De plus, il a été montré qu'une déficience en uPA chez des souris entraînait un défaut de régénération transitoire après hépatectomie (Roselli *et al.*, 1998). En effet, chez les souris *uPA*<sup>-/-</sup>, le pic de synthèse d'ADN à 44h est



significativement réduit par rapport aux souris *uPA*<sup>+/+</sup>. D'autres études ont démontré que les remodelages de la matrice extracellulaire sont importants pour le bon déroulement du processus de régénération ; les souris *MMP9*<sup>-/-</sup> (Olle *et al.*, 2006) et *PAI*<sup>-/-</sup> (Plasminogen Activator Inhibitor) (Shimizu *et al.*, 2001) présentent une inhibition et une accélération de la régénération, respectivement.

Les conséquences de l'absence d'uPA sur la régénération hépatique sont aussi liées aux facteurs de croissance qui sont nécessaires à ce processus (comme décrit dans la suite du manuscrit). En effet, il a été montré que la matrice extracellulaire contenait des molécules d'HGF sous forme inactive et que celles-ci étaient libérées suite à la dégradation de cette matrice (Schuppan *et al.*, 1998). Ces molécules sont ensuite activées par la protéase uPA et deviennent disponibles localement afin de se lier à leur récepteur c-Met ou d'entrer dans la circulation.

La régénération hépatique cause des changements importants des niveaux protéiques de la  $\beta$ -caténine dans les premières minutes du processus. La  $\beta$ -caténine est une protéine multifonctionnelle impliquée dans le développement embryonnaire, la polarité cellulaire et la carcinogénèse. Cette protéine participe à l'adhésion cellulaire médiée par la cadhérine, mais aussi à la signalisation cellulaire induite par les voies canonique et non-canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. L'implication de la  $\beta$ -caténine au cours de la régénération a été évaluée chez des souris dépourvues de  $\beta$ -caténine dans le tissu hépatique ; celles-ci présentent une diminution de la régénération hépatique (Tan *et al.*, 2006). A l'inverse, l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine entraîne une accélération de la prolifération probablement due à la dissociation du complexe Met/ $\beta$ -caténine (Nejak-Bowen *et al.*, 2010). De façon intéressante, l'expression de la  $\beta$ -caténine a été récemment liée à l'activation d'uPA, uPA-R et PAI-1 dans des lignées cancéreuses (Moreau *et al.*, 2011).

En résumé, l'activation de diverses protéines en lien avec la matrice extracellulaire et les remodelages de celle-ci, qui ont lieu très précocement au cours de la régénération hépatique, vont permettre d'induire la transcription de gènes et d'activer des facteurs de croissance indispensables à la prolifération des cellules après hépatectomie.

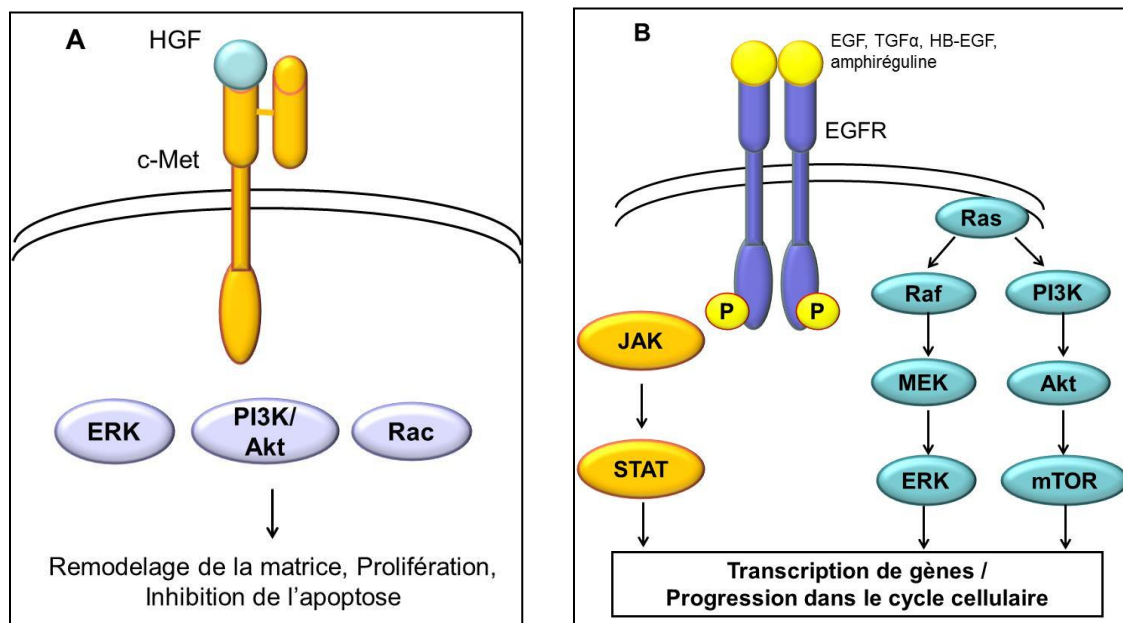
#### d) Signaux mitogéniques

Dans les premières étapes de la régénération hépatique, le processus est réversible, c'est-à-dire que, sans la présence de signaux mitogéniques, les cellules peuvent retrouver leur état quiescent avant d'avoir achevé un cycle cellulaire complet. Parmi les signaux mitogéniques, on retrouve des facteurs de croissance (HGF, EGF, TGF $\alpha$ ..), des hormones (insuline, sérotonine..), et d'autres molécules (acides biliaires, protéines du complément..).

**La voie de signalisation c-Met / HGF :** Le gène *met* code pour un récepteur tyrosine kinase sur lequel se fixe le facteur de croissance hépatocytaire (HGF, Hepatocyte Growth Factor) et possède un potentiel oncogénique. Le récepteur c-Met est exprimé dans la plupart des cellules endothéliales, épithéliales et dans les neurones. L'activation de c-Met a pour conséquence une induction de la prolifération cellulaire et de la survie, et passe par différentes voies de signalisation : Ras/ERK/MAPK ; PI3K/Akt ; Rac/Pak et Crk/Rap1 (Figure 21A). Plusieurs données suggèrent l'implication d'HGF au cours de la régénération hépatique : 1) l'augmentation élevée d'HGF dans le plasma des rats après hépatectomie ; 2) la réponse mitogénique et l'expansion des hépatocytes en culture primaire sous l'influence d'HGF ; 3) la prolifération des hépatocytes *in vivo* chez des rats et des souris normaux après injection d'HGF ; 4) l'activation précoce de c-Met par phosphorylation (30-60 min) ; 5) un défaut de régénération chez les souris *uPA*<sup>-/-</sup>, protéase activant HGF ((Michalopoulos, 2007) ; 6) la diminution importante de la réponse régénérative chez les souris *c-Met*<sup>-/-</sup>. En effet, il a été montré un défaut de régénération chez des mutants conditionnels c-Met avec une dérégulation des protéines du cycle cellulaire, telles que la cycline D1, E et A, et une augmentation de p21 (Borowiak *et al.*, 2004). Les marqueurs de la phase S, PCNA et phospho-Rb, sont significativement diminués chez les souris invalidées pour la protéine c-Met. L'absence de c-Met a pour conséquence un défaut d'activation des protéines ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), qui doivent être phosphorylées et donc actives dans le foie en régénération (Borowiak *et al.*, 2004). Cette inactivation d'ERK1 et ERK2 provoque l'arrêt des cellules en G2/M après hépatectomie (Factor *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que c-Met contrôle la progression des hépatocytes dans le cycle cellulaire aux transitions G1/S et G2/M après hépatectomie. Récemment, l'invalidation conditionnelle d'HGF chez des souris a

confirmé le rôle de ce facteur de croissance au cours de la régénération hépatique (Nejak-Bowen *et al.*, 2013). En effet, la diminution de l'expression d'HGF après traitement au CCl<sub>4</sub> (Tétrachlorure de carbone) entraîne un retard de prolifération des hépatocytes.

HGF est un acteur primordial dans l'initiation de la régénération, mais n'est pas la première molécule à être impliquée. En effet, l'activation d'uPA est plus précoce et, au cours de la régénération, la synthèse d'HGF dans les cellules endothéliales et les cellules étoilées est induite par le VEGF qui est secrété par les hépatocytes. HGF va ensuite avoir une action mitogénique sur les hépatocytes.



**Figure 21** : Représentation schématique des voies dépendantes de l'HGF (A) et des ligands d'EGFR (B)

La liaison de ces cytokines pro-inflammatoires sur leurs récepteurs respectifs entre l'induction de différentes voies de signalisation qui vont aboutir à la prolifération ou la mort cellulaire.

**Participation des ligands d'EGFR** : Le récepteur à l'EGF (EGFR), contrairement au récepteur c-Met, est capable de lier plusieurs ligands comme l'EGF, le TGF $\alpha$ , HB-EGF et l'amphiréguline, ce qui permet de créer une redondance dans les voies de signalisation, même si elle n'est pas complète (Figure 21B) (Collin de L'hortet *et al.*, 2012). En effet, les souris déficientes en TGF $\alpha$  présentent une régénération normale, alors que les souris déficientes en HB-EGF ou en amphiréguline ont des défauts de régénération importants.

- **EGF** : l'EGF est produit par les glandes de Brunner, situés dans le duodénum, et arrive dans le foie par la veine porte. Cette molécule est un mitogène qui stimule la prolifération des hépatocytes *in vitro* comme *in vivo* sans stimulation préalable. Aucune augmentation d'EGF n'est détectée après hépatectomie, par contre, on observe une activation importante du récepteur EGFR par phosphorylation (Stolz *et al.*, 1999).

- **TGF $\alpha$**  : Après hépatectomie, le TGF $\alpha$  est produit par les hépatocytes à partir de 2h et jusqu'à 48h. Il est produit sous une forme inactive et nécessite un clivage protéolytique catalysé par la protéase TACE pour être activé. Les hépatocytes, ainsi que les cellules endothéliales et étoilées, expriment le récepteur EGFR, donc le TGF $\alpha$  peut avoir un rôle autocrine, en ciblant la cellule productrice, comme paracrine en ciblant d'autres types cellulaires. Le TGF $\alpha$ , tout comme l'EGF, est un mitogène direct, car il induit la prolifération des hépatocytes *in vivo* dans des animaux normaux. Toutefois, la nécessité de cette molécule n'est pas certaine, car comme évoqué précédemment, l'élimination génétique du TGF $\alpha$  ne modifie pas le processus de régénération (Russell *et al.*, 1996). Il semble en effet que les fonctions d'autres ligands d'EGFR, comme HB-EGF, peuvent compenser l'absence du TGF $\alpha$ .

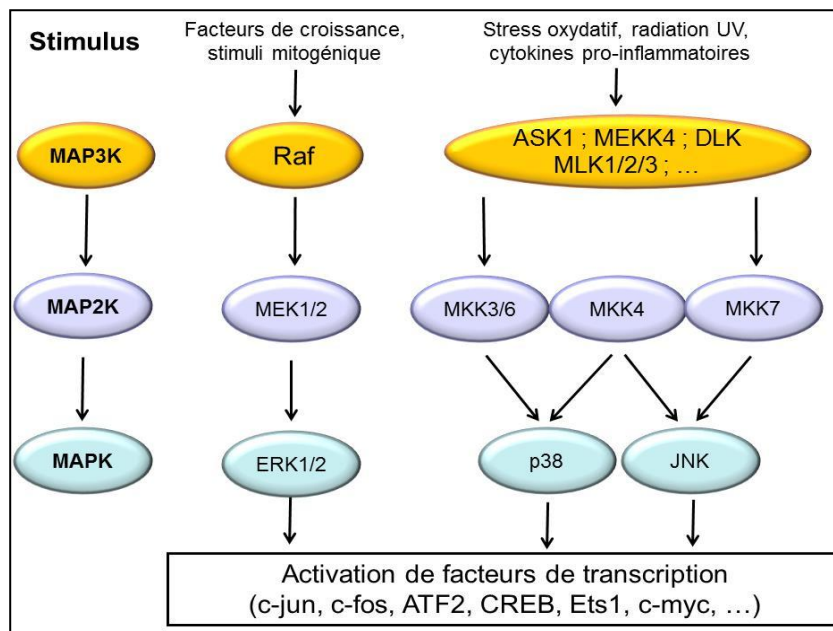
- **HB-EGF** : HB-EGF (Heparin binding EGF-like growth factor) est synthétisé par les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Son expression est augmentée dans la première heure et demi après hépatectomie et sa surexpression chez des souris entraîne une augmentation de la régénération (Kiso *et al.*, 2003). A l'inverse, la déficience en HB-EGF chez des souris a pour conséquence une diminution de la réponse régénérative (Mitchell *et al.*, 2005).

- **Amphiréguline** : De même que pour HB-EGF, l'inhibition de l'amphiréguline entraîne des défauts de régénération (Berasain *et al.*, 2005). Comme EGF et TGF $\alpha$ , l'amphiréguline est synthétisée sous la forme d'un précurseur transmembranaire qui est clivé pour donner une forme active sécrétée. Elle possède deux fonctions majeures : promouvoir la prolifération des cellules normales et inhiber celle des cellules tumorales.

Les signaux mitogéniques peuvent aussi être médiés par d'autres molécules, comme la noradrénaline (Ohtake *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 1985); les acides biliaires (Dong *et al.* 2010; Huang *et al.* 2006) ; la sérotonine (Lesurtel *et al.*, 2006) ; les composés du complément (Strey *et al.*, 2003) ; la leptine (Leclercq *et al.*, 2006; Shteyer *et al.*, 2004); certains acteurs de la voie Notch-Jagged (Köhler *et al.*, 2004), ou encore, l'insuline (Yamada *et al.*, 1977).

### e) Voies de signalisation

Suite à l'activation des récepteurs transmembranaires par les facteurs de croissance et les cytokines pro-inflammatoires, le signal est transduit dans le domaine intracellulaire par différentes voies de signalisation. Ces voies vont aboutir à l'activation de facteurs de transcription par l'intermédiaire de cascades de phosphorylations. Parmi celles-ci, les voies des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), JNK, ERK et p38, jouent un rôle régulateur important au cours de la régénération hépatique (Figure 22).



**Figure 22 :** Voies de signalisation dépendante des MAPK

En réponse à divers stimuli, les cellules vont activer différentes voies de signalisation, dont celles des MAPK, et vont ainsi permettre l'activation de facteurs de transcription. Ces cascades de phosphorylation font intervenir des nombreuses kinases. MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; MAPKK : MAPK Kinase ; ERK : Extracellular Signal Regulated Kinase ; JNK : c-Jun N-Terminal Kinase.

### **C-jun N-terminal Kinase (JNK)**

Les protéines kinases JNK sont codées par trois gènes : *jnk1*, *jnk2* et *jnk3*. Contrairement à *jnk1* et *jnk2*, qui sont exprimés de façon ubiquitaire, le gène *jnk3* est seulement exprimé dans le cerveau, le cœur et les testicules (Bogoyevitch, 2006). Les protéines JNK sont activées grâce à la phosphorylation des résidus Thr et Tyr présents dans leurs boucles d'activation par MKK4 ou MKK7. Ces deux kinases répondent à des stimuli différents et par conséquent entraînent des réactions différentes. De nombreuses MAPKKK interviennent dans la voie JNK, dont ASK1 qui active MKK4 et MKK7 et qui est indispensable dans l'activation de JNK induite par TRAF2 (Nishitoh *et al.*, 1998).

JNK phosphoryle et induit l'activation transcriptionnelle de plusieurs cibles, dont c-jun et ATF2. C-jun est préférentiellement phosphorylée par JNK1 alors qu'ATF2 est la cible de JNK2. Le rôle régulateur de JNK sur c-jun et JunD laisse supposer que celui-ci a aussi un effet sur l'activité du facteur de transcription AP-1. En effet, l'invalidation de MKK4 conduit à un défaut de l'activité transcriptionnelle d'AP-1 en réponse à un stress (Yang *et al.*, 1997). C-jun possède une demi-vie courte car elle est rapidement ubiquitinilée et dégradée par le protéasome. La phosphorylation de c-jun par JNK sur les Ser 63 et 73 permet d'inhiber l'ubiquitination et donc la dégradation de c-jun (Musti *et al.*, 1997). Celle-ci s'accumule et augmente l'activité d'AP-1.

JNK est activée précocement après hépatectomie. L'utilisation du SP600125, inhibiteur compétitif, entraîne un blocage des hépatocytes en transition G1/S après hépatectomie, confirmé par une diminution de l'expression du PCNA et de la cycline D1 (Schwabe *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que la durée d'activation de JNK avait un impact important sur ses fonctions. Ainsi, une activation prolongée est délétère pour la prolifération des hépatocytes en induisant le processus de mort cellulaire programmée (Iimuro *et al.*, 2010).

### **P38 MAPK**

La kinase p38 présente quatre variants d'épissage : p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  et p38 $\delta$ . Ces kinases sont activées par un grand nombre de stimulus, dont les cytokines, les hormones, les chocs osmotiques ou les chocs de températures. Ces kinases sont principalement

phosphorylées et activées par les MAPKK MEK3 et MEK6, mais dans certaines cellules elles peuvent aussi être la cible de MEK4 (Jiang *et al.*, 1997). Une part importante des MAPKKK qui activent les voies de signalisation JNK et p38 sont communes aux deux voies. L'activation de p38 a un effet antiprolifératif. Au cours du cycle cellulaire, p38 doit être inactif pour permettre aux cellules de sortir de leur état de quiescence. Au niveau de la transition G1/S, l'activation de p38 peut promouvoir ou inhiber la progression dans le cycle cellulaire en fonction du type cellulaire et du stimulus (Ambrosino *et al.*, 2001).

Au cours de la régénération hépatique, les niveaux d'activation de p38 varient de façon importante pour permettre aux cellules de proliférer. En effet, p38, qui se trouve sous forme active dans le foie normal, est rapidement inactivé après hépatectomie (30 min) (Campbell *et al.*, 2011). Cette inactivation joue un rôle permissif dans la synthèse d'ADN après hépatectomie.

### **Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)**

Les kinases ERK1 et 2 sont les effecteurs finaux de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK et phosphorylent plus de 160 substrats cytosoliques et nucléaires (Yoon *et al.*, 2006). Malgré leur grande homologie (88% de leur séquence protéique), les protéines ERK1 et ERK2 possèdent des fonctions différentes. En effet, la délétion de ERK2 entraîne une létalité précoce chez les souris, alors que les souris *Erk1*<sup>-/-</sup> sont viables (Hatano *et al.*, 2003; Pagès *et al.*, 1999). Ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire, mais leurs niveaux d'expression varient en fonction des organes. L'activation de Raf par la protéine Ras entraîne la phosphorylation de MEK1 et MEK2. Ces kinases vont ensuite phosphoryler et activer les protéines ERK1 et ERK2. La translocation nucléaire de ces protéines va entraîner la phosphorylation et la régulation de divers facteurs de transcription, comme CREB et AP-1, impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire et la prévention de l'apoptose (Park *et al.* 2006 ; Xu *et al.* 2006).

La voie de signalisation Ras/ERK est impliquée dans la prolifération des hépatocytes après hépatectomie. En effet, Talarmin *et al.* (Talarmin *et al.*, 1999) ont mis en évidence une induction biphasique de la voie MEK/ERK au cours de la phase G1 après hépatectomie. De plus, le défaut d'activation de ERK1 et ERK2 après hépatectomie chez des souris *c-Met*<sup>-/-</sup>

provoque l'arrêt des cellules en G2/M après hépatectomie (Borowiak *et al.*, 2004; Factor *et al.*, 2010).

## f) Implication des facteurs de transcription

L'expression de très nombreux gènes est modifiée de façon très précoce et est induite grâce aux facteurs de transcription préexistants (Su *et al.* 2002; Arai *et al.* 2003; Juskeviciute *et al.* 2008; Li *et al.* 2009). Ces derniers sont inactifs dans le foie normal mais activés dans les premières minutes après hépatectomie, suite à des modifications post-traductionnelles. Les gènes qui sont modulés lors de cette première phase sont nombreux et appartiennent à des classes protéiques distinctes comme les phosphatases, les protéines métaboliques, les proto-oncogènes et les facteurs de transcription eux-mêmes (Su *et al.* 2002). Parmi ceux-ci, on retrouve AP-1, NFκB, STAT3 et C/EBPβ.

**AP-1 (Activator Protein 1)** : La régénération hépatique est un processus complexe et séquentiel qui fait intervenir de nombreux acteurs et de nombreuses voies de signalisation, en particulier les voies des MAPK. L'activation de JNK est un des événements les plus précoces de ce processus avec celle des proto-oncogènes tels que c-jun et c-fos (Westwick *et al.*, 1995). c-jun est en effet une cible de JNK : la phosphorylation des Ser 63 et 73 de c-jun par JNK permet son activation et la formation du complexe AP-1 (c-fos/c-jun). AP-1 est un facteur de transcription régulant la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation cellulaire. Ce facteur est central dans les voies de signalisation impliquées dans la régénération hépatique.

Différentes études ont mis en avant le rôle primordial de JNK et c-jun dans la prolifération des hépatocytes après hépatectomie. Chez la souris, l'inactivation de JNK et de c-jun est létale, c'est pourquoi des stratégies d'inactivation par des inhibiteurs ou l'utilisation de knockout (KO) conditionnels ont été choisies. En ce qui concerne c-jun, les souris invalidées pour ce gène présentent un retard de régénération avec une augmentation des cellules nécrotiques, une diminution de l'activité d'AP-1, une augmentation de l'expression de p21 et une diminution de l'expression des cyclines B1 et E (Behrens *et al.*, 2002). L'inhibition de

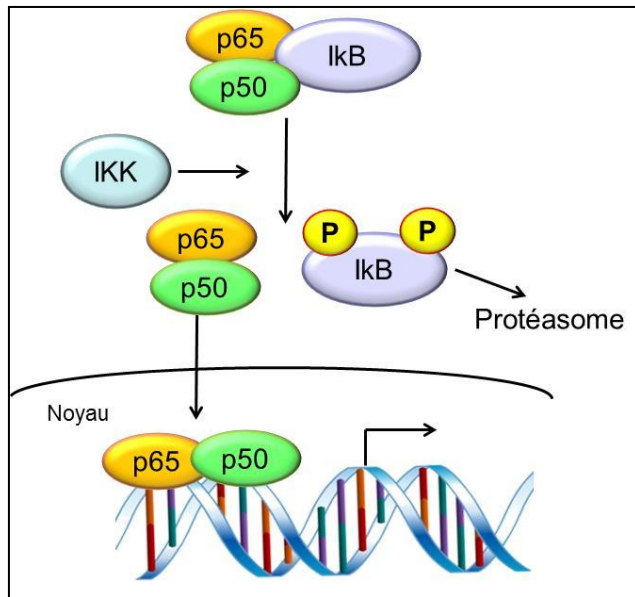


p21 permet de restaurer le défaut de régénération observé chez les souris *c-jun*<sup>-/-</sup>. Stepniak *et al.* (Stepniak *et al.*, 2006) ont mis en évidence que la régulation de p21 était indépendante de p53, mais dépendante de p38 $\alpha$  après hépatectomie.

**NF $\kappa$ B** : NF $\kappa$ B se réfère à une famille de facteurs de transcription qui ont tout d'abord été identifiés par leur capacité à se fixer au promoteur du gène de l'immunoglobuline kappa dans les cellules immunitaires de type B. La famille NF $\kappa$ B compte plusieurs membres : RelA (p65) ; NF $\kappa$ B 1 (p50 et p105) ; NF $\kappa$ B 2 (p52 et p100), cRel et RelB, devant s'associer en homo- et en hétérodimères pour être actifs. La forme la plus fréquente, et par conséquent la plus étudiée, est composée de NF $\kappa$ B1 (p50) et RelA (p65) et dénommée NF $\kappa$ B.

Hormis dans les cellules immunitaires B et T où elles sont constitutivement présentes dans le noyau, ces différentes sous-unités sont retenues dans le cytoplasme via la liaison à des inhibiteurs de la famille I $\kappa$ Bs. En particulier, NF $\kappa$ B (p50/p65) est inhibé par I $\kappa$ B $\alpha$ . Un mécanisme d'autorégulation permet de moduler cette cascade. En effet, la phosphorylation de ces inhibiteurs par IKK (I $\kappa$ B kinase) en réponse à un stimulus (TNF $\alpha$ , IL-1..) va entraîner leur dégradation et la libération des différentes sous-unités. Celles-ci vont s'associer pour former des complexes et ainsi entrer dans le noyau, où elles vont se fixer aux promoteurs de gènes cibles et induire leur transcription (Figure 23). Parmi les gènes cibles de NF $\kappa$ B, on retrouve son inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ .

Fitzgerald *et al.* (FitzGerald *et al.*, 1995) ont mis en évidence une induction rapide (0-30 min) et forte de la liaison de trois complexes protéiques aux sites de reconnaissance NF $\kappa$ B après hépatectomie. Parmi ceux-ci, on retrouve l'hétérodimère NF $\kappa$ B 1/RelA, l'homodimère p50/p50 et le complexe PHF. Une autre étude a également mis en évidence une augmentation rapide de l'ARNm de I $\kappa$ B $\alpha$  après hépatectomie, ce qui reflète une augmentation de l'activité de NF $\kappa$ B et la mise en place d'un processus d'autorégulation (Tewari *et al.*, 1992). L'inhibition de l'activité de NF $\kappa$ B dans les hépatocytes (NEMO <sup>$\Delta$ hep</sup>) a pour conséquence une mortalité importante chez les souris après hépatectomie avec des défauts d'initiation de la régénération et une induction du stress oxydant (Malato *et al.*, 2012).



**Figure 23:** Représentation schématique de la régulation de l'activité du facteur de transcription NFκB

NFκB est maintenu sous forme inactive dans le cytoplasme par la liaison avec IκB. La phosphorylation de ce dernier entraîne la libération de NFκB qui peut entrer dans le noyau et induire la transcription de ses gènes cibles.

**Les protéines STAT :** Actuellement, 7 gènes codant pour des protéines STAT sont connus dans le génome humain. Les protéines STAT sont cytoplasmiques et participent au contrôle de la transcription de gènes et sont activées par des récepteurs tyrosines kinases (EGFR, PDGFR, récepteur à l'insuline..). Leur activité est majoritairement régulée par modifications post-transcriptionnelles, comme les phosphorylations de sérine et de thréonine, et par dégradation protéolytique. Ces protéines peuvent interagir avec des récepteurs, d'autres facteurs de transcription, ainsi qu'avec la machinerie de transcription.

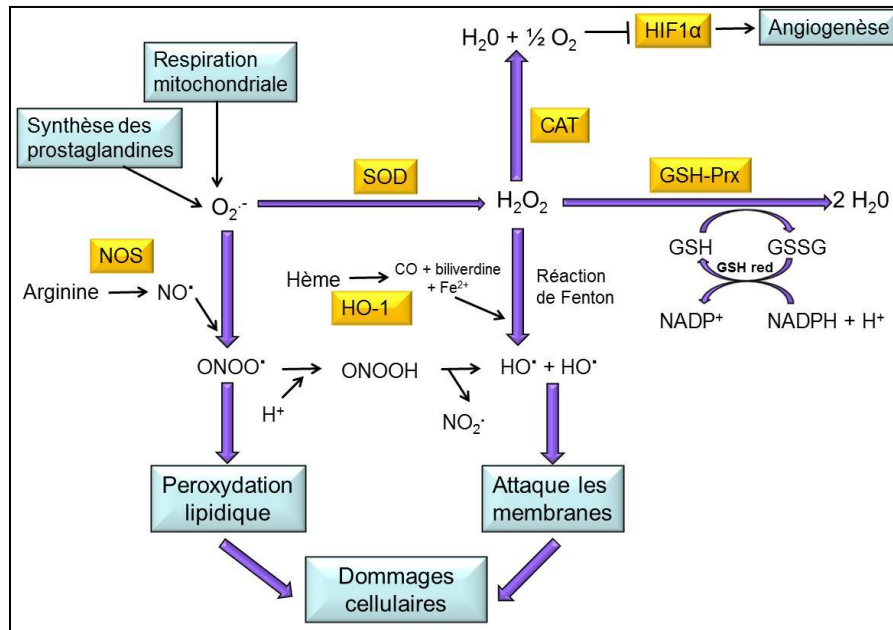
L'étude de la protéine STAT3 au cours de la régénération a un fort intérêt, car elle est majoritairement activée par la cytokine pro-inflammatoire IL-6 dont la production est induite après hépatectomie. La délétion de STAT3 a pour conséquence une synthèse d'ADN anormale après hépatectomie. Toutefois après chirurgie, les souris invalidées pour la protéine STAT3 ne montrent pas de défaillances hépatiques ni de nécrose, contrairement aux souris *Il-6<sup>-/-</sup>*, ce qui pourrait être expliqué par une compensation partielle de l'activité de STAT3 par un autre membre de la famille STAT : STAT1 (Li *et al.* 2002).

**La famille C/EBP (CCAAT/enhancer-binding proteins) :** Dans la famille des facteurs de transcription C/EBP, les isoformes α et β sont fortement exprimées dans le foie et participent au maintien de la différenciation cellulaire dans cet organe, en induisant la transcription de gènes hépato-spécifiques, comme l'albumine ou l'alpha-1-antitrypsine.

Au cours de la régénération hépatique, l'expression de C/EBP $\alpha$  est transitoirement réduite du milieu de la phase G1 jusqu'à la phase S et cette diminution est corrélée à une augmentation d'expression de l'isoforme  $\beta$  (Greenbaum *et al.*, 1995). La modification du ratio  $\beta/\alpha$  a pour conséquence de changer l'expression des gènes cibles de ces facteurs de transcription. C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  sont exprimées en même temps que les marqueurs de la synthèse d'ADN, ce qui suggère que l'expression de ces protéines est compatible avec la prolifération cellulaire, contrairement à ce qui a été montré dans d'autres modèles (Timchenko *et al.*, 1996). L'inactivation de C/EBP $\beta$  chez des souris provoque un défaut de la réponse régénérative après hépatectomie, avec une diminution d'expression des cyclines B et E en particulier. Cependant la voie de signalisation dépendante de l'IL-6 est inchangée, ce qui suggère qu'une autre voie de signalisation est défectueuse (Greenbaum *et al.*, 1998). En conclusion de cette étude, les auteurs placent le blocage du cycle cellulaire proche de la transition G1/S chez les souris C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup>.

### **g) Signalisation redox**

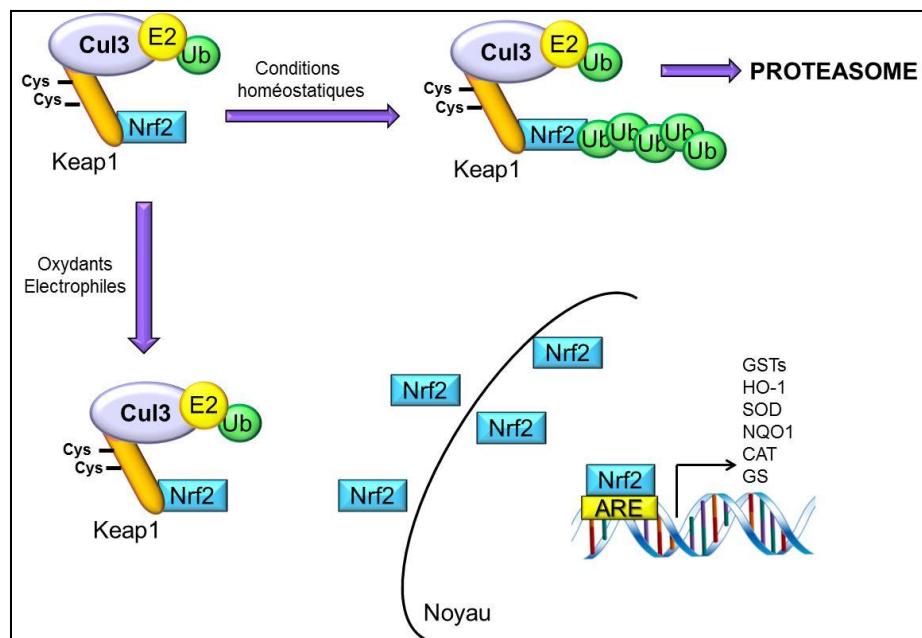
Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre redox en faveur des composés pro-oxydants, qui favorise la production de radicaux libres (Figure 24). Ces radicaux possèdent un nombre impair d'électrons ce qui les rend très réactifs vis-à-vis des molécules biologiques comme les protéines, l'ADN ou les lipides. Les ERO produits par la respiration mitochondriale sont des transducteurs du signal lorsqu'ils sont présents en faible quantité, mais à l'inverse ils deviennent très nuisibles au bon fonctionnement des cellules lorsqu'ils sont présents en grande quantité. De façon intéressante, ces voies de signalisation sont aussi induites par la production de ROS. Le mécanisme qui intervient n'est pas totalement connu mais deux hypothèses sont évoquées : des modifications oxydatives ciblant les protéines de signalisation (facteurs de croissance, cytokines pro-inflammatoires,...) ou l'inactivation et la dégradation des phosphatases des MAPK (MKP) qui ont pour rôle d'inhiber les kinases présentes dans ces voies de signalisation (Kamata *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2011, 2013). De plus, de nombreuses études ont montré que les protéines impliquées dans le stress oxydant influençaient la régénération hépatique.



