



Rôle de l'ostéopontine dans les complications hépatiques induites par l'alcool, l'obésité et l'ischémie-reperfusion

Stéphanie Patouraux

► To cite this version:

Stéphanie Patouraux. Rôle de l'ostéopontine dans les complications hépatiques induites par l'alcool, l'obésité et l'ischémie-reperfusion. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4134 . tel-01249404

HAL Id: tel-01249404

<https://theses.hal.science/tel-01249404>

Submitted on 4 Jan 2016

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

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

UNIVERSITE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

UFR Sciences

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED85)

THESE DE DOCTORAT

Présentée par Stéphanie PATOURAUX

Pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

ROLE DE L'OSTEOPONTINE DANS LES COMPLICATIONS HEPATIQUES INDUITES PAR L'ALCOOL, L'OBESITE ET L'ISCHEMIE-REPERFUSION

Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2014

Devant le jury composé de

Professeur Jean-François MICHIELS

Président du jury

Docteur Sophie LOTERSZTAJN

Rapporteur

Professeur Valérie PARADIS

Rapporteur

Docteur Philippe GUAL

Directeur de thèse

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	2
RESUME.....	4
INTRODUCTION.....	5
PARTIE 1 : MALADIES ALCOOLIQUES ET NON ALCOOLIQUES DU FOIE.....	6
1. L'obésité	6
1.1. Généralités	6
1.1.1. Définition et épidémiologie	6
1.1.2. Principales causes de l'obésité	8
1.1.3. Principales complications de l'obésité	8
1.2. Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation et l'insulino-résistance liées à l'obésité	12
1.2.1. Macrophages dans l'inflammation chronique lors de l'obésité	13
1.2.2. Lymphocytes dans l'inflammation chronique lors de l'obésité	14
1.2.2.1. Lymphocytes T	14
1.2.2.2. Lymphocytes B.....	16
1.2.3. Cellules dendritiques dans l'inflammation chronique lors de l'obésité	16
1.2.4. Rôle de l'inflammation dans le développement de l'insulino-résistance.....	17
1.3. Lésions hépatiques dues à l'obésité : Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) ____	21
1.3.1. Epidémiologie des NAFLD	21
1.3.2. Histopathologie de l'atteinte hépatique	22
1.3.2.1. Lésions élémentaires	22
1.3.2.2. Stéatose	22
1.3.2.3. Stéatohépatite (NASH-Non Alcoholic Steatohepatitis)	22
1.3.2.4. Fibrose	22
1.3.2.5. Classification des NAFLD.....	24
1.4. Physiopathologie de l'atteinte hépatique lors de l'obésité	27
1.4.1. Stéatose.....	27
1.4.2. Stéatohépatite.....	29
1.4.2.1. Rôle de la stéatose.....	29
1.4.2.2. Rôle des cytokines inflammatoires.....	30
1.4.2.3. Rôle du microbiote intestinal	31
1.4.3. Fibrose	33
2. L'alcool	36
2.1. Généralités	36
2.2. Epidémiologie des maladies alcooliques hépatiques.....	38
2.3. Histopathologie des maladies alcooliques du foie.....	39
2.3.1. Lésions élémentaires.....	39
2.3.2. Classifications des maladies alcooliques du foie.....	39

2.4.	Physiopathologie de l'atteinte hépatique lors de l'alcoolisme chronique	41
2.4.1.	Métabolisme de l'éthanol	41
2.4.2.	Stéatose	41
2.4.3.	Stéatohépatite et fibrose	42
PARTIE 2 : L'OSTEOPONTINE		45
1.	Structure de l'ostéopontine	45
1.1.	Gène	45
1.2.	Protéine	46
1.2.1.	OPN sécrétée (OPNs)	46
1.2.2.	OPN intra cellulaire (OPNi)	47
2.	OPN et carcinome hépatocellulaire	50
3.	Rôle de l'ostéopontine dans l'inflammation	51
3.1.	Régulation de l'expression d'OPN lors de l'inflammation	53
3.2.	Rôle chimioattractant	53
3.3.	Rôle sur la prolifération et la survie cellulaire	54
3.4.	Rôle sur la modulation de la réponse inflammatoire	55
3.5.	Rôle sur la différenciation des cellules inflammatoires	55
4.	Ostéopontine et obésité	56
4.1.	Taux plasmatiques	56
4.1.1.	Homme	56
4.1.2.	Souris	57
4.2.	Tissu adipeux	57
4.2.1.	Homme	57
4.2.2.	Modèles murins	57
4.3.	Maladies non alcooliques du foie	59
4.3.1.	Stéatose	59
4.3.1.1.	Homme	59
4.3.1.2.	Souris	60
4.3.2.	Inflammation et fibrose	60
4.3.2.1.	Homme	60
4.3.2.2.	Modèles murins	60
5.	Ostéopontine et alcool	64
5.1.	Patients	64
5.2.	Modèles murins	65
5.2.1.	Inflammation et souffrance hépatique	65
5.2.2.	Fibrose hépatique	66
5.3.	Rôle protecteur de l'OPN dans l'alcoolisme chronique	68

6. Ostéopontine et ischémie reperfusion	70
6.1. L'ischémie reperfusion (IR)	70
6.1.1. Définition de l'ischémie-reperfusion.....	70
6.1.2. Ischémie-reperfusion hépatique.....	70
6.1.3. Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion	71
6.1.3.1. Phase ischémique	71
6.1.3.2. Phase de reperfusion.....	72
6.1.4. Aspects histopathologiques	75
6.2. Ostéopontine et ischémie-reperfusion	76
6.2.1. Rein.....	76
6.2.1.1. Le rôle chimioattractant de l'OPN lors de l'ischémie-reperfusion.....	76
6.2.1.2. L'OPN est un facteur de survie des cellules des tubules rénaux.....	77
6.2.1.3. L'OPN est associée à la régénération cellulaire après ischémie reperfusion.	78
6.2.2. Cerveau.....	78
OBJECTIFS	79
RESULTATS	80
PARTIE 1 : OPN ET OBESITE	81
PARTIE 2: OPN ET ALCOOL	106
PARTIE 3: OPN ET ISCHEMIE-REPERFUSION.....	110
DISCUSSION	115
CONCLUSION	130
ANNEXES	133
REFERENCES	134

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Répartition de la population en fonction du niveau d'IMC selon le rapport Obépi 2012	7
Figure 2 : Obésité: épidémiologie, causes et conséquences	10
Figure 3 : Inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité	12
Figure 4 : Aspects histopathologiques des maladies alcooliques et non alcooliques du foie .	23
Figure 5 : Consommation mondiale d'alcool en litres par personne (World Health Organisation).....	37
Figure 6 : Ostéopontine : traduction, structure moléculaire et interactions	49
Figure 7 : Rôle et régulation de l'ostéopontine dans l'inflammation	52
Tableau I : Définitions du syndrome métabolique	11
Tableau II : Score NAS et fibrose selon Kleiner et coll.	25
Tableau III : Score SAF et algorithme diagnostique selon Bedossa et coll.	26
Tableau IV : Score histologique à visée pronostique des hépatites alcooliques d'après Altamirano <i>et coll.</i>	40
Schéma 1 : Résistance à l'insuline.....	20
Schéma 2 : Physiopathologie des maladies non alcooliques du foie (NAFLD)	35
Schéma 3 : Physiopathologie des maladies alcooliques du foie.....	44
Schéma 4 : OPN et fibrose hépatique, d'après Machado et coll.	63
Schéma 5 : Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion	74
Schéma 6 : Impact de l'OPN sur l'inflammation du tissu adipeux et des complications hépatiques au cours de l'obésité	105
Schéma 7 : Rôles potentiels de l'OPN lors de l'ischémie-reperfusion hépatique	114

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH: Alcool déshydrogénase

AG: Acide Gras

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AMPK: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase

ATGL: Adipose Triglyceride Lipase

CB1-2: Cannabinoid receptor 1-2

CCL2: Chemokine ligand 2

CD: Cluster de différenciation

ConA: Concavalin-A

Cyt P450 2E1: Cytochrome P450 isoforme 2E1

DC: Cellules dendritiques

GLUT: Glucose Transporter

HFD: High Fat Diet

Hh: Hedgehog

HSL: Hormone-sensitive Lipase

IFN γ : Interféron gamma

IL: Interleukine

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase

IR: Ischémie-reperfusion

IRS: Insulin Receptor Substrate

LB: Lymphocyte B

LPS: Lipopolysaccharide

LT: Lymphocyte T

M1: Macrophages inflammatoires

M2: Macrophages anti-inflammatoires ou alternatifs

MAF: Maladie Alcoolique du Foie

MCD: Méthionine Choline Deficient

MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein 1

Myd88: Myeloid Differentiation factor 88

NAD: Nicotinamide adenine dinucléotide

NADH: Nicotinamide adenine dinucléotide hydrogéné

NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH: Non-Alcoholic SteatoHepatitis

NF- κ B: Nuclear factor kappa B

NKT: Lymphocytes T Natural Killer

NLR: NOD-like receptor

NO: monoxyde d'azote

NOD: Nucleotid-binding Oligomerization Domain

NOS2 : Nitric Oxide Synthase 2

OPN : Ostéopontine

PNPLA2: Patatin-like Phospholipase domain containing 2

ROC: Receiving Operator Curve

SREBP-1c: Sterol Responsive Binding Element Protein 1c

STAT-1: Signal Transducer and Activator of Transcription 1

TA: Tissu Adipeux

TG: Triglycérides

TGF: Transforming Growth Factor

Th: T-helper

TLR: Toll-like Receptor 4

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Treg: Lymphocyte T régulateur

RESUME

L'ostéopontine (OPN) est une protéine synthétisée et sécrétée par de nombreux types cellulaires. Elle joue un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire et immune, en régulant le recrutement et le maintien des cellules immunitaires sur le site de l'inflammation. Cette protéine est également pro-fibrogénique, en favorisant l'activation de cellules fibroblastiques. Cette protéine peut aussi présenter des propriétés anti-apoptiques dans les cellules immunitaires et les hépatocytes. Nous avons recherché son rôle dans les complications hépatiques allant des maladies chroniques du foie induites par l'obésité (NAFLD) ou une consommation chronique d'alcool (ALD) aux lésions hépatiques induites par l'ischémie reperfusion (IR).

Les NAFLD et ALD sont les premières causes d'hépatopathies en France. Le spectre de ces complications va de la stéatose à la stéatohépatite, la fibrose, la cirrhose et parfois le carcinome hépatocellulaire. Des acteurs intra- et extra-hépatiques favorisent le développement de ces complications. Parmi les facteurs extra-hépatiques, le tissu adipeux joue un rôle important dans les NAFLD. Mes études ont permis de mettre en évidence que l'OPN favorise l'inflammation du foie et du tissu adipeux dans les NAFLD et constitue un marqueur prédictif de la fibrose hépatique dans les ALD. Chez les patients obèses, l'expression de l'OPN augmente avec l'inflammation et corrèle avec l'expression des marqueurs des cellules dendritiques et des lymphocytes T (LT) dans le tissu adipeux et le foie. Chez la souris obèse, son invalidation prévient la stéatose hépatique et l'inflammation du tissu adipeux qui s'explique par une diminution de l'infiltration des macrophages, des cellules dendritiques et des LT et de la polarisation Th1 des LT CD4. Son invalidation prévient aussi l'inflammation hépatique et les réponses Th1 et Th17 des LT CD4 après injection de LPS. Chez les patients alcooliques, l'expression de l'OPN dans le foie, le tissu adipeux et le sérum augmente avec la fibrose hépatique. Son expression hépatique corrèle avec l'inflammation hépatique, la fibrose, l'expression du TGF β , l'accumulation des neutrophiles et son niveau systémique. OPN circulant prédit aussi la fibrose modérée avec la même efficacité que l'acide hyaluronique, la kératine 18 ou le FibroMeter®.

Les lésions induites par l'IR hépatique sont la principale cause de dommages survenant au cours des procédures chirurgicales comme la transplantation hépatique ou la résection hépatique partielle. Le rôle de l'OPN lors de l'IR a été principalement rapporté au niveau rénal, mais n'avait pas été étudié dans le foie. Mes études ont mis en évidence que l'OPN pourrait jouer un rôle protecteur. Son invalidation (OPN^{-/-}) aggrave les lésions hépatiques induites par l'ischémie reperfusion chez la souris. Chez les souris OPN^{-/-}, après IR, les marqueurs de souffrance hépatocytaire, le niveau d'expression génique hépatique des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , INF γ , IL6 et de l'IL1 β) et d'iNOS étaient fortement augmentés, et la nécrose hépatocytaire plus étendue par rapport aux souris sauvages. Nos travaux in vitro suggèrent que le rôle protecteur de l'OPN pourrait être dû à sa capacité à prévenir la mort hépatocytaire (régule positivement l'expression de Bcl2 et le niveau ATP) et à limiter la production toxique de NO dépendant d'iNOS dans les macrophages.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence de nouveaux rôles de l'OPN dans les lésions induites par l'I/R hépatique et pourrait constituer une cible thérapeutique pour les maladies chroniques du foie.

INTRODUCTION

PARTIE 1 : MALADIES ALCOOLIQUES ET NON ALCOOLIQUES DU FOIE

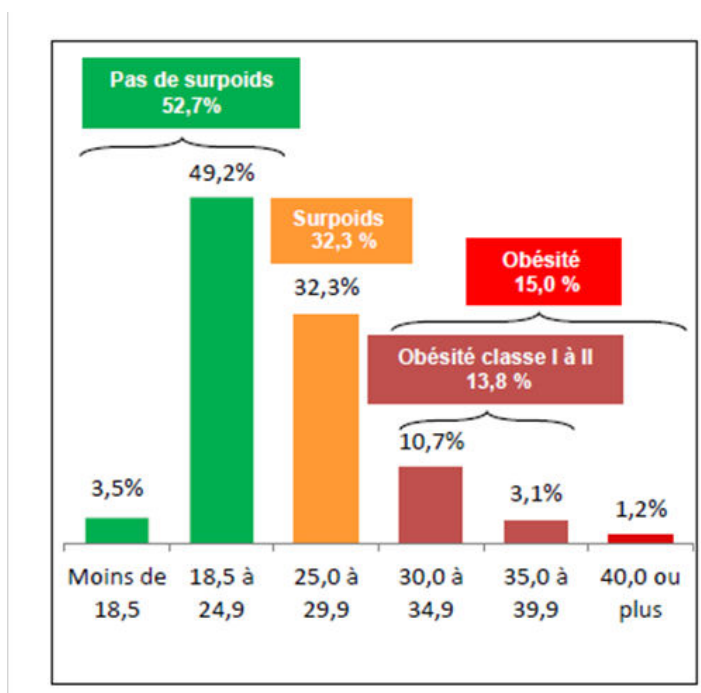
1. L'obésité

1.1. Généralités

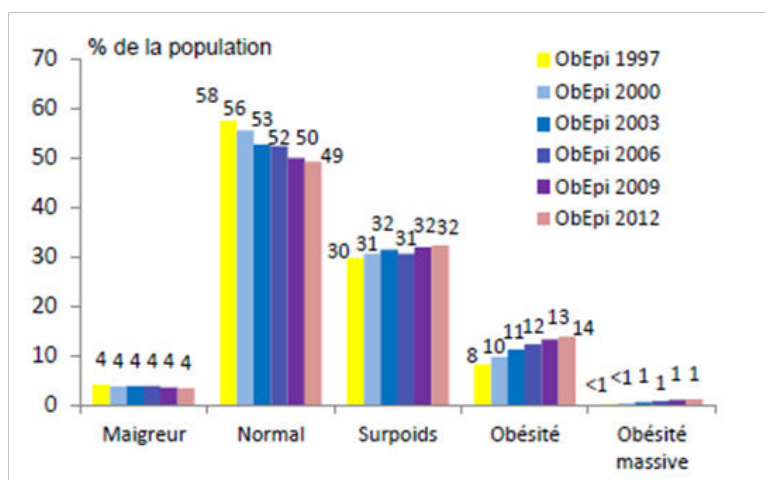
1.1.1. Définition et épidémiologie

L'obésité est définie selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) par un indice de masse corporelle (IMC), supérieur ou égal à 30. L'obésité morbide est définie par un IMC supérieur ou égal à 40. L'IMC est calculé par le rapport du poids (kg) sur la taille au carré (m²). L'IMC normal est entre 20 et 25, un IMC supérieur ou égal à 25 signe le surpoids. On distingue l'obésité androïde, centrale ou viscérale, où la distribution des graisses est principalement abdominale, et l'obésité gynoïde. Alors que la première est associée au syndrome métabolique, la seconde ne se complique que rarement d'insulino-résistance et de maladies cardio-vasculaires. L'augmentation de la prévalence de l'obésité dans le monde en fait un problème majeur de santé publique. Selon un rapport de l'OMS de 2008, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980, 35% de la population mondiale est en surpoids et 11% est obèse. En France, l'enquête Obépi de 2012 rapporte 32,3% de cas de surpoids et 15% de cas d'obésité dont 1,2% d'obèses morbides chez des sujets de plus de 18 ans.

Les différentes études Obépi réalisées depuis 1997 permettent d'observer une augmentation progressive de la prévalence de l'obésité en France (Figure 1).



Répartition de la population en fonction du niveau d'IMC en 2012



Répartition de la population en fonction du niveau d'IMC depuis 1997

Figure 1 : Répartition de la population en fonction du niveau d'IMC selon le rapport Obépi 2012

1.1.2. Principales causes de l'obésité (Figure 2)

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre l'apport énergétique et les dépenses énergétiques. Dans de rares cas, l'obésité est due à une modification génétique identifiée. Une mutation de gène de la leptine ou de son récepteur (Mazen, El-Gammal et al. 2009) , une mutation du récepteur de la mélanocortine (Bell, Meyre et al. 2005) ou du gène du récepteur de la cholécystokinine (Panchal and Brown 2011) sont alors responsables d'une prise alimentaire excessive. Plus récemment, le rôle de la flore intestinale a été mis en évidence. La composition du microbiote intestinal serait unique chez chaque individu, avec un ensemble de bactéries communes à tous les individus. Cette flore intestinale serait influencée par des facteurs génétiques, l'alimentation, ou un traitement (antibiotiques, gastric by pass). Le microbiote modifierait l'immunité et le métabolisme de l'hôte, en modulant l'adiposité, la sensibilité à l'insuline, et l'inflammation de bas grade qui leur sont associées. Ce système microbien jouerait un rôle sur la perméabilité intestinale, en permettant la translocation de lipopolysaccharides (LPS) dans le sang, appelée aussi endotoxémie métabolique (Clarke, Murphy et al. 2012).