**Figure 24 :** Formation et élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

NOS : Nitric oxide Synthase ; SOD : Superoxide Dismutase ; CAT : catalase ; HIF1 $\alpha$  : Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  ; HO-1 : Hème oxygénase ; GSH-Prx : Glutathion peroxydase ; GSH red : Glutathion réductase ; CO : monoxyde de carbone ; NO : monoxyde d'azote (modifié de (Akyol *et al.*, 2002).

**Nrf2 :** La protéine Nrf2 est un facteur de transcription qui se fixe sur les séquences ARE (Antioxydant Response Element) et participe à la régulation de la transcription des protéines antioxydantes (NQO1, GST, GPx..) (Figure 25). Les souris *Nrf2*<sup>-/-</sup> montrent un défaut de régénération avec une diminution du nombre de cellules en phase S et une augmentation du stress oxydant (Beyer *et al.*, 2008). Les voies de signalisation ERK et JNK ne sont pas modifiées, contrairement à p38 et Akt qui sont plus faiblement activées chez les souris *Nrf2*<sup>-/-</sup>. Une augmentation de l'apoptose est aussi visible, ce qui peut être corrélée avec le rôle anti-apoptotique de Nrf2 déjà mis en évidence par Kotlo *et al.* (Kotlo *et al.*, 2003). En effet, dans cette étude, la surexpression de Nrf2 protège les cellules de l'apoptose induite par Fas, tandis que son inhibition sensibilise les cellules à ce phénomène. Récemment, il a été démontré par Niture *et al.* (Niture *et al.*, 2012) que Bcl2 était régulé par Nrf2 et que l'induction de son expression inhibait l'apoptose. Le stress oxydant tient une place importante dans le développement des pathologies hépatiques ; en régulant un nombre important de protéines antioxydantes, le facteur de transcription Nrf2 possède un rôle central dans la protection contre ces pathologies (Shin *et al.*, 2013).



**Figure 25 :** Mécanisme d'activation de Nrf2 par les produits du stress oxydant

Cul3 interagit avec Keap1 et ubiquitine les résidus lysine de Nrf2. Les électrophiles et les oxydants participe à l'inhibition du processus d'ubiquitination et entraîne l'accumulation de Nrf2 dans le noyau et la transcription de ces gènes cibles. GST : Glutathion transférases ; HO-1 : Hème oxygénase ; SOD : Superoxyde Dismutase ; NQO1 : NAD(P)H:quinone oxydoréductase ; CAT :catalase ; GS : Glutathion synthétase. (D'après (Kobayashi *et al.*, 2006).

**Monoxyde d'azote (NO) :** Le NO est un agent pléiotrope qui influence de multiples aspects de la physiologie et de la physiopathologie hépatique, et semble être impliqué dans l'initiation de la régénération hépatique. Le NO est produit par des NO synthases, eNOS et iNOS, dont les expressions sont modifiées au cours de la régénération hépatique. L'invalidation d'eNOS chez des souris diminue le nombre de cellules en phase S après hépatectomie, et est corrélée à une diminution de l'activation précoce d'ERK, MEK (MAP kinase kinase) et de c-jun et ainsi qu'à une diminution de la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 (Mei *et al.*, 2011). De même, les souris *iNOS*<sup>-/-</sup> ont un défaut de régénération après hépatectomie avec une diminution du nombre de cellules en phase S et M et une augmentation de l'activité caspase avec une augmentation de nombre de zones de nécrose (Rai *et al.*, 1998).

**HIF1α (Hypoxia Inducible Factor 1α) :** La protéine HIF1α est un régulateur majeur de la réponse adaptative au stress et contrôle l'expression de gènes impliqués dans la

distribution de l'oxygène, la glycolyse et la prolifération cellulaire. L'expression de cette protéine est modulée au cours de la régénération avec un pic d'expression protéique dans le noyau à 24h, corrélée à une augmentation transcriptionnelle (Maeno *et al.*, 2005). L'induction d'HIF1 $\alpha$  est médiée par HGF et TNF $\alpha$  et l'absence de cette protéine au cours de la régénération entraîne une diminution importante du nombre de cellules en prolifération, l'accumulation du glycogène hépatique et une diminution de la glycémie, conséquence de l'inhibition des enzymes impliquées dans la glycolyse, PEPCCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) et FBPase (fructose-2,6-bisphosphatase) (Tajima *et al.*, 2009).

**Hsp70 (Heat Shock Protein 70)** : Parmi les protéines induites par le stress, les Hsp sont une famille de protéines chaperonnes qui stabilisent et protègent les protéines nouvellement synthétisées et prennent en charge les protéines endommagées afin qu'elles soient dégradées. L'expression d'Hsp70 est induite au cours de la régénération hépatique avec un pic d'expression protéique entre 24 et 48h. Si on inhibe l'expression de cette protéine, on observe une diminution du ratio poids du foie / poids corporel entre 24 et 48h chez la souris. Hsp70 semble donc avoir un rôle stimulateur dans le processus de régénération et un rôle anti-apoptotique via l'inhibition de l'activation des caspases (Shi *et al.*, 2007).

**HO-1 (Heme oxygenase-1)** : L'hème oxygénase est une enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème et génère du monoxyde de carbone (CO). Cette protéine est induite par le stress, possède des effets anti-inflammatoires et permet de protéger les cellules contre le stress oxydant. L'expression de cette protéine est fortement induite 4h après hépatectomie chez la souris et les souris *Hmox*<sup>-/-</sup> ne survivent pas plus de 36h après hépatectomie. Le rôle d'HO-1 est donc primordial dans la réponse régénérative, mais Kuramitsu *et al.* (Kuramitsu *et al.*, 2011) ont mis en avant, non pas l'importance de l'activité de l'enzyme dans la régénération hépatique, mais l'effet de son produit, le monoxyde de carbone. En effet, cette molécule induit la prolifération des hépatocytes *in vitro* et *in vivo* suite à une hépatectomie.

**MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase)** est une enzyme antioxydante mitochondriale très importante. Elle catalyse la conversion de deux anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est pris en charge par la catalase pour

former de l'eau. Elle permet la diminution de la croissance tumorale en supprimant la prolifération cellulaire, lorsqu'elle est fortement exprimée. De la même façon, la surexpression hépatique de MnSOD entraîne une diminution de la prolifération cellulaire après hépatectomie (Kim *et al.*, 2010).

#### 4. Signal « stop » et phase de terminaison

Quand le foie a atteint sa masse initiale, le processus de régénération se termine. Cette phase est mal connue et le signal « stop » n'est pas clairement défini. L'un des candidats potentiel est le facteur de croissance TGF $\beta$ 1. En effet, celui-ci possède des actions anti-mitogènes ; il inhibe la prolifération des hépatocytes en culture, supprime la production et l'activation d'HGF et inhibe l'expression d'uPA. De plus, l'injection de TGF $\beta$ 1 après une hépatectomie entraîne la suppression ou le retard d'apparition du pic de synthèse d'ADN (Russell *et al.*, 1988). Cette protéine apparaît pourtant très tôt après hépatectomie (2-3h) et son expression reste élevée jusqu'à 72h, mais à cette étape les hépatocytes sont résistants à ce signal suite à la diminution d'expression des récepteurs au TGF $\beta$ 1 (TGF $\beta$ -R1 et R2) (Chari *et al.*, 1995). TGF $\beta$ 1 possède aussi un rôle important dans la production de la matrice extracellulaire et du réseau de sinusoides, afin de séquestrer à nouveau les facteurs de croissance et inhiber la prolifération des cellules. Les résultats des études de TGF $\beta$ 1 au cours de la régénération suggèrent que cette molécule n'agit pas seule pour induire la terminaison. En effet, l'augmentation ou la diminution de TGF $\beta$ 1 ne modifie pas le processus de régénération et en particulier, la phase de terminaison (Nygård *et al.*, 2012; Oe *et al.*, 2004). L'activine est un « co-facteur » potentiel de cette phase de terminaison (Ho *et al.*, 2004).

Le glypican 3 est un protéoglycane à héparane sulfate dont l'expression est induite au cours de la régénération hépatique (Liu *et al.*, 2009) et dont la surexpression dans les hépatocytes est associée à une réduction de la régénération hépatique (Liu *et al.*, 2010). L'invalidation du glypican 3 entraîne une hypertrophie de nombreux organes, dont le foie, chez l'Homme et la souris (Cano-Gauci *et al.*, 1999) et possède donc un rôle anti-prolifératif important dans le foie sain.

Une autre voie de signalisation semble avoir un rôle dans la terminaison de la régénération hépatique. En effet, la surexpression de YAP (Yes-associated Protein) dans le foie entraîne une augmentation de la taille du foie jusqu'à 5 fois par rapport au foie contrôle (Dong *et al.*, 2007). Cette protéine appartient à la voie de signalisation Hippo et cette étude montre pour la première fois l'implication de cette voie de signalisation dans le contrôle de la croissance d'un organe chez les mammifères. Au sein de cette voie, l'inhibition de Mst1/2 a pour conséquence l'activation de YAP et un accroissement de la taille du foie (Zhou *et al.*, 2009).

La resynthèse de la matrice extracellulaire permet de restituer la structure du foie et modifie la signalisation médiée par les intégrines. Une étude a ainsi démontré une induction de la régénération de foies déficients en ILK (Integrin-Linked Kinase), qui est un médiateur intracellulaire de la voie des intégrines (Apte *et al.*, 2009). De façon intéressante, une augmentation de l'activation de YAP a été observée dans ces foies. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour définir si un lien existe entre la voie de signalisation Hippo et les signaux extracellulaires médiés par les récepteurs tyrosines kinases et les intégrines (Kang *et al.*, 2012).





# **CADRE ET BUT DU TRAVAIL**



Le foie est un organe essentiel à la vie qui possède des fonctions importantes dont celle de détoxification qui permet de protéger l'organisme des molécules toxiques exogènes (polluants environnementaux, carcinogènes,...) et endogènes (ERO, produits de peroxydation lipidique,...). Le processus de détoxification fait intervenir de nombreuses enzymes et transporteurs au cours de trois phases distinctes. Les enzymes qui nous intéressent dans ce travail sont les Glutathion transférases (GSTs), et plus particulièrement les GSTs de la classe Pi. Ces enzymes de détoxification de phase II catalysent la conjugaison du GSH sur des molécules électrophiles et facilitent leurs excrétions par les transporteurs membranaires.

Chez l'Homme, la protéine GSTP1 est exprimée de façon ubiquitaire, mais son niveau d'expression varie fortement entre les organes et à l'intérieur d'un même organe, en fonction du type cellulaire. Son expression est aussi modifiée au cours de l'organogenèse ; ainsi on la retrouve abondamment dans les hépatocytes fœtaux alors qu'elle n'est pas exprimée dans les hépatocytes adultes. De même, son expression est induite dans le tissu cancéreux par rapport au tissu sain, comme cela a été démontré pour le sein, l'estomac, le poumon ou encore le col de l'utérus. En plus de son activité catalytique de conjugaison du GSH, la protéine GSTP1 possède d'autres fonctions. En effet, il a été montré que cette protéine régule négativement l'activité des protéines kinases JNK et TRAF2, qui sont impliquées dans les voies de signalisation cellulaire de prolifération et de mort.

De par sa localisation et ses fonctions, le foie est également soumis à de nombreuses agressions. Suite aux lésions engendrées, deux types de réponses sont observées dans le parenchyme restant : la mise en place des systèmes de défenses cellulaires afin de limiter la cytotoxicité et la mort cellulaire, et l'initiation d'un processus de réparation tissulaire, ou régénération, qui permet la restauration de la masse hépatique. De façon intéressante, il existe une superposition des voies de signalisation impliquées dans les processus de développement, de régénération et de carcinogenèse. Aussi dans ce contexte, l'objectif de notre travail a consisté à rechercher si la GSTP1 pouvait contribuer à la régulation de la prolifération de l'hépatocyte normal et tumoral et à identifier les voies de signalisation impliquées.

Ce travail s'est organisé autour de trois axes :

### 1. Caractérisation du rôle de la GSTP1 dans la régénération hépatique

La résection hépatique des 2/3 du foie de souris déclenche la régénération hépatique *in vivo*. Les hépatocytes entrent alors de façon synchrone dans le cycle cellulaire faisant de l'hépatectomie partielle un modèle de choix pour l'étude de la régulation de la prolifération des hépatocytes normaux. Aussi pour évaluer le rôle de la GSTP1 et de la GSTP2 dans la prolifération de l'hépatocyte normal, nous avons utilisé le **modèle d'hépatectomie partielle des 2/3** chez des souris sauvages ou des souris dont les gènes *Gstp1* et *Gstp2* (*Gstp1/2<sup>-/-</sup>*) sont invalidés. Nous avons ainsi comparé la progression des hépatocytes dans les différentes phases du cycle cellulaire entre les souris *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* et *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*, examiné l'activation des voies de signalisation dépendantes des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et l'expression des enzymes antioxydantes impliquées dans la régulation du stress oxydant (**Chapitre 1**).

### 2. Evaluation du rôle de la GSTP1 dans la prolifération des cellules cancéreuses

Dans un second temps, nous avons utilisé des **lignées de cellules cancéreuses humaines** provenant de divers organes, dont le foie, afin d'évaluer le rôle de la GSTP1 dans la prolifération cellulaire, mais cette fois-ci, de cellules transformées ; l'intérêt de ces lignées étant qu'elles expriment ou non la GSTP1. Deux stratégies complémentaires ont été utilisées : une stratégie d'inactivation de la GSTP1 dans les lignées HeLa, Huh7 et HT29, et, une stratégie de surexpression dans une lignée cellulaire, HepG2. L'impact de l'expression de la GSTP1 sur la prolifération et la mort cellulaire a été évalué et l'implication de la kinase JNK dans la modulation de la prolifération cellulaire par la GSTP1 a été démontrée en utilisant un inhibiteur synthétique, SP600125 (**Chapitre 2**).

### 3. Etude de l'expression d'enzymes de biotransformation dans le CHC

Le CHC est le cancer primitif du foie le plus fréquent (80%). Ce cancer présente une forte incidence, un taux de mortalité élevé et une résistance accrue aux traitements de chimiothérapies. Comme évoqué précédemment, le foie est l'organe majeur de détoxication et exprime donc de fortes quantités d'enzymes de détoxication. De plus, ces enzymes peuvent

avoir comme substrats des xénobiotiques, comme le Sorafenib, la doxorubicine ou le cisplatine, qui sont des agents anticancéreux utilisés dans le traitement de divers cancers.

Nous avons donc recherché de manière non supervisée quelles étaient les enzymes de détoxification différemment exprimées dans les CHC par rapport au tissu adjacent. Nous avons ensuite initié l'étude de l'expression de ces gènes, qui incluent la GSTP1, **dans une cohorte de CHC** issue du Centre de Ressources Biologiques de Rennes (CRB). Cette étude a permis de mettre en évidence que l'expression de 18 gènes impliqués dans le processus de détoxification était modulée dans les CHC (**Chapitre 3**).



# RESULTATS





# **Chapitre 1 :**

Etude du rôle des protéines GSTP1 et GSTP2 dans la prolifération cellulaire *in vivo* au cours de la régénération hépatique chez la souris



## I. Introduction

De nombreuses études ont mis en avant une surexpression de l'expression de GSTP1 dans des cancers et suggèrent que cette protéine impacte sur la prolifération cellulaire. De plus, la GSTP1 possède un rôle inhibiteur vis-à-vis de protéines kinases qui interviennent dans les voies de signalisation de prolifération et de mort cellulaire.

## II. Objectifs de l'étude

Ces observations, ainsi que la génération d'une souche de souris invalidées pour les gènes *Gstp1* et *Gstp2*, nous ont incitées à étudier le rôle de ces protéines au cours de la prolifération des hépatocytes dans un modèle d'hépatectomie des 2/3. Ce modèle induit une prolifération synchrone des hépatocytes et permet de suivre facilement la progression des hépatocytes dans le cycle cellulaire. La régénération hépatique est un processus complexe qui fait intervenir de nombreux acteurs et se décompose en trois étapes : initiation, prolifération et terminaison (Fausto *et al.*, 2006). Grâce à ce modèle expérimental, nous avons pu comparer l'activation ou l'expression des protéines impliquées dans ces différentes étapes entre les souris *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* et *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*.

## III. Résultats et Discussion

Cette étude nous a permis de montrer que les protéines GSTP1/2 contribuent au contrôle de la prolifération des hépatocytes après hépatectomie chez la souris. L'invalidation des protéines GSTP1/2 entraîne un défaut de prolifération des hépatocytes avec une dérégulation du passage du point de restriction dépendant des mitogènes et de la transition G1/S.

L'invalidation des gènes *Gstp1* et *Gstp2* chez la souris a un impact sur la production des cytokines pro-inflammatoires et l'expression des proto-oncogènes précoces et, par conséquent, entraîne un retard dans l'initiation de la régénération hépatique. Au cours de l'étape de prolifération, les retards d'expression du facteur de croissance HGF et de la cycline D1 coïncident avec le défaut d'activation d'ERK1/2 observé chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* après

hépatectomie. Avec la cycline D1, on constate aussi un retard d'expression des marqueurs du passage du point de restriction dépendant des mitogènes (cdk4 et E2F1), ainsi que les acteurs de la transition G1/S (cycline E, cdk2 et MCM7). En parallèle, la diminution d'expression de TRAF2 et l'activation tardive de JNK chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* est corrélée à une activation d'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, qui participe probablement au ralentissement du cycle cellulaire. Malgré l'accumulation de p21, aucune augmentation significative de l'apoptose au cours de la réponse régénérative n'est observée chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*.

Les changements hémodynamiques et la libération de cytokines générés lors du processus de régénération hépatique induisent la production de faibles quantités d'ERO et ERA (Espèces Réactives de l'Azote), qui contrairement aux fortes concentrations provoquant des dommages cellulaires, joue un rôle majeur dans la signalisation intracellulaire et la régulation de l'homéostasie. La concentration des ROS est contrôlée par l'expression d'enzymes antioxydantes induites lors du processus de régénération hépatique. De façon intéressante, il est démontré que les ROS peuvent induire ou maintenir l'activation des MAPK même si aujourd'hui les mécanismes impliqués ne sont pas bien connus. Nous avons donc étudié l'expression ARNm d'enzymes antioxydantes au cours de la régénération hépatique. Des profils distincts entre les deux génotypes ont été détectés, avec un retard d'expression de la MnSOD et de la catalase, en particulier. De même, on observe un retard d'expression des enzymes impliquées dans la production du monoxyde d'azote (NO), une molécule antioxydante importante, chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*. De façon intéressante, les retards d'expression de ces enzymes coïncident avec le retard du franchissement du point de restriction dépendant des mitogènes.

En conclusion, cette étude met pour la première fois en évidence l'implication des protéines GSTP1 et GSTP2 dans le processus de régénération hépatique ; leur extinction provoquant une réduction et/ou un retard de l'activation des voies signalisations ERK, JNK et TRAF2 et une modification dans la régulation du stress oxydant induit au cours de la régénération hépatique.

**GSTP1/P2 is involved in the timing of signaling pathway activations  
and cell cycle regulator expressions for efficient and synchronous liver  
regeneration in mice**

**Pajaud J<sup>1,2</sup>, Ribault C<sup>1,2</sup>, Ben Mosbah I<sup>1,2</sup>, Rauch C<sup>1,2</sup>, Bellaud P<sup>2,3</sup>, Aninat C.<sup>1,2</sup>, Loyer P<sup>1,2</sup>, Morel F<sup>1,2</sup>, Corlu A<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Inserm, UMR 991, Liver, Metabolisms and Cancer, CHU Pontchaillou, F-35033 Rennes;

<sup>2</sup> Université de Rennes 1, F-35043 Rennes;

<sup>3</sup> Plateforme histopathologie H2P2, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes

\* Corresponding author : CORLU Anne, UMR 991, Foie, Métabolismes et Cancer, CHU Pontchaillou, Rennes, France Phone: 0033 (0)223233870, Fax:0033 (0)299540137

e-mail: anne.corlu@inserm.fr

**Abbreviations:**

PH: Partial hepatectomy ; GST: Glutathione Transferase ; GSH: Glutathione ; TRAF2: Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 2 ; ASK1: Apoptosis signal regulating kinase 1 ; Hepatocellular carcinoma: HCC ; MAPK: Mitogen-Activated Kinase ; JNK: c-jun N-terminal kinase ; ERK: Extracellular signal Regulated Kinase ; MEK: MAPK/ERK kinase ; RNS: Reactive Nitrogen Species ; ROS: Reactive Oxygen Species ; BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine ; pHH3: phospho-histone H3 ; ATF: Activating Transcription Factor ; Cdk: cyclin-dependent kinase ; ALT: Alanine transaminase ; AST: Aspartate transaminase

**Financial support**

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the FEDER (Fonds Européen de Développement Régional) and the « Contrat de projet Etat région Bretagne » (axe biothérapie). Ismail Ben Mosbah was funded by the « Contrat de projet Etat région Bretagne» (axe biothérapie) and the Fondation pour la Recherche Médicale. Julie Pajaud was funded by the Conseil Régional de Bretagne and the Ligue Contre le Cancer- Comité d'Ille-et-Vilaine. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## **Abstract**

Glutathion transferases (GST) are phase II enzymes catalyzing the detoxification of endogenous noxious compounds and xenobiotics. They also regulate phosphorylation activities of MAPKinases in a catalytic-independent manner. Previous studies have demonstrated the regulation of JNK-dependent pathway by GSTP1. Since the crucial role of JNK in the early steps of the hepatocyte cell cycle is well established, we sought to determine whether GSTP1 is essential for hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy (PH). Using a conventional double knock-out mouse model for the *Gstp1* and *Gstp2* genes, we found that deletion of GSTP1/P2 reduced the rate of DNA replication and mitotic index during the first wave of proliferation. The lowered proliferation was associated with a decrease in TNFalpha and IL-6 plasma concentration, a reduced hepatic HGF expression and a delayed and/or altered activation of STAT3, JNK and ERK1/2 signaling pathways. In addition, the expression and/or activation of cell cycle regulators such as Cyclin D1, Cdk4, E2F1, MCM7 was post-poned demonstrating that deficiency in GSTP1/2 delayed the entry into and progression through the G1 phase of the cell cycle in hepatocytes and impaired the synchrony of hepatocyte proliferation following PH. Furthermore, while JNK and its downstream targets c-jun and ATF2 were activated during the early steps of the liver regeneration in wild type animals, the constitutively active JNK found in quiescent liver of *Gstp1/2* knock-out mice underwent a decrease in its activity after PH. Transient induction of antioxidant enzymes and nitric oxide synthase were also delayed or repressed during the regenerative response. In conclusion, our results demonstrate that GSTP1/2 is a critical regulator of hepatocyte proliferation in the initial phases of liver regeneration.



## **Introduction**

Liver regeneration is a complex and sequential process allowing liver mass restoration after tissue injury. This process of compensatory hyperplasia is controlled by multiple regulatory pathways that orchestrate both proliferative and hepatoprotective signaling cascades. Liver regeneration process has been divided in three distinct phases: the initiation, the promotion or proliferation step and the termination [1]. The initiation corresponds to the activation of the immediate early response genes by pro-inflammatory cytokines, such as TNF $\alpha$  [2] and IL-6 [3] that induces the G0/G1 transition of quiescent hepatocytes. The initiation, also called priming, results in inducing hepatocytes to become sensitive to growth factors and competent for replication. Among the immediate early response genes, expressions of c-jun and c-fos are induced to form the transcription factor AP-1 that regulates transcription of target genes implicated in cell proliferation or differentiation. Activation of c-jun requires c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated phosphorylation on its Ser73 and Ser83. The activation of JNK is therefore an early event that occurs concomitantly to NF- $\kappa$ B activation following TNF $\alpha$  signaling [4]. Among growth factors involved in the proliferation step, HGF, TGF $\alpha$  and EGF induce hepatocytes to override the mitogen restriction point located at 2/3 of the G1 phase. They activate mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that induce key regulators in late G1 phase such as cyclin D's and cyclin-dependent-kinases (Cdks), which play a critical role in the control of the G1/S transition and the commitment to DNA replication [5-8]. Gene-deficient knockout mouse models have confirmed the importance of cytokines and growth factors but also revealed the role of metabolic networks in the integration of the regenerative response with maintenance of hepatic function. Despite intensive studies during the last decades, the cell-extrinsic and intrinsic molecular mechanisms governing the dynamic changes

in hepatocytes after partial hepatectomy (PH) still remain incompletely understood.

Hemodynamic changes induced by PH and pro-inflammatory cytokines, are also known to cause the alteration of the redox potential affecting the stress activated signaling cascades. Glutathione Transferases (GST) phase II detoxification enzymes belong to a multigenic family with 7 classes (alpha, mu, pi, omega, sigma, theta, zeta). They are involved in various functions ranging from detoxification to biosynthesis and cell signaling [9; 10]. Biotransformation activities of GSTs result in cell protection by eliminating noxious compounds, by protecting cellular molecules such as proteins, lipids or DNA against reactive species and by metabolizing molecules such as prostaglandins [11] and 4-HNE [12]. GSTs also catalyze glutathionylation or S-glutathionylation, a reversible mechanism of protein regulation, which is significantly promoted by RNS (Reactive Nitrogen Species), ROS (Reactive Oxygen Species). GSTs also play important role in the regulation of signaling pathways in a catalytic-independent manner but through direct interaction with proteins such as protein kinases to regulate their phosphorylation activities. For example, GSTA1 [13] and mGSTA4 [14] bind to JNK, and GSTM1 interact with ASK1, the kinase transducing JNK signaling, to inhibit the apoptotic pathways [15]. During oxidative stress in mouse hepatocytes, it was shown that JNK is required for the induction of GSTA4 leading to the formation of mGSTA4/JNK complexes that might regulate JNK activity [14]. Gilot *et al.* [16] have also shown that not only GSTM1, but also GSTA1 and GSTP1, play a key role in the regulation of ASK1 phosphorylation activity in rat hepatocytes. In mice 3T3/4A fibroblasts, GSTP1/JNK interaction occurring in non-stressed conditions also inhibits JNK activity and c-jun phosphorylation [17]. More recently, in osteosarcoma cells, GSTP1 has been shown to interfere not only with JNK pathway but also with TRAF2 signaling resulting in the inhibition of P38 and JNK phosphorylation. The dissociation of the complexes leads to the stimulation of ASK1,

prolonged activation of p38 and JNK that cause cell growth arrest by increasing expression of the CDK inhibitor p21<sup>CIP1</sup> and apoptosis [18].

Numerous studies have linked several GSTs isoforms, especially the GSTP1, to the regulation the JNK-dependent pathway activation however, there is no report on the possible involvement of the GSTP1 in the regulation of the liver regeneration although the crucial role of JNK in the entry into and progression through the G1 phase of the cell cycle in the hepatocytes is well established. Using a conventional double knock-out mouse model for the *Gstp1* and *Gstp2* genes, we investigated for the first time the effects of *Gstp1/2* invalidation on the liver regeneration after two-third partial hepatectomy. Our data demonstrate that GSTP1/P2 contribute to the finely tuned levels of activation of proliferation signaling pathways and the downstream expression of cell cycle regulators in order to achieve the proper proliferation rate and cell cycle synchrony during the liver regeneration.

## **Materials and methods**

**Animal experiments:** All experiments were made in accordance with ethical laws and experimental procedures were approved by ethical committee (n° R-2010-AC-01). C57BL6/J wild-type (WT) mice and *Gstp1/2* knockout (*Gstp1/2*<sup>-/-</sup>) mice in C57BL6/J background were a gift from Dr. Colin J. Henderson, University of Dundee UK [19]. Animals were maintained on a standard diet and housed under a 12-hour light/dark cycle. Adult male mice (8 and 12 weeks old) were subjected to 70% PH under ketamine/xylazine anesthesia. Briefly, mice were subjected to mid-ventral laparotomy and resection of right medial, left medial and left lateral lobes were performed after separate ligation. A special care was taken to preserve the gallbladder. Remnant livers (right lateral and caudal lobes) from 3 to 6 mice per genotype were harvested at various time points (30 min to 7 days).

**Analysis of liver function:** Blood samples were collected from retro-orbital sinus under anesthesia before sacrifice. Serum levels of triglycerides, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), bilirubin, and urea were measured using automatic analyzer (Olympus automated chemistry Analyzer AU 2700) following manufacturer's instruction.

**Liver histology, BrdU labeling and immunohistochemistry:** Liver histology was performed on 4µm hematoxylin-eosin stained paraffin sections. To evaluate cell proliferation, a single intra-peritoneal injection of BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine; Sigma; 0.5 mg/g animal weight) was realized one hour before the sacrifice. Livers were fixed and cells in S or M phases were then detected by using anti-BrdU (ab8152, Abcam) or anti-phospho-histone H3 (#9701, Cell Signaling), respectively. A co-staining for nucleus was performed with Hoechst. Apoptotic cells were detected using TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling kit, Roche). Cell counting was made with SimplePCI software (Hamamatsu) on 20X pictures with at least 500 cells.

**Caspase 3 activity assay:** Remnants livers (50mg) were lysed in caspase activity buffer (20 mM PIPES, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 10% sucrose, pH 7.2) and 100µg of proteins were incubated with 100µM DEVD-AMC at 37°C for 1 hour. The liberation of AMC was monitored using excitation/emission wavelength of 380/440 nm (Gemini). Caspase activity was measured as arbitrary fluorescent units.

**Western blot analysis and ELISA:** Whole liver lysates were prepared by sonication in HEPES lysis buffer (50mM HEPES pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 1mM EDTA pH 8 ; 2,5mM EGTA pH 7,4 ; 0,1% Tween 20 ; 10% glycerol ; 0,1mM orthovanadate Na ; 1mM NaF ; 10mM β-

glycerophosphate qsp 100ml H<sub>2</sub>O) containing protease inhibitor cocktail (EDTA-free complete Mini, Roche). Proteins were separated using NuPAGE® Novex® Bis-Tris 4-12% Gels Kit (Invitrogen). Western blots were performed according standard procedure using the following antibodies: anti-GSTpi (Abnova, PB13020) ; anti-JNK (#9258), anti-phosphoJNK (#4671), anti-STAT3 (#9132), anti-phosphoSTAT3 (#9131), anti-ATF2 (#9226), anti-phosphoATF2 (#5112), anti-p27<sup>Kip1</sup> (#2552), anti-p38 (#9212), anti-phosphop38 (#4511), anti-ERK (#9102), anti-phosphoERK (#9101) and anti-phospho c-jun (#9261) from Cell Signaling ; anti-c-jun (sc-1694), anti-cdk2 (sc-163) , anti-cdk4 (sc-260), anti-cyclin E (sc-25303), anti-MCM7 (sc-9966), anti-Hsc70 (sc-7298), anti-p53 (sc-6243), anti-TRAF2 (sc-876) and anti-p21Cip1 (sc-397) from Santa Cruz Biotechnology ; anti-iNOS (610431) and anti-eNOS (610298) from BD transduction laboratories ; anti-E2F1 (OABB00513) from Aviva Systems Biology.

For ELISA, liver tissues were sonicated in 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (EDTA-free Complete Mini, Roche). IL-6 and TNF $\alpha$  levels were determined by commercial enzyme-linked immunosorbent assay (DY406 and DY410 respectively, R&D system) according to the manufacturer's guideline.

**Real Time PCR:** Total RNA from remnants livers were extracted with RNeasy Mini kit (QIAGEN; Cat N° 74106) following manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using 1 $\mu$ g of total ARN with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Part N° 4368813). mRNA levels of various genes was determined using Taqman- or SYBR green- based quantitative PCR (qPCR) technology. qPCR were performed in 7900HT system (Applied Biosystems) and TBP was used as housekeeping gene [20] Primers are listed in supplementary Table 1 and 2.

## Statistical Analysis

Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad 5.0® software with ANOVA non parametrical test and then unpaired Student t test.

## Results

### Expression of GSTP1/P2 increases in regenerating liver after PH

Following PH, GSTP1 and P2 mRNA levels in regenerating livers increased at 2h when compared to normal liver but they dropped at 36h to levels below to those found in normal liver (Figure 1A). In agreement, the protein amounts were augmented rapidly in the liver after PH before decreasing in a time-dependent manner until 48h (Figure 1B). GSTP1/P2 immunodetection showed a homogeneous staining across the hepatic lobule in normal liver while the expression appeared higher in periportal hepatocytes from 6 hours (not shown) to 48h in the regenerating livers (Figure 1C). Interestingly, GSTP1/P2 was also found in the nucleus of some regenerating hepatocytes at 48h post-hepatectomy. No labeling was detected in the *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mouse livers.

### Loss of *Gstp1/2* does not modify hepatocyte survival following PH

After PH, postoperative survival was similar for WT and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice when the gallbladder was kept intact. However, the number and extent of bile infarcts increased when gallbladder alterations occurred in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice (data not shown).

In absence of gallbladder alterations, histological analysis of regenerating livers did not reveal important abnormalities and signs of accelerated inflammatory reaction in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2). Serum levels of ALT and AST peaked at 12h in both mice genotype (Figure 2A and B). Caspase 3 activity began to increase at 6h in WT mice before returning to basal level at 12

h (Figure 2C). In *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, basal level of caspase 3 activity was significantly higher than in WT normal livers and this activity did not show any increase over the time course performed. Blood levels of triglycerides, urea, and bilirubin were not significantly affected and indicated that the overall liver function remained efficient in both mice (not shown).