Mais c'est surtout l'évolution du mode de vie, avec une prise alimentaire excessive par rapport à une activité physique décroissante qui est principalement rapportée comme responsable du maintien du déséquilibre entre apport et dépense énergétique. L'évaluation de ces paramètres reste complexe. Une plus grande consommation de boissons sucrées et une augmentation de la taille des portions alimentaires sont rapportées (Stein and Colditz 2004). La diminution de l'activité physique est liée aux transports ou aux occupations domestiques plus sédentaires (Lopez and Hynes 2006; Cizza and Rother 2012).

1.1.3. Principales complications de l'obésité

L'obésité est associée à plusieurs complications (Figure 2) :

- L'obésité un facteur de risque de développer des complications métaboliques telles que la dyslipidémie, la résistance à l'insuline et le diabète de type II. L'obésité fait partie des anomalies qui constituent le syndrome métabolique. En effet, le syndrome métabolique regroupe des anomalies du bilan glucidique, lipidique, l'hypertension artérielle et l'obésité. Selon les différentes organisations, l'obésité sera un facteur obligatoire ou non obligatoire pour définir le syndrome métabolique (Tableau I). Selon le consensus actuel, la présence de trois facteurs parmi l'obésité viscérale, l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie, le faible taux

d'HDL-cholestérol et l'hypertension artérielle définit un syndrome métabolique (Alberti, Eckel et al. 2009). L'existence de ce syndrome prédispose à la survenue d'un diabète de type II et au développement de maladies cardio-vasculaires. L'obésité et la sédentarité sont donc des facteurs qui prédisposent au syndrome métabolique.

- L'obésité est un facteur de risque de complications cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque (Poirier, Giles et al. 2006).

- L'obésité est associée à des complications respiratoires comme les apnées du sommeil touchant 40% des individus obèses (Jubber 2004).

- L'obésité est un facteur de risque important pour le développement de certains types de cancer comme le cancer du sein, de l'endomètre, de l'œsophage et du colon (Pischon, Nothlings et al. 2008).

- L'obésité est associée à des complications articulaires mécaniques, et à certaines pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde (Crowson, Matteson et al. 2013).

- L'obésité est également responsable de complications hépatiques, allant de la stéatose à la stéatohépatite et à la fibrose, pouvant évoluer vers la cirrhose et le développement d'un carcinome hépatocellulaire. Ces complications hépatiques sont regroupées sous le terme de NAFLD, pour Non alcoholic fatty liver disease. D'après le rapport de la World Gastroenterology Organisation de 2012, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et la stéatohépatite non alcoolique (NASH) représentent actuellement la première cause de maladie hépatique dans les pays occidentaux. Ces complications hépatiques seront détaillées plus loin.

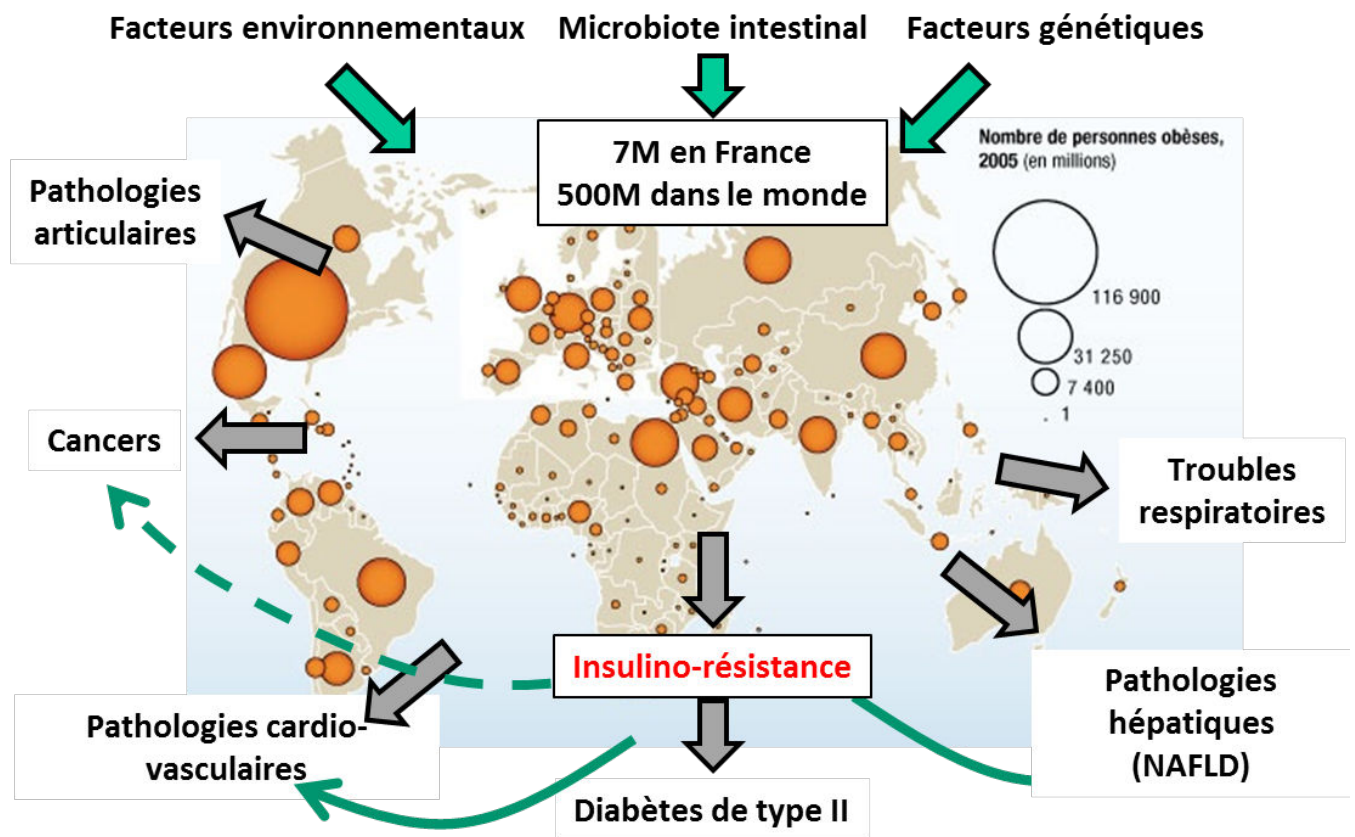


Figure 2 : Obésité : épidémiologie, causes et conséquences

L'obésité est un problème majeur de santé publique. Elle est due à plusieurs facteurs. C'est un facteur de risque pour le développement de plusieurs complications métaboliques (résistance à l'insuline), hépatiques, cardiovasculaires, respiratoires et articulaires. C'est aussi un facteur de risque de développer certains cancers.

OMS 1999	EGIR 1999	FID 2005	NCEP ATP III 2001
CONDITION OBLIGATOIRE			
Intolérance au glucose ou insulino-résistance ou diabète de type 2	Hyper insulinémie (non diabétique)	Obésité abdominale	Aucune
+ 2 parmi			3 parmi
OBESITE			
IMC > 30 kg/m ² ou T/H : > 0,9 (H) et 0,85 (F)	Tour de taille : ≥ 94 cm (H) ≥ 80 cm (F)	Condition obligatoire (tour de taille selon origine ethnique et sexe)	Tour de taille : ≥ 102 cm (H) ≥ 88 cm (F)
HYPERTENSION ARTERIELLE			
Pression artérielle ≥ 140/90mmHg ou traitement	Pression artérielle ≥ 140/90mmHg ou traitement	Pression artérielle Systolique ≥ 130 mmHg Diastolique ≥ 85mmHg ou traitement	Pression artérielle ≥ 130/85mmHg ou traitement
DYSLIPIDEMIE			
HDL-C < 0,9 mmol/l (H) < 1 mmol/l (F) ou TG > 1,7 mmol/l	HDL-C < 1 mmol/l ou TG > 2 mmol/l	HDL-C < 1,3 mmol/l (H) < 1,29 mmol/l (F) ou traitement Et TG > 1,7 mmol/l ou traitement	HDL-C < 1,3 mmol/l (H) < 1,29 mmol/l (F) Et TG > 1,7 mmol/l
AUTRES			
MICROALBUMINURIE Taux d'excrétion urinaire > 20µg/min ou albumine/créatine >30mg/g	HYPERGLYCEMIE à jeun ≥ 110 mg/dl	HYPERGLYCEMIE à jeun ≥ 100 mg/dl ou diabète de type 2	HYPERGLYCEMIE à jeun ≥ 110 mg/dl

Tableau I : Définitions du syndrome métabolique

OMS = Organisation Mondiale de la Santé ; EGIR = European Group for the Study of Insulin Resistance ; NCEP ATP III= National Cholesterol Education Program Third Adult Treatment Panel ; FID = Fédération Internationale du Diabète, H = Homme, F= Femme ; HDL –C = High Density Lipoprotein-Cholestérol ; TG = Triglycérides

1.2. Rôle du tissu adipeux dans l'inflammation et l'insulino-résistance liées à l'obésité

L'obésité est caractérisée par une augmentation du tissu adipeux, et s'accompagne d'une inflammation chronique de bas grade. Les cellules immunes du tissu adipeux participeraient à cette inflammation, et au développement de l'insulino-résistance. L'accumulation et/ou la (dé)régulation des macrophages, des lymphocytes et des cellules dendritiques dans le tissu adipeux sont des sources importantes d'inflammation qui expliquent un lien causal entre le développement d'une insulino-résistance et de complications hépatiques. En effet, lors de l'obésité, la population et le profil des cellules immunes sont modifiés (Figure 3).

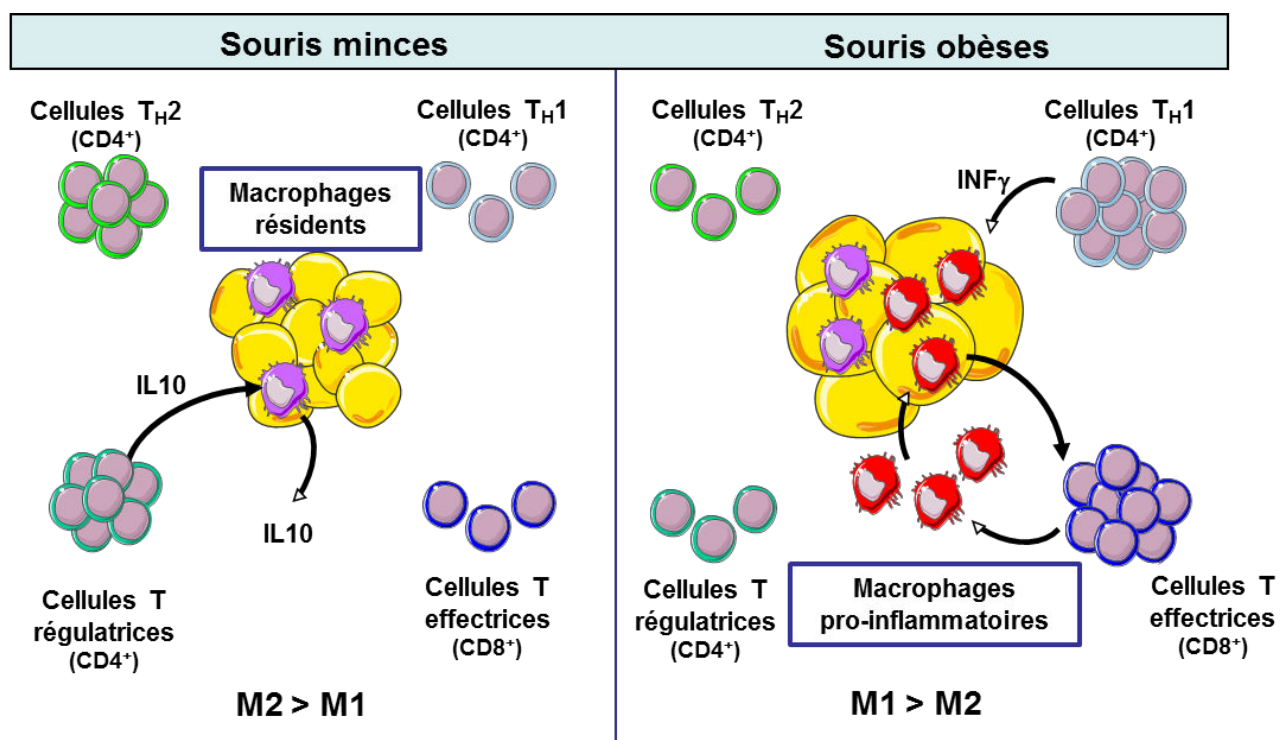


Figure 3 : Inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité

Dans le tissu adipeux de sujets minces, les macrophages M2 et les lymphocytes Treg et Th2 prédominent. Ces cellules sécrètent des cytokines anti-inflammatoires. Les adipocytes sécrètent de l'adiponectine.

Lors de l'obésité, l'hypertrophie du tissu adipeux, l'hypoxie et l'apoptose des adipocytes entraînent une sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires et de MCP1, favorisant l'infiltration du tissu adipeux par des macrophages M1. La polarisation des lymphocytes T en Th1 et l'afflux de lymphocytes T cytotoxiques impliquent une polarisation M1 et la production de cytokines inflammatoires.

Les cytokines inflammatoires altèrent la voie de signalisation de l'insuline, entraînant la résistance à l'insuline.

1.2.1. Macrophages dans l'inflammation chronique lors de l'obésité

L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de bas grade. L'obésité est accompagnée d'une production anormale d'adipokines (leptine, adiponectine ...) et d'une augmentation de l'expression de marqueurs de l'inflammation, par les adipocytes et les macrophages. L'infiltration macrophagique du tissu adipeux au cours de l'obésité est à la fois une cause et une conséquence de l'inflammation chronique. Dans le tissu adipeux, la production de cytokines inflammatoires est en partie responsable d'une infiltration par des macrophages (Xu, Barnes et al. 2003).

La plasticité et la polarisation fonctionnelle sont des caractéristiques des macrophages. Selon le contexte, les macrophages auront plusieurs phénotypes (Mantovani, Sica et al. 2004; Gordon and Taylor 2005):

- Le phénotype M1, pro-inflammatoire, induit par des stimuli pro-inflammatoires (LPS, INF γ), entraîne la production élevée de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, TNF α). Ces macrophages sont CD11b $^{+}$ /CD11c $^{+}$.
- Le phénotype M2, induit par l'IL-4 et l'IL13, entraîne la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) ainsi que l'inhibition d'iNOS. Ces macrophages sont CD11b $^{+}$ /CD11c $^{-}$.

Des phénotypes intermédiaires sont aussi présents mais ne seront pas développés ici.

Dans le tissu adipeux de souris minces, les macrophages présentent un phénotype M2, expriment le marqueur MGL-1 (macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1) et sont dispersés entre les adipocytes. Chez les souris obèses, en plus des macrophages résidents, il existe une infiltration par des macrophages M1, pro-inflammatoire, recrutés en partie par le biais du récepteur CCR2 (C-C chemokine receptor type 2), provenant de cellules dérivées de la moelle osseuse et se localisant en « couronnes » autour d'adipocytes nécrotiques (Lumeng, DelProposto et al. 2008). Les mécanismes par lesquels l'hypertrophie du tissu adipeux entraîne la nécrose des adipocytes ne sont pas clairement établis. Le stress du réticulum endoplasmique augmenté en réponse à l'excès de nutriment, notamment des acides gras libres et des protéines pourrait être impliqué. De plus, lors de l'obésité, les adipocytes sécrètent des chimiokines comme MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) qui entraîne le recrutement de macrophages pro-inflammatoires.

Chez l'homme, les macrophages ne sont pas strictement polarisés. Lors de l'obésité, plusieurs études rapportent que les macrophages auraient un phénotype mixte mais sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Zeyda, Farmer et al. 2007; Bourlier, Zakaroff-Girard et al. 2008). Les macrophages du tissu adipeux seraient impliqués dans le développement des complications hépatiques chez l'homme. Il a en effet été montré que l'accumulation de macrophages au niveau du tissu adipeux viscéral seraient associé au degré de stéatose chez les patients insulino-résistants ainsi qu'à l'inflammation et à la fibrose hépatique chez les patients obèses, insulino-sensibles ou résistants (Tordjman, Poitou et al. 2009).

1.2.2. Lymphocytes dans l'inflammation chronique lors de l'obésité

Il a été récemment mis en évidence que cette inflammation du tissu adipeux est aussi dépendante des lymphocytes T et B.

1.2.2.1. Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont séparés en deux groupes: les lymphocytes T conventionnels, qui expriment CD4 ou CD8, et les lymphocytes T non conventionnels exprimant les marqueurs NK. Comme pour les macrophages, les lymphocytes T ont plusieurs phénotypes:

- Les lymphocytes T CD4 (ou auxiliaires): ils peuvent être polarisés en type Th1, Th2 ou Th17:
 - Le type Th1 est pro-inflammatoire, induit par l'IFN γ , et entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires comme IFN γ , IL-12 et TNF α . L'activation de cette voie est sous le contrôle du facteur de transcription T-bet (T-box expressed in T-cells) (Chakir, Wang et al. 2003).
 - Le type Th2, anti-inflammatoire est induit par l'IL-4 et entraîne la production de cytokines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. L'activation de cette voie est sous le contrôle du facteur de transcription GATA3 (GATA binding protein 3) (Chakir, Wang et al. 2003) .
 - Le type Th17 a été récemment mis en évidence pour son rôle pro-inflammatoire dans les maladies auto-immunes. Il est induit par le TGF β , l'IL-23, l'IL-6 et l'IL-1 β (Bettelli, Carrier et al. 2006; Volpe, Servant et al. 2008), et entraîne la production de l'IL-17, l'IL-21 et l'IL-22. Lors de l'activation de cette voie, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) augmente

l'expression des facteurs de transcription ROR γ t (Retinoid-related Orphan Receptor gamma t) et ROR α .