### **Loss of *Gstp1/2* impairs hepatocyte proliferation following PH**

In WT mice, the percentage of BrdU-positive hepatocytes increased at 40h and reached a peak 48h after PH. The hepatocyte DNA synthesis returned to basal level at 3 days. In the livers of *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, DNA synthesis also started at 40h but did not show any sharp increase over the 72h time course analysis performed. Only  $6.58 \pm 1.71\%$  of hepatocytes were BrdU-positive 48h after PH vs  $37.07 \pm 10.8\%$  in WT livers (Figure 3A, E). At 60h post-PH, the percentage of BrdU-positive hepatocytes was slightly higher in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice compared to WT normal livers and was strongly decreased at 72h in both WT and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> livers. The mitotic index (Figure 3B) and the percentage of phosphorylated histone H3 positive hepatocytes (Figure 3C-D) further evidenced the significant decrease in the proliferation rate in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> livers compared to WT livers. At 52 and 55h, the *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> livers displayed a ~3 fold decrease in the numbers of cells in G2 and M phases compared to their control counterparts. Altogether, these data indicate that GSTP1/P2 deficiency significantly impaired hepatocyte proliferation without abolishing totally the process of liver regeneration.

### **Loss of *Gstp1/2* alters kinetics of cell cycle regulator expressions**

To evaluate the effect of *Gstp1/2* deletion on cell cycle progression during the partially synchronized first wave of hepatocyte proliferation, we analyzed the expression of main regulators involved in G0/G1 transition. Serum levels of TNF $\alpha$  and IL-6, which play a

significant role in the early phase of the liver regeneration, were rapidly increased at 6h post-PH in WT mice (Figure 4A). The IL-6 concentration dropped slowly thereafter while TNF $\alpha$  concentration remained elevated for at least 24h. In contrast, production of TNF $\alpha$  and IL-6 was delayed in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice and their serum concentration peaked after only 12h. The changes in IL-6 secretion were accompanied by the delayed phosphorylation of STAT3 *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> livers (Figure 4B) and a postponed and/or reduced expression of c-fos, Jun B and c-jun mRNA levels during the first 24h post hepatectomy (Figure 4C). In contrast, the induction of c-myc mRNAs occurred earlier and their levels remained higher at several time points in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> regenerating livers compared to WT control animals (Figure 5A). P53 mRNA expression levels were also slightly higher during the first 24h after PH in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 5A). At 36 and 40h, in mid-late G1 phase, the hepatic mRNA levels of HGF appeared significantly lower in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> (Figure 5C) along with a limited induction of Cyclin D1 mRNA levels at 40h compared to their strong increase in WT livers (Figure 5C). In contrast, the induction of the Cdk1 mRNA expression was found relatively similar in both mice genotypes (Figure 5E).

In order to further compare the sequential expression of cell cycle regulators during the first wave of proliferation in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> and WT regenerating livers, we studied the kinetic of expression of proteins involved in the mid-late G1 phase, the G1/S transition and the DNA replication (Figure 5B). As found for the Cyclin D1 mRNAs, the amount of Cyclin D1 protein is strongly induced in WT regenerating livers from 36 to 48h prior the onset of DNA synthesis while its expression gradually increased in a time dependent manner leading to the maximal levels after only 55h in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> livers before decreasing at 60 and 72h. Similar patterns of expression were observed for Cdk4 and its delayed induction in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup>. The expressions of the proteins E2F1, Cyclin E, Cdk2 and MCM7, which characterize the progression in late G1



phase and the commitment to DNA replication, were also investigated. The induction of E2F1 occurred between 40 and 55h and peaked at 44h in WT mice while the maximal expression was observed at 55h in mutant mice. *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* deficiency also affected the expressions of Cdk2 and MCM7 that occurred as early as 40h after PH in WT mice while their induction remained moderate before 44-48h in the *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice. Importantly, the expression of the tumor suppressor protein p53 occurred earlier in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* regenerating livers with a sharp induction at 24 and 36h while in WT livers its expression at a lower level was mainly detected at 40 and 44h. The levels of cell cycle inhibitors p21<sup>CIP1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> were also altered in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* reinforcing the conclusion of an impaired progression in G1 phase in mutant mice (Figure 5B). High levels of p21<sup>CIP1</sup> were maintained during all the regeneration period including the early time points in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice whereas p21<sup>CIP1</sup> amounts increased only at 40h in WT livers (Figure 6). The basal protein levels of p27<sup>Kip1</sup>, high in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice, decreased rapidly from 2h up to 36h whereas its expression low in normal WT liver increased at 6h and 24h. Then, p27<sup>Kip1</sup> expression was similar in both mice genotype. Cdk1 induction, which is associated with the DNA replication and the progression in G2 and M phases took place at 40 and 44h before decreasing in WT livers while, as observed with the other cell cycle markers, its expression increased progressively with maximal levels between 55 and 72h in mutant mice.

### **Activation of JNK and ERK signaling pathways are altered in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice following PH.**

To address the molecular mechanisms inducing the delayed liver regeneration and the alteration of cell cycle regulators expression in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice, we investigated the activation of signaling pathways during the liver regenerative process. As previously reported [21], we

observed an increased constitutive activation of JNK pathway in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mouse livers prior to PH (Figure 6A). Phosphorylation of JNK and its downstream substrates c-jun and ATF2 were higher in livers of *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice than in WT normal livers. Following PH, the levels of p-JNK and P-c-jun decreased progressively until 24h while that of P-ATF2 remained stable (Figure 6A). At later time points (Figure 6B), the levels of P-JNK kept decreasing in mouse mutant livers until 55 to 60h before increasing at 72 and 168h. Conversely, in WT mice, the JNK pathway was activated from 2h to 40h as evidenced by the enhanced phosphorylation levels of JNK, c-jun and ATF2 (Figure 6A). At later time points (40 to 168h), p-JNK kept increasing while levels of p-c-jun and p-ATF2 decreased.

Regarding p38 activation, similar profiles were obtained in WT and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice. P-p38 expressed in quiescent liver underwent a rapid but transient dephosphorylation that lasted 24h (Figure 6A). Then induction of p38 activation was observed 36h after PH and remained stable until 168h (Figure 6B). ERK1/2 activation occurred successively three times in liver of WT mice at 2-6h, 24-36 and 44-48h after PH (Figure 6A-B). In contrast in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, increased ERK1/2 phosphorylation was only detected at 2-6h and in a lesser extend at 40 to 48h after PH. TRAF2 expressed at 2-6h in both mice genotypes was re-expressed in WT at 36h and 48-60h after PH whereas it was barely detectable at 40h and 60h in mutant mice.

### **Expression of genes involved in stress response are expressed earlier in WT mice**

ROS modulate MAPK activation such as JNK which is essential in regulating the intracellular redox status. Among enzymes involved in this redox system, GSTP1/P2 is directly responsible of the elimination of electrophilic oxidants. Since JNK activation was increased while hepatocyte survival was not significantly reduced in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice after resection, we studied the expression of enzymes involved in cell defenses mechanisms (Figure 7). We first observed

that basal mRNA levels of Nrf2, involved in antioxidant stress response, were lower in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* than in WT mice. After PH in WT mice, RNA levels of Nrf2 increased at 36h as well as those of its two target genes, the mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) and the catalase. Regarding HO-1, RNA amounts showed a biphasic induction at 6h and 60h in WT mice. In mutant mice, expression profiles of Nrf2, MnSOD, catalase and HO-1 were different. No increase in Nrf2 RNA levels were detected during the regenerative response and MnSOD and catalase RNA amounts increased only at 40h and at late time points between ~55 and 72h. In addition, HO-1 RNA levels stayed low until 6h, then progressively increased to become higher than in WT mice at ~36 and 52h (Figure 7A).

Expression of Hsp70 involved in correct folding or elimination of misfolded proteins was similar in both mice genotypes except at the early time point of 0.5h, for which the RNA levels were rapidly and transiently increased in WT mice. HIF1 $\alpha$  mRNA expression did not differ between the control and mutant mice although the initial level of HIF1 $\alpha$  expression was higher in WT livers than in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* livers (Figure 7A).

Interestingly, expression of the nitric oxide synthases, eNOS and iNOS, involved in the production of NO and hemodynamic changes were also altered in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice. In WT mice eNOS RNA levels increased from 6 to 40h post-PH. This increase correlated with the accumulation of eNOS protein from 24 to 72h (Figure 7B). RNA and protein levels of iNOS increased only at late stages of the regeneration at 55-60h post-PH. In contrast, although the RNA level of eNOS remained lower in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* livers than those found in WT livers, the protein was highly expressed at least from 24h to 72h post-PH in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* livers. In addition, the maximum levels of iNOS mRNA also found at 60h were significantly lower than those in WT livers and the protein was detected latter at 60-72h post-PH.

## Discussion

It is now well-established that the functions of GST are much broader than their canonical role in xenobiotic detoxification. They play crucial role in regulating stress response signaling pathways by the direct interaction with MAPKinases and the modulation of their phosphorylation activities. Our laboratory has previously shown the inductions of GSTA1, GSTA4, GSTMu and GSTP1/P2 during mouse liver regeneration [22]. In the present report, we first confirmed the induction of the GSTP1/P2 during the first hours following PH and further demonstrated that GSTP1/P2 intra-lobular localization changed rapidly after PH. Homogeneously located across the hepatic lobule in normal liver, GSTP1/P2 proteins accumulated in periportal hepatocytes and concentrated in the nuclei of some of them after PH. This predominant localization reinforced the hypothesis that GSTP1/P2 could support liver regeneration since hepatocyte proliferation begins in the periportal areas [23] and that gene inductions linked to cell proliferation mainly occurs in these areas [24].

Using a conventional double knock-out for *Gstp1* and *p2* genes, we have shown that GSTP1/P2 is required for the activation of signaling pathways involved in liver regeneration. Liver regeneration is characterized by a precise temporal pattern of events that regulate the entry into the cell cycle, the progression into the G1 phase including the progression beyond the mitogen dependent restriction point in late G1 phase, the G1/S transition and then the mitosis [25-26]. In wild-type mice, the first wave of hepatocyte proliferation is completed during the 72h after two-third hepatectomy. After PH in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, the lack of GSTP1/P2 strongly modified the chronology of the induction of cell cycle regulators and the magnitude of the proliferative response. The secretions of TNF $\alpha$  and IL-6 that function as priming agents for the entry into the G1 phase was delayed leading to a postponed c-fos and jun-B inductions as

well as a late and reduced activation of STAT3. Then, the increase in HGF and CyclinD1 RNA amounts occurring in WT mice at 36 and 40h, respectively, appeared only at 40h and 44h in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice. The delay in HGF and Cyclin D1 expression also coincided with differences in the kinetics of ERK1/2 phosphorylation between the two mice genotypes suggesting that growth factor stimulation required for hepatocyte progression up to G1/S boundary was also altered [27-28]. In both mice, the first activation of ERK1/2 signaling pathway occurred in early G1. However, the second induction happening in mid-late G1 phase was lowered in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice and the downstream inductions of Cyclin D1 and its catalytic partner Cdk4 were delayed leading to alteration in the accumulation of E2F1 that allows the coordination of gene transcription necessary for DNA replication. Accordingly, the expression of Cyclin E and A, two E2F1-target genes, and the induction of MCM7, Cdk2 and Cdk1 were postponed. Together, these delayed and/or reduced inductions of crucial cell cycle regulators in mid-late G1 demonstrate that the progression beyond the mitogen-dependent restriction point and the G1/S transition were significantly altered by the *Gstp1/2* deficiency. Finally, the third burst of ERK1/2 activation associated with G2/M progression [29] was also greatly diminished and associated with a reduced number of cells replicating DNA and progressing in G2 and M phases.

Besides ERK1/2, other MAPKinases, including p38 and JNK, also drive specific cell cycle responses following extracellular stimuli. During liver regeneration, the activations of JNK and c-jun are important early events [30]. Indeed, genetic invalidation of JNK [31] or activation of JNK prior to PH [32] decreases or improves hepatocyte proliferation, respectively. Moreover, JNK activation is partially regulated by GSTP1/P2 interaction [17]. As previously observed, we found that JNK is constitutively activated in control livers of *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice as demonstrated by the high levels of p-JNK expression. Unexpectedly, this activation was

rapidly reduced after PH in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice whereas in WT mice, phosphorylation of JNK progressively increased from 1 to 36h post-PH. ASK1 is an upstream regulator of JNK and its activity is inhibited by GSTmu. In *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> livers, the diminution of JNK activity could be correlated to the GSTmu protein levels that increased in the early phase of liver regeneration. Concomitantly to the decrease in p-JNK levels in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, we observed the inactivation of its downstream substrates c-Jun and ATF2 whereas their phosphorylation levels increased in WT mice during the first 36h after PH. Since the c-jun/ATF2 heterodimers induce transcription of many genes such as Cyclin D1, Cyclin A, c-jun and ATF3 [33], changes in JNK activation most like contributes along with ERK1/2 signaling alterations to the delay in G1 to S phase progression in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice. Given that the transcription factor ATF3 induces p21<sup>CIP</sup> expression [34], the c-jun/ATF2 and ERK1/2 activations participate to the increase in p21<sup>CIP</sup> protein amounts from 36-40h in WT mice. However, in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, despite lower activations of JNK, c-jun/ATF2 and ERK1/2, the expressions of p21<sup>CIP</sup> and p53 expressions were higher than in WT mice and probably contribute to the delay and decrease in hepatocyte proliferation. The expression of p21<sup>CIP</sup> is also under the control of c-myc [35]. In *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, the induction of c-myc RNA levels after PH found earlier and for a longer period of time than in livers of WT mice may explain the higher expression of p21<sup>CIP</sup>.

Considering the alterations of the JNK and ERK1/2 activations in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, we have also investigated the expression of genes involved in the cellular redox status and hemodynamic changes that arise after the liver resection [36-37]. To avoid cellular and DNA damages, ROS concentration is tightly regulated during liver regeneration and this process is achieved at least in part by the cytoprotective transcription factor Nrf2. In agreement with the lowered MAPK activation in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice, the transient increase in Nrf2 mRNA levels at the time of MAPK activation (36h) was not observed. However, the ROS detoxifying-Nrf2 target genes, MnSOD

and catalase were eventually induced but with a significant delayed expression compared to the WT mice. Interestingly, HO-1 RNA levels were not increased at 6h like in WT mice but progressively augmented later and may play a protective role during liver regeneration by modulating MnSOD and catalase expression. One may expect that HO-1 expression could result from NO production. Indeed, NO is known to up-regulate HO-1 expression [38] and the high expression of eNOS protein detected from 24h to 72h in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice suggests an enhanced NO production during this period of time. In addition, the significantly higher expression of p53 in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice suggest that p53 participate to the induction of the antioxidant enzymes, MnSOD, catalase and eNOS.

In conclusion, although many reports previously evidenced the regulation of signaling pathways by GSTs in various *in vitro* cell systems, we demonstrate for the first time that the invalidation of GSTP1/P2 affects multiple key events of the hepatocyte cell cycle *in vivo* after partial hepatectomy. Accumulation of lagging events immediately after PH and throughout the progression in G1, including the alteration of the finely tuned activations of JNK and ERK1/2 considerably delays the commitment to DNA replication and mitosis.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Dr. C Lucas Clerc from the Laboratoire de Biochimie Générale, CHU Rennes, the Animal core facility (SF Biosit, Université de Rennes 1), the ImpACcell platform (Biogenouest, SF Biosit, Université de rennes 1).

## References

- [1] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S45-53.
- [2] Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1441-6.
- [3] Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996 Nov 22;274(5291):1379-83.
- [4] Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, Brenner DA. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology*. 2003 Apr;37(4):824-32.
- [5] Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA, Evers BM. Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery*. 1997 Nov;122(5):927-35.
- [6] Moriuchi A, Hirono S, Ido A, Ochiai T, Nakama T, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Additive and inhibitory effects of simultaneous treatment with growth factors on DNA synthesis through MAPK pathway and G1 cyclins in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12;280(1):368-73.
- [7] Wada T, Stepniak E, Hui L, Leibbrandt A, Katada T, Nishina H, Wagner EF, Penninger JM. Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. *Cell Death Differ*. 2008 Jan;15(1):89-93.
- [8] Guégan JP, Frémin C, Baffet G. The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control. *Int J Hepatol*. 2012;2012:328372.
- [9] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.
- [10] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30(6):445-600.
- [11] Bogaards JJ, Venekamp JC, van Bladeren PJ. Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione, catalyzed by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem Res Toxicol*. 1997 Mar;10(3):310-7.
- [12] Dwivedi S, Sharma A, Patrick B, Sharma R, Awasthi YC. Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling. *Redox Rep*. 2007;12(1):4-10.



- [13] Romero L, Andrews K, Ng L, O'Rourke K, Maslen A, Kirby G. Human GSTA1-1 reduces c-Jun N-terminal kinase signaling and apoptosis in Caco-2 cells. *Biochem J.* 2006 Nov 15;400(1):135-41.
- [14] Desmots F, Loyer P, Rissel M, Guillouzo A, Morel F. Activation of C-Jun N-terminal kinase is required for glutathione transferase A4 induction during oxidative stress, not during cell proliferation, in mouse hepatocytes. *FEBS Lett.* 2005 Oct 24;579(25):5691-6.
- [15] Cho SG, Lee YH, Park HS, Ryoo K, Kang KW, Park J, Eom SJ, Kim MJ, Chang TS, Choi SY, Shim J, Kim Y, Dong MS, Lee MJ, Kim SG, Ichijo H, Choi EJ. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):12749-55.
- [16] Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaise D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H, Guguen-Guillouzo C. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49220-9.
- [17] Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 1999 Mar 1;18(5):1321-34.
- [18] Sau A, Filomeni G, Pezzola S, D'Aguanno S, Tregno FP, Urbani A, Serra M, Pasello M, Picci P, Federici G, Caccuri AM. Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines. *Mol Biosyst.* 2012 Apr;8(4):994-1006.
- [19] Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5275-80.
- [20] Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Sep 12;374(1):106-10.
- [21] Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR, Park BK. Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J Biol Chem.* 2003 Jun 20;278(25):22243-9.
- [22] Desmots F, Rissel M, Gilot D, Lagadic-Gossmann D, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A, Loyer P. Pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 and survival factor epidermal growth factor positively regulate the murine GSTA4 enzyme in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):17892-900
- [23] Rabes HM. Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. *Ciba Found Symp.* 1977;(55):31-53.

- [24] Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010 Jan;176(1):2-13.
- [25] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2012 Sep;57(3):692-4.
- [26] Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):286-300.
- [27] Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G. The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 1999 Sep;19(9):6003-11.
- [28] Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3227-39.
- [29] Factor VM, Seo D, Ishikawa T, Kaposi-Novak P, Marquardt JU, Andersen JB, Conner EA, Thorgeirsson SS. Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One.* 2010 Sep 16;5(9). pii: e12739.
- [30] Iimuro Y, Fujimoto J. TLRs, NF- $\kappa$ B, JNK, and Liver Regeneration. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010. pii: 598109.
- [31] Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):3943-53
- [32] Duval H, Mbatchi SF, Grandadam S, Legendre C, Loyer P, Ribault C, Piquet-Pellorce C, Guguen-Guillouzo C, Boudjema K, Corlu A. Reperfusion stress induced during intermittent selective clamping accelerates rat liver regeneration through JNK pathway. *J Hepatol.* 2010 Apr;52(4):560-9.
- [33] Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V. The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays.* 2008 Apr;30(4):314-27.
- [34] Oh YK, Lee HJ, Jeong MH, Rhee M, Mo JW, Song EH, Lim JY, Choi KH, Jo I, Park SI, Gao B, Kwon Y, Kim WH. Role of activating transcription factor 3 on TAp73 stability and apoptosis in paclitaxel-treated cervical cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008 Jul;6(7):1232-49.
- [35] Claassen GF, Hann SR. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9498-503.
- [36] Mei Y, Thevananther S. Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice. *Hepatology.* 2011 Nov;54(5):1777-89.
- [37] Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct.* 2011;2011:792639.

[38] Chen K, Maines MD. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2000 May;46(3):609-17

## Figure legends

### Figure 1. Expression and hepatic localization of GStP1/2 after PH in WT mice.

(A) mRNA levels of hepatic *Gstp1* (grey bar) and *Gstp2* (white bar) were measured by RT-qPCR at the indicated times after PH. Results are expressed as fold induction compared to the control liver arbitrarily set at 1 and as mean  $\pm$  SEM (n=3 to 7 mice/group/time point). #  $P \leq 0.05$ , time point after PH versus normal livers. (B) Immunoblot analyses of GSTP1/2 expression in *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> livers at the indicated times after PH. HSC70 is used as loading control. (C) Immunolocalization of GSTP1/2 in control livers of *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice and 48h after PH in WT mice, bars: 250 $\mu$ m or 25 $\mu$ m.

### Figure 2. Transaminase levels and cell death in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice after PH.

Serum levels of AST (A) and ALT (B) in *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice at indicated times after PH. (C) Caspase 3 activity in liver homogenates of *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice at indicated times after PH. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3 to 7 mice/group/time point). \*  $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> versus *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> mice. (D) Histology of livers from *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice at 52h and 7 days after PH. Bar: 100 $\mu$ m

### Figure 3. Defective hepatocyte proliferation in *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice after PH.

Percentage of BrdU positive hepatocytes (A) and of hepatocytes in mitosis (B) in *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mouse livers at indicated times after PH. Percentage of pHH3-positive

hepatocytes in G2/M phase in *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* (C) and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* (D) livers at indicated time after PH. Quantification was performed by analyzing at least six microscope fields (20X) per mice. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3 to 7 mice/group/time point). \*\*P  $\leq$  0.01, \*\*\*P  $\leq$  0.001, *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* versus WT mice. (E) Immunolocalization of BrdU or of pHH3 at the indicated times after PH, Bars: 200 $\mu$ m

**Figure 4. Alteration of the hepatocyte “priming” after PH in *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice.**

Serum levels of TNF $\alpha$  (A) and IL-6 (B) in *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice at indicated times after PH. (B) Western blot analysis of STAT3 activation in *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* livers. HSC 70 is used as loading control. (C) mRNA levels of c-jun, c-fos and JunB proto-oncogenes by qPCR in *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice at indicated times after PH. Results are expressed as fold induction compared to the *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* control liver arbitrarily set at 1 and as mean  $\pm$  SEM (n=3 to 7 mice/group/time point). \*P  $\leq$  0.05, \*\*\*P  $\leq$  0.001, *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* versus WT mice.

**Figure 5. Differential mRNA and protein expression profiles of cell cycle regulators in livers of *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice after PH.**

(A) mRNA levels of c-myc and p53 in *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* livers at indicated times after PH. (B) Western blot analysis of cell cycle regulators in livers of *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* mice at indicated times after PH. HSC 70 is used as loading control. (C) mRNA levels of HGF, CyclinD1 and Cdk1 in livers of *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* and *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* livers at indicated times after PH. Results are expressed as fold induction compared to the *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* control liver arbitrarily set at 1 and as mean  $\pm$  SEM (n=3 to 7 mice/group/time point). \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01, \*\*\*P  $\leq$  0.001, *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* versus *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* mice

**Figure 6. Cell signaling protein expression and/or activation in *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice after PH.**

Analysis by western blot of STAT3, JNK, c-jun, ATF2, p38, ERK phosphorylation and TRAF2 and GSTmu expression in *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice at indicated times after PH. HSC70 is used as loading control.

**Figure 7. Differential mRNA expression of antioxidant enzymes in livers of *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice after PH.**

(A) mRNA of Nrf2, MnSOD, catalase, HO-1, Hsp70, HIF1 $\alpha$  eNOS and iNOS expression in *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice at indicated times after PH. Results are expressed as fold induction compared to the *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> control liver arbitrarily set at 1 and as mean  $\pm$  SEM (n=3 to 7 mice/group/time point). \*P  $\leq$  0.05, \*\*P  $\leq$  0.01, *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> versus *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> mice. (B) Western blot analysis of eNOS and iNOS in *Gstp1/2*<sup>+/+</sup> and *Gstp1/2*<sup>-/-</sup> mice at indicated times after PH. HSC 70 is used as loading control.

**Supplementary Table 1: Taqman primers list**

<b>Gene</b>	<b>Applied denomination</b>	<b>Reference</b>
Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1)	Cdc2a	Mm00772472-m1
c-fos	Fos	Mm00487425-m1
c-jun	Jun	Mm00495062-m1
c-myc	Myc	Mm00487804
Cyclin D1	Ccnd1	Mm00432359-m1
HGF (Hepatocyte growth factor)	HGF	Mm01135193-m1
JunB	Junb	Mm01251660-m1
p53	Trp53	Mm01731287-m1
TBP (TATA-binding protein)	TBP	Mm00446971-m1
Gstp1 (Glutathione transferase P1)	Gstp1	Mm00496606
Gstp2 (Glutathione transferase P2)	Gstp2	Mm01231544

**Supplementary Table 2 : SYBR green primers list**

	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
mMnSOD (Manganese Superoxide Dismutase)	TGG-TGG-TCC-ATG- AGA-AAC-AA	GTT-TAC-TGC-GCA-ATC- CCA-AT
mHsp70 (Heat-Shock Protein)	TAT-GCC-TTC-AAC- ATG-AAG-AGC-GCC	CTT-GTC-CAG-CAC-CTT- CTT-CTT-GTC
mHO-1 (Heme-oxygenase 1)	CAC-GCA-TAT-ACC- CGC-TAC-CT	CCA-GAG-TGT-TCA-TTC- GAG-CA
mNRF2 (Nuclear factor 2)	AGG-ACA-TGG-AGC- AAG-TTT-GC	TCT-GTC-AGT-GTG-GCT- TCT-GG
mTBP (TATA-binding protein)	AGG-GGC-AAT-GTA- ACA-CAG-GT	GGT-GCA-TCG-AGT-CCG- GTA
mHIF1 $\alpha$ (Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ )	GT-CAC-CTG-GYY-GCT- GCA-ATA	CA-TGA-TGG-CTC-CCT- TTT-TCA
mCAT (catalase)	TGA-GAA-GCC-TAA- GAA-CGC-AAT-TC	CCC-TTC-GCA-GCC-ATG- TG
mNOSi (inducible NO synthase)	AAC-GGA-GAA-CGT- TGG-ATT-TG	CAG-CAC-AAG-GGG-TTT- TCT-TC
mNOSe (endothelial NO synthase)	CCT-TCC-GCT-ACC- AGC-CAG-A	CAG-AGA-TCT-TCA-CTG- CAT-TGG-CTA





## **Chapitre 2 :**

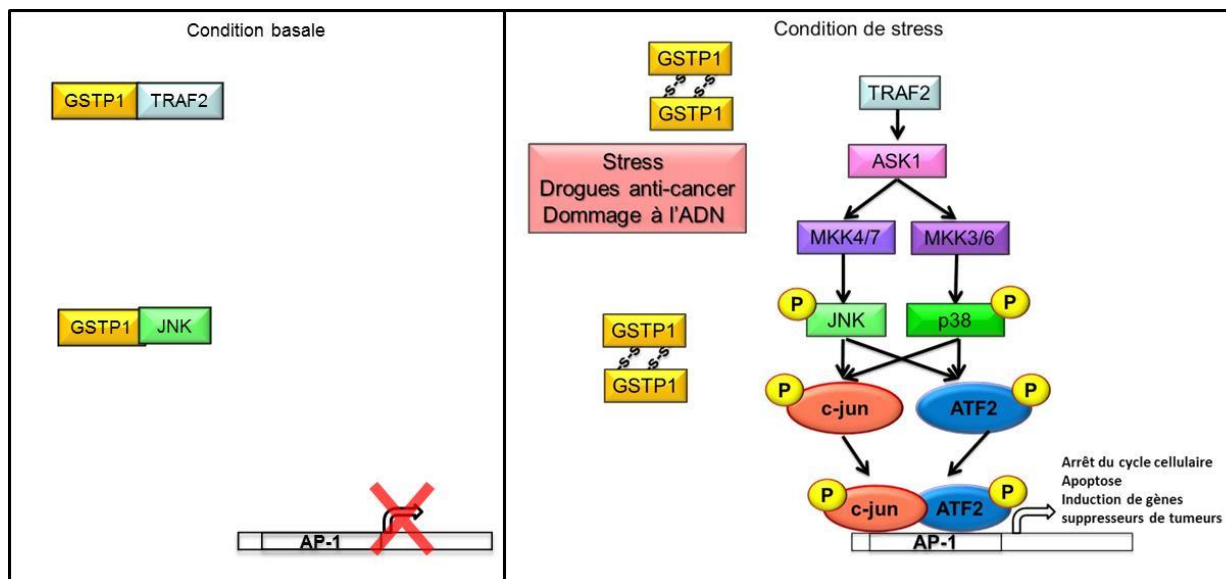
Etude du rôle de la protéine GSTP1  
dans la prolifération des cellules  
transformées *in vitro*



## I. Introduction

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le développement des carcinomes hépatocellulaires, comme AP-1 et NFκB (Karin, 2009; Young *et al.*, 2003). En effet, la surexpression de c-jun, un des membres du facteur de transcription AP-1, est détectée dans de nombreux cancers, ce qui favorise la transcription des gènes du cycle cellulaire et la prolifération des cellules (Lopez-Bergami *et al.*, 2010). De même, les cinq membres de la famille NFκB sont actifs dans différents cancers et favorisent un environnement inflammatoire et pro-tumorigène (Xiao *et al.*, 2010). Ces facteurs de transcription sont régulés en amont par les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) : p38, JNK et ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Il est à noter que la voie de signalisation Ras/MEK/ERK est dérégulée dans environ 1/3 des cancers humains. JNK et p38 possèdent des effets suppresseurs de tumeur en induisant l'apoptose et l'expression de p53, respectivement (Dhillon *et al.*, 2007). Les MAPK sont régulés en amont par les MAPKK (MAPK kinase) et les MAPKKK (MAPKK kinase). Parmi les MAPKKK, ASK1 active spécifiquement JNK et p38 en réponse à de nombreux stimuli (cytokines, ERO) et est impliqué dans la mort ou la prolifération cellulaire en fonction du contexte et du type cellulaire (Soga *et al.*, 2012). En effet, ASK1 favorise la tumorigenèse gastrique en induisant la transcription de la cycline D1 par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription AP-1 (Hayakawa *et al.*, 2011). A l'inverse, il entraîne l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en activant JNK et p38 dans les CHC (Nakagawa *et al.*, 2011). En accord avec ces résultats, la phosphorylation de JNK a récemment été proposée comme un biomarqueur prédictif de la récurrence post-opératoire dans les CHC (Hagiwara *et al.*, 2012).

La protéine GSTP1 régule l'activité des kinases JNK et TRAF2, et par conséquent, régule les voies de signalisation auxquelles elles appartiennent (Figure 26).



**Figure 26 :** Modèle de régulation des protéines kinases JNK et TRAF2 par la GSTP1 en condition basale (gauche) et en condition de stress (droite).

## II. Objectifs de l'étude

La surexpression de la GSTP1 dans de nombreux cancers et son rôle régulateur envers les protéines kinases, dont JNK, a incité certains auteurs à étudier la modulation des voies de survie cellulaire par la protéine GSTP1. Cette dernière permet de protéger les cellules NIH3T3 (Holley *et al.*, 2007), les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y (Castro-Caldas *et al.*, 2009) et les cellules d'ostéosarcomes U-20S (Sau *et al.*, 2012) de l'apoptose. Plus récemment, il a été suggéré que la GSTP1 jouait un rôle suppresseur de l'apoptose en stimulant l'activité catalytique de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Ochiai *et al.*, 2013). Peu de travaux ont étudié l'implication de la GSTP1 dans la prolifération cellulaire. Ceux-ci montrent des résultats différents mais utilisent aussi des modèles d'études très éloignés. En effet, l'inhibition pharmacologique de la GSTP1 par le TLK199 induit une myéloprolifération chez les souris (Ruscoe *et al.*, 2001), alors que l'utilisation de NBDHEX, un inhibiteur de l'interaction GSTP1/JNK, entraîne l'arrêt des cellules U-20S en phase G2/M et l'apoptose (Sau *et al.*, 2012). A l'aide de souris *Gstp1*<sup>1/2</sup>, il a été montré que le temps de doublement des fibroblastes embryonnaires (MEF) était moins rapide en présence de GSTP1/2, mais que l'immortalisation de ces cellules abolissait cette différence de prolifération (Ruscoe *et al.*, 2001). Cependant, nous avons montré une altération du processus de régénération, plus particulièrement une diminution de la

prolifération des hépatocytes après hépatectomie chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* (cf. Chapitre 1). Nous avons donc poursuivi notre étude du rôle de la GSTP1 dans la régulation de la prolifération cellulaire en évaluant l'impact d'une surexpression ou d'une extinction de l'expression de la GSTP1 sur la prolifération et la mort cellulaire, dans des lignées de cellules cancéreuses d'origines différentes. Pour cela, nous avons utilisé les lignées HeLa, HT29 et Huh7 qui exprime la GSTP1 et une lignée qui n'en exprime pas, la lignée HepG2.

### **III. Matériel et Méthodes**

#### **1) Réactifs**

BrdU (RPN20LR, GE Healthcare); Hygromycine (InvivoGen, HygroGold) ; Puromycine (Invitrogen, A11138-03) ; SP600125 (Sigma, S5567). Les siARN contrôle (AM4611) et GSTP1 (AM51333), ainsi que les shARN contrôle (RHS4348) et GSTP1 (Clone ID V3LHS\_406905) possédant une résistance à la puromycine et couplés à la GFP (Green Fluorescent Protein) sont produits par Ambion. La surexpression de la GSTP1 est réalisée avec les plasmides de surexpression pcDNA (pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit, Invitrogen) ou pcEP4 (V044-50, Invitrogen). Ces derniers possèdent une résistance à l'hygromycine B. L'ADNc humain de la GSTP1 a été obtenu par PCR à partir d'ARN de foie et cloné dans les plasmides précédemment cités.