- Une sous population de LT CD4 est représentée par les T régulateurs (Treg). Ces cellules ont un rôle immunorégulateur. Elles expriment CD25 (ou IL-2 receptor alpha chain) et FOXP3 (forkhead-winged-helix transcription factor), et produisent de l'IL-10 et du TGF β (Gutcher and Becher 2007).
- Les lymphocytes T CD8 (ou cytotoxiques) sont induits par l'IL-2. Ils produisent de l'IL-2, RANTES et son récepteur CCR5, et des cytotoxines.
- Les cellules T Natural Killer (NKT) sont une sous population de lymphocytes T. Elles sont sous-divisées en 3 sous-populations: type I, type II et NKT invariantes ou iNKT. Les NKT produisent des cytokines telles que le TNF α , l'IFN γ et l'IL-4. Ces cellules représentent moins de 1% des cellules sanguines chez l'homme et la souris. Dans certains tissus, elles sont plus représentées (20 à 30% dans le foie et 10 à 20% des thymocytes chez la souris).

Dans le tissu adipeux de souris minces, les lymphocytes T régulateurs et CD4⁺ sont majoritaires. Dans l'obésité, les lymphocytes T CD8⁺ augmentent, et favoriseraient le recrutement des macrophages. La diminution des lymphocytes T régulateurs favoriserait l'insulino-résistance. En effet, la sécrétion d'IL-10 par ces cellules protégerait les adipocytes des effets du TNF α sur la voie de signalisation de l'insuline (Feuerer, Herrero et al. 2009; Nishimura, Manabe et al. 2009; Winer, Chan et al. 2009). Les lymphocytes Th17 seraient augmentés lors de l'obésité et de l'insulino-résistance (van der Weerd, Dik et al. 2012; Fabbrini, Cella et al. 2013). Ces cellules pourraient participer à l'insulino-résistance, en activant la voie JNK (Jun N-terminal Kinase) (Zhu, Wu et al. 2011). Cependant, le rôle d'IL-17 est controversé, des études chez la souris suggèrent au contraire un rôle protecteur contre la prise de poids et l'insulino-résistance (Kopp, Buechler et al. 2009; Zuniga, Shen et al. 2010). Le rôle des lymphocytes T non conventionnels dans l'obésité a été étudié à partir de modèles murins déficients en cellules NKT et soumis à un régime riche en graisse. Les résultats sont hétérogènes. Selon les modèles, les NKT favoriseraient ou préviendraient l'inflammation et l'insulino-résistance de tissu adipeux, ainsi que la stéatose (Wu, Parekh et al. 2012; Martin-Murphy, You et al. 2014).

1.2.2.2. Lymphocytes B

Au cours de l'obésité, les lymphocytes B augmentent dans le tissu adipeux, et contribuent à l'insulino-résistance en interagissant avec les lymphocytes T (Winer, Winer et al. 2011). En effet, les souris dépourvues de LB matures et soumises à un régime riche en graisse ont une meilleure tolérance au glucose et sont plus insulino-sensibles que les souris sauvages. La production de cytokines inflammatoires est diminuée dans le tissu adipeux de ces souris. Initialement, les LB activés secrèteraient des immunoglobulines (IgG) dirigés contre les antigènes intracellulaires issus d'adipocytes apoptotiques. En parallèle, les LB interagiraient avec les LT CD4 et CD8 via les complexes d'histocompatibilité (CMH de classe I et II). Cette interaction est nécessaire à l'action métabolique délétère des LB. Cette interaction entraînerait la production par les LT de cytokines inflammatoires, et maintiendrait la production d'IgG par les LB. Ces IgG forment des complexes immuns avec des auto-antigènes, responsables d'une activation des macrophages et d'une augmentation de l'inflammation du tissu adipeux, induisant une altération de la sensibilité à l'insuline (Mallat 2011; Winer, Winer et al. 2011).

1.2.3. Cellules dendritiques dans l'inflammation chronique lors de l'obésité

Une infiltration et une régulation pro-inflammatoire des lymphocytes T à des étapes précoces, et des macrophages, à des étapes plus tardives, pourraient être responsables de la mise en place de l'inflammation et de l'insulino-résistance du tissu adipeux dans l'obésité. L'identification des cellules présentatrices d'antigènes permettrait une meilleure compréhension de la mise en place de l'inflammation du tissu adipeux et par conséquent de l'insulino-résistance et des complications hépatiques.

Cependant, le recrutement et le rôle des cellules dendritiques (CD), cellules présentatrices d'antigènes, dans l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux est peu connu, car peu d'études ont été rapportées. Le nombre de CD serait augmenté dans le tissu adipeux lors de l'obésité et participerait à l'inflammation et l'insulino-résistance (Wu, Perrard et al. 2010). Notre équipe a mis en évidence que l'obésité est associée à une accumulation et une activation des CD dans le tissu adipeux des souris et de patients. De plus, l'expression de marqueurs de CD et de CD activées est augmentée progressivement en fonction de l'obésité et de l'insulino-résistance chez les patients. Chez la souris, l'équipe a pu identifier et caractériser deux populations de CD dans le tissu adipeux : les CD conventionnelles cDC,

présentes chez les souris minces et obèses, et les CD inflammatoires iDC, différenciées à partir de monocyte, présentes uniquement chez les souris obèses. Les cDC induisent *in vitro* une polarisation des LT naïfs Th1. Par contre, les iDC isolées des souris obèses induisent *in vitro* une polarisation des LT naïfs en Th17 (Bertola, Ciucci et al. 2012). Les CD pourraient être d'importants acteurs de la régulation de l'inflammation et de l'insulino-résistance du tissu adipeux au cours de l'obésité. Il a été montré que des souris dépourvues de CD et soumises à un régime riche en graisse étaient résistantes à la prise de poids et aux anomalies métaboliques (Stefanovic-Racic, Yang et al. 2012). Dans une autre étude, la déplétion en cellules CD11c+, exprimé par les cellules dendritiques et les macrophages M1, améliore l'insulino-résistance et l'inflammation du tissu adipeux et systémique dans des modèles murins d'obésité (Patsouris, Li et al. 2008).

1.2.4. Rôle de l'inflammation dans le développement de l'insulino-résistance

Chez les individus sains, la fixation de la molécule d'insuline sur son récepteur, situé au niveau de la membrane cellulaire, induit son activité tyrosine kinase (Schéma 1, d'après (Capeau 2003)). Le récepteur activé phosphoryle sur des résidus de tyrosines des protéines dont celles de la famille des IRSs (Insulin Receptor Substrate) (Virkamaki, Ueki et al. 1999). Les IRSs possèdent dans leur partie N-terminale un domaine PTB (phosphotyrosine binding domain) qui se lie à la tyrosine 960 du récepteur de l'insuline lorsqu'elle est phosphorylée. Cette interaction est requise pour la phosphorylation des résidus tyrosine de ces protéines adaptatrices par les récepteurs de l'insuline. La partie C-terminale de ces protéines contient des sites de phosphorylation des résidus tyrosine qui constituent des motifs d'ancrage pour des protéines possédant des domaines SH2 dont la sous-unité régulatrice de la PI3-kinase (phosphoinositide 3-kinase). L'activation de la PI3-kinase va entraîner la phosphorylation et l'activation de la protéine Akt (ou protéine kinase B). Celle-ci va inhiber la néoglucogénèse, et promouvoir la synthèse protéique, lipidique et glycogénique. Akt va également induire une réorganisation du cytosquelette (via l'activation d'une petite protéine GTPase, Rab), qui va permettre la translocation du récepteur du glucose Glut4 à la membrane cellulaire, facilitant l'entrée du glucose dans la cellule. De manière physiologique, dans le tissu adipeux, l'insuline augmente le transport des acides gras (AG) et leur stockage sous forme de triglycérides (TG) et elle stimule le transport glucose qui est transformé en AG dans la cellule (lipogénèse de novo). Dans le foie, l'insuline entraîne le stockage du glucose sous la forme de glycogène et la néoglucogénèse est inhibée.

A la fin du signal insulinaire, chez les sujets insulino-sensibles, les complexes insuline/récepteurs seront internalisés puis dégradés ou recyclés. Le contrôle négatif du signal nécessite aussi la déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et des protéines IRSs par les tyrosines phosphatases (PTPases). Enfin, la phosphorylation de résidus sérine et thréonine sur le récepteur ou l'IRS1 entraîne une inhibition du signal insulinaire. Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler les IRSs en sérine/thréonine : la kinase IKK- β (inhibitor of nuclear factor κ B kinase), la Jun kinase (JNK) et la PKC θ (protein kinase C theta) (Gual, Le Marchand-Brustel et al. 2005).