#### **2) Culture cellulaire**

Les lignées cellulaires HT29, HeLa, Huh7 et HepG2 proviennent de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures ; Salisbury, UK). Ces cellules ont été cultivées dans leurs milieux respectifs à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules HT29 sont ensemencées dans du milieu Eagle's MEM 1X (Eurobio) supplémenté de L-glutamine (2 mM), d'antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml-Streptomycine 100µg/ml) et de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules Huh7 sont cultivées dans du milieu DMEM 1X avec 4,5g/L de glucose (Gibco) supplémenté de L-glutamine, d'antibiotiques et de SVF. Pour les cellules HeLa et HepG2, le même milieu est utilisé : MEM Alpha Medium 1X (Gibco), acides aminés non-essentiels 1X, antibiotiques (Pénicilline 100 U/ml-Streptomycine 100µg/ml) et SVF 10%.

Les cellules transfectées avec les shARN sont traitées avec de la puromycine (2µg/ml)

et les cellules transfectées avec le pcEP4 sont traitées avec de l'hygromycine (100µg/ml) pour enrichir en cellules transfectées.

### **3) Méthodes de transfection :**

Les cellules HeLa ont été transfectées en utilisant la Lipofectamine® 2000. Les siARN contrôle et GSTP1 (5-9pmol ; concentration final 40-75nM) ont été mélangés à la Lipofectamine® avec un ratio de 1:1 (v/v) et incubés pendant 20 min à température ambiante avant d'être déposés sur les cellules à confluence (20 000 cellules/puits en plaque 96 puits). Le milieu a été changé 24h après la transfection. Afin d'étudier le rôle de JNK, les cellules HeLa ont été traitées avec un inhibiteur de l'activation de JNK, SP600125 (10µM), 24h après transfection des siARN.

Les cellules HT29 ont été transfectées par électroporation (Microporator MP100, Digital Bio, LabTech France) avec les siARN (40-75nM). Les cellules Huh7 et HepG2 ont aussi été transfectées par électroporation avec les siARN (10pmol) et les plasmides pcDNA ou pcEP4 (0,3-0,4µg ; concentration final 2,5-3,33mg/L) respectivement. Les cellules HeLa ont aussi été infectées par des shARN en utilisant plusieurs MOI (Multiplicity of Infection) : 5, 10 ou 20 particules par cellule.

Les cellules ont été récoltées 24, 48, 72 et 96h après transfection.

### **4) Immunomarquage**

Des marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur les cellules après transfection. Les cellules en phase S sont détectées grâce au marquage BrdU et les cellules en mitose grâce à la détection de l'histone H3 phosphorylée (pHH3).

Concrètement, les cellules sont traitées avec du BrdU (2µl/ml) pendant 1h30 puis sont fixées par un mélange acide acétique/éthanol (5% / 90%) 48h après transfection. Elles sont ensuite perméabilisées (PBS/Triton 0,3%). Des étapes supplémentaires sont nécessaires pour le marquage BrdU : traitement avec une solution d'HCl 2N puis lavage avec une solution de borate 0,1M pH8,5. Après lavages, les cellules sont incubées dans une solution de saturation (PBS 1X/0,05% Tween20/2% Normal Donkey Serum), puis dans la solution d'anticorps primaire anti-BrdU (Abcam, ab8152, 1/200<sup>ème</sup>) ou anti-pHH3 (#9701, Cell Signaling) dilué dans la solution de saturation. Enfin, les cellules sont incubées dans la solution d'anticorps

secondaire DyLight 488 anti-mouse (Eurobio, 1/500<sup>ème</sup>), dilué dans la solution de saturation. Finalement, nous avons réalisé un marquage Hoechst (1/5000<sup>ème</sup>) pour visualiser les noyaux. La lecture des plaques et la détection de la fluorescence ont été effectuées par le lecteur ArrayScan V<sup>II</sup> HCS Reader (Cellomics ; Plateforme ImPACcell).

### **5) Western blot**

Pour les analyses de Western blot, les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 35mm (500 000 cellules/puits). Les protéines cellulaires ont été extraites dans un tampon de lyse HEPES (50mM HEPES pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 1mM EDTA pH 8 ; 2,5mM EGTA pH 7,4 ; 0,1% Tween 20 ; 10% glycérol ; 0,1mM orthovanadate Na ; 1mM NaF ; 10mM  $\beta$ -glycérophosphate). La concentration protéique a été évaluée par dosage Bradford (Biorad) et 50 $\mu$ g de protéines totales ont été déposées sur gel de polyacrylamide (NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gels, Invitrogen). Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose (iBlot® Transfer Stack, Invitrogen). Les membranes sont ensuite saturées (PBS 1X-BSA 3%-Tween 20 0,2%) puis incubées avec différents anticorps primaires: anti-GSTP1 (Abnova, PAB13020), anti-JNK (#9258), anti-phospho-JNK (#4671), anti-phospho c-jun (#9261), anti-ATF2 (#9226), anti-phospho-ATF2 (#5112), anti-p38 (#9212) et anti-phospho-p38 (#4511) fournis par Cell Signaling ; anti-TRAF2 (sc-876), anti-c-jun (sc-4113), anti-ATF3 (sc-188), anti-p21Cip1 (sc-397) et anti-Hsc70 (sc-7298) fournis par SantaCruz Biotechnology. Les anticorps secondaires anti-souris (P0447, Dako) et anti-lapin (P0448, Dako) couplés à la peroxydase ont été utilisé afin de permettre la révélation des protéines par le kit ECL Advance Western Blotting (Amersham).

### **6) Mesure de l'activité caspase 3**

Pour réaliser ce test, les cellules ont été lysées dans un tampon spécifique : 20 mM PIPES, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 10% sucrose, pH 7.2. La concentration protéique a été évaluée puis 100 $\mu$ g de protéines ont été soumis au test. 100 $\mu$ M de substrat DEVD-AMC ont été incubés avec les protéines pendant 1h à 37°C. La libération de l'AMC est la conséquence du clivage protéolytique catalysé par la caspase 3 active. Cette libération est suivie par mesure de la fluorescence (380/440 nm) (Gemini XS Fluorescence).

## 7) Test de cicatrisation

Les cellules HeLa transfectées avec les siARN Contrôle et GSTP1 ont été mis en culture jusqu'à confluence dans une plaque 96 puits. La cicatrice a été effectuée dans la monocouche de cellules avec un cône de pipette. La migration cellulaire a été observée immédiatement après (temps 0) puis une vidéo en contraste de phase a été réalisée à intervalle de temps de 6h avec un objectif 10x sur un microscope inversé Carl Zeiss (AxioVert 200M). Celui-ci est équipé d'un contrôleur de température et de CO<sub>2</sub> et d'une caméra Zeiss AxioCam MR digital. La quantification de la migration cellulaire est permise grâce au logiciel d'analyse d'image Simple PCI, qui mesure la surface de la cicatrice au cours du temps.

## 8) Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM (Erreur Standard à la Moyenne). Les analyses statistiques ont été réalisées sur le Logiciel GraphPad 5.0<sup>®</sup> en utilisant un test t de Student non apparié.

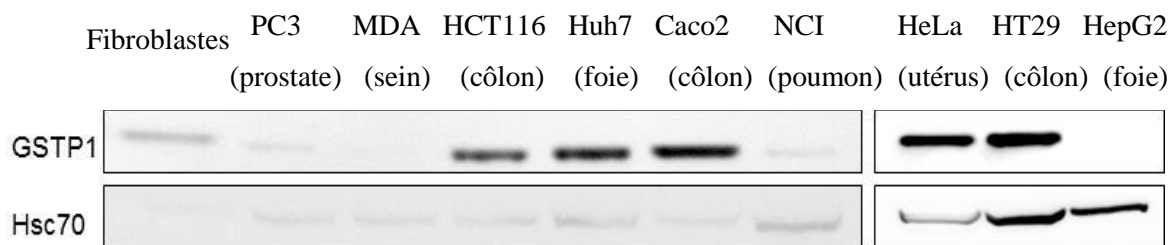
# IV. Résultats

## *A. Expression de la GSTP1 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses*

La protéine GSTP1 est une protéine ubiquitaire mais son expression varie fortement en fonction du type cellulaire et de la pathologie. Pour cette raison, nous avons analysé l'expression de la GSTP1 dans des lignées cancéreuses d'origines différentes (Figure 27). L'analyse par Western blot montre une forte expression de la GSTP1 dans les lignées HCT116 (cancer colorectal), Huh7 (carcinome hépatocellulaire), Caco2 (cancer colorectal), HeLa (cancer du col de l'utérus) et HT29 (cancer colorectal). A l'inverse, son expression est faible, mais détectable, dans les lignées MDA-MB-231 (adénocarcinome du sein), PC3 (adénocarcinome prostatique) et NCI (cancer du poumon non à petites cellules) et elle est absente dans la lignée HepG2 (carcinome hépatocellulaire). L'expression de la GSTP1 est hétérogène dans les lignées cellulaires étudiées et peut fortement varier au sein d'un même



organe. En effet, contrairement à HepG2, la lignée Huh7, qui est aussi d'origine hépatique, exprime un niveau élevé de GSTP1. Des différences d'expression sont aussi retrouvées dans les trois lignées cancéreuses issues du côlon.



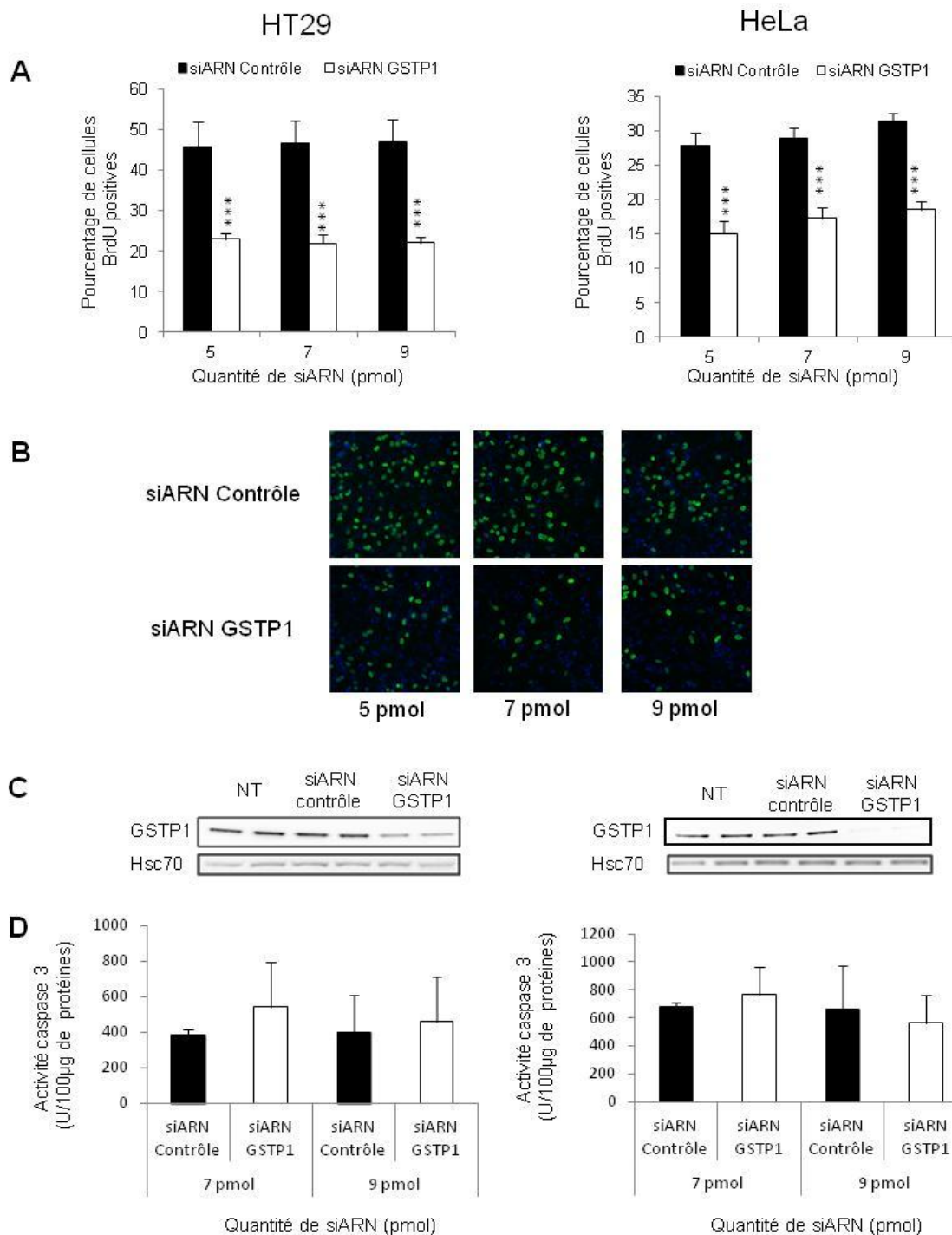
**Figure 27 :** Niveau d'expression protéique de la GSTP1 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines

L'expression protéique de la GSTP1 a été déterminée par Western blot dans les lignées cancéreuses suivantes : PC3 (prostate), MDA (sein), HCT116 (côlon), Huh7 (foie), Caco2 (côlon), NCI (poumon), HeLa (col de l'utérus), HT29 (côlon) et HepG2 (foie). Hsc70 est utilisé comme contrôle de dépôt.

Puisque notre étude porte sur la prolifération des cellules hépatiques, nous avons sélectionné les lignées Huh7 et HepG2. Afin d'élargir l'étude du rôle de GSTP1 à d'autres tissus, nous avons choisi d'étudier les lignées HeLa et HT29. Les lignées cellulaires Huh7, HeLa et HT29 expriment des niveaux importants de GSTP1 à l'état basal, alors que la lignée HepG2 n'en exprime pas. Dans un premier temps, nous décrirons les résultats obtenus sur les lignées HeLa et HT29, puis dans un second temps, nous nous intéresserons à la lignée Huh7.

### ***B. Impact de la GSTP1 sur la prolifération et la mort cellulaire dans les lignées HeLa et HT29***

Afin d'invalider la GSTP1 dans ces lignées, une stratégie d'invalidation par ARN interférents a été choisie. Plusieurs quantités de siARN ont été utilisées (5, 7 et 9 pmol/20 000 cellules). Quarante-huit heures après transfection des siARN, nous constatons une forte réduction du nombre de cellules en phase S (visualisé par incorporation du BrdU) pour les cellules transfectées par le siARN GSTP1 par rapport aux cellules transfectées par le siARN contrôle (Figure 28A et B). La Figure 28C confirme l'efficacité des transfusions. En effet, les Western blot montrent une inhibition importante de l'expression de la protéine GSTP1 48h après transfection du siARN GSTP1.



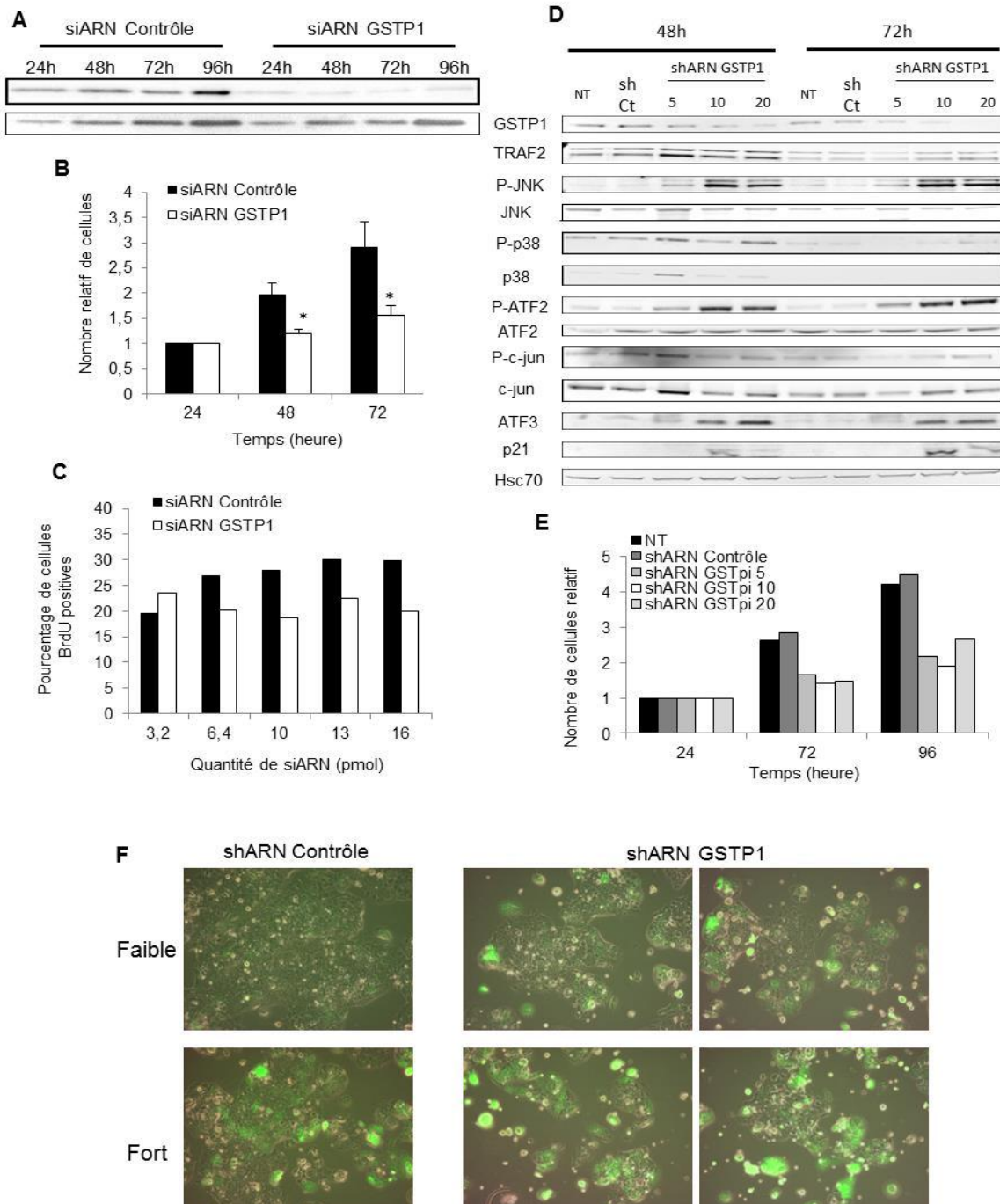
**Figure 28** : Evaluation du rôle de la GSTP1 dans la prolifération cellulaire des cellules HT29 et HeLa 48h après transfection

Après transfection des siARN contrôle et GSTP1, le nombre de cellules en phase S a été déterminé par immunomarquage du BrdU (A). Dans les cellules HeLa, le marquage vert (BrdU) diminue en absence de GSTP1 (B). L'extinction de la GSTP1 est confirmée par Western blot (C) pour la condition 7 pmol (NT : Non-transfectées). Hsc70 est utilisé comme contrôle de dépôt. L'activité caspase 3 a été mesurée dans les cellules 48h après transfection (n=4). \*\*\*, P<0,001.

### ***C. Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur la prolifération et les voies de signalisation dans les cellules Huh7***

Dans les cellules Huh7, deux stratégies d'extinction ont été réalisées : une inhibition transitoire par siARN et une inhibition stable par shARN. Les expériences de transfection transitoire montrent que le siRNA utilisé provoque une réduction importante de la quantité de GSTP1 jusqu'à 96h après transfection (Figure 29A). Cette inhibition est associée à une diminution de la prolifération cellulaire (Figure 29B ; n=4) et à une réduction du nombre de cellules en phase S 48h après transfection (Figure 29C ; n=1).

La stratégie d'inactivation stable montre aussi une efficacité importante. Il est à noter que l'extinction de la GSTP1 est plus importante avec la dose la plus forte de shARN GSTP1 (MOI 20 = 20 particules par cellule). Cette inhibition a un impact sur l'état d'activation ou l'expression de certaines protéines. Nous observons que l'inhibition de la GSTP1 dans les cellules Huh7 augmente l'expression de TRAF2 et active JNK et ATF2. Ces activations sont aussi corrélées à une augmentation d'expression d'ATF3 et de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 (Figure 29D). L'inhibition de la GSTP1 a également un effet sur la prolifération cellulaire. En effet, le comptage cellulaire montre une réduction du nombre de cellules pour les cellules transfectées avec le shARN GSTP1 à 72 et 96h après transfection (Figure 29E ; n=1). La présence de la GFP dans le lentivirus nous a permis de trier les cellules en fonction de l'intensité de marquage par cytométrie en flux. Nous avons ainsi obtenu des cellules faiblement marquées et des cellules fortement marquées que nous avons remises en culture. A l'ensemencement, on observe une proportion importante de cellules GFP+ dans les deux conditions. Après 10 jours de culture, on constate que les cellules GFP+ sont moins nombreuses et que les cellules en cours de prolifération sont GFP- (Figure 29F). La densité cellulaire est aussi diminuée en présence du shARN GSTP1.



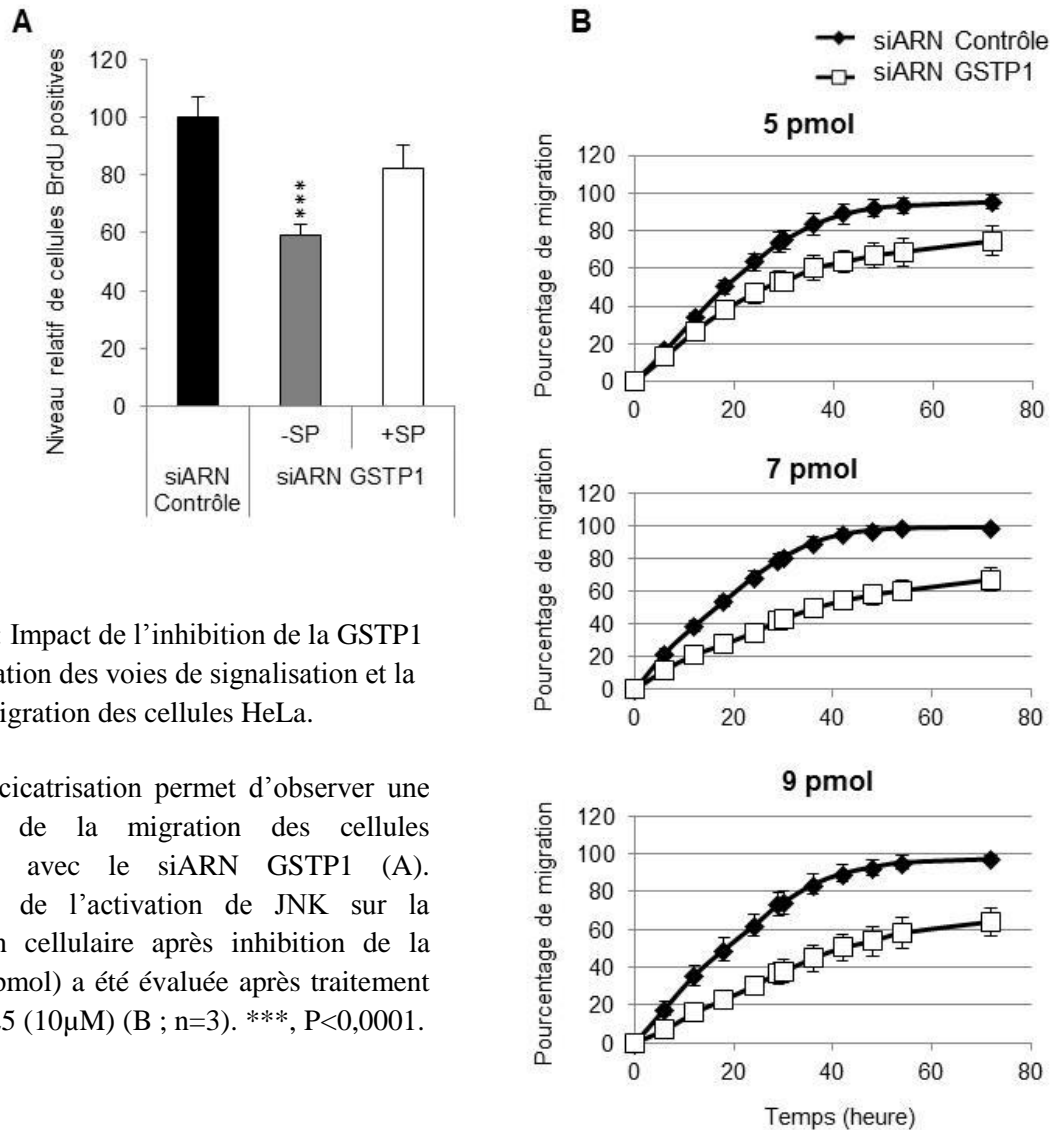
**Figure 29** : Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur la prolifération cellulaire et les voies de signalisation dans les cellules Huh7

L'inhibition de la GSTP1, confirmée par Western blot (A), entraîne une diminution de la prolifération (B ; n=3) et du nombre de cellules en phase S (C ; n=1). L'utilisation de shARN a permis d'étudier l'activation et l'expression de protéines cibles par Western blot (D) (NT : Non-transfectées). On retrouve une diminution de la prolifération cellulaire après infection par le shARN GSTP1 (E ; n=1). La GFP (vert) permet de détecter les cellules infectées par les shARN après le tri cellulaire (J10) des cellules faiblement et fortement marquées (F). \*, P<0,05.

#### ***D. Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur les voies de signalisation et la migration dans les cellules HeLa***

L'activation de JNK a été mise en évidence lorsque la protéine GSTP1 est inhibée, or cette kinase joue un rôle important dans les voies de signalisation de prolifération comme de mort cellulaire. Pour évaluer l'impact de l'activation de JNK sur la prolifération cellulaire dans les cellules HeLa, nous avons utilisé un inhibiteur de cette kinase, le SP600125 (Figure 30A). Comme indiqué dans la Figure 28, nous retrouvons la diminution du nombre de cellules en phase S dans les cellules transfectées avec le siARN GSTP1. De façon intéressante, lorsqu'on inhibe l'activation de JNK en utilisant le SP600125 dans cette condition, on observe que le taux de prolifération est équivalent à celui du contrôle.

En parallèle, un test de cicatrisation a été réalisé afin d'étudier le taux de migration des cellules HeLa en présence ou en absence d'expression de la GSTP1. Cette expérience montre une diminution de la migration des cellules invalidées pour la GSTP1 comparées aux cellules normales (Figure 30B). Il est à noter que cette inhibition est d'autant plus marquée que la quantité de siARN utilisée est élevée.



**Figure 30** : Impact de l'inhibition de la GSTP1 sur l'activation des voies de signalisation et la migration des cellules HeLa.

Le test de cicatrisation permet d'observer une diminution de la migration des cellules transfectées avec le siARN GSTP1 (A). L'influence de l'activation de JNK sur la prolifération cellulaire après inhibition de la GSTP1 (9 pmol) a été évaluée après traitement au SP600125 (10µM) (B ; n=3). \*\*\*, P<0,0001.

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'inhibition de l'expression de la GSTP1 sur les lignées cellulaires cancéreuses, nous avons appliqué la stratégie inverse en nous basant sur une lignée cellulaire qui n'exprime pas la GSTP1, HepG2.

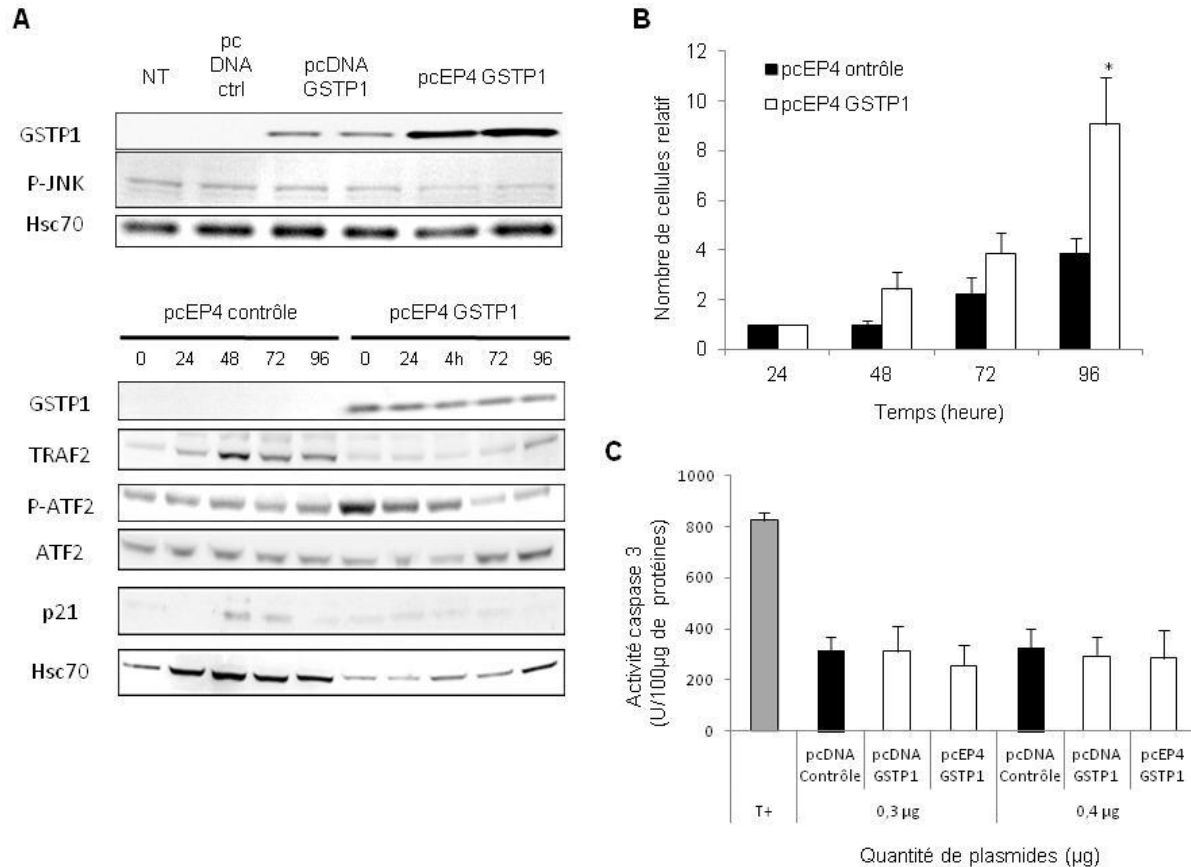
### ***E. Etude de la surexpression de la GSTP1 sur la prolifération et la mort des cellules HepG2***

Dans la lignée HepG2, nous avons surexprimé la protéine GSTP1 en utilisant différents vecteurs d'expression : pcDNA et pcEP4. Des vecteurs contrôles ont été utilisés pour évaluer l'impact de la transfection seule sur les cellules.

Ainsi, nous constatons une augmentation de l'expression de la GSTP1 après transfection des vecteurs pcDNA GSTP1 et pcEP4 GSTP1 dans les cellules HepG2 (Figure 31A). Il est à noter que l'expression de la GSTP1 est supérieure avec le pcEP4, ce qui semble cohérent avec le fait que le promoteur présent dans ce vecteur soit plus fort que celui contenu dans le pcDNA. De façon intéressante, la diminution de la forme active de JNK, p-JNK, est observée seulement après transfection du pcEP4. Une cinétique a donc été réalisée après transfection des pcEP4 contrôle et GSTP1. Un fort taux de GSTP1 est maintenu jusqu'à 96h après transfection. Il est associé à une diminution de l'expression de TRAF2, de p21 et une réduction progressive de la forme active d'ATF2. En parallèle, nous constatons par comptage cellulaire une augmentation de la prolifération des cellules qui surexpriment la protéine GSTP1 comparées à celles qui ne l'expriment pas (Figure 31B). Enfin, aucune différence d'activité caspase 3 n'est détectée entre les cellules qui n'expriment pas la GSTP1 (contrôle) et celles qui l'expriment (GSTP1) (Figure 31C).

## **V. Discussion**

La surexpression de la GSTP1 est positivement corrélée à la résistance des tissus aux anticancéreux, l'inhibition de l'apoptose et le développement de différents types de cancer. Notre travail sur les lignées cellulaires, exprimant ou non la GSTP1, permet de montrer qu'il existe également un lien direct entre la prolifération cellulaire et l'expression de la GSTP1. L'inhibition de l'expression de la GSTP1 par des stratégies utilisant des siARN ou des shARN entraîne une réduction de la prolifération cellulaire, alors que la surexpression de la GSTP1 l'augmente. Par contre, nos expérimentations n'ont pas montré d'impact majeur de l'expression de la GSTP1 sur la mort cellulaire.



**Figure 31:** Effet de la surexpression de la GSTP1 sur l'activation des voies de signalisation, la prolifération et la mort cellulaire dans les cellules HepG2

L'expression et l'activation des protéines appartenant aux voies de signalisation MAPK a été étudié par Western blot dans les cellules HepG2 après transfection des plasmides (pcDNA ou pcEP4) (A). Hsc70 est utilisé comme contrôle de dépôt. La surexpression de la GSTP1 induit une augmentation de la prolifération cellulaire (B ; n=4), mais n'a pas d'effet sur la mort par apoptose 48h après transfection (C ; n=3). \*, P<0,05.

L'expression basale de la GSTP1 dans les tissus humains sains est très hétérogène (Terrier *et al.*, 1990). Dans cette étude, nous avons aussi observé une forte hétérogénéité d'expression de la GSTP1 dans les lignées cancéreuses étudiées et provenant de différentes origines (foie, poumon, côlon, prostate...). De façon intéressante, les lignées cancéreuses Huh7 et HepG2, toutes deux dérivées du foie, présentent des profils d'expression de la GSTP1 opposés. Il est intéressant de noter que les hépatocytes humain normaux, dont le potentiel de renouvellement est lent dans un foie normal, n'expriment pas la protéine GSTP1 (Terrier *et al.*, 1990), alors qu'elle est abondante dans le foie foetal (Kashiwada *et al.*, 1991). De la même façon dans les lignées cellulaires étudiées, la présence ou l'absence de la GSTP1 est corrélée



au potentiel de prolifération cellulaire. L'extinction de l'expression de la GSTP1 entraîne une diminution du nombre total de cellules au cours du temps associée à une réduction du nombre de cellules en phase S et G2/M. A l'inverse, la surexpression de la GSTP1 induit une augmentation du nombre de cellules dans le temps. *In vitro*, l'expression de la GSTP1 influence aussi la migration cellulaire. En effet, le test de cicatrisation montre que l'inhibition de la GSTP1 dans les cellules HeLa diminue la migration cellulaire. De plus, cette inhibition est positivement corrélée à la concentration de siARN utilisée.

Cette étude met en avant un effet pro-prolifératif de la GSTP1 dans les lignées de cellules cancéreuses Huh7, HT29, HeLa et HepG2. Un effet similaire de la GSTP1 a été démontré dans les cellules HCT116, issues du côlon, mais seulement lorsque les cellules sont cultivées en absence de sérum (Dang *et al.*, 2005). En condition de culture standard, ces auteurs ne montrent toutefois pas de différences de prolifération entre les cellules GSTP1 positives et GSTP1 négatives. Une étude plus récente a montré que l'inhibition de la GSTP1 diminuait la prolifération cellulaire et augmentait la production d'ERO dans les cellules Pca1, dérivées d'un cancer de la prostate (Naiki *et al.*, 2012). Nos résultats corrént donc avec ces travaux menés sur des lignées de cellules cancéreuses différentes. Il faut toutefois noter que dans les cellules Huh7, si une réduction de la prolifération après l'infection shARN est observée, au cours du temps, les cellules retrouvent un niveau de prolifération normal ; les cellules proliférantes devenant négatives pour la protéine GFP. Deux explications sont possibles : ces cellules n'ont jamais été infectées ou l'expression du shARN est éteinte. De plus, si on cultive les cellules avec une pression de sélection, elles finissent par proliférer suggérant que des mécanismes de compensation se mettent en place.

En parallèle de son activité catalytique de conjugaison du GSH, la GSTP1 joue un rôle régulateur important en se liant à différentes protéines comme JNK (Adler *et al.*, 1999) et TRAF2 (Wu *et al.*, 2006) et en inhibant leurs activités. En accord avec ces observations, nous avons démontré, dans les lignées Huh7 et HepG2, une augmentation de la phosphorylation de JNK et une induction d'expression de TRAF2 lorsque l'expression de la GSTP1 est inhibée. Dans les cellules Huh7, l'activation de JNK est corrélée à une augmentation de l'activation d'ATF2, une augmentation d'expression d'ATF3 et de p21. Ceci suggère donc que la modulation de l'activité est dépendante de la voie JNK/GSTP1. Différentes études ont montré

qu'ATF3 était responsable de l'arrêt de la croissance cellulaire et ralentissait la transition G1/S dans des fibroblastes immortalisés ou les cellules HeLa (Fan *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2006). Cet effet peut être lié à l'induction de l'expression de p53, qui est connu pour être un activateur de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, ou à l'induction directe de l'expression de p21 par ATF3. En effet, ATF3 est capable de se lier au promoteur de cet inhibiteur du cycle cellulaire et induit son expression (Oh *et al.*, 2008). Dans les cellules étudiées, l'induction de p21 est associée à l'expression d'ATF3 et la phosphorylation de JNK et ATF2, ce qui suggère que la GSTP1 est impliquée dans la régulation d'acteurs du cycle cellulaire par l'intermédiaire de l'activation de JNK. Cette hypothèse a été confirmée en utilisant un inhibiteur de JNK, le SP600125, sur les cellules HeLa. En effet, l'inhibition de JNK contrecarre les effets de l'inhibition de la GSTP1 sur la prolifération cellulaire.

JNK et TRAF2 appartiennent aussi à la voie de signalisation apoptotique dépendante du TNF $\alpha$ . La fixation de ce dernier à son récepteur dissocie les complexes TRAF2-GSTP1 ce qui permet l'interaction entre TRAF2 et ASK1 et l'activation d'ASK1. Dans les lignées Huh7 et HepG2, le niveau d'expression de TRAF2 est réduit en présence de GSTP1, ce qui concorde avec les travaux de Wu *et al.* (2006) et confirme le rôle inhibiteur de la GSTP1 vis-à-vis de TRAF2 dans ces cellules. La protéine TRAF2 est impliquée dans l'activation de deux voies de signalisation qui présentent des fonctions opposées : JNK (induction de l'apoptose) et NF $\kappa$ B (induction de la prolifération). Au sein de la première voie, l'activation de JNK par TRAF2 nécessite la phosphorylation de la protéine ASK1 et permet d'induire l'apoptose (Nishitoh *et al.*, 1998). Au cours de ces événements, la protéine GSTP1 joue donc un rôle protecteur vis-à-vis de l'apoptose en inhibant les activités de TRAF2 et JNK. Ceci a été mis en évidence dans plusieurs travaux. Par exemple, dans les cultures primaires d'hépatocytes de rat, le DMSO (Diméthylsulfoxyde) augmente l'expression des GSTs, dont la GSTP1 qui inhibe la voie ASK1/JNK et protège les cellules de l'apoptose (Gilot *et al.*, 2002). Dans les cellules NIH3T3, l'induction de la production d'ERO par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entraîne la dissociation des complexes JNK-GSTP1 et l'activation de JNK. L'activation de c-jun qui en résulte augmente la transcription et l'expression de la GSTP1. Cette dernière va inhiber l'activité de JNK et activer p38 et ERK pour permettre de réduire la mort cellulaire induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yin *et al.* 2000). La GSTP1 est aussi impliquée dans la protection de l'apoptose induite

par les UV dans les cellules SH-SY5Y (Castro-Caldas *et al.*, 2009) et par l'arsenic dans les cellules de cancer de la prostate (Lu *et al.*, 2004). L'étude présente ne montre pas de différence de mort cellulaire en présence ou en absence de GSTP1. Toutefois, il existe une différence importante entre notre étude et les travaux précédemment cités ; en effet, dans nos conditions, les cellules ne sont pas stressées contrairement aux autres études qui utilisent des inducteurs de l'apoptose (UV, arsenic, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ...). Une étude confirme l'effet du stress dans le rôle protecteur de la GSTP1 vis-à-vis de l'apoptose. En effet, cette étude montre que l'inhibition de la GSTP1 augmente le niveau d'apoptose quand les cellules sont ensemencées à faible densité et cultivées avec de faibles quantités de sérum, mais que cette inhibition n'a pas d'effet sur l'apoptose lorsque les cellules sont cultivées dans les conditions de croissance standard (Dang *et al.*, 2005).

Par ailleurs, notre étude suggère que le niveau d'expression de la GSTP1 est important pour détecter un effet sur la prolifération cellulaire ou la modulation des voies de signalisation. Par exemple, la surexpression de la GSTP1 par le pcDNA dans les cellules HepG2 ne suffit pas pour inhiber la phosphorylation de JNK, alors que le niveau plus important d'expression dans les cellules transfectées avec pcEP4 GSTP1, permet d'inhiber l'activation de JNK. Cependant, nous n'avons pas établi le pourcentage de cellules transfectées. De même, il semble que l'effet de la GSTP1 sur la prolifération cellulaire soit dépendant de la quantité. En effet, suite à une infection par le shARN, nous avons effectué un tri cellulaire et isolé des cellules exprimant très fortement ou plus faiblement la GFP. Les niveaux de prolifération étaient corrélés au niveau d'expression de la GFP dans les premiers temps après transfection. De façon intéressante, grâce au suivi de la protéine GFP intégrée au shARN, on observe une diminution du nombre de cellules GFP positives et on remarque que les cellules qui prolifèrent sont les cellules GFP négatives, donc celles qui expriment la GSTP1. Nous avons de plus constaté que l'activation de JNK, ATF2, ATF3 et p21 est plus faible dans la condition MOI 5 par rapport aux autres conditions (MOI 10 et 20). La difficulté d'obtenir un phénotype stable ou une efficacité de transfection et d'extinction semblable d'une expérience à l'autre nous a conduits à obtenir des résultats hétérogènes.

## **VI. Conclusion**

En conclusion, cette étude montre l'implication de la GSTP1 dans la prolifération, mais pas dans la mort, des cellules cancéreuses étudiées en conditions normales. La GSTP1 influence l'activation de différentes voies de signalisation dont JNK et TRAF2 ; l'activation de la voie JNK étant associée à l'inhibition de la prolifération cellulaire. Nos résultats suggèrent également un effet dépendant de la quantité de cette protéine sur les fonctions cellulaires. Des controverses sont toujours d'actualité concernant le niveau d'expression de la GSTP1 dans les tumeurs. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre le rôle de la GSTP1 dans le contexte cancéreux, ainsi que les voies de signalisation associées.

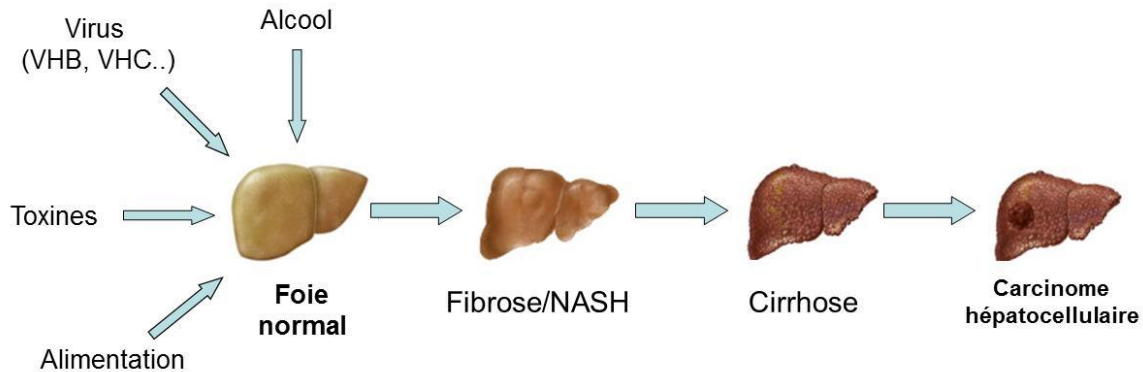
## **Chapitre 3 :**

Etude de l'expression d'enzymes de  
biotransformation dans le carcinome  
hépatocellulaire



# I. Introduction

Le foie peut être le siège de nombreuses pathologies, infectieuses, métaboliques, génétiques ou environnementales, dont une partie est listée ci-dessous (Figure 32).



**Figure 32 :** Evolution des pathologies hépatiques chez l'Homme

Les différents stimuli et les différentes étapes conduisant au développement d'un CHC. VHB : virus de l'hépatite B ; VHC : virus de l'hépatite C ; NASH : Non alcoholic Steatohepatitis.

## A. Stéatose

La balance entre synthèse/absorption et hydrolyse/sécrétion des triglycérides est critique dans le maintien de l'homéostasie lipidique au niveau hépatique (Koo, 2013). La stéatose hépatique se caractérise par une accumulation de lipides, qui favorise le développement des pathologies hépatiques comme la NASH (Non alcoholic Steatohepatitis) ou la cirrhose (Browning *et al.*, 2004). En effet, l'accumulation de lipides s'accompagne d'une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation par l'intermédiaire de l'induction des cytokines pro-inflammatoires et d'une résistance à l'insuline dans les hépatocytes (Stefan *et al.*, 2008).

## B. Cirrhose

La cirrhose est le stade ultime des maladies hépatiques chroniques. Elle est caractérisée par des déficiences hépatiques importantes, une inflammation et une structure anormale. Suite à l'exposition à des surdoses d'alcool, de toxiques ou de médicaments, ou comme conséquence d'une hépatite, les cellules étoilées vont se différencier en myofibroblastes et produire de la matrice extracellulaire en abondance. Cette matrice fibrotique va se déposer et ne pas être

dégradée. En effet, les inhibiteurs des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (TIMPs, Tissue Inhibitors of Metalloproteinase) sont inactivés dans ces conditions (Henderson *et al.* 2007). Cette fibrose entraîne l'apparition de nodules dysplasiques puis le développement d'un CHC. L'accumulation de graisse dans le foie, qu'elle soit due (NASH) ou non à l'alcool (stéatose), initie également tout ce processus qui aboutit au développement d'un cancer hépatique.

### **C. Le carcinome hépatocellulaire**

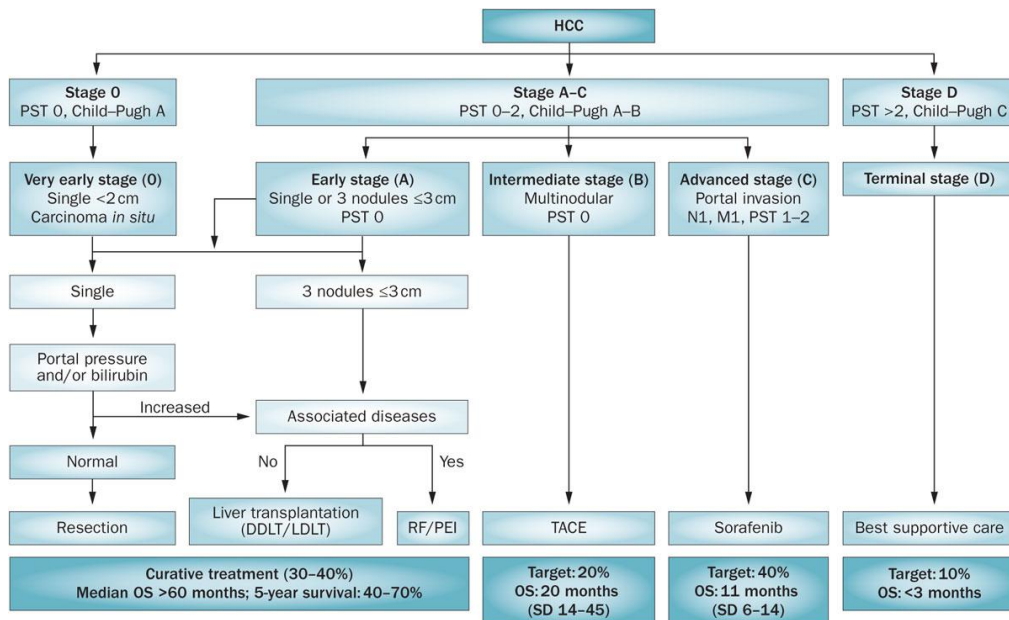
Les tumeurs du foie peuvent être bénignes ou malignes, primitives ou secondaires. Les tumeurs bénignes sont le plus souvent asymptomatiques et sans retentissement sur la fonction hépatique. A l'inverse, les tumeurs malignes, comme le CHC, ont des répercussions sur les fonctions hépatiques et le fonctionnement global de l'organisme. Dans les premiers stades, le CHC est asymptomatique et donc difficile à détecter. Puis différents symptômes peuvent se manifester : fièvre, amaigrissement, jaunisse, ascites, splénomégalie ou œdèmes (Sun *et al.*, 2008).

Le CHC représente 80% des tumeurs primitives du foie et se développe le plus souvent sur un foie cirrhotique. En 2010 en France, près de 8 000 nouveaux cas ont été découverts. Parmi l'ensemble des cancers, le CHC est celui qui présente un lien le plus fréquent avec l'obésité et les anomalies métaboliques associées, telle que le diabète. En effet, l'obésité et le diabète induisent le développement des CHC en créant une inflammation chronique due au phénomène de résistance à l'insuline, à l'activation de l'axe IGF/IGF-1R (Insulin-like Growth Factor) et à l'accumulation de lipides (Shimizu *et al.* 2013).

En raison de la forte résistance de ces cancers aux chimiothérapies, les traitements les plus efficaces sont la résection (ou hépatectomie) et la transplantation. Celles-ci sont notamment possibles grâce à la capacité unique de régénération du foie, mais le taux de récurrence reste toutefois important avec 70% de récurrence pour la résection et 25% pour la transplantation (Forner *et al.*, 2012). Il existe des traitements locaux qui permettent de cibler la tumeur. Parmi les techniques d'ablation locale, l'ablation par radiofréquence est une technique de traitement thermique qui induit la destruction de la tumeur en augmentant la température du tissu (> 60°C) (Minami *et al.*, 2011). Des injections percutanées d'éthanol peuvent aussi être



réalisées directement au sein des tumeurs pour détruire les cellules cancéreuses (Shiina *et al.* 2012). Ces traitements, moins invasifs que la résection, ne peuvent être utilisés que sur des CHC précoces. Enfin, la chimio-embolisation induit une nécrose tumorale via une ischémie (absence d'oxygène) et l'utilisation de molécules chimio-thérapeutiques. La classification Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC) permet de diviser les patients atteints de CHC en 5 stades et de leur associer des traitements en fonction des variables pronostic (taille de la tumeur, nombre, invasion vasculaire,...) et des variables dépendantes du traitement (bilirubine, hypertension portale,...) (EASL-EORTC, 2012) (Figure 33).



**Figure 33 :** Système de classification BCLC et stratégies de traitement des CHC

Cette classification permet de séparer les patients atteints de CHC et d'y associer des traitements. PST : Performance status test ; DDLT : Deceased Donor Liver Transplantation ; LDLT : Living Donor Liver Transplantation ; RF : Radiofrequency ; PEI : Percutaneous Ethanol Injection ; TACE : Transcatheter Arterial Chemoembolization OS : Overall Survival ( EASL-EORTC, 2012).

Il existe des traitements anticancéreux ciblés sur des protéines spécifiques, telles que les protéines pro-angiogéniques, les facteurs de croissance et la télomérase, qui sont actuellement en essai clinique. Seulement un seul traitement ciblé, le Sorafenib (juin 2007) est actuellement sur le marché. Ce traitement a montré des résultats concluants avec des médianes de survie et de progression significativement rallongées (Llovet *et al.*, 2008). Cette molécule possède plusieurs effets, dont l'inhibition de la voie de signalisation ras-MAPK (Mitogen-Activated

Protein Kinase) (prolifération) et le blocage du récepteur au VEGF/PDGF (Vascular Endothelial Growth Factor/ Platelet-derived Growth Factor) (angiogénèse).

#### ***D. Le processus de biotransformation***

Comme nous l'avons mentionné, les CHC sont des cancers fortement résistants aux chimiothérapies alors que le foie est un des organes majeurs impliqués dans le métabolisme des médicaments. Parmi les facteurs qui régissent cette résistance, il existe des facteurs cellulaires. Ces facteurs sont liés à la cellule tumorale elle-même et font intervenir plusieurs mécanismes : 1) la pénétration du médicament dans la cellule tumorale où il doit se maintenir suffisamment longtemps pour être actif, 2) le métabolisme des anti-cancéreux (activation, inactivation), 3) les cibles cellulaires et les processus de réparation de l'ADN.

Dans le foie normal, le procédé de biotransformation très actif permet de modifier la structure chimique des molécules pour les rendre solubles, augmenter leur élimination, et diminuer leur demi-vie et leur toxicité. Il peut également contribuer à la production de métabolites actifs.

## **II. Objectifs de l'étude**

Le niveau d'expression de la GSTP1 est très variable en fonction des types de cancers. Dans le cadre de ma thèse, nous avons montré qu'outre ses fonctions de biotransformation, la GSTP1 participe au contrôle de la prolifération hépatocytaire. Absente dans les hépatocytes normaux, elle est induite au cours du développement et de la régénération hépatique. Basé sur ces observations, nous nous sommes posé plusieurs questions : la perte de la différenciation hépatocytaire associée à la progression des CHC est-elle accompagnée par une variation de l'expression des enzymes de biotransformation dont la GSTP1 ? Ce processus est-il associé à la nature résistante des CHC ? Dans ce contexte, nous avons réalisé des études non supervisées puis supervisées afin d'établir une liste d'enzymes qui présentaient une expression différentielle entre des CHC et du tissu non-tumoral adjacent. Enfin, l'abondance des transcrits de certains gènes intervenant dans le processus de biotransformation a été recherchée dans des CHC et leurs tissus adjacents. Les protéines étudiées sont des enzymes de biotransformation de phases I et II métabolisant différents substrats dont des molécules anticancéreuses (Tableau 3).

**Tableau 3** : Exemples de molécules cibles métabolisées par les différentes enzymes de biotransformation étudiées

<b>Enzymes</b>	<b>Molécules métabolisées</b>	<b>Fonction/Action</b>	<b>Références</b>
<b>UGT1A9</b>	Sorafenib	Anticancéreux ; Inhibiteur de protéines kinases	(Peer <i>et al.</i> , 2012)
	Irinotecan	Anticancéreux ; Inhibiteur de l'ADN topoisomérase I	(Gagné <i>et al.</i> , 2002)
	Flavopiridol	Anticancéreux ; Inhibiteur des cdk's Anesthésique avec effets anticancéreux	(Ramírez <i>et al.</i> , 2002)
	Propofol	Antalgique	(Court, 2005)
	Acetaminophen		(Court <i>et al.</i> , 2001)
<b>GSTA4</b>	4-HNE	Produit de peroxydation lipidique	(Awasthi <i>et al.</i> , 2004)
	Cisplatine	Anticancéreux ; Fixation à l'ADN	(Kalinina <i>et al.</i> , 2012)
	Doxorubicine	Anticancéreux ; Intercalant de l'ADN	(Kalinina <i>et al.</i> , 2007)
<b>GSTA1/A2</b>	Cyclophosphamide	Anticancéreux ; Inhibition de la transcription et réplication de l'ADN	(Ekhart <i>et al.</i> , 2008)
	Busulfan	Anticancéreux/Carcinogène ; Alkylation de l'ADN	(Czerwinski <i>et al.</i> , 1996)
<b>MDR1</b>	Large spectre de molécules	Export de molécules conjuguées ou non par les enzymes de phase II	(Deeley <i>et al.</i> , 2006)
<b>GSTP1</b>	Cisplatine	Anticancéreux ; Fixation à l'ADN	(Kalinina <i>et al.</i> , 2012)
	Doxorubicine	Anticancéreux ; Intercalant de l'ADN	(Kalinina <i>et al.</i> , 2007)
	Cyclophosphamide	Anticancéreux ; Inhibition de la transcription et réplication de l'ADN	(Ekhart <i>et al.</i> , 2008)
<b>CYP17A1</b>	Catalyse la formation de tous les androgènes endogènes ; l'inhibition de cette enzyme bloque la biosynthèse des androgènes et permet de traiter le cancer de la prostate résistant à la castration.		(Porubek, 2013) (DeVore <i>et al.</i> , 2012)

### III. Matériel et Méthodes

Méta-analyse : A partir des données d'expression publiées par Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2004, 2006), une analyse non-supervisée et une analyse supervisée ont été réalisées entre 10 foies NT, 60 foies PT et 139 foies T, afin d'étudier l'expression des gènes impliqués dans le processus de biotransformation.

Echantillons : Une cohorte de foies humains histologiquement normaux et pathologiques, provenant du Centre de Ressources Biologiques (CRB) de Rennes a permis de réaliser les études suivantes. L'abondance des transcrits des cibles a été comparée entre des foies non-tumoraux (NT), des foies tumoraux (T) et leurs tissus adjacents (PT). Un nombre restreint d'échantillons différents a servi à cette étude (NT n=13, PT n=21 et T n=23). Les échantillons présentent les caractéristiques suivantes (Tableau 4) et le tissu péritumoral est prélevé à plus de 2 cm de la tumeur.

**Tableau 4** : Description des principales caractéristiques des patients et des échantillons

Age (> 65 ans)	Homme	Alcool	Cirrhose	Hémochromatose
8/20	20/21	14/18	15/20	3/14

Score de Child	Taille des tumeurs	Nombre de nodules	Degrés de différenciation
A : 9/10 C : 1/10	Entre 1,4 et 17 cm	Entre 1 et 10	0 > 7 ; 1 > 6 2 > 4 ; 3 > 2

Analyse par Q-RT-PCR : 10 ng d'ARNm extraits des différents foies ont été utilisés pour réaliser des q-RT-PCR et analyser l'abondance des transcrits. Les technologies Taqman et SybrGreen ont été utilisées pour étudier les cibles suivantes : MDR1, UGT1A9, GSTA1/A2, CYP17A1, GSTA4, et GSTP1 (Tableau 5). L'expression de l'ARN ribosomal 18S a servi de référence. Le thermocycleur StepOnePlus<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) a permis de réaliser les q-RT-PCR.

**Tableau 5** : Séquences des amorces SybrGreen et références des amorces Taqman utilisées

Gènes	Amorce Sens (5' > 3')	Amorce Antisens (5' > 3')
18S	CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC	TTG GCA AAT GCT TTC GCT C
UGT1A9	AAACCCGTGATGCCCAAC	GGCTTCAAATTCCATAGGCAAC
GSTA1/A2	GC AAC AAT TAA GTG CTT TAC CTA AGT G	TA ACT AAG TGG GTG AAT AGG AGT TGT ATT
MDR1	GACATGACCAGGTATGCCTA	CTTGAGACATCATCTGTAAGTC
Gènes	Nomination Applied	Référence Taqman
18S	RN18S1	Hs03928985_g1
GSTP1	GSTP1	Hs00168310_m1
CYP17A1	CYP17A1	Hs01124136_m1
GSTA4	GSTA4	Hs00155308_m1

Analyses statistiques : Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney en utilisant le logiciel GraphPad 5.0®.

## IV. Résultats

### A. Identification par méta-analyse d'enzymes de biotransformation différenciellement exprimées dans les CHC

A partir des données d'expression publiées par Lee *et al.* (Lee *et al.* 2006 ; Lee *et al.* 2003), une analyse non-supervisée a été réalisée par Cédric Coulouarn (équipe 4, UMR991) afin d'identifier un ensemble de gènes présentant une expression différentielle entre des CHC et du tissu non-tumoral adjacent (n=149 patients). Un test univarié a permis d'identifier 1127 gènes avec une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 et un fold-change absolu supérieur à 1,5. Parmi ces gènes, 18 sont impliqués dans le processus de biotransformation et au sein de ce groupe de 18 gènes, 2 sont surexprimés dans le tissu tumoral par rapport au tissu péri-tumoral (GSTA4, CYP17A1) et 16 sont réprimés (Tableau 6).

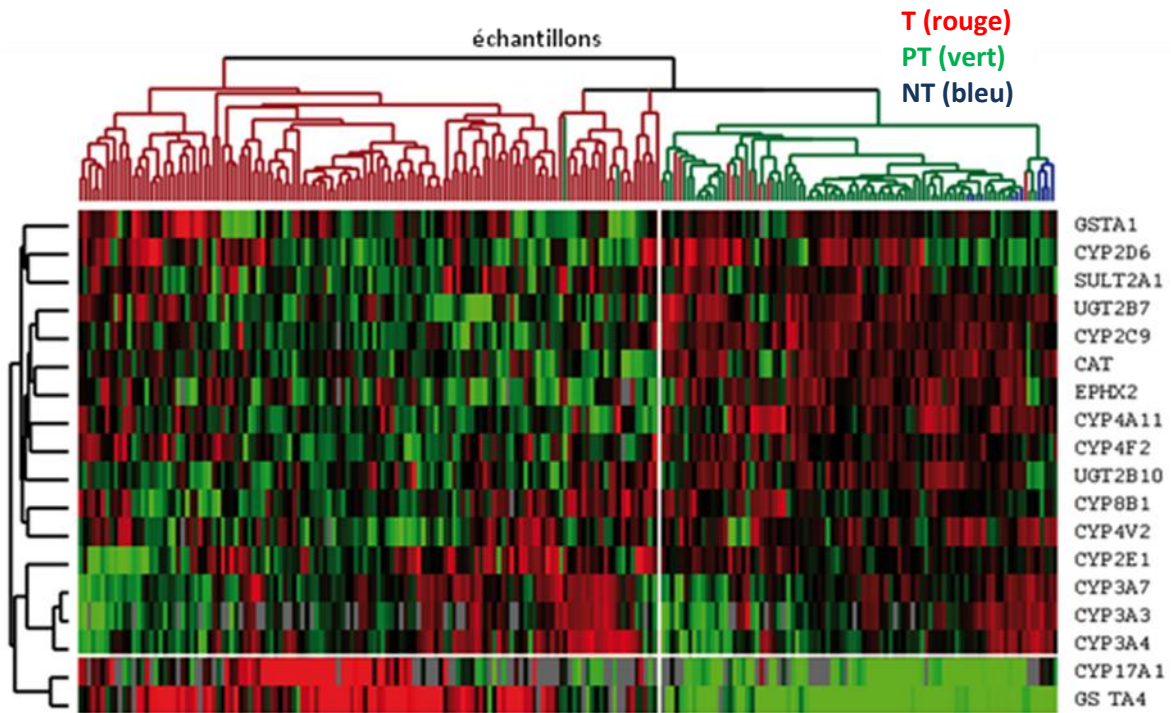
Dans un deuxième temps, une analyse supervisée a permis d'étudier l'expression de 163 gènes impliqués dans le processus de biotransformation. Parmi ces 163 gènes, 18 sont modulés dans le tissu tumoral (T) par rapport au tissu péri-tumoral (PT) avec une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 et un fold-change absolu supérieur à 1,5. La liste de gènes est identique à celle obtenue avec l'analyse non-supervisée (Tableau 7). De plus, le clustering montre que l'ensemble de ces gènes est capable de discriminer les tissus tumoraux, des tissus péri- et non-tumoraux (Figure 34).

**Tableau 6** : Résultats de l'analyse non-supervisée PT vs. T

Gène	T	PT	Fold-change
<b>GSTA4</b>	1,84	1,09	1,69
<b>CYP17A1</b>	1,45	0,96	1,5
<b>CYP4V2</b>	0,43	0,92	0,47
<b>EPHX2</b>	0,54	1,21	0,45
<b>CYP3A4</b>	0,15	0,34	0,44
<b>CYP8B1</b>	0,43	0,97	0,44
<b>UGT2B10</b>	0,51	1,25	0,41
<b>CYP4F2</b>	0,42	1,13	0,37
<b>SULT2A1</b>	0,38	1,06	0,36
<b>CAT</b>	0,41	1,2	0,34
<b>CYP4A11</b>	0,53	1,54	0,34
<b>CYP2E1</b>	0,31	0,97	0,32
<b>CYP3A3</b>	0,14	0,43	0,32
<b>CYP2D6</b>	0,48	1,57	0,31
<b>CYP3A7</b>	0,13	0,41	0,31
<b>GSTA1</b>	0,28	1,02	0,28
<b>CYP2C9</b>	0,27	1,24	0,22
<b>UGT2B7</b>	0,2	1,04	0,19

**Tableau 7** : Résultats de l'analyse supervisée NT vs. PT vs. T

Gène	T	PT	Fold-change
<b>GSTA4</b>	1,87	1,02	1,82
<b>CYP17A1</b>	1,46	0,84	1,75
<b>CYP2D6</b>	0,93	2,26	0,41
<b>CYP8B1</b>	0,62	1,06	0,59
<b>SULT2A1</b>	0,57	1,16	0,50
<b>CYP4F2</b>	0,51	1,04	0,49
<b>UGT2B10</b>	0,51	1,07	0,48
<b>CYP2E1</b>	0,51	0,99	0,51
<b>EPHX2</b>	0,49	0,98	0,50
<b>CYP3A4</b>	0,41	0,63	0,65
<b>CYP4V2</b>	0,40	0,76	0,53
<b>CYP4A11</b>	0,40	1,00	0,40
<b>CYP3A7</b>	0,37	0,67	0,55
<b>GSTA1</b>	0,37	0,82	0,45
<b>CYP3A3</b>	0,33	0,59	0,56
<b>CYP2C9</b>	0,33	1,06	0,31
<b>CAT</b>	0,32	0,82	0,39
<b>UGT2B7</b>	0,27	0,95	0,29



**Figure 34:** Clustering hiérarchique des données de la méta-analyse de l'expression des gènes de détoxification dans des foies NT ainsi que dans des foies PT et T provenant de CHC  
 Les échantillons et les gènes présentant des profils d'expression similaires sont regroupés comme indiqué par les dendrogrammes. Dans la matrice d'expression, les gènes les plus exprimés et les gènes moins exprimés sont indiqués respectivement en rouge et en vert.