La résistance à l'insuline est la conséquence d'une atténuation du signal insulinaire, due à un défaut sur la cascade de signalisation. La phosphorylation du récepteur à l'insuline et des protéines IRSs, non pas sur un résidu tyrosine, mais sur certains résidus sérine ou thréonine a été rapportée comme mécanisme principal dans la résistance à l'insuline. IRS-1 et IRS-2 jouent un rôle majeur dans la régulation par l'insuline de l'homéostasie glucidique et une altération de leurs fonctions pourrait donc être associée à un état de résistance à l'insuline se traduisant par une inhibition du transport de glucose. En accord avec cette hypothèse, chez l'homme ou l'animal obèse ou diabétique de type 2, une diminution du transport de glucose au niveau du tissu adipeux et du muscle a été corrélée à une diminution de l'expression et/ou de la phosphorylation sur des résidus tyrosine des IRSs (Smith 2002; White 2002). De plus, chez 30 % des sujets ayant un risque élevé de développer un diabète de type II, par exemple des sujets dont les parents sont diabétiques de type 2, la phosphorylation sur résidu tyrosine d'IRS-1 en réponse à l'insuline est diminuée (Sesti, Federici et al. 2001). Enfin, une série de travaux indiquent que la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérine ou thréonine pourrait aussi être un des mécanismes de régulation négative de sa phosphorylation sur résidu tyrosine.

Les causes principales de cette dérégulation de la voie de l'insuline sont l'hyperinsulinémie, les cytokines pro-inflammatoires et les lipides. Les mécanismes sont complexes et en partie élucidés.

En cas d'insulino-résistance, les cellules ne répondront plus aux signaux insuliniques, et par conséquent, la production d'insuline par les cellules β pancréatiques sera augmentée. Cette hyperinsulinémie va entraîner une régulation négative par l'insuline de sa propre voie de signalisation, par plusieurs mécanismes. L'insuline va stimuler la phosphorylation sur des résidus sérine/thréonine des IRSs. En effet, un traitement prolongé des cellules avec de

l'insuline augmente la phosphorylation sur des résidus sérine/thréonine d'IRS-1, et parallèlement diminue leur phosphorylation sur des résidus tyrosine (Gual, Le Marchand-Brustel et al. 2005). Enfin, l'insuline diminue l'expression de son récepteur à la surface cellulaire, augmente l'activité des tyrosines phosphatases, ainsi que la retro-phosphorylation des IRSs, diminuant leurs phosphorylations tyrosine (Saltiel 2012).

Parmi les cytokines inflammatoires, le TNF α stimule les sérines kinases IKK- β et JNK qui phosphorylent les protéines IRSs sur un résidu sérine, bloquant la signalisation de l'insuline (Gao, Hwang et al. 2002; Hirosumi, Tuncman et al. 2002). Le TNF α et l'IL-6 augmentent la production de SOCS (suppressor of cytokine signaling), qui en se liant au récepteur à l'insuline va diminuer la phosphorylation des IRSs (Emanuelli, Peraldi et al. 2000; Ueki, Kondo et al. 2004). Enfin, le TNF α diminuerait la synthèse du transporteur GLUT-4 (Stephens and Pekala 1991).

Les cytokines inflammatoires et les acides gras saturés vont induire une augmentation de la synthèse des céramides. Les céramides vont entraîner une déphosphorylation de l'Akt, bloquant le signal insulinique (Dobrowsky, Kamibayashi et al. 1993).

La polarisation et le recrutement des cellules immunes du tissu adipeux participent à cette insulino-résistance. Chez l'homme comme chez la souris, la sécrétion de chimiokines comme MCP-1 par les adipocytes entraîne le recrutement de macrophages pro-inflammatoires, qui vont sécréter des cytokines inflammatoires. Ces cytokines provenant des macrophages, vont comme nous l'avons vu, altérer la voie de signalisation de l'insuline. Le rôle des macrophages dans le développement de l'insulino-résistance a été conforté par une étude montrant que l'inhibition de l'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux chez la souris obèse conduit à une diminution de l'inflammation, de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique (Xu, Barnes et al. 2003; Lumeng, Bodzin et al. 2007). De plus, la production de cytokines pro-inflammatoires altère la voie de signalisation de l'insuline dans les adipocytes menant à une augmentation de la lipolyse et au relargage d'acides gras libres dans la circulation sanguine. Ces derniers avec la sécrétion d'adipokines favorisent l'insulino-résistance hépatique et le développement des complications hépatique (NAFLD).

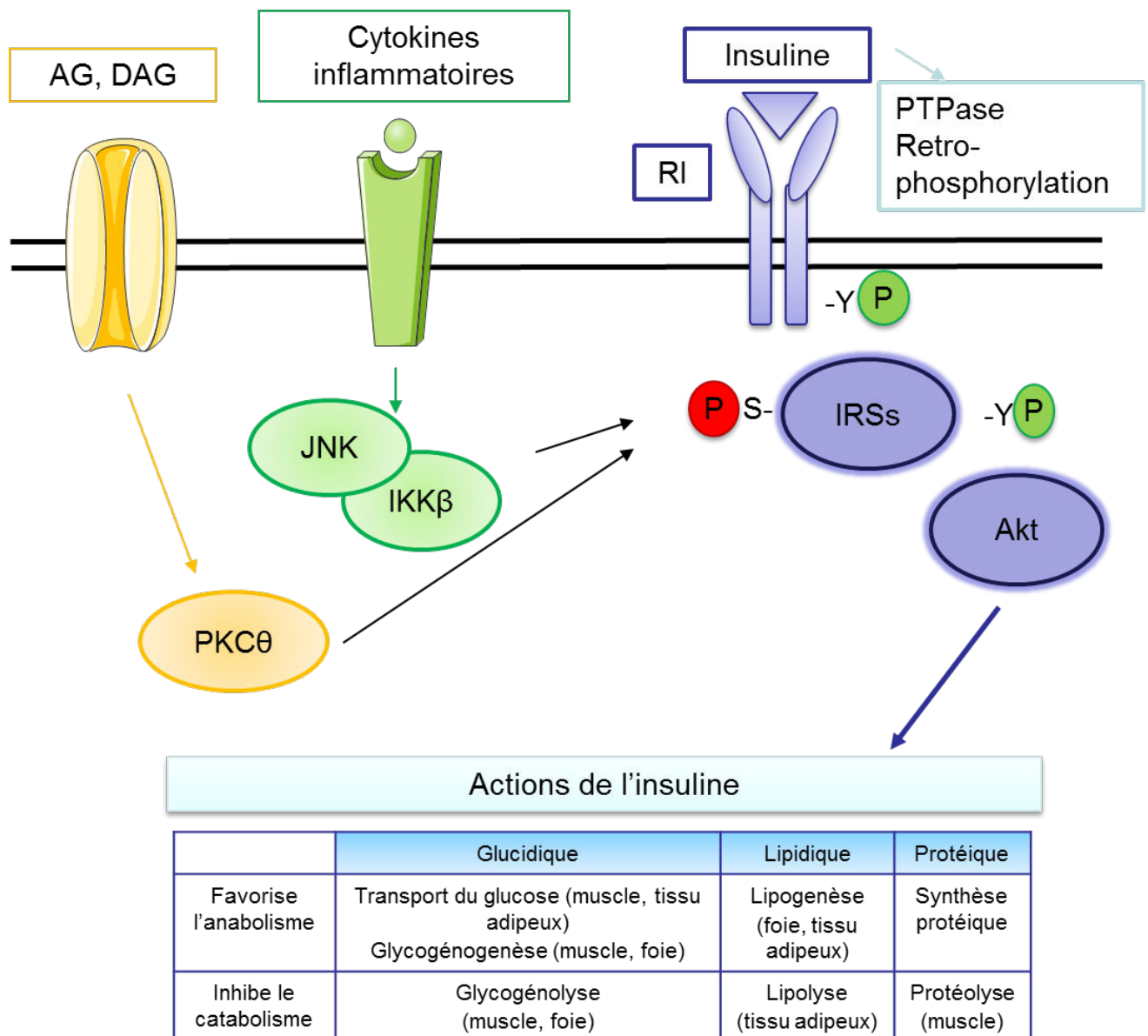


Schéma 1 : Résistance à l'insuline

La liaison de la molécule à son récepteur de l'insuline (RI: récepteur à l'insuline) entraîne une auto-phosphorylation du récepteur. Les IRSs (Insulin Receptor Substrate) se lient au récepteur activé et sont activés par phosphorylation sur des résidus tyrosine (Y). Au final, la voie entraîne l'activation de la protéine Akt, qui favorise le stockage des lipides dans les adipocytes.

La résistance à l'insuline provient d'un rétrocontrôle du signal insuline (activation des PTPase- tyrosines phosphatases et rétrophosphorylation), ou de l'action d'autres agents comme le TNFα (tumor necrosis factor α) et les acides gras libres, mais aussi de l'IL1β (interleukine), et même de l'insuline. Certains facteurs activent la kinase IKK β (inhibitor of nuclear factor κB kinase) et la Jun kinase (JNK) qui phosphorylent sur des résidus sérine des IRSs, rendant les IRSs moins bon substrats pour le RI. Par ailleurs, l'élévation des acides gras libres (AG) et l'accumulation de diacylglycérol (DAG) pourraient conduire à une activation de la PKCθ et à une phosphorylation des IRSs sur des résidus sérine.