### ***B. Expression de certaines enzymes de biotransformation dans une cohorte de CHC issue du Centre de Ressources Biologiques de Rennes***

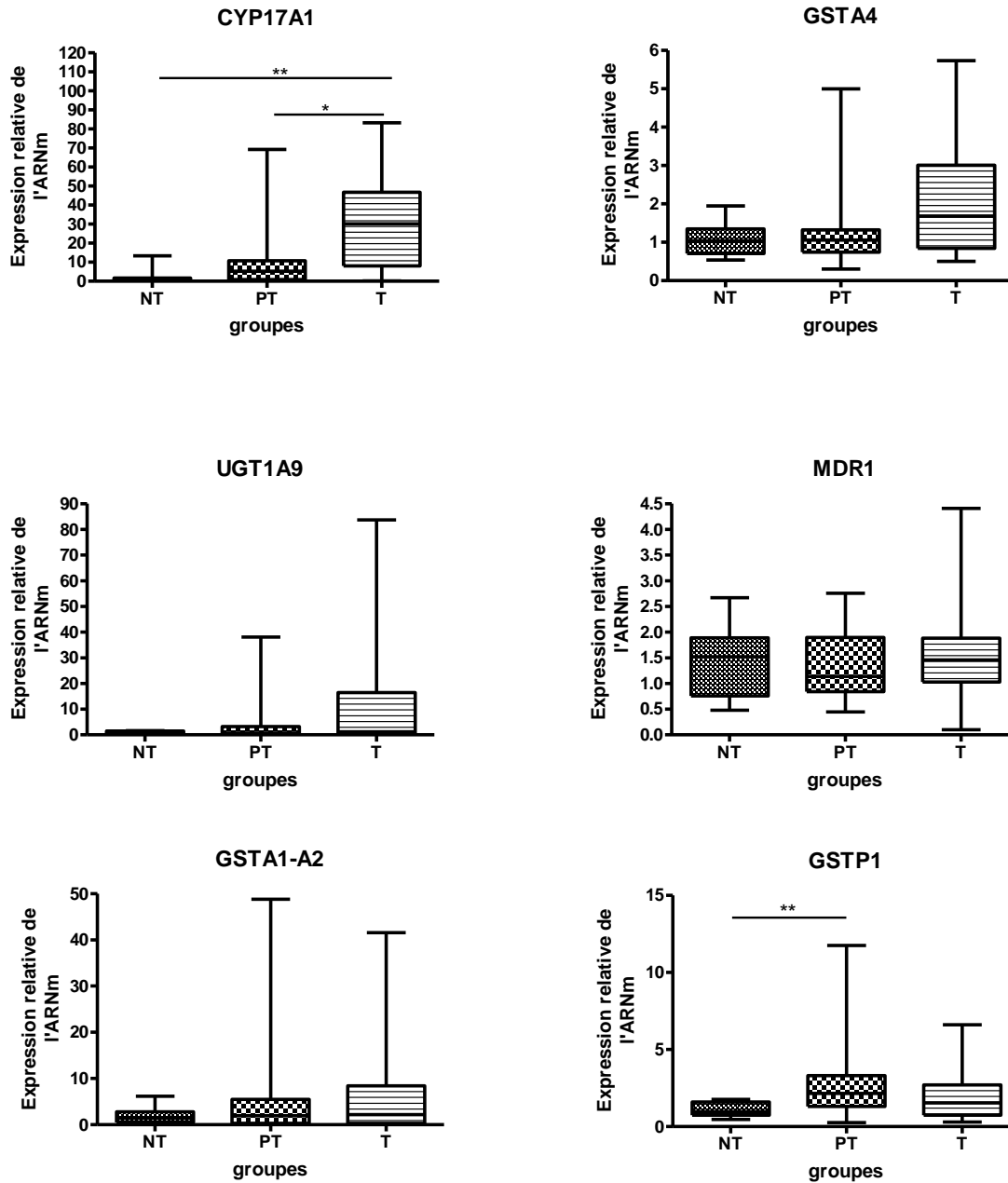
Une évaluation de l'abondance des transcrits des gènes *gstA1/a2*, *gstA4*, *gstM1*, *gstI1*, *gstZ1* et *gstP1* avait déjà été effectuée de façon préliminaire dans 18 CHC et leur tissus adjacents, au cours d'une thèse réalisée en 2008 dans notre équipe (Thèse Hanane Akhdar, 2008). Il a alors été mis en évidence que les gènes *gstA1/a2* et *gstZ1* étaient moins exprimés dans le tissu tumoral par rapport au tissu non-tumoral adjacent ( $p < 0,05$ ). Une augmentation non-significative d'expression des transcrits de la GSTA4 et une diminution non-significative des transcrits des GSTM1 et GSTP1 dans le tissu tumoral ont aussi été observées.

A partir des résultats de la méta-analyse et dans le prolongement de ces résultats, j'ai

effectué une étude portant sur les gènes suivants : le *cyp17A1* et la *gsta4* appartenant à la liste des gènes obtenus lors de la méta-analyse, les *gsta1/a2* et *gstp1* étudiées préalablement, le transporteur *mdr1* et l'*ugt1a9*. Toutes ces enzymes, à part le CYP17A1, sont impliquées dans la détoxification d'agents anticancéreux et sont donc susceptibles d'entraîner une résistance s'ils sont surexprimés. Le CYP17A1 est quant à lui impliqué dans la synthèse d'hormone stéroïdes à partir du cholestérol et plus particulièrement la transformation de la pregnenolone en hydroepiandrosterone (DHEA).

Les analyses qPCR montrent une forte hétérogénéité dans l'expression des différents gènes sélectionnés dans la cohorte étudiée (Figure 35). Elles ne montrent pas de différences significatives dans l'expression de la GSTA4, des GSTA1/A2, du MDR1 et de l'UGT1A9 entre les échantillons NT, PT et T. Par contre, on observe une augmentation significative des transcrits du CYP17A1 dans le tissu tumoral par rapport au tissu non-tumoral et au tissu péri-tumoral. Ces résultats concordent avec la méta-analyse décrite précédemment. A l'inverse, la surexpression de GSTA4 constatée dans la méta-analyse dans le tissu tumoral n'est pas retrouvée dans notre cohorte alors qu'une augmentation était observée dans l'analyse réalisée par Hanane Akdhar. De façon intéressante, une expression de GSTP1 plus importante est observée dans le tissu péri-tumoral par rapport au tissu non-tumoral. Aucune autre différence significative n'est retrouvée.





**Figure 35 :** Représentation des variations de l'abondance des transcrits des enzymes de détoxication CYP17A1, GSTA4, UGT1A9, MDR1, GSTA1/A2 et GSTP1 ont été étudiés dans des échantillons de foies non-tumoraux (NT), des foies péri-tumoraux (PT) et tumoraux (T). \* P<0,05 ; \*\* P<0,01. (13 NT, 21 PT et 23 T)

## V. Discussion et Conclusions

Le foie est l'organe majeur impliqué dans le processus de détoxication. Dans le cytosol des hépatocytes, les enzymes de détoxication représentent un pourcentage important du contenu protéique. L'activité de ces enzymes est primordiale pour protéger l'organisme de la toxicité de certaines molécules exogènes comme endogènes. Toutefois, elle peut aussi avoir l'effet inverse, en favorisant l'élimination des agents chimio-thérapeutiques et en réduisant ainsi leur action anticancéreuse. Par exemple, la protéine GSTP1 est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers (sein, poumon, côlon...) (Doğru-Abbasoğlu *et al.*, 2002; Unsal *et al.*, 2003) et il existe une corrélation positive entre le niveau d'expression de cette enzyme et la résistance des tissus aux anticancéreux (Jardim *et al.*, 2012).

La méta-analyse a mis en évidence que peu d'enzymes de détoxication sont différentiellement exprimées dans les CHC. Nous retrouvons réprimés les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, dont le plus abondant au niveau du foie le CYP3A4 et son variant le CYP3A3, les CYP2D6, CYP2E1, et CYP2C9. Des CYP impliqués dans le métabolisme des lipides comme le CYP4F2, le CYP4A11 le CYP4V2 et l'époxyde hydrolase (EPHX2) sont également réprimés. L'expression de la catalase, une enzyme antioxydante et l'expression de deux UDP Glucuronosyltransférases 2B7 et 2B10 sont diminués. Nous y trouvons également réprimée, la SULT2A1 (sulfonation des stéroïdes), la GSTA1 et le CYP8B1. Ce dernier est impliqué dans la conversion des acides biliaires. Plusieurs études montrent des résultats concordants avec notre étude (Chen *et al.*, 2002; Corona *et al.*, 2010; Okabe *et al.*, 2001; Tackels-Horne *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2008). Seules deux enzymes sont surexprimées dans les CHC, le CYP17A1, impliqué dans le métabolisme des androgènes et œstrogènes et la GSTA4, impliquée dans l'élimination du 4-HNE. Ce produit de peroxydation lipidique est impliqué dans le développement des cancers, notamment en formant des adduits avec l'ADN et en favorisant l'apparition de mutations (Hu *et al.*, 2002). La réduction d'expression de certaines enzymes de détoxication dans le CHC a déjà été démontrée (Maass *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2001). L'hypothèse formulée par ces auteurs suggère que la diminution de l'expression de ces enzymes est une conséquence de la modulation d'activité des facteurs de transcription qui a lieu au cours du développement des CHC.

L'analyse de l'abondance des transcrits dans des tissus hépatiques NT, PT et T issus de CHC n'a pas montré de différences significatives pour les gènes MDR1, GSTA1/A2, GSTA4 et UGT1A9. Pour GSTA1/A2 et GSTA4, les résultats présentés ici ne corrélaient pas avec l'étude menée précédemment (Thèse Hanane Akhdar, 2008) et avec la méta-analyse, respectivement. Ces différences sont probablement dues aux différences de caractéristiques des échantillons étudiés dans ces deux cohortes. Une autre différence importante est l'étiologie des CHC étudiés par rapport à ceux analysés dans la cohorte publiée par Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2004, 2006). En effet, plus de 70% de la cohorte provient de Chine (i.e. infection VHB), alors que l'étiologie des CHC issus de la cohorte du CRB de Rennes est majoritairement liée à la consommation d'éthanol.

En ce qui concerne l'expression du CYP17A1, les résultats concordent avec la méta-analyse avec une expression plus importante dans le tissu tumoral. Cette enzyme n'est pas impliquée dans le processus de détoxication, mais dans le métabolisme des androgènes à partir du cholestérol, mais il existe un lien entre la prolifération tumorale et l'expression de cette enzyme. En effet, il a été mis en évidence que l'inhibition de son expression traitait le cancer de la prostate résistant à la castration (DeVore *et al.*, 2012). De plus, le DHEA, qui est produit par le CYP17A1 lors de la synthèse des androgènes, joue un rôle de mitogène pour les hépatocytes dans certaines situations. En effet, l'injection de DHEA chez un rat induit une prolifération hépatocytaire alors qu'un prétraitement avant hépatectomie ralentit le processus de régénération hépatique (Kopplow *et al.*, 2005).

Enfin, nous avons étudié l'expression de la GSTP1 dans ces mêmes tissus. Dans la cohorte étudiée, la cirrhose est le facteur de risque majeur des CHC. Cette étude préliminaire met en avant une expression d'ARNm significativement plus importante dans le tissu péri-tumoral par rapport au tissu non-tumoral. Ceci corréla avec des travaux menés précédemment qui montrent une expression plus importante de la GSTP1 dans les foies cirrhotiques (Shen *et al.*, 2003; Yusof *et al.*, 2003). De même, une surexpression de la GSTP1 dans les CHC n'est observée que dans 25% des cas (Hayes *et al.* 1991). Depuis, des études ont démontré que l'hyperméthylation du promoteur de la GSTP1 était plus fréquente dans les CHC par rapport au tissu non-tumoral ou au foie cirrhotique. Cette hyperméthylation diminue l'expression de la GSTP1 dans ces tissus (Harder *et al.*, 2008; Tchou *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). Il semble

que la méthylation du promoteur de la GSTP1 fasse partie du processus de tumorigenèse dans le foie. Une étude récente révèle que la GSTP1 est fortement exprimé dans le microenvironnement des cancers du sein. En effet, les *Cancer Associated Fibroblast* (CAF) semblent protéger les cellules cancéreuses de sein, négatives pour la GSTP1, en augmentant la détoxification des agents chimio-thérapeutiques (Chaiwun *et al.*, 2011). Dans le foie, on peut envisager qu'un mécanisme similaire ait lieu et que l'expression de la GSTP1 constitue une barrière contre la chimiothérapie, augmentant ainsi la résistance de ces cancers aux traitements.

Une sous-population de cellules souches cancéreuses, les cellules ovales, a été identifiée dans les CHC (Chiba *et al.*, 2006). De façon intéressante, ces cellules présentent une résistance importante aux traitements anticancéreux (Xin *et al.*, 2013). En effet, plusieurs facteurs permettent à ces cellules d'acquérir cette résistance : dormance, niche vasculaire, stabilité hypoxique, expression de protéines anti-apoptotiques, expression de transporteurs d'efflux et augmentation de l'activité des enzymes de réparation (Vinogradov *et al.*, 2012). Il serait donc intéressant de regarder l'expression des enzymes de détoxification dans ces cellules et en particulier l'expression de la GSTP1. A ma connaissance, l'expression de cette dernière a été étudiée dans les cellules souches hématopoïétiques (Shao *et al.*, 2007) mais pas dans les cellules souches cancéreuses.

En conclusion, cette étude préliminaire nécessite d'être poursuivie en augmentant le nombre d'échantillons et en incluant des CHC d'étiologies différentes, notamment en faisant appel à d'autres CRB. Les premiers résultats sont hétérogènes en fonction du gène étudié. Toutefois, le CYP17A1 qui est sélectionné lors des méta-analyses et validé lors de l'analyse sur les tissus de CHC disponibles, conforte l'approche non-supervisée. Ces résultats mettent également en lumière que seules certaines enzymes de détoxification sont impliquées dans le processus de carcinogénèse et de résistance. Si ceux-ci se confirment, on pourrait donc en déduire que toutes les enzymes de détoxification ne sont pas en lien avec la carcinogénèse, ce qui est cohérent car elles ne possèdent pas les mêmes fonctions et les mêmes substrats.

# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



La compréhension des mécanismes qui régulent la prolifération cellulaire est importante, en particulier lors de processus de réparation tissulaire, mais également dans l'étude de la carcinogenèse. De nombreux acteurs régulant le processus de régénération hépatique ont été identifiés, cependant les mécanismes qui contrôlent la prolifération hépatocytaire sont complexes.

L'ensemble des résultats issus de mon travail de thèse nous a permis d'apporter des précisions concernant les mécanismes de prolifération des hépatocytes normaux et transformés, et plus particulièrement a permis de mettre en évidence l'implication de la GSTP1 dans ces mécanismes. Dans cette dernière partie, nous évoquerons les multiples fonctions de la protéine GSTP1, dont son rôle dans le métabolisme qui n'a pas été abordé auparavant. Nous évoquerons les travaux complémentaires à réaliser pour préciser le rôle de la GSTP1 dans ces mécanismes. Enfin, la relation entre les enzymes de détoxification et le CHC sera abordée.

## **La GSTP1 : une protéine aux multiples fonctions**

Afin d'étudier le rôle de la GSTP1 dans la prolifération cellulaire, nous avons utilisé deux modèles expérimentaux : des lignées de cellules cancéreuses humaines et le modèle d'hépatectomie des 2/3 chez la souris. Ces deux modèles nous ont permis de mettre en évidence un rôle pro-prolifératif de la GSTP1. En effet, nous avons observé une diminution du nombre de cellules en phase S chez les souris *Gstp1*<sup>-/-</sup> après hépatectomie, ainsi que dans les cellules cancéreuses dont l'expression de la GSTP1 a été invalidée.

Cette diminution de la prolifération cellulaire observée dans les cellules cancéreuses après inhibition de l'expression de la GSTP1 corrèle avec les résultats de Dang *et al.* qui montrent une diminution du nombre de cellules en phase S dans les cellules HCT116 (lignée de cellules cancéreuses du côlon) dont l'expression de la GSTP1 a été invalidée (Dang *et al.*, 2005). Cette inhibition de prolifération est associée à une induction de la voie de signalisation dépendante de JNK avec une expression plus importante de TRAF2, de p-JNK et de p-ATF2. Ces données corréleront avec le **rôle inhibiteur de la GSTP1 vis-à-vis des kinases JNK et TRAF2** (Adler *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2006). A l'inverse, p38, qui est aussi un activateur de c-jun et ATF2, n'est pas activé en absence de GSTP1. En aval d'ATF2, l'expression d'ATF3 est induite de façon plus importante en absence de GSTP1. Or, cette protéine inhibe la

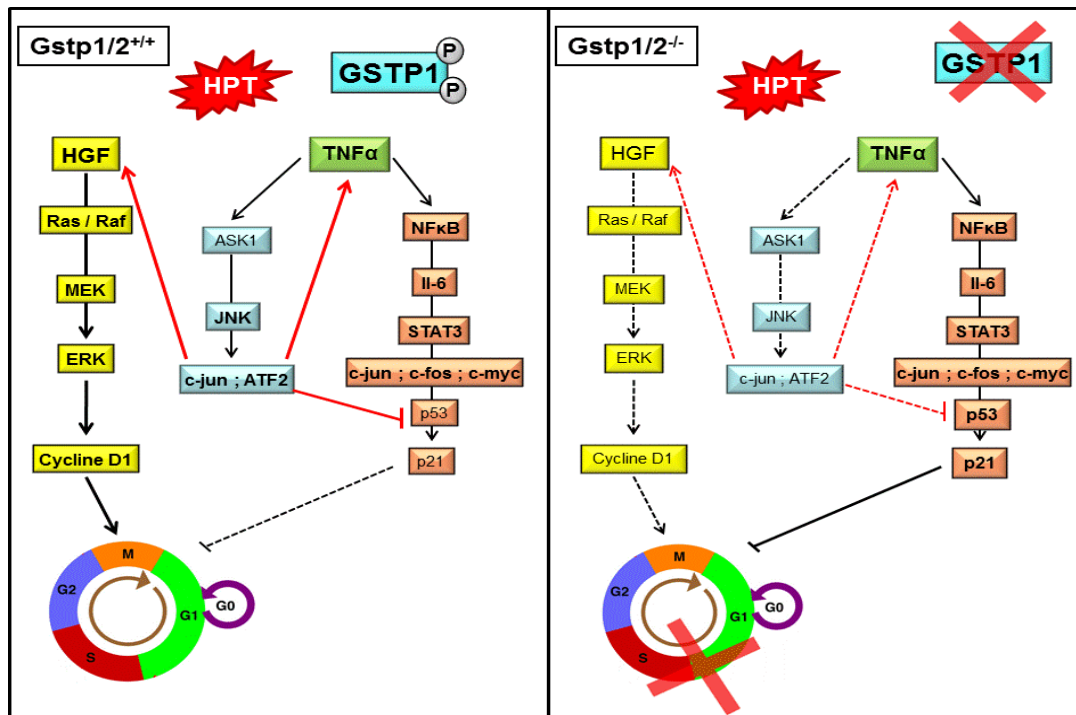
croissance cellulaire et ralentit la transition de la phase G1 vers la phase S (Lu *et al.* 2006; Fan *et al.* 2002), en induisant vraisemblablement l'expression de p21 (Oh *et al.*, 2008). Ici l'induction de p21 n'est pas associée à une modification de la mort cellulaire. Ce résultat ne corrèle pas avec le rôle des protéines JNK et TRAF2 dans la voie de signalisation induisant l'apoptose, ni avec les résultats de plusieurs études (Gilot *et al.* 2002; Yin *et al.* 2000; Lu *et al.* 2004), qui montrent un effet protecteur de GSTP1 vis-à-vis de l'apoptose. Cependant, contrairement à ces travaux, nos cellules ne sont soumises à aucun stress. A l'inverse, nos résultats concordent avec les résultats de Dang *et al.* qui montre que l'inhibition de la GSTP1 n'a pas d'influence sur l'apoptose lorsque la densité cellulaire est forte, mais que l'apoptose augmente quand la densité cellulaire est faible (Dang *et al.*, 2005).

Lors de notre étude *in vivo* chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*, nous avons mis en évidence que le défaut de régénération hépatique s'accompagne de dérégulations dans les profils d'activation des kinases de la voie des MAPK, ERK et JNK. Plus particulièrement, la réduction d'activation d'ERK observée chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* est accompagnée par un retard d'expression de la cycline D1 et de son partenaire cdk4, un défaut d'accumulation d'E2F1 et une diminution d'expression des cyclines E et A. En accord avec ces observations, il a été constaté une induction des cyclines D1 et E dans les hépatocytes dysplasiques exprimant la GSTP1 (Pok *et al.*, 2013). De plus, à l'inverse de ce qui est observé chez les souris sauvages, l'activation constitutive de JNK présente chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* est fortement réduite aux temps précoces après hépatectomie. Cette inhibition rapide de l'activation de JNK est corrélée à la diminution des formes actives de c-jun et ATF2, et est aussi associée à une augmentation des niveaux protéiques de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Toutefois chez ces souris l'augmentation de p21 est vraisemblablement induite par l'intermédiaire de l'activation précoce et importante de p53 (Stepniak *et al.*, 2006). De façon intéressante, tout comme dans les cellules cancéreuses, aucune induction de l'apoptose n'est observée chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* après hépatectomie. Il est à noter que lors de la régénération hépatique, de nombreux signaux hépato-protecteurs sont induits et peuvent contrecarrer les effets du maintien de p21 à des niveaux plus importants que dans la souris sauvage. Pour confirmer le rôle inhibiteur de p21 au cours de la prolifération cellulaire chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*, ainsi que dans les cellules cancéreuses invalidées pour la GSTP1, la réalisation d'immunoprécipitations nous permettrait de déterminer si cette protéine est liée à certains complexes cycline/cdk et d'identifier ces



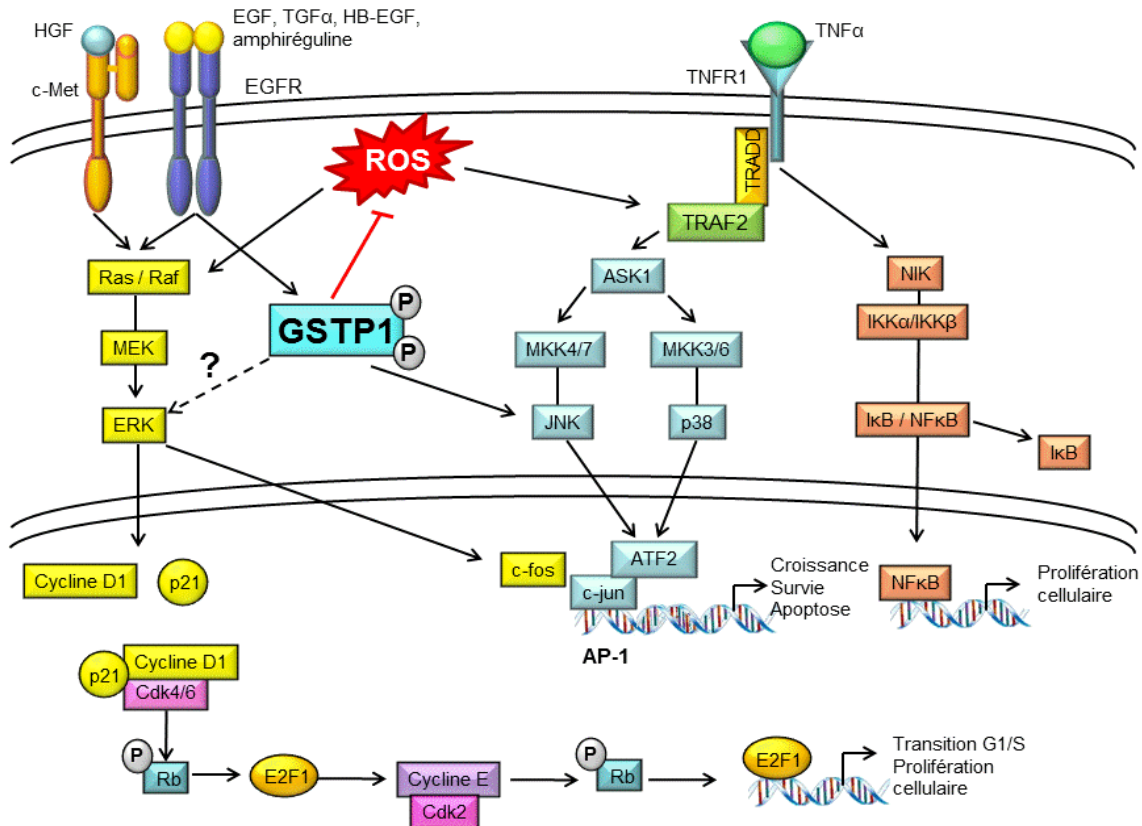
complexes. De même, des tests d'activité kinase seraient envisageables pour permettre d'évaluer l'activation des complexes cycline/cdk au cours du cycle cellulaire en absence de GSTP1/2.

Nous observons également une diminution de la fraction cytosolique de TRAF2 chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*, qui peut être la conséquence de deux phénomènes distincts : la translocation de TRAF2 du cytoplasme vers une fraction insoluble (raft lipidique) ou sa dégradation protéolytique (Fotin-Mleczek *et al.*, 2002). De plus, l'augmentation de l'expression de GSTmu chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* au cours du processus de régénération hépatique peut participer à l'inhibition de l'activité enzymatique d'ASK1 (Cho *et al.*, 2001). En accord avec les travaux de Gilot *et al.* (2002), nous observons que l'absence de GSTP1 entraîne une plus grande sensibilité des hépatocytes à l'apoptose lors de leur isolement. L'induction basale de JNK ainsi que de l'activité caspase 3 et l'absence des mécanismes hépato-protecteurs, qui permettent aux hépatocytes *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* de résister à l'apoptose dans un foie intact, peuvent en effet contribuer à l'accroissement de cette sensibilité. Les voies de signalisation JNK et ERK contribuent donc toutes les deux au retard de prolifération des hépatocytes chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*, en différant notamment le passage du point de restriction dépendant des mitogènes et la transition G1/S du cycle cellulaire (Figures 36-37). Dans ce contexte, la recherche de partenaires de la GSTP1 au moment du franchissement du point de restriction et lors de la transition G1/S serait informative.



**Figure 36 :** Evénements moléculaires intervenant au cours de la régénération hépatique chez les souris *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* et *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*. Après hépatectomie, les voies de signalisation sont différemment régulées entre les souris *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* et *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*. Certaines voies sont induites (trait plein) et d'autres sont réprimés (trait en pointillé).

Les mécanismes impliqués dans la prolifération des hépatocytes après hépatectomie et des cellules cancéreuses sont différents et, par conséquent, les profils d'expression et d'activation des différentes protéines au cours de la prolifération cellulaire dans ces deux modèles ne peuvent pas être directement comparés. De plus, même si les voies de signalisation ont été très conservées entre les espèces étudiées, elles présentent des différences dans les mécanismes de prolifération et de mort cellulaire, mais également dans l'expression de la GSTP1. En effet, alors que chez l'Homme et le rat la GSTP1 est absente dans les hépatocytes adultes, elle est présente dans les hépatocytes de souris. Enfin, d'un côté nous avons utilisé des cellules normales et de l'autre des cellules transformées, dont on sait qu'elles contiennent des mutations.



**Figure 37** : Représentation schématique de l'impact de la protéine GSTP1 dans les différentes voies de signalisation modulées au cours de la régénération hépatique. La dissociation des complexes GSTP1/JNK et GSTP1/TRAF2, ainsi que la phosphorylation de GSTP1 induite par l'activation du récepteur à l'EGF, entraîne l'activation des voies de signalisation et la prolifération des hépatocytes après HPT.

Au vu de ces résultats, deux questions se posent : **Comment la GSTP1 régule la voie ERK1/2 et pourquoi observe-t-on une diminution de l'activation de la voie JNK chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* après hépatectomie ?**

### GSTP1 et voie de signalisation ERK

Nous avons mis en évidence une réduction importante des niveaux d'activation d'ERK au cours de la régénération hépatique chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*. De plus, il a été montré que la voie MEK/ERK était impliquée dans la prolifération induite par la GSTP1 dans les cellules HCT116 (Dang *et al.*, 2005). En effet, l'utilisation de l'U0126, et par conséquent, l'inhibition de MEK dans les cellules GSTP1 positives entraîne une diminution de la prolifération cellulaire. Ces résultats suggèrent donc que la protéine GSTP1 régule l'activité d'ERK au

cours de la prolifération cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier le niveau d'activation de la voie ERK dans les cellules cancéreuses dans lesquelles l'expression de la GSTP1 est invalidée ou non.

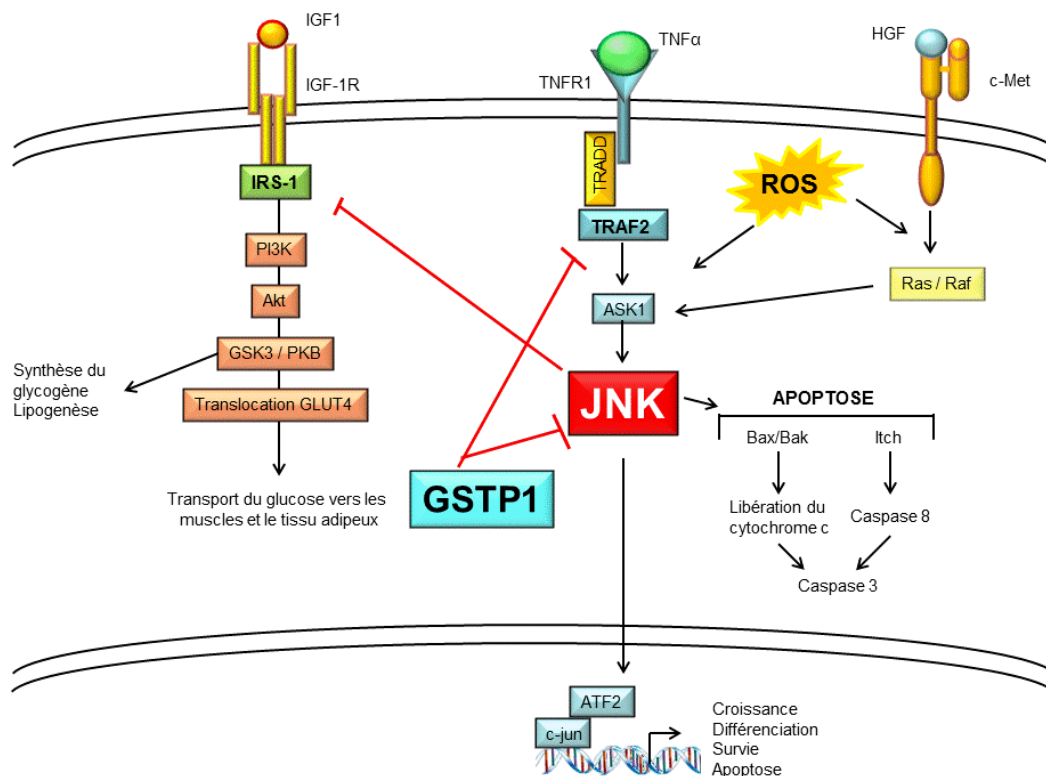
Les facteurs qui interviennent dans cette régulation n'ont pas été mis en évidence, mais plusieurs hypothèses sont envisageables : l'implication des facteurs de transcription AP-1 ou la réaction de S-glutathionylation. En effet, la protéine GSTP1 régule la voie de signalisation TRAF2/JNK/AP-1 et possède une fonction non-catalytique de **S-glutathionylation** (Klaus *et al.*, 2013; Ralat *et al.*, 2006). Il a été démontré que le promoteur d'ERK possède des séquences de liaison aux facteurs AP-1 et que la S-glutathionylation de Ras induit l'activation d'ERK (Pimentel *et al.*, 2006). Cette modification post-traductionnelle de S-glutathionylation cible de nombreuses protéines, comme les protéines de signalisation cellulaire, et modifie leurs structures et leurs activités (Pastore *et al.*, 2012). Plusieurs protéines directement impliquées dans le processus de régénération hépatique sont S-glutathionylées : AMPK (Merlen *et al.*, 2013), NFκB, p53, c-jun ou encore Keap1 (Pastore *et al.*, 2012). Dans le prolongement de cette hypothèse, il serait intéressant de comparer le taux de S-glutathionylation au cours de la régénération hépatique et de la prolifération des cellules cancéreuses entre les différentes conditions (invalidation ou surexpression des protéines GSTP1) et d'évaluer les cibles protéiques qui sont différentiellement modifiées entre les conditions.

### GSTP1 et voie de signalisation JNK

La protéine kinase JNK possède un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la survie, la mort par apoptose, l'angiogenèse ou encore la migration cellulaire (Figure 38). La durée d'activation de JNK est importante dans la discrimination entre son effet pro-prolifératif ou pro-apoptotique. La diminution d'activité de JNK observée chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* après hépatectomie (0,5h) pourrait être la conséquence d'une activation de phosphatases spécifiques des MAPK (MKP) (Boutros *et al.*, 2008) ou de l'activation des cibles de la voie NFκB, comme A20, GADD45β ou XIAP, qui ont pour fonction d'inhiber la voie apoptotique dépendante de JNK (Wullaert *et al.*, 2006). Les protéines c-jun, c-fos et ATF2 sont des cibles importantes de la kinase JNK et composent le facteur de transcription AP-1, qui joue un rôle important dans l'initiation de la transcription de gènes au cours de la

régénération hépatique et de la prolifération cellulaire. Dans ces conditions, l'analyse de l'activité de liaison d'AP-1 à l'ADN par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) permettrait d'évaluer le niveau d'activation de ce facteur de transcription.

La régénération hépatique entraîne de nombreuses modifications métaboliques, et en particulier, une accumulation de lipides au niveau hépatique qui est essentielle dans la prolifération des hépatocytes. En effet, l'inhibition de cette accumulation diminue fortement le taux de prolifération hépatocytaire (Shteyer *et al.*, 2004). Des observations similaires sont faites lorsque l'accumulation de lipides est trop importante (Leclercq *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2009). Ceci suggère qu'une régulation fine de la production lipidique au niveau hépatique est nécessaire au cours de la régénération hépatique. De façon intéressante, il a été montré que la protéine JNK joue un rôle central dans le métabolisme du glucose et des lipides, induit une résistance à l'insuline en inhibant l'interaction entre la récepteur à l'insuline et IRS-1 (Werner *et al.*, 2004) et participe au développement de l'obésité (Hirosumi *et al.*, 2002). Puisqu'une augmentation de prise de poids est observée chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* à partir de 6 mois (Henderson *et al.*, 1998) et que JNK est activée de façon constitutive chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* (Elsby *et al.*, 2003), nous avons réalisé une étude préliminaire en collaboration avec l'équipe 3 de l'unité afin de déterminer si la protéine GSTP1 est impliquée dans le **métabolisme des glucides et des lipides**. Les principaux résultats montrent une meilleure tolérance au glucose et une augmentation de la résistance à l'insuline, qui apparaît de façon transitoire, chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* après un régime hypercalorique de 10 semaines. Ceci suggère que le signal insulinémique est traité différemment chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*. Ces résultats préliminaires nécessitent de plus amples investigations, en particulier l'étude de l'expression des enzymes impliquées dans les voies de synthèse du glucose et des lipides, ainsi que l'étude du niveau d'activation de JNK par Western blot. Comme évoqué précédemment, de nombreuses protéines impliquées dans la sécrétion et la signalisation dépendante de l'insuline sont des cibles de S-glutathionylation (Mieyal *et al.*, 2008). Dans ces conditions, il serait intéressant d'évaluer le taux de S-glutathionylation de ces protéines entre les souris *Gstp1/2<sup>+/+</sup>* et *Gstp1/2<sup>-/-</sup>* avant et après le régime hypercalorique.



**Figure 38** : Rôle central de la protéine kinase JNK dans la signalisation cellulaire  
 La protéine kinase JNK régule de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation ou la mort. Elle participe aussi à la régulation du métabolisme des lipides et des glucides.

### GSTP1, ERO et activation des MAPK

Un mécanisme d'activation commun existe entre les voies ERK et JNK : l'activation des voies des MAPK par les ERO. Le stress oxydant joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et doit être finement régulé (Boonstra *et al.*, 2004). Plusieurs observations impliquent directement la protéine GSTP1 dans la **régulation du stress oxydant**. En effet, Dang *et al.* (2005) et Naiki *et al.* (2012) ont mis en évidence une induction du stress oxydant dans les cellules GSTP1 négatives. Après hépatectomie chez les souris *Gstp1/2<sup>-/-</sup>*, le décalage d'expression des enzymes antioxydantes est corrélé à une augmentation d'expression d'eNOS, à une diminution d'expression du facteur de transcription Nrf2 et à une diminution d'activation des MAPK. Ceci suggère que le stress oxydant est inhibé chez ces souris, ce qui est probablement la conséquence de l'induction de l'expression d'eNOS. Le NO produit par les synthèses eNOS et iNOS a en effet un rôle antioxydant important en inhibant la réaction de

Fenton et la peroxydation lipidique (Hummel *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2005) qui sont d'importants producteurs d'ERO, comme le radical hydroxyl.

### GSTP1 et CHC

Le CHC est un cancer fréquent qui possède un taux de mortalité élevé et montre une résistance importante aux agents anticancéreux, c'est pourquoi l'étude de l'expression d'enzymes de détoxification a été effectuée dans des CHC. Dans cette partie, je ne discuterai que les résultats concernant la GSTP1.

De façon intéressante, nous avons observé une différence significative d'expression de la GSTP1 entre les échantillons NT et PT, avec une expression plus importante dans le tissu PT. Etant donné que l'étiologie majeure de notre cohorte est la cirrhose, ces résultats corrélerent avec des études menées précédemment, qui démontrent une expression plus importante de la GSTP1 dans les foies cirrhotiques (Yusof *et al.*, 2003). Toutefois, dans les CHC, certaines controverses persistent car les niveaux d'expression de la GSTP1 varient fortement entre les différentes études. Il est à noter que la GSTP1 est depuis longtemps utilisée comme un marqueur des lésions préneoplasiques au cours de l'hépatocarcinogenèse chez le rat (Ogiso *et al.*, 1985). Le taux de prolifération des cellules GSTP1 positives est supérieur aux cellules GSTP1 négatives (Short *et al.*, 1997; Tsuchiya *et al.*, 2012).

L'expression ARNm ne corrèle pas toujours avec le niveau d'expression protéique. Pour cela, un immunomarquage de la protéine GSTP1 dans les tissus NT, PT et T issus de CHC nous aiderait à évaluer le niveau d'expression protéique et la localisation de cette protéine dans le tissu hépatique en fonction des conditions. Cette étude prend en compte un faible nombre d'échantillons qu'il faudrait accroître pour confirmer ces premiers résultats. De même, il a été montré que les CHC présentaient une sous-population de cellules souches (Chiba *et al.*, 2006) et que celles-ci possèdent une résistance importante aux anticancéreux (Xin *et al.*, 2013). Il serait donc intéressant de déterminer l'expression de la GSTP1 dans ces cellules. Connaissant le rôle inhibiteur de l'inflammation sur l'expression des enzymes de détoxification (Aitken *et al.*, 2006; Theken *et al.*, 2011), il serait important de définir le niveau d'inflammation présent dans les CHC en déterminant notamment l'expression de l'IL-6 et de la CRP (C Reactive Protein).

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle de la protéine GSTP1 dans la prolifération des hépatocytes normaux après hépatectomie et des cellules cancéreuses humaines. Une modulation d'activation des voies des MAPK, ERK et JNK, a été observée dans ces modèles en absence de la GSTP1, ce qui impacte sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire, en particulier au niveau du passage du point de restriction dépendant des mitogènes et de la transition G1/S. Dans les CHC, nous avons aussi mis en évidence une induction de l'expression de la GSTP1 dans le tissu péri-tumoral. Tous ces résultats ouvrent des perspectives qui ont été en partie évoquées ci-dessus et qui pourront faire l'objet de futures études.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



Abramovitz, M., Ishigaki, S., and Listowsky, I. (1989). Differential regulation of glutathione S-transferases in cultured hepatocytes. *Hepatology*. Baltimore, Md 9, 235–239.

Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., et al. (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 18, 1321–1334.

Aitken, A.E., Richardson, T.A., and Morgan, E.T. (2006). Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 123–149.

Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G.J., and Diehl, A.M. (1992). Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 263, G579–585.

Akyol, O., Herken, H., Uz, E., Fadillioğlu, E., Unal, S., Söğüt, S., Ozyurt, H., and Savaş, H.A. (2002). The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 26, 995–1005.

Ambrosino, C., and Nebreda, A.R. (2001). Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol. Cell* (Auspices Eur. Cell Biol. Organ.) 93, 47–51.

Anderson, G.J., and Frazer, D.M. (2005). Hepatic iron metabolism. *Semin. Liver Dis.* 25, 420–432.

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

Arai, M., Yokosuka, O., Chiba, T., Imazeki, F., Kato, M., Hashida, J., Ueda, Y., Sugano, S., Hashimoto, K., Saisho, H., et al. (2003). Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 278, 29813–29818.

Awasthi, Y.C., Yang, Y., Tiwari, N.K., Patrick, B., Sharma, A., Li, J., and Awasthi, S. (2004). Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 607–619.

Baddour, J.A., Sousounis, K., and Tsonis, P.A. (2012). Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 96, 1–29.

Bakker, J., Lin, X., and Nelson, W.G. (2002). Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 22573–22580.

Bammler, T.K., Smith, C.A., and Wolf, C.R. (1994). Isolation and characterization of two mouse Pi-class glutathione S-transferase genes. *Biochem. J.* 298 (Pt 2), 385–390.

Bass, R., Ruddock, L.W., Klappa, P., and Freedman, R.B. (2004). A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J. Biol. Chem.* 279, 5257–5262.

- Bedossa, P., and Paradis, V. (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* *200*, 504–515.
- Behrens, A., Sibilila, M., David, J.-P., Möhle-Steinlein, U., Tronche, F., Schütz, G., and Wagner, E.F. (2002). Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J.* *21*, 1782–1790.
- Berasain, C., García-Trevijano, E.R., Castillo, J., Erroba, E., Lee, D.C., Prieto, J., and Avila, M.A. (2005). Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* *128*, 424–432.
- Beuckmann, C.T., Fujimori, K., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem. Res.* *25*, 733–738.
- Beyer, T.A., Xu, W., Teupser, D., auf dem Keller, U., Bugnon, P., Hildt, E., Thiery, J., Kan, Y.W., and Werner, S. (2008). Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J.* *27*, 212–223.
- Bissell, D.M., Arenson, D.M., Maher, J.J., and Roll, F.J. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J. Clin. Invest.* *79*, 801–812.
- Bogaards, J.J., Venekamp, J.C., and van Bladeren, P.J. (1997). Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione, catalyzed by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem. Res. Toxicol.* *10*, 310–317.
- Bogoyevitch, M.A. (2006). The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *28*, 923–934.
- Boonstra, J., and Post, J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* *337*, 1–13.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10608–10613.
- Boutros, T., Chevet, E., and Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol. Rev.* *60*, 261–310.
- Browning, J.D., and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* *114*, 147–152.
- Campbell, J.S., Argast, G.M., Yuen, S.Y., Hayes, B., and Fausto, N. (2011). Inactivation of p38 MAPK during liver regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 180–188.
- Cano-Gauci, D.F., Song, H.H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T.D., Grisaru, S., Soon, S., et al. (1999). Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J. Cell Biol.* *146*, 255–264.

Castro-Caldas, M., Milagre, I., Rodrigues, E., and Gama, M.J. (2009). Glutathione S-transferase pi regulates UV-induced JNK signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.* *451*, 241–245.

Castro-Caldas, M., Carvalho, A.N., Rodrigues, E., Henderson, C., Wolf, C.R., and Gama, M.J. (2012). Glutathione S-transferase pi mediates MPTP-induced c-Jun N-terminal kinase activation in the nigrostriatal pathway. *Mol. Neurobiol.* *45*, 466–477.

Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2010). Polyploidization of liver cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* *676*, 123–135.

Chaiwun, B., Sukhamwang, N., Trakultivakorn, H., Saha, B., Young, L., Tsao-Wei, D., Naritoku, W.Y., Groshen, S., Taylor, C.R., and Imam, S.A. (2011). GSTPi-positive tumour microenvironment-associated fibroblasts are significantly associated with GSTPi-negative cancer cells in paired cases of primary invasive breast cancer and axillary lymph node metastases. *Br. J. Cancer* *105*, 1224–1229.

Chan, L.M.S., Lowes, S., and Hirst, B.H. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *21*, 25–51.

Chari, R.S., Price, D.T., Sue, S.R., Meyers, W.C., and Jirtle, R.L. (1995). Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am. J. Surg.* *169*, 126–131; discussion 131–132.

Charlton, M.R. (1996). Protein metabolism and liver disease. *Baillière's Clin. Endocrinol. Metab.* *10*, 617–635.

Chen, X., Cheung, S.T., So, S., Fan, S.T., Barry, C., Higgins, J., Lai, K.-M., Ji, J., Dudoit, S., Ng, I.O.L., et al. (2002). Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol. Biol. Cell* *13*, 1929–1939.

Chiba, T., Kita, K., Zheng, Y.-W., Yokosuka, O., Saisho, H., Iwama, A., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2006). Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* *44*, 240–251.

Cho, S.G., Lee, Y.H., Park, H.S., Ryoo, K., Kang, K.W., Park, J., Eom, S.J., Kim, M.J., Chang, T.S., Choi, S.Y., et al. (2001). Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J. Biol. Chem.* *276*, 12749–12755.

Chou, J.Y., Jun, H.S., and Mansfield, B.C. (2010). Glycogen storage disease type I and G6Pase- $\beta$  deficiency: etiology and therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* *6*, 676–688.

Collin de L'hortet, A., Gilgenkrantz, H., and Guidotti, J.-E. (2012). EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration. *Int. J. Hepatol.* *2012*, 476910.

Conklin, D.J., Haberzettl, P., Lesgards, J.-F., Prough, R.A., Srivastava, S., and Bhatnagar, A. (2009). Increased sensitivity of glutathione S-transferase P-null mice to cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *331*, 456–469.

Corlu, A., and Loyer, P. (2012). Regulation of the g1/s transition in hepatocytes: involvement of the cyclin-dependent kinase cdk1 in the DNA replication. *Int. J. Hepatol.* *2012*, 689324.

Cornell, R.P. (1985). Restriction of gut-derived endotoxin impairs DNA synthesis for liver regeneration. *Am. J. Physiol.* *249*, R563–569.

Corona, G., De Lorenzo, E., Elia, C., Simula, M.P., Avellini, C., Baccarani, U., Lupo, F., Tiribelli, C., Colombatti, A., and Toffoli, G. (2010). Differential proteomic analysis of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* *36*, 93–99.

Court, M.H. (2005). Isoform-selective probe substrates for in vitro studies of human UDP-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymol.* *400*, 104–116.

Court, M.H., Duan, S.X., von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., Patten, C.J., Miners, J.O., and Mackenzie, P.I. (2001). Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *299*, 998–1006.

Cowell, I.G., Dixon, K.H., Pemble, S.E., Ketterer, B., and Taylor, J.B. (1988). The structure of the human glutathione S-transferase pi gene. *Biochem. J.* *255*, 79–83.

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

Czerwinski, M., Gibbs, J.P., and Slattery, J.T. (1996). Busulfan conjugation by glutathione S-transferases alpha, mu, and pi. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *24*, 1015–1019.

Dang, D.T., Chen, F., Kohli, M., Rago, C., Cummins, J.M., and Dang, L.H. (2005). Glutathione S-transferase pi1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 9485–9494.

Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (2006). Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett.* *580*, 1103–1111.

Desmots, F., Rissel, M., Gilot, D., Lagadic-Gossmann, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., and Loyer, P. (2002). Pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 and survival factor epidermal growth factor positively regulate the murine GSTA4 enzyme in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *277*, 17892–17900.

DeVore, N.M., and Scott, E.E. (2012). Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature* *482*, 116–119.

Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* *26*, 3279–3290.

Diehl, A.M., Bisgaard, H.C., Kren, B.T., and Steer, C.J. (1991). Ethanol interferes with regeneration-associated changes in biotransforming enzymes: a potential mechanism underlying ethanol's carcinogenicity? *Hepatology* *13*, 722–727.

Ding, S., Gong, B.-D., Yu, J., Gu, J., Zhang, H.-Y., Shang, Z.-B., Fei, Q., Wang, P., and Zhu, J.-D. (2004). Methylation profile of the promoter CpG islands of 14 “drug-resistance” genes in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* 10, 3433–3440.

Doğru-Abbasoğlu, S., Mutlu-Türkoğlu, U., Türkoğlu, S., Erbil, Y., Barbaros, U., Uysal, M., and Aykaç-Toker, G. (2002). Glutathione S-transferase-pi in malignant tissues and plasma of human colorectal and gastric cancers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 128, 91–95.

Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130, 1120–1133.

Dong, X., Zhao, H., Ma, X., and Wang, S. (2010). Reduction in bile acid pool causes delayed liver regeneration accompanied by down-regulated expression of FXR and c-Jun mRNA in rats. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 30, 55–60.

Duncan, A.W. (2013). Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 347–356.

Duval, H., Mbatchi, S.-F., Grandadam, S., Legendre, C., Loyer, P., Ribault, C., Piquet-Pellorce, C., Guguen-Guillouzo, C., Boudjema, K., and Corlu, A. (2010). Reperfusion stress induced during intermittent selective clamping accelerates rat liver regeneration through JNK pathway. *J. Hepatol.* 52, 560–569.

Eaton, D.L., and Bammler, T.K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 49, 156–164.

Eisenberg, M.L., Maker, A.V., Slezak, L.A., Nathan, J.D., Sritharan, K.C., Jena, B.P., Geibel, J.P., and Andersen, D.K. (2005). Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 15, 51–58.

Ekhart, C., Doodeman, V.D., Rodenhuis, S., Smits, P.H.M., Beijnen, J.H., and Huitema, A.D.R. (2008). Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenet. Genomics* 18, 515–523.

Elsby, R., Kitteringham, N.R., Goldring, C.E., Lovatt, C.A., Chamberlain, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., and Park, B.K. (2003). Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J. Biol. Chem.* 278, 22243–22249.

European Association For The Study Of The Liver, and European Organisation For Research And Treatment Of Cancer (2012). EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 56, 908–943.

Factor, V.M., Seo, D., Ishikawa, T., Kaposi-Novak, P., Marquardt, J.U., Andersen, J.B., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2010). Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One* 5.

- Fan, F., Jin, S., Amundson, S.A., Tong, T., Fan, W., Zhao, H., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., et al. (2002). ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene* 21, 7488–7496.
- Fausto, N., and Campbell, J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 120, 117–130.
- Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45–53.
- Fitz, J.G. (2002). Regulation of cholangiocyte secretion. *Semin. Liver Dis.* 22, 241–249.
- FitzGerald, M.J., Webber, E.M., Donovan, J.R., and Fausto, N. (1995). Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 417–427.
- Foijer, F., and Te Riele, H. (2006). Restriction beyond the restriction point: mitogen requirement for G2 passage. *Cell Div.* 1, 8.
- Forbes, S., Vig, P., Poulson, R., Thomas, H., and Alison, M. (2002). Hepatic stem cells. *J. Pathol.* 197, 510–518.
- Forner, A., Llovet, J.M., and Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379, 1245–1255.
- Fotin-Mleczeck, M., Henkler, F., Samel, D., Reichwein, M., Hausser, A., Parmryd, I., Scheurich, P., Schmid, J.A., and Wajant, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell Sci.* 115, 2757–2770.
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Villa, P., Eberini, I., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., and Ghezzi, P. (2003). Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics* 3, 1154–1161.
- Fujita, J., Marino, M.W., Wada, H., Jungbluth, A.A., Mackrell, P.J., Rivadeneira, D.E., Stapleton, P.P., and Daly, J.M. (2001). Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 129, 48–54.
- Gagné, J.-F., Montminy, V., Belanger, P., Journault, K., Gaucher, G., and Guillemette, C. (2002). Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol. Pharmacol.* 62, 608–617.
- Garcia, J., Han, D., Sancheti, H., Yap, L.-P., Kaplowitz, N., and Cadenas, E. (2010). Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J. Biol. Chem.* 285, 39646–39654.
- Garnier, D., Loyer, P., Ribault, C., Guguen-Guillouzo, C., and Corlu, A. (2009). Cyclin-dependent kinase 1 plays a critical role in DNA replication control during rat liver regeneration. *Hepatology* 50, 1946–1956.



- Gate, L., Majumdar, R.S., Lunk, A., and Tew, K.D. (2004). Increased myeloproliferation in glutathione S-transferase pi-deficient mice is associated with a deregulation of JNK and Janus kinase/STAT pathways. *J. Biol. Chem.* *279*, 8608–8616.
- Geier, A., Fickert, P., and Trauner, M. (2006). Mechanisms of disease: mechanisms and clinical implications of cholestasis in sepsis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* *3*, 574–585.
- Gentric, G., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2012). Polyploidy and liver proliferation. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* *36*, 29–34.
- Van Gijssel, H.E., Ohlson, L.C., Torndal, U.B., Mulder, G.J., Eriksson, L.C., Porsch-Hällström, I., and Meerman, J.H. (2000). Loss of nuclear p53 protein in preneoplastic rat hepatocytes is accompanied by Mdm2 and Bcl-2 overexpression and by defective response to DNA damage in vivo. *Hepatol. Baltim. Md* *32*, 701–710.
- Gilot, D., Loyer, P., Corlu, A., Glaise, D., Lagadic-Gossmann, D., Atfi, A., Morel, F., Ichijo, H., and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J. Biol. Chem.* *277*, 49220–49229.
- Greenbaum, L.E., Cressman, D.E., Haber, B.A., and Taub, R. (1995). Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth. *J. Clin. Invest.* *96*, 1351–1365.
- Greenbaum, L.E., Li, W., Cressman, D.E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V., and Taub, R. (1998). CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J. Clin. Invest.* *102*, 996–1007.
- Gressner, A.M. (1996). Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int. Suppl.* *54*, S39–45.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* *249*, 7130–7139.
- Hagiwara, S., Kudo, M., Chung, H., Ueshima, K., Inoue, T., Haji, S., Watanabe, T., Park, A.-M., Munakata, H., and Sakurai, T. (2012). Activation of c-Jun N-terminal kinase in non-cancerous liver tissue predicts a high risk of recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* *42*, 394–400.
- Hall, A.G. (1999). Glutathione and the regulation of cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* *457*, 199–203.
- Hansen, L.K., Mooney, D.J., Vacanti, J.P., and Ingber, D.E. (1994). Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth. *Mol. Biol. Cell* *5*, 967–975.
- Harder, J., Opitz, O.G., Brabender, J., Olschewski, M., Blum, H.E., Nomoto, S., and Usadel, H. (2008). Quantitative promoter methylation analysis of hepatocellular carcinoma, cirrhotic and normal liver. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *122*, 2800–2804.

Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T., and Ogata, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 8, 847–856.

Hatayama, I., Satoh, K., and Sato, K. (1986). Developmental and hormonal regulation of the major form of hepatic glutathione S-transferase in male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 581–588.

Hatayama, I., Satoh, K., and Sato, K. (1990). A cDNA sequence coding a class pi glutathione S-transferase of mouse. *Nucleic Acids Res.* 18, 4606.

Haubrich, W.S. (2004). Disse of the space of Disse. *Gastroenterology* 127, 1684.

Hayakawa, Y., Hirata, Y., Nakagawa, H., Sakamoto, K., Hikiba, Y., Kinoshita, H., Nakata, W., Takahashi, R., Tateishi, K., Tada, M., et al. (2011). Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 780–785.

Hayes, P.C., May, L., Hayes, J.D., and Harrison, D.J. (1991). Glutathione S-transferases in human liver cancer. *Gut* 32, 1546–1549.

Henderson, N.C., and Iredale, J.P. (2007). Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 112, 265–280.

Henderson, C.J., Smith, A.G., Ure, J., Brown, K., Bacon, E.J., and Wolf, C.R. (1998). Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5275–5280.

Henderson, C.J., Wolf, C.R., Kitteringham, N., Powell, H., Otto, D., and Park, B.K. (2000). Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12741–12745.

Higgins, G.M. and Anderson, R.M. (1931). Experimental pathology of the liver: restoration of the liver following partial hepatectomy. *Arch. Pathol.* 12, 186–202.

Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.-L., and Karlsson, J. (2007). Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35, 1333–1340.

Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336.

Ho, J., de Guise, C., Kim, C., Lemay, S., Wang, X.-F., and Lebrun, J.-J. (2004). Activin induces hepatocyte cell growth arrest through induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B and Sp1. *Cell. Signal.* 16, 693–701.

Holley, S.L., Fryer, A.A., Haycock, J.W., Grubb, S.E.W., Strange, R.C., and Hoban, P.R. (2007). Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis* 28, 2268–2273.

- Hu, X., and Moscinski, L.C. (2011). Cdc2: a monopotent or pluripotent CDK? *Cell Prolif.* *44*, 205–211.
- Hu, W., Feng, Z., Eveleigh, J., Iyer, G., Pan, J., Amin, S., Chung, F.-L., and Tang, M.-S. (2002). The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* *23*, 1781–1789.
- Huang, W., Ma, K., Zhang, J., Qatanani, M., Cuvillier, J., Liu, J., Dong, B., Huang, X., and Moore, D.D. (2006). Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* *312*, 233–236.
- Huang, Z., Pinto, J.T., Deng, H., and Richie, J.P., Jr (2008). Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. *Biochem. Pharmacol.* *75*, 2234–2244.
- Huang, Z.Z., Mao, Z., Cai, J., and Lu, S.C. (1998). Changes in methionine adenosyltransferase during liver regeneration in the rat. *Am. J. Physiol.* *275*, G14–21.
- Hummel, S.G., Fischer, A.J., Martin, S.M., Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2006). Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 501–506.
- Iimuro, Y., and Fujimoto, J. (2010). TLRs, NF- $\kappa$ B, JNK, and Liver Regeneration. *Gastroenterol. Res. Pr.* *2010*.
- Ikeda, H., Serria, M.S., Kakizaki, I., Hatayama, I., Satoh, K., Tsuchida, S., Muramatsu, M., Nishi, S., and Sakai, M. (2002). Activation of mouse Pi-class glutathione S-transferase gene by Nrf2(NF-E2-related factor 2) and androgen. *Biochem. J.* *364*, 563–570.
- Ikeda, H., Nishi, S., and Sakai, M. (2004). Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem. J.* *380*, 515–521.
- Iredale, J.P., Thompson, A., and Henderson, N.C. (2013). Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1832*, 876–883.
- Ishimoto, T.M., and Ali-Osman, F. (2002). Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *Escherichia coli*. *Pharmacogenetics* *12*, 543–553.
- Iyanagi, T. (2007). Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int. Rev. Cytol.* *260*, 35–112.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov.* *154*, 103–116.
- Jardim, B.V., Moschetta, M.G., Gelaleti, G.B., Leonel, C., Regiani, V.R., de Santi Neto, D., Bordin-Junior, N.A., Perea, S.A., and Zuccari, D.A.P. de C. (2012). Glutathione transferase pi (GSTpi) expression in breast cancer: an immunohistochemical and molecular study. *Acta Histochem.* *114*, 510–517.

- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J., and Han, J. (1997). Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J. Biol. Chem.* *272*, 30122–30128.
- Jochum, C., Beste, M., Sowa, J.-P., Farahani, M.S., Penndorf, V., Nadalin, S., Saner, F., Canbay, A., and Gerken, G. (2011). Glutathione-S-transferase subtypes  $\alpha$  and  $\pi$  as a tool to predict and monitor graft failure or regeneration in a pilot study of living donor liver transplantation. *Eur. J. Med. Res.* *16*, 34–40.
- Johansson, A.S., and Mannervik, B. (2001). Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J. Biol. Chem.* *276*, 33061–33065.
- Jones, S.M., and Kazlauskas, A. (2000). Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* *19*, 5558–5567.
- Josephy, P.D. (2010). Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum. Genomics Proteomics HGP 2010*, 876940.
- Juskeviciute, E., Vadigepalli, R., and Hoek, J.B. (2008). Temporal and functional profile of the transcriptional regulatory network in the early regenerative response to partial hepatectomy in the rat. *BMC Genomics* *9*, 527.
- Kalinina, E.V., Chernov, N.N., Saprin, A.N., Kotova, Y.N., Remizov, V.I., and Shcherbak, N.P. (2007). Expression of genes for redox-dependent glutathione S-transferase isoforms GSTP1-1 and GSTA4-4 in tumor cell during the development doxorubicin resistance. *Bull. Exp. Biol. Med.* *143*, 328–330.
- Kalinina, E.V., Berozov, T.T., Shtil, A.A., Chernov, N.N., Glasunova, V.A., Novichkova, M.D., and Nurmuradov, N.K. (2012). Expression of genes of glutathione transferase isoforms GSTP1-1, GSTA4-4, and GSTK1-1 in tumor cells during the formation of drug resistance to cisplatin. *Bull. Exp. Biol. Med.* *154*, 64–67.
- Kamata, H., Honda, S.-I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* *120*, 649–661.
- Kang, L.-I., Mars, W., and Michalopoulos, G. (2012). Signals and Cells Involved in Regulating Liver Regeneration. *Cells* *1*, 1261–1292.
- Karin, M. (2009). NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a000141.
- Kashiwada, M., Kitada, M., Shimada, T., Itahashi, K., Sato, K., and Kamataki, T. (1991). Purification and characterization of acidic form of glutathione S-transferase in human fetal livers: high similarity to placental form. *J. Biochem. (Tokyo)* *110*, 743–747.
- Kiernan, F. (1833). *The Anatomy and Physiology of the Liver*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* *123*, 711–770.

Kim, A., Joseph, S., Khan, A., Epstein, C.J., Sobel, R., and Huang, T.-T. (2010). Enhanced expression of mitochondrial superoxide dismutase leads to prolonged in vivo cell cycle progression and up-regulation of mitochondrial thioredoxin. *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 1501–1512.

Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B., Petersen, B.E., and Michalopoulos, G.K. (1997). Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *26*, 896–904.

Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Inui, Y., Yoshida, Y., Sawai, Y., Umeki, S., Ito, N., Yamada, A., Miyagawa, J.-I., et al. (2003). Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* *124*, 701–707.

Klaus, A., Zorman, S., Berthier, A., Polge, C., Ramirez, S., Michelland, S., Sève, M., Vertommen, D., Rider, M., Lentze, N., et al. (2013). Glutathione S-transferases interact with AMP-activated protein kinase: evidence for S-glutathionylation and activation in vitro. *PLoS One* *8*, e62497.

Kobayashi, M., and Yamamoto, M. (2006). Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* *46*, 113–140.

Kodate, C., Fukushi, A., Narita, T., Kudo, H., Soma, Y., and Sato, K. (1986). Human placental form of glutathione S-transferase (GST-pi) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* *77*, 226–229.

Köhler, C., Bell, A.W., Bowen, W.C., Monga, S.P., Fleig, W., and Michalopoulos, G.K. (2004). Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *39*, 1056–1065.

Koo, S.-H. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatology*. *19*, 210–215.

Kopplow, K., Wayss, K., Enzmann, H., and Mayer, D. (2005). Dehydroepiandrosterone causes hyperplasia and impairs regeneration in rat liver. *Int. J. Oncol.* *27*, 1551–1558.

Kotlo, K.U., Yehiely, F., Efimova, E., Harasty, H., Hesabi, B., Shchors, K., Einat, P., Rozen, A., Berent, E., and Deiss, L.P. (2003). Nrf2 is an inhibitor of the Fas pathway as identified by Achilles' Heel Method, a new function-based approach to gene identification in human cells. *Oncogene* *22*, 797–806.

Kuramitsu, K., Gallo, D., Yoon, M., Chin, B.Y., Csizmadia, E., Hanto, D.W., and Otterbein, L.E. (2011). Carbon monoxide enhances early liver regeneration in mice after hepatectomy. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *53*, 2016–2026.

Lautt, W.W., and Greenway, C.V. (1987). Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *7*, 952–963.

Leclercq, I.A., Vansteenberghe, M., Lebrun, V.B., VanHul, N.K., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C.L., Picard, C., Stärkel, P., and Horsmans, Y.L. (2006). Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *86*, 1161–1171.

- Lee, S.J., and Boyer, T.D. (1993). The effect of hepatic regeneration on the expression of the glutathione S-transferases. *Biochem. J.* *293 ( Pt 1)*, 137–142.
- Lee, J.-S., Chu, I.-S., Heo, J., Calvisi, D.F., Sun, Z., Roskams, T., Durnez, A., Demetris, A.J., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *40*, 667–676.
- Lee, J.-S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I.-S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D.F., Mikaelyan, A., Roberts, L.R., Demetris, A.J., Sun, Z., et al. (2006). A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.* *12*, 410–416.
- Lee, W.H., Morton, R.A., Epstein, J.I., Brooks, J.D., Campbell, P.A., Bova, G.S., Hsieh, W.S., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (1994). Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11733–11737.
- Lei, M., and Tye, B.K. (2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J. Cell Sci.* *114*, 1447–1454.
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., and Clavien, P.-A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* *312*, 104–107.
- Li, D., Dandara, C., and Parker, M.I. (2010). The 341C/T polymorphism in the GSTP1 gene is associated with increased risk of oesophageal cancer. *BMC Genet.* *11*, 47.
- Li, J., Campbell, J.S., Mitchell, C., McMahan, R.S., Yu, X., Riehle, K.J., Bumgarner, R.E., and Fausto, N. (2009). Relationships between deficits in tissue mass and transcriptional programs after partial hepatectomy in mice. *Am. J. Pathol.* *175*, 947–957.
- Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V., and Taub, R. (2002). STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* *277*, 28411–28417.
- Lindblad, W.J., Schuetz, E.G., Redford, K.S., and Guzelian, P.S. (1991). Hepatocellular phenotype in vitro is influenced by biophysical features of the collagenous substratum. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *13*, 282–288.
- Liu, B., Paranjpe, S., Bowen, W.C., Bell, A.W., Luo, J.-H., Yu, Y.-P., Mars, W.M., and Michalopoulos, G.K. (2009). Investigation of the role of glypican 3 in liver regeneration and hepatocyte proliferation. *Am. J. Pathol.* *175*, 717–724.
- Liu, B., Bell, A.W., Paranjpe, S., Bowen, W.C., Khillan, J.S., Luo, J.-H., Mars, W.M., and Michalopoulos, G.K. (2010). Suppression of liver regeneration and hepatocyte proliferation in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice. *Hepatology*. *Baltimore, Md* *52*, 1060–1067.
- Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., et al. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *359*, 378–390.