1.3. Lésions hépatiques dues à l'obésité: Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

Le développement de lésions hépatiques lors de l'obésité est complexe et multifactoriel. L'apparition des NAFLD est très étroitement liée à la résistance à l'insuline, à l'obésité et au syndrome métabolique. Il est actuellement admis que les NAFLD sont une manifestation hépatique du syndrome métabolique. Si la stéatose est considérée comme bénigne et réversible, la stéatohépatite, ou NASH (Non Alcoholic SteatoHepatitis) est une maladie pouvant entraîner une cirrhose, une insuffisance hépatique et le développement d'un hépatocarcinome.

1.3.1. Epidémiologie des NAFLD

Si la prévalence des NAFLD est de 20 à 30% dans la population générale (Bedogni, Miglioli et al. 2005; Ratzliff, Bellentani et al. 2010), 28 à 55% des patients diabétiques, 27 à 92 % des patients ayant une hyperlipidémie, et 60 à 95% des obèses présentent une NAFLD (Angulo 2002). Une sous population particulière est représentée par les obèses morbides. Chez ces patients, la prévalence des NAFLD atteint 90%, et le stade de stéatohépatite toucherait jusqu'à 37% des patients (Machado, Marques-Vidal et al. 2006), alors que dans la population générale, la prévalence de la stéatohépatite serait de 2 à 3%. 30% des patients présentent une fibrose légère à modérée, 10% une fibrose avancée et 1% sont cirrhotiques (Machado, Marques-Vidal et al. 2006). D'après le rapport de la World Gastroenterology Organisation de 2012, la présence de stéatohépatite ou NASH, augmente de façon dramatique le risque de cirrhose, d'insuffisance hépatique et de carcinome hépatocellulaire. La cirrhose due à une NASH représente une indication de plus en plus fréquente à une transplantation hépatique. Tandis que la morbidité et la mortalité dues aux problèmes hépatiques sont nettement augmentées chez les patients avec une NASH, il existe une corrélation encore plus forte avec la morbidité et la mortalité résultant d'une maladie cardiovasculaire.

1.3.2. Histopathologie de l'atteinte hépatique (Figure 4)

1.3.2.1. Lésions élémentaires

Les lésions élémentaires sont communes aux maladies du foie non alcooliques (NAFLD) ou alcooliques (ALD pour Alcoholic Liver Disease). Elles correspondent aux étapes de l'atteinte hépatique, probablement non forcément successives ni obligatoires : stéatose, stéatohépatite, et fibrose. A ces lésions élémentaires, s'associent fréquemment d'autres lésions non spécifiques comme les corps de Mallory, formations éosinophiles rubanées dans le cytoplasme des hépatocytes ballonnés, ou les méga-mitochondries.

1.3.2.2. Stéatose (Figure 4a)

La stéatose résulte d'une accumulation d'acides gras libres et de triglycérides dans le foie. Seuls les triglycérides intra cytoplasmiques sont visibles microscopiquement, sous la forme de vacuoles optiquement vides. La stéatose est macro-vacuolaire si les vacuoles sont de taille supérieure à celle du noyau, micro-vacuolaire si elles sont de taille inférieure. La stéatose se développe initialement dans les zones péri-centrolobulaires. La stéatose se grade selon le pourcentage d'hépatocytes intéressés, de 0 à 3.

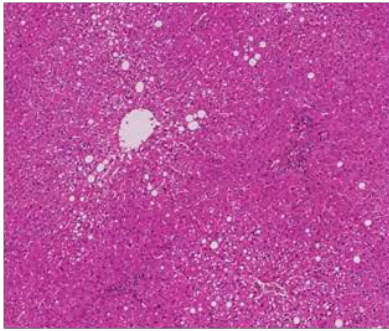
1.3.2.3. Stéatohépatite (NASH- Non Alcoholic Steatohepatitis) (Figure 4b)

Les foyers d'hépatites alcooliques ou non alcooliques prédominent dans la zone péri centrolobulaire. Ils sont définis par une ballonnisation hépatocytaire (clarification du cytoplasme, augmentation du volume cellulaire) associé à un infiltrat inflammatoire (polynucléaires neutrophiles ou cellules mononuclées).

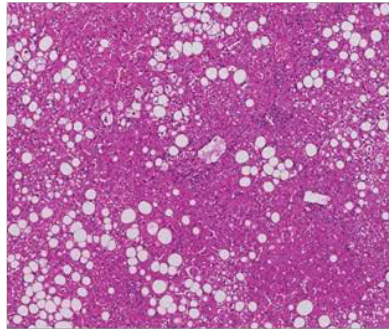
1.3.2.4. Fibrose (Figure 4c)

La fibrose se développe initialement dans les sinus des zones centrolobulaires. La fibrose est ensuite multicentrique, portale, péri-sinusoïdale et centrolobulaire, aboutissant à la formation de septa fibreux. La cirrhose correspond à une nodulation du parenchyme hépatique par des travées fibreuses.

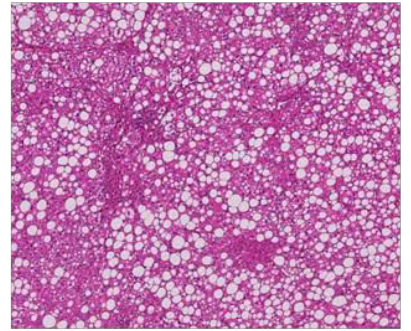
Stéatose de grade 1



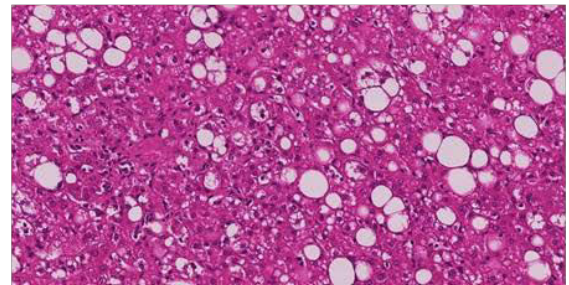
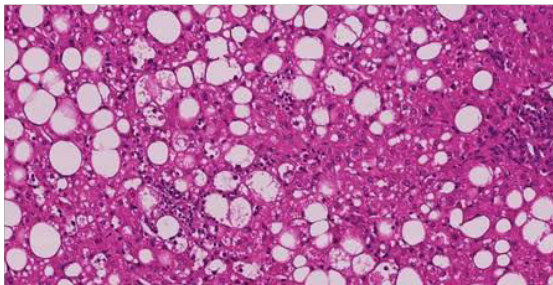
Stéatose de grade 2



Stéatose de grade 3

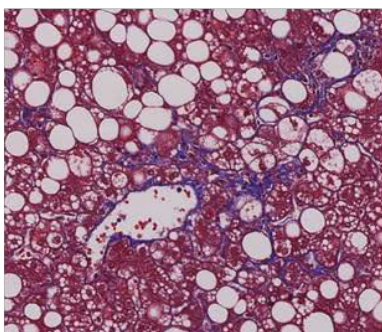


4b: Stéatohépatite: hépatocytes ballonisés au contact de cellules inflammatoires.
HESx200

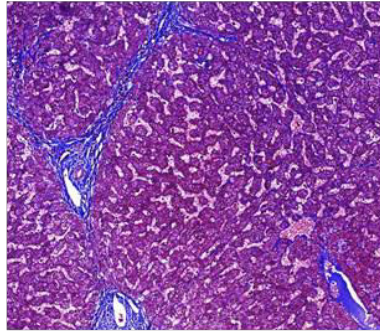


4c: Fibrose selon le grade de Brunt. Trichrome de Masson x200 et x100

Grade 1a : fibrose
sinusoïdale péri centro
lobulaire



Grade 3: septas fibreux



Grade 4: cirrhose

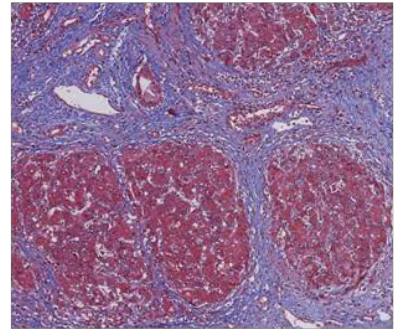


Figure 4 : Aspects histopathologiques des maladies alcooliques et non alcooliques du foie

1.3.2.5. Classification des NAFLD

Le système de classification le plus utilisé actuellement évalue et quantifie trois des lésions observées dans les NAFLD : la stéatose, la ballonnisation et l'inflammation. Il s'agit du score NAS (NAFLD Activity Score), décrit par Kleiner *et coll.* (Kleiner, Brunt et al. 2005) (Tableau II). La ballonnisation et l'inflammation sont gradées selon les critères définis précédemment par Brunt *et coll.* (Brunt, Janney et al. 1999). La somme du grade de ces lésions permet d'établir le score NAS, de 0 à 8. Un score inférieur à 2 élimine le diagnostic de stéatohépatite, supérieur à 5, il affirme la stéatohépatite. Entre 3 et 4, le diagnostic ne peut être porté (Borderline).