- Lo, H.-W., and Ali-Osman, F. (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr. Opin. Pharmacol.* *7*, 367–374.
- Lopez-Bergami, P., Lau, E., and Ronai, Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 65–76.
- Lowes, K.N., Brennan, B.A., Yeoh, G.C., and Olynyk, J.K. (1999). Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol.* *154*, 537–541.
- Lowes, K.N., Croager, E.J., Olynyk, J.K., Abraham, L.J., and Yeoh, G.C.T. (2003). Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *18*, 4–12.
- Loyer, P., Glaise, D., Cariou, S., Baffet, G., Meijer, L., and Guguen-Guillouzo, C. (1994). Expression and activation of cdk2 (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* *269*, 2491–2500.
- Lu, S.C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *13*, 1169–1183.
- Lu, C., and Koppenol, W.H. (2005). Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* *10*, 732–738.
- Lu, D., Wolfgang, C.D., and Hai, T. (2006). Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* *281*, 10473–10481.
- Lu, M., Xia, L., Luo, D., Waxman, S., and Jing, Y. (2004). Dual effects of glutathione-S-transferase pi on As2O3 action in prostate cancer cells: enhancement of growth inhibition and inhibition of apoptosis. *Oncogene* *23*, 3945–3952.
- Maass, T., Sfakianakis, I., Staib, F., Krupp, M., Galle, P.R., and Teufel, A. (2010). Microarray-based gene expression analysis of hepatocellular carcinoma. *Curr. Genomics* *11*, 261–268.
- MACDONALD, R.A. (1961). “Lifespan” of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Arch. Intern. Med.* *107*, 335–343.
- Maeno, H., Ono, T., Dhar, D.K., Sato, T., Yamanoi, A., and Nagasue, N. (2005). Expression of hypoxia inducible factor-1alpha during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *25*, 1002–1009.
- Malato, Y., Ehedego, H., Al-Masaoudi, M., Cubero, F.J., Bornemann, J., Gassler, N., Liedtke, C., Beraza, N., and Trautwein, C. (2012). NF-κB essential modifier is required for hepatocyte proliferation and the oval cell reaction after partial hepatectomy in mice. *Gastroenterology* *143*, 1597–1608.e11.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.-H., and Wolgemuth, D.J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1275–1276.
- Manevich, Y., Feinstein, S.I., and Fisher, A.B. (2004). Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3780–3785.

- Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I., and Pearson, W.R. (2005). Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* *401*, 1–8.
- Martinez-Hernandez, A., and Amenta, P.S. (1995). The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *9*, 1401–1410.
- Martins, P.N.A., Theruvath, T.P., and Neuhaus, P. (2008). Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *28*, 3–11.
- Mei, Y., and Thevananther, S. (2011). Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. *Baltim. Md* *54*, 1777–1789.
- Meister, A., Anderson, M.E., and Hwang, O. (1986). Intracellular cysteine and glutathione delivery systems. *J. Am. Coll. Nutr.* *5*, 137–151.
- Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.-E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2013). AMPK $\alpha$ 1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. *J. Hepatol.*
- Meyer, D.J., Beale, D., Tan, K.H., Coles, B., and Ketterer, B. (1985). Glutathione transferases in primary rat hepatomas: the isolation of a form with GSH peroxidase activity. *FEBS Lett.* *184*, 139–143.
- Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.* *213*, 286–300.
- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* *276*, 60–66.
- Mieyal, J.J., Gallogly, M.M., Qanungo, S., Sabens, E.A., and Shelton, M.D. (2008). Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxidants Redox Signal.* *10*, 1941–1988.
- Minami, Y., and Kudo, M. (2011). Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: a literature review. *Int. J. Hepatol.* *2011*, 104685.
- Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L.F., Fox, R., Lee, D.C., Campbell, J.S., and Fausto, N. (2005). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* *280*, 2562–2568.
- Moreau, M., Mourah, S., and Dosquet, C. (2011).  $\beta$ -Catenin and NF- $\kappa$ B cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *128*, 1280–1292.
- Morel, F., and Aninat, C. (2011). The glutathione transferase kappa family. *Drug Metab. Rev.* *43*, 281–291.
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., and Guillouzo, A. (2004). Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* *279*, 16246–16253.
- Mori, M., Ishizaki, M., and Onda, M. (1995). Immunohistochemical investigation of hepatocellular pi class glutathione S-transferase in normal and regenerating rat liver. *Nihon Ika Daigaku Zasshi* *62*, 447–455.



- Morimura, S., Suzuki, T., Hochi, S., Yuki, A., Nomura, K., Kitagawa, T., Nagatsu, I., Imagawa, M., and Muramatsu, M. (1993). Trans-activation of glutathione transferase P gene during chemical hepatocarcinogenesis of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 2065–2068.
- Morrow, C.S., Cowan, K.H., and Goldsmith, M.E. (1989). Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene. *Gene* *75*, 3–11.
- Mortensen, K.E., Conley, L.N., Nygaard, I., Sorenesen, P., Mortensen, E., Bendixen, C., and Revhaug, A. (2010). Increased sinusoidal flow is not the primary stimulus to liver regeneration. *Comp. Hepatol.* *9*, 2.
- Musti, A.M., Treier, M., and Bohmann, D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* *275*, 400–402.
- Naiki, T., Asamoto, M., Toyoda-Hokaiwado, N., Naiki-Ito, A., Tozawa, K., Kohri, K., Takahashi, S., and Shirai, T. (2012). Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice. *Prostate* *72*, 533–541.
- Naito, M., Hasegawa, G., and Takahashi, K. (1997). Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc. Res. Tech.* *39*, 350–364.
- Nakagawa, H., Hirata, Y., Takeda, K., Hayakawa, Y., Sato, T., Kinoshita, H., Sakamoto, K., Nakata, W., Hikiba, Y., Omata, M., et al. (2011). Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated mitogen-activated protein kinase. *Hepatol. Baltim. Md* *54*, 185–195.
- Nakanishi, T., and Tamai, I. (2012). Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *27*, 106–121.
- Nejak-Bowen, K., Orr, A., Bowen, W.C., Jr, and Michalopoulos, G.K. (2013). Conditional genetic elimination of hepatocyte growth factor in mice compromises liver regeneration after partial hepatectomy. *PloS One* *8*, e59836.
- Nejak-Bowen, K.N., Thompson, M.D., Singh, S., Bowen, W.C., Jr, Dar, M.J., Khillan, J., Dai, C., and Monga, S.P.S. (2010). Accelerated liver regeneration and hepatocarcinogenesis in mice overexpressing serine-45 mutant beta-catenin. *Hepatol. Baltim. Md* *51*, 1603–1613.
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc’h, J., Siliart, B., and Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* *92*, 272–283.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998). ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell* *2*, 389–395.
- Niture, S.K., and Jaiswal, A.K. (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.* *287*, 9873–9886.
- Niu, Z.-S., and Wang, M. (2005). Expression of c-erbB-2 and glutathione S-transferase-pi in hepatocellular carcinoma and its adjacent tissue. *World J. Gastroenterol. WJG* *11*, 4404–4408.

Norimizu, S., Kudo, A., Kajimura, M., Ishikawa, K., Tani, H., Yamaguchi, T., Fujii, K., Arii, S., Nimura, Y., and Suematsu, M. (2003). Carbon monoxide stimulates mrp2-dependent excretion of bilirubin-IXalpha into bile in the perfused rat liver. *Antioxidants Redox Signal*. 5, 449–456.

Nygård, I.E., Mortensen, K.E., Hedegaard, J., Conley, L.N., Kalstad, T., Bendixen, C., and Revhaug, A. (2012). The genetic regulation of the terminating phase of liver regeneration. *Comp. Hepatol*. 11, 3.

Ochiai, H., Eguchi, H., Noguchi, S., Hayashi, Y., Nishino, H., Kawamura, M., and Wu, C.H. (2013). Glutathione S-transferase  $\pi$  complexes with and stimulates  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. *J. Mol. Recognit. JMR* 26, 32–37.

Oe, S., Lemmer, E.R., Conner, E.A., Factor, V.M., Levéen, P., Larsson, J., Karlsson, S., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatol. Baltim. Md* 40, 1098–1105.

Ogiso, T., Tatematsu, M., Tamano, S., Tsuda, H., and Ito, N. (1985). Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay. *Toxicol. Pathol.* 13, 257–265.

Oh, Y.K., Lee, H.J., Jeong, M.-H., Rhee, M., Mo, J.-W., Song, E.H., Lim, J.-Y., Choi, K.-H., Jo, I., Park, S.I., et al. (2008). Role of activating transcription factor 3 on TAp73 stability and apoptosis in paclitaxel-treated cervical cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 1232–1249.

Ohtake, Y., Kobayashi, T., Maruko, A., Oh-Ishi, N., Yamamoto, F., Katoh, S., and Ohkubo, Y. (2010). Norepinephrine modulates the zonally different hepatocyte proliferation through the regulation of transglutaminase activity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G106–114.

Okabe, H., Satoh, S., Kato, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Yamaoka, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y., and Nakamura, Y. (2001). Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 61, 2129–2137.

Okuda, A., Sakai, M., and Muramatsu, M. (1987). The structure of the rat glutathione S-transferase P gene and related pseudogenes. *J. Biol. Chem.* 262, 3858–3863.

Olle, E.W., Ren, X., McClintock, S.D., Warner, R.L., Deogracias, M.P., Johnson, K.J., and Colletti, L.M. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatol. Baltim. Md* 44, 540–549.

Olsen, P.S., Poulsen, S.S., and Kirkegaard, P. (1985). Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut* 26, 920–927.

Olvera-Bello, A.E., Estrada-Muñiz, E., Elizondo, G., and Vega, L. (2010). Susceptibility to the cytogenetic effects of dichloromethane is related to the glutathione S-transferase theta phenotype. *Toxicol. Lett.* 199, 218–224.

Ali-Osman, F., Brunner, J.M., Kutluk, T.M., and Hess, K. (1997). Prognostic significance of glutathione S-transferase pi expression and subcellular localization in human gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 2253–2261.

Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M., and Grompe, M. (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* *151*, 1273–1280.

Pagès, G., Guérin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auburger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* *286*, 1374–1377.

Pajaud, J., Kumar, S., Rauch, C., Morel, F., and Aninat, C. (2012). Regulation of signal transduction by glutathione transferases. *Int. J. Hepatol.* *2012*, 137676.

Pandya, U., Srivastava, S.K., Singhal, S.S., Pal, A., Awasthi, S., Zimniak, P., Awasthi, Y.C., and Singh, S.V. (2000). Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *278*, 258–262.

Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 1286–1290.

Park, E.-M., and Cho, S. (2006). Enhanced ERK dependent CREB activation reduces apoptosis in staurosporine-treated human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *Neurosci. Lett.* *402*, 190–194.

Pastore, A., and Piemonte, F. (2012). S-Glutathionylation signaling in cell biology: progress and prospects. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *46*, 279–292.

Peer, C.J., Sissung, T.M., Kim, A., Jain, L., Woo, S., Gardner, E.R., Kirkland, C.T., Troutman, S.M., English, B.C., Richardson, E.D., et al. (2012). Sorafenib is an inhibitor of UGT1A1 but is metabolized by UGT1A9: implications of genetic variants on pharmacokinetics and hyperbilirubinemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 2099–2107.

Petit, E., Michelet, X., Rauch, C., Bertrand-Michel, J., Tercé, F., Legouis, R., and Morel, F. (2009). Glutathione transferases kappa 1 and kappa 2 localize in peroxisomes and mitochondria, respectively, and are involved in lipid metabolism and respiration in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS J.* *276*, 5030–5040.

Pimentel, D.R., Adachi, T., Ido, Y., Heibeck, T., Jiang, B., Lee, Y., Melendez, J.A., Cohen, R.A., and Colucci, W.S. (2006). Strain-stimulated hypertrophy in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species-dependent Ras S-glutathiolation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *41*, 613–622.

Pok, S., Wen, V., Shackel, N., Alsop, A., Pyakurel, P., Fahrner, A., Farrell, G.C., and Teoh, N.C. (2013). Cyclin E facilitates dysplastic hepatocytes to bypass G1 /S checkpoint in hepatocarcinogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *28*, 1545–1554.

Porubek, D. (2013). CYP17A1: a biochemistry, chemistry, and clinical review. *Curr. Top. Med. Chem.* *13*, 1364–1384.

Power, C., and Rasko, J.E.J. (2008). Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. *Ann. Intern. Med.* *149*, 421–426.

Rai, R.M., Lee, F.Y., Rosen, A., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Koteish, A., Liew, F.Y., Zaragoza, C., Lowenstein, C., and Diehl, A.M. (1998). Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13829–13834.

Raijmakers, M.T., Steegers, E.A., and Peters, W.H. (2001). Glutathione S-transferases and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *16*, 2445–2450.

Ralat, L.A., Manevich, Y., Fisher, A.B., and Colman, R.F. (2006). Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 360–372.

Ramírez, J., Iyer, L., Journault, K., Bélanger, P., Innocenti, F., Ratain, M.J., and Guillemette, C. (2002). In vitro characterization of hepatic flavopiridol metabolism using human liver microsomes and recombinant UGT enzymes. *Pharm. Res.* *19*, 588–594.

Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D.L., and Quigley, J.P. (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.* *274*, 13066–13076.

Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* *263*, 1149–1152.

Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1995). Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4942–4946.

Ritchie, K.J., Henderson, C.J., Wang, X.J., Vassieva, O., Carrie, D., Farmer, P.B., Gaskell, M., Park, K., and Wolf, C.R. (2007). Glutathione transferase pi plays a critical role in the development of lung carcinogenesis following exposure to tobacco-related carcinogens and urethane. *Cancer Res.* *67*, 9248–9257.

Ritchie, K.J., Walsh, S., Sansom, O.J., Henderson, C.J., and Wolf, C.R. (2009). Markedly enhanced colon tumorigenesis in Apc(Min) mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20859–20864.

Roselli, H.T., Su, M., Washington, K., Kerins, D.M., Vaughan, D.E., and Russell, W.E. (1998). Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice. *Am. J. Physiol.* *275*, G1472–1479.

Rudolph, K.L., Trautwein, C., Kubicka, S., Rakemann, T., Bahr, M.J., Sedlacek, N., Schuppan, D., and Manns, M.P. (1999). Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* *30*, 1159–1166.

Ruscoe, J.E., Rosario, L.A., Wang, T., Gaté, L., Arifoglu, P., Wolf, C.R., Henderson, C.J., Ronai, Z., and Tew, K.D. (2001). Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTpi) influences cell proliferation pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *298*, 339–345.

Russell, W.E., Coffey, R.J., Jr, Ouellette, A.J., and Moses, H.L. (1988). Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 5126–5130.

Russell, W.E., Kaufmann, W.K., Sitaric, S., Luetkeke, N.C., and Lee, D.C. (1996). Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor- $\alpha$ -targeted mice. *Mol. Carcinog.* *15*, 183–189.

Sakai, M., and Muramatsu, M. (2007). Regulation of glutathione transferase P: a tumor marker of hepatocarcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *357*, 575–578.

Sakai, M., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1988). Multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 9456–9460.

Sandgren, E.P., Palmiter, R.D., Heckel, J.L., Daugherty, C.C., Brinster, R.L., and Degen, J.L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* *66*, 245–256.

Sau, A., Filomeni, G., Pezzola, S., D’Aguanno, S., Tregno, F.P., Urbani, A., Serra, M., Pasello, M., Picci, P., Federici, G., et al. (2012). Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines. *Mol. Biosyst.* *8*, 994–1006.

Saxena, R., and Theise, N. (2004). Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Semin. Liver Dis.* *24*, 43–48.

Schafer, K.A. (1998). The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.* *35*, 461–478.

Schinkel, A.H., and Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *55*, 3–29.

Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., and te Riele, H.P. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* *77*, 491–502.

Schnekenburger, M., Morceau, F., Duvoix, A., Delhalle, S., Trentesaux, C., Dicato, M., and Diederich, M. (2004). Increased glutathione S-transferase P1-1 expression by mRNA stabilization in hemin-induced differentiation of K562 cells. *Biochem. Pharmacol.* *68*, 1269–1277.

Schoen, J.M., Wang, H.H., Minuk, G.Y., and Lutt, W.W. (2001). Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* *5*, 453–464.

Schuppan, D., Schmid, M., Somasundaram, R., Ackermann, R., Ruehl, M., Nakamura, T., and Riecken, E.O. (1998). Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor. *Gastroenterology* *114*, 139–152.

Schwabe, R.F., and Brenner, D.A. (2006). Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *290*, G583–589.

Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., and Brenner, D.A. (2003). c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* *37*, 824–832.

- Seglen, P.O. (1997). DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol. Toxicol.* *13*, 301–315.
- Senoo, H., Kojima, N., and Sato, M. (2007). Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam. Horm.* *75*, 131–159.
- Sérandour, A.-L., Loyer, P., Garnier, D., Courselaud, B., Théret, N., Glaise, D., Guguen-Guillouzo, C., and Corlu, A. (2005). TNF $\alpha$ -mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* *41*, 478–486.
- Shao, J., Stapleton, P.L., Lin, Y.S., and Gallagher, E.P. (2007). Cytochrome p450 and glutathione s-transferase mRNA expression in human fetal liver hematopoietic stem cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *35*, 168–175.
- Shen, L.-J., Zhang, H.-X., Zhang, Z.-J., Li, J.-Y., Chen, M.-Q., Yang, W.-B., and Huang, R. (2003). Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J. Gastroenterol.* *9*, 459–462.
- Shi, Q., Dong, Z., and Wei, H. (2007). The involvement of heat shock proteins in murine liver regeneration. *Cell. Mol. Immunol.* *4*, 53–57.
- Shiina, S., Tateishi, R., Imamura, M., Teratani, T., Koike, Y., Sato, S., Obi, S., Kanai, F., Kato, N., Yoshida, H., et al. (2012). Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* *32*, 1434–1442.
- Shimizu, M., Hara, A., Okuno, M., Matsuno, H., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., Niwa, M., Akita, K., Yamada, Y., et al. (2001). Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* *33*, 569–576.
- Shimizu, M., Tanaka, T., and Moriwaki, H. (2013). Obesity and hepatocellular carcinoma: targeting obesity-related inflammation for chemoprevention of liver carcinogenesis. *Semin. Immunopathol.* *35*, 191–202.
- Shin, S.M., Yang, J.H., and Ki, S.H. (2013). Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2013*, 763257.
- Shiratori, Y., Soma, Y., Maruyama, H., Sato, S., Takano, A., and Sato, K. (1987). Immunohistochemical detection of the placental form of glutathione S-transferase in dysplastic and neoplastic human uterine cervix lesions. *Cancer Res.* *47*, 6806–6809.
- Short, B.G., Zimmerman, D.M., and Schwartz, L.W. (1997). Automated double labeling of proliferation and apoptosis in glutathione S-transferase-positive hepatocytes in rats. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *45*, 1299–1305.
- Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L.J., Hruz, P.W., and Rudnick, D.A. (2004). Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* *40*, 1322–1332.

- Shu, R.-Z., Zhang, F., Wang, F., Feng, D.-C., Li, X.-H., Ren, W.-H., Wu, X.-L., Yang, X., Liao, X.-D., Huang, L., et al. (2009). Adiponectin deficiency impairs liver regeneration through attenuating STAT3 phosphorylation in mice. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *89*, 1043–1052.
- SIMPSON, G.E., and FINCKH, E.S. (1963). THE PATTERN OF REGENERATION OF RAT LIVER AFTER REPEATED PARTIAL HEPATECTOMIES. *J. Pathol. Bacteriol.* *86*, 361–370.
- Soga, M., Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2012). Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. *Int. J. Cell Biol.* *2012*, 439587.
- Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D.G., and Pae, H.-O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J. Signal Transduct.* *2011*, 792639.
- Son, Y., Kim, S., Chung, H.-T., and Pae, H.-O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol.* *528*, 27–48.
- Srivastava, S.K., Singhal, S.S., Hu, X., Awasthi, Y.C., Zimniak, P., and Singh, S.V. (1999). Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing the glutathione conjugation of thiotepea. *Arch. Biochem. Biophys.* *366*, 89–94.
- Stefan, N., Kantartzis, K., and Häring, H.-U. (2008). Causes and metabolic consequences of Fatty liver. *Endocr. Rev.* *29*, 939–960.
- Stepniak, E., Ricci, R., Eferl, R., Sumara, G., Sumara, I., Rath, M., Hui, L., and Wagner, E.F. (2006). c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev.* *20*, 2306–2314.
- Stolz, D.B., Mars, W.M., Petersen, B.E., Kim, T.H., and Michalopoulos, G.K. (1999). Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.* *59*, 3954–3960.
- Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E., and Lambris, J.D. (2003). The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J. Exp. Med.* *198*, 913–923.
- Su, A.I., Guidotti, L.G., Pezacki, J.P., Chisari, F.V., and Schultz, P.G. (2002). Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11181–11186.
- Su, F., Hu, X., Jia, W., Gong, C., Song, E., and Hamar, P. (2003). Glutathion S transferase pi indicates chemotherapy resistance in breast cancer. *J. Surg. Res.* *113*, 102–108.
- Sun, V.C.-Y., and Sarna, L. (2008). Symptom management in hepatocellular carcinoma. *Clin. J. Oncol. Nurs.* *12*, 759–766.
- Suryo Rahmanto, Y., Kalinowski, D.S., Lane, D.J.R., Lok, H.C., Richardson, V., and Richardson, D.R. (2012). Nitrogen monoxide (NO) storage and transport by dinitrosyl-dithiol-iron complexes: long-lived NO that is trafficked by interacting proteins. *J. Biol. Chem.* *287*, 6960–6968.

- Tackels-Horne, D., Goodman, M.D., Williams, A.J., Wilson, D.J., Eskandari, T., Vogt, L.M., Boland, J.F., Scherf, U., and Vockley, J.G. (2001). Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* 92, 395–405.
- Tajima, T., Goda, N., Fujiki, N., Hishiki, T., Nishiyama, Y., Senoo-Matsuda, N., Shimazu, M., Soga, T., Yoshimura, Y., Johnson, R.S., et al. (2009). HIF-1 $\alpha$  is necessary to support gluconeogenesis during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 789–794.
- Talarmin, H., Rescan, C., Cariou, S., Glaise, D., Zanninelli, G., Bilodeau, M., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C., and Baffet, G. (1999). The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6003–6011.
- Tan, X., Behari, J., Cieply, B., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P.S. (2006). Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 131, 1561–1572.
- Tchou, J.C., Lin, X., Freije, D., Isaacs, W.B., Brooks, J.D., Rashid, A., De Marzo, A.M., Kanai, Y., Hirohashi, S., and Nelson, W.G. (2000). GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int. J. Oncol.* 16, 663–676.
- Terrier, P., Townsend, A.J., Coindre, J.M., Triche, T.J., and Cowan, K.H. (1990). An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am. J. Pathol.* 137, 845–853.
- Tewari, M., Dobrzanski, P., Mohn, K.L., Cressman, D.E., Hsu, J.C., Bravo, R., and Taub, R. (1992). Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I kappa B that inhibits NF-kappa B, RelB-p50, and c-Rel-p50) and PHF, a novel kappa B site-binding complex. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2898–2908.
- Theken, K.N., Deng, Y., Kannon, M.A., Miller, T.M., Poloyac, S.M., and Lee, C.R. (2011). Activation of the acute inflammatory response alters cytochrome P450 expression and eicosanoid metabolism. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 39, 22–29.
- Timchenko, N.A., Wilde, M., Nakanishi, M., Smith, J.R., and Darlington, G.J. (1996). CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev.* 10, 804–815.
- Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369–7375.
- Townsend, D.M., Manevich, Y., He, L., Hutchens, S., Pazoles, C.J., and Tew, K.D. (2009). Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 436–445.
- Toyoda, H., Bregerie, O., Vallet, A., Nalpas, B., Pivert, G., Brechot, C., and Desdouets, C. (2005). Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* 54, 297–302.
- Trutmann, M., and Sasse, D. (1994). The lymphatics of the liver. *Anat. Embryol. (Berl.)* 190, 201–209.



- Tsuchiya, T., Wang, L., Yafune, A., Kimura, M., Ohishi, T., Suzuki, K., Mitsumori, K., and Shibutani, M. (2012). Disruptive cell cycle regulation involving epigenetic downregulation of Cdkn2a (p16(Ink4a)) in early-stage liver tumor-promotion facilitating liver cell regeneration in rats. *Toxicology* 299, 146–154.
- Tsutsumi, M., Sugisaki, T., Makino, T., Miyagi, N., Nakatani, K., Shiratori, T., Takahashi, S., and Konishi, Y. (1987). Oncofetal expression of glutathione S-transferase placental form in human stomach carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 78, 631–633.
- Unsal, M., Akpolat, I., and Kandemir, B. (2003). Glutathione-S transferase-pi expression in non small cell lung cancer in the assessment of response to chemotherapy. *Saudi Med. J.* 24, 493–498.
- Vaughn, M.P., Biswal Shinohara, D., Castagna, N., Hicks, J.L., Netto, G., De Marzo, A.M., Speed, T.J., Reichert, Z.R., Kwabi-Addo, B., Henderson, C.J., et al. (2011). Humanizing  $\pi$ -class glutathione S-transferase regulation in a mouse model alters liver toxicity in response to acetaminophen overdose. *PLoS One* 6, e25707.
- Vinogradov, S., and Wei, X. (2012). Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomed.* 7, 597–615.
- Walker, R.M. (1966). Francis Glisson and his capsule. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 38, 71–91.
- Wang, L., and Boyer, J.L. (2004). The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *Hepatology* 39, 892–899.
- Werner, E.D., Lee, J., Hansen, L., Yuan, M., and Shoelson, S.E. (2004). Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J. Biol. Chem.* 279, 35298–35305.
- Westwick, J.K., Weitzel, C., Leffert, H.L., and Brenner, D.A. (1995). Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J. Clin. Invest.* 95, 803–810.
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P.A., Modlin, R.L., Liblau, R.S., Gressner, A.M., and Kaufmann, S.H.E. (2007). Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26, 117–129.
- Wisse, E., Braet, F., Luo, D., De Zanger, R., Jans, D., Crabbé, E., and Vermoesen, A. (1996). Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol. Pathol.* 24, 100–111.
- Wisse, E., Luo, D., Vermijlen, D., Kanellopoulou, C., De Zanger, R., and Braet, F. (1997). On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin. Liver Dis.* 17, 265–286.
- Wittenberg, C., and Reed, S.I. (1989). Conservation of function and regulation within the Cdc28/cdc2 protein kinase family: characterization of the human Cdc2Hs protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4064–4068.
- Wu, J.-M., Skill, N.J., and Maluccio, M.A. (2010). Evidence of aberrant lipid metabolism in hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *HPB* 12, 625–636.
- Wu, Y., Fan, Y., Xue, B., Luo, L., Shen, J., Zhang, S., Jiang, Y., and Yin, Z. (2006). Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene* 25, 5787–5800.

- Wullaert, A., Heynincx, K., and Beyaert, R. (2006). Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- $\kappa$ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1090–1101.
- Wüstefeld, T., Rakemann, T., Kubicka, S., Manns, M.P., and Trautwein, C. (2000). Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology*. *Baltim. Md* *32*, 514–522.
- Xiao, G., and Fu, J. (2010). NF- $\kappa$ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am. J. Cancer Res.* *1*, 192–221.
- Xin, H.-W., Ambe, C.M., Hari, D.M., Wiegand, G.W., Miller, T.C., Chen, J.-Q., Anderson, A.J., Ray, S., Mullinax, J.E., Koizumi, T., et al. (2013). Label-retaining liver cancer cells are relatively resistant to sorafenib. *Gut*.
- Xu, C., Shen, G., Yuan, X., Kim, J.-H., Gopalkrishnan, A., Keum, Y.-S., Nair, S., and Kong, A.-N.T. (2006). ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* *27*, 437–445.
- Xu, C., Feng, D., Li, L., Yu, P., Hu, X., and Liu, Y. (2010). [The expression and prognostic significance of ERCC1 and GST-pi in lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi Chin. J. Lung Cancer* *13*, 195–200.
- Xu, X.R., Huang, J., Xu, Z.G., Qian, B.Z., Zhu, Z.D., Yan, Q., Cai, T., Zhang, X., Xiao, H.S., Qu, J., et al. (2001). Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 15089–15094.
- Yamada, T., Yamamoto, M., Ozawa, K., and Honjo, I. (1977). Insulin requirements for hepatic regeneration following hepatectomy. *Ann. Surg.* *185*, 35–42.
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J.J., and Fausto, N. (1997). Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1441–1446.
- Yamamoto, H., Murawaki, Y., and Kawasaki, H. (1995). Hepatic collagen synthesis and degradation during liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*. *Baltim. Md* *21*, 155–161.
- Yamashita, T., Forgues, M., Wang, W., Kim, J.W., Ye, Q., Jia, H., Budhu, A., Zanetti, K.A., Chen, Y., Qin, L.-X., et al. (2008). EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *68*, 1451–1461.
- Yang, B., Guo, M., Herman, J.G., and Clark, D.P. (2003). Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* *163*, 1101–1107.
- Yang, D., Tournier, C., Wysk, M., Lu, H.T., Xu, J., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (1997). Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3004–3009.
- Yin, Z., Ivanov, V.N., Habelhah, H., Tew, K., and Ronai, Z. (2000). Glutathione S-transferase p elicits protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res.* *60*, 4053–4057.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors Chur Switz*. 24, 21–44.

Young, M.R., Yang, H.-S., and Colburn, N.H. (2003). Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kappa B and Pcd4. *Trends Mol. Med.* 9, 36–41.

Yusof, Y.A.M., Yan, K.L., and Hussain, S.N.A.S. (2003). Immunohistochemical expression of pi class glutathione S-transferase and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Anal. Quant. Cytol. Histol. Int. Acad. Cytol. Am. Soc. Cytol.* 25, 332–338.

Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.-S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J., et al. (2009). Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell* 16, 425–438.

### Ouvrages :

- Hépatologie, Bourel Michel, Aupelf-Uref, 1991.
- Précis d'histoire naturelle, Pizon Antoine, Lib. Octave Douin ed., 1930.
- Cancérologie, Lorient Y. et Mordant P., Elsevier Masson, 2011



# **ANNEXES**



## LISTE DES PUBLICATIONS

### En préparation :

- Pajaud J, Ribault C, Ben Mosbah I, Rauch C, Bellaud P, Aninat C, Loyer P, Morel F, Corlu A. GSTP1/P2 is involved in the timing of signaling pathway activations and cell cycle regulator expressions for efficient and synchronous liver regeneration in mice.

### En cours de soumission :

- Ben Mosbah I, Duval H, Mbatchi S-F, Ribault C, Dr. Grandadam S, Pajaud J, Morel F, Boudjema K, Compagnon P. Intermittent selective clamping improves rat liver regeneration by attenuating oxidative and endoplasmic reticulum stress. Cell Death and Disease.

### Acceptés :

- Ben Mosbah I, Mouchel Y, Pajaud J, Ribault C, Lucas C, Laurent A, Boudjema K, Morel F, Corlu A, Compagnon P. Pretreatment with mangafodipir improves liver graft tolerance to ischemia/reperfusion injury in rat. PLoS One. 2012;7(11):e50235.
- Pajaud J, Kumar S, Rauch C, Morel F, Aninat C. Regulation of signal transduction by glutathione transferases. Int J Hepatol. 2012;2012:137676.
- El-Seedy A, Girodon E, Norez C, Pajaud J, Pasquet MC, de Becdelièvre A, Bienvenu T, des Georges M, Cabet F, Lalau G, Bieth E, Blayau M, Becq F, Kitzi A, Fanen P, Ladeveze V. CFTR mutation combinations producing frequent complex alleles with different clinical and functional outcomes. Hum Mutat. 2012 Nov;33(11):1557-65.
- Aubert J, Begriche K, Delannoy M, Morel I, Pajaud J, Ribault C, Lepage S, McGill MR, Lucas-Clerc C, Turlin B, Robin MA, Jaeschke H, Fromenty B. Differences in early acetaminophen hepatotoxicity between obese ob/ob and db/db mice. J Pharmacol Exp Ther. 2012 Sep;342(3):676-87.
- Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost PE, Fautrel A, Pajaud J, Lepage S, Lucas-Clerc C, Bégué JM, Fromenty B, Robin MA. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. Lab Invest. 2012 Mar;92(3):396-410.

# FORMATIONS

## Année 2009-2010 :

- Mission d'enseignement auprès des L1 sciences de la vie pour les années scolaires (64h équivalent TP)
- Formations proposées par l'IUFM de Bretagne dans le cadre de la mission d'enseignement (Janvier-Mars, Rennes, durée 9 jours)
- Journée des doctorants de la faculté de pharmacie de l'Université de Rennes 1 (10 Janvier 2010, Rennes, 1 journée)

## Année 2010-2011 :

- Mission d'enseignement auprès des L1 sciences de la vie pour les années scolaires (64h équivalent TP)
- Formations proposées par l'IUFM de Bretagne dans le cadre de la mission d'enseignement (Janvier-Mars, Rennes, durée 9 jours)
- Formation « Ecrire et se faire publier : le doctorat et la publication scientifique » (21 janvier 2011, Rennes, ½ journée)
- Réalisation d'un court métrage de vulgarisation scientifique
- « Formation spéciale à l'expérimentation animale-Niveau 1 » (Paris, 2 semaines)

## Année 2011-2012 :

- Formation « Et pourquoi pas un docteur dans votre entreprise ? » (23 Septembre 2011, Rennes, ½ journée)
- Participation aux Doctoriales de Bretagne 2012

# COMMUNICATIONS AFFICHEES

- Communication affichée au 4<sup>ème</sup> colloque sur la **Génomique Fonctionnelle du Foie** à Bordeaux (GFF), mars 2012 : « Implication de la Glutathion Transferase Pi dans le contrôle de la régénération hépatique »
- Communication affichée à la 71<sup>ème</sup> journée scientifique de l'**AFEF** de Montpellier, octobre 2012 : « Implication de la Glutathion Transferase Pi dans le contrôle de la régénération hépatique chez la souris et la prolifération des cellules cancéreuses hépatiques humaines »



VU :

**Le Directeur de Thèse**  
(Nom et Prénom)

VU :

**Le Responsable de l'École Doctorale**

**VU pour autorisation de soutenance**  
**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINEAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**  
**Le Président de Jury,**  
(Nom et Prénom)