La classification de la fibrose diffère de la classification de METAVIR, utilisée pour les hépatopathies chroniques virales, où la fibrose est à point de départ portal. Le grade 1 correspond à une fibrose sinusoidale péri-centrolobulaire, discrète (1a), ou modérée (1b) ou péri portale (1c). Le grade 2 correspond à une fibrose sinusoidale péri-centrolobulaire et péri-portale. Le grade 3 est défini par la présence de pont, et le grade 4 par la cirrhose (Tableau II).

Un nouveau score a été proposé récemment pour grader l'atteinte hépatique dans les NAFLD (Bedossa, Poitou et al. 2012). La stéatose et la fibrose sont évaluées selon les mêmes modalités que dans le score NAS. Un score d'activité est calculé par la somme des grades de la ballonnisation (0 à 2) et de l'inflammation (0 à 2). Le résultat obtenu est chiffré de 0 à 4 : pas d'activité, activité légère, modérée et sévère (Tableau III).

Le score SAF (Stéatose, Activité, Fibrose), reprenant ces différents items a été proposé et validé par l'équipe de Bédossa *et coll.* Dans l'algorithme proposé (Tableau III), une stéatose inférieure à 5% exclut le diagnostic de NAFLD, quel que soit le grade d'inflammation et de ballonnisation. S'il existe une stéatose supérieure à 5%, le diagnostic de NAFLD peut être porté. Le diagnostic de stéatohépatite est posé si la ballonnisation et l'inflammation sont au moins égales à 1.

Grade	Stéatose %	Inflammation Nombre foyer/ grandissement 200	Ballonisation
0	< 5 %	0	absence
1	5-33 %	<2	quelques
2	34-66 %	2-4	nombreuses
3	67-100 %	>4	

Score NAS = somme des grades de stéatose, inflammation et ballonnisation.

O-2: Non NASH, 3-4: Borderline, ≥ 5 : NASH.

Grade	Fibrose
0	normal
1	sinusoïdale péri centrolobulaire (discrète:a, modérée:b), péri portale (c)
2	sinusoïdale, péri centrolobulaire ET portale
3	septa fibreux
4	cirrhose

Tableau II: Score NAS et fibrose selon Kleiner *et coll.*

		Activité	
Grade	Stéatose %	Inflammation Nombre foyer/ grandissement 200	Ballonisation
0	< 5 %	0	absence
1	5-33 %	≤2	ballonisés, taille<2 hépatocytes
2	34-66 %	>2	ballonisés, taille>2 hépatocytes
3	67-100 %		

Score SAF: **S** (grade de stéatose), **A** (activité, correspondant à la somme des grades de l'inflammation et de la ballonisation), **F** (grade de fibrose)

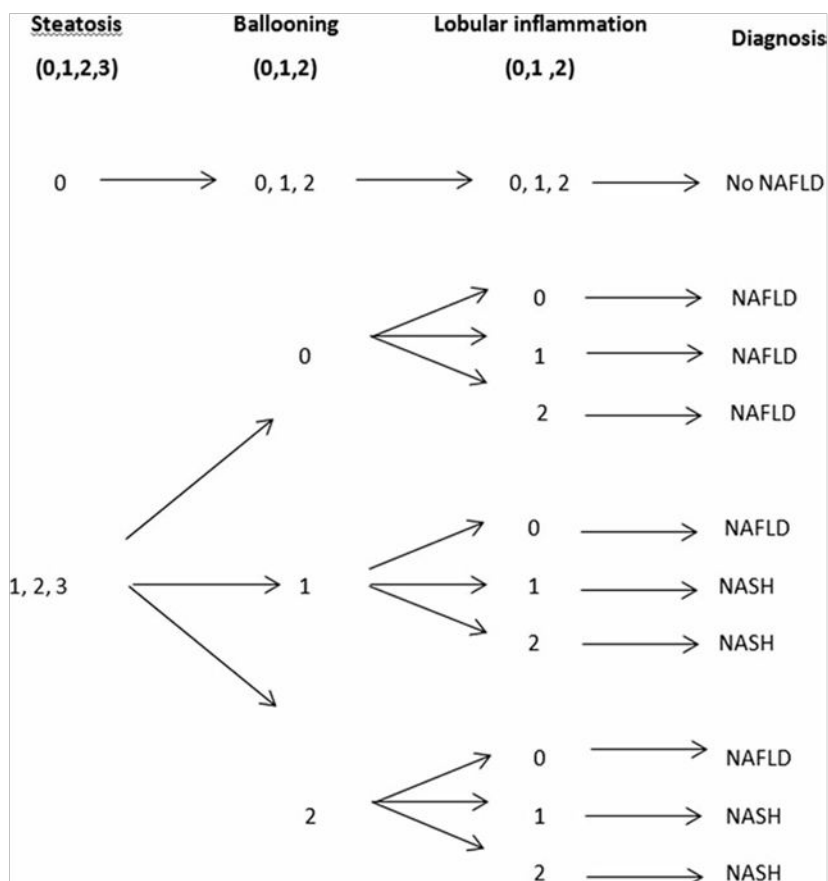


Tableau III : Score SAF et algorithme diagnostique selon Bedossa *et coll.*

1.4. Physiopathologie de l'atteinte hépatique lors de l'obésité (Schéma 2)

1.4.1. Stéatose

Rappelons que la stéatose résulte d'une accumulation d'acides gras libres et de triglycérides dans le foie. Le contenu lipidique hépatique dépend en partie de l'équilibre entre apport et export d'acides gras. Les acides gras plasmatiques affluent vers le foie, où ils sont estérifiés en triglycérides. Les triglycérides sont sécrétés sous la forme de VLDL (Very Low density Lipoprotein). L'équilibre lipidique hépatique dépend également de mécanismes intra-hépatiques. Les triglycérides hépatiques sont produits à partir de glucose lors de la lipogenèse *de novo*. Les triglycérides hépatiques sont hydrolysés en acides gras, qui servent de substrats pour la β -oxydation mitochondriale.

Plusieurs facteurs de transcription jouent un rôle majeur dans la régulation de cet équilibre:

- PPAR α qui peut activer des gènes impliqués dans le transport, l'oxydation et l'export des acides gras libres,

- SBREB-1c (sterol regulatory element binding protein 1c) et ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) qui peuvent activer des gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol et d'acides gras libres en réponse à l'insuline (SBREB-1c) et des gènes impliqués dans la synthèse des triglycérides, en réponse au glucose (ChREBP).

La voie de l'AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) active l'oxydation des acides gras et la glycolyse, et inhibe la synthèse lipidique et protéique.

Dans les NAFLD, l'accumulation des triglycérides hépatiques est due à l'afflux augmenté d'acides gras libres vers le foie. Ces acides gras proviennent de l'apport alimentaire (10%), et de l'insulino-résistance des tissus périphériques qui entraînent d'une part une libération accrue des acides gras libres (lipolyse du tissu adipeux) (60%), et d'autre part une augmentation de la production hépatique d'acides gras (lipogénèse *de novo*) (30%). Dans le foie, les acides gras libres sont estérifiés pour former des triglycérides, alors stockés dans le cytoplasme des hépatocytes sous la forme de gouttelettes lipidiques. Lors des stéatopathies métaboliques, un défaut d'export des triglycérides sous la forme de VLDL favorise encore le développement de la stéatose (Schéma 2).

Dans les situations d'insulino-résistance, la néoglucogénèse hépatique n'est plus efficacement inhibée par l'insuline mais, de façon paradoxale, l'insuline continue à stimuler la synthèse *de novo* d'acides gras et de triglycérides par la voie de la lipogenèse. Il existe donc une insulino-résistance sélective au niveau du foie (Brown and Goldstein 2008).

La lipogenèse hépatique est en effet un mécanisme important de la formation de la stéatose. En cas d'insulino-résistance, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie activent les facteurs de transcription SREBP1c et ChREBP. SREBP1c active la lipogenèse, mais aussi la production de Malonyl CoA, ce qui a pour conséquence de saturer la capacité d'oxydation mitochondriale. ChREBP active la pyruvate kinase hépatique, enzyme clé de la glycolyse, augmentant ainsi la production d'Acétyl CoA utilisé pour la synthèse d'acides gras, avec pour conséquence une dérégulation de l'AMPK, favorisant la lipogenèse et diminuant la β -oxydation mitochondriale.

L'expression de SREBP1c et ChREBP est augmentée dans le foie des souris *ob/ob*. Les souris transgéniques qui surexpriment SREBP1c développent une stéatose hépatique massive due à l'activation des gènes de la lipogenèse (Shimano, Horton et al. 1997) et l'inactivation de SREBP1c chez les souris *ob/ob* diminue d'environ 50% le contenu hépatique en triglycérides (Yahagi, Shimano et al. 2002). De même, l'inactivation de ChREBP chez les souris *ob/ob* ou la diminution de son expression dans le foie de ces souris réduit la stéatose hépatique (Iizuka, Bruick et al. 2004; Dentin, Girard et al. 2005). Il a été montré que l'expression de SREBP1c est augmentée dans le foie des patients avec une NAFLD (Kohjima, Enjoji et al. 2007; Kohjima, Higuchi et al. 2008).

L'obésité est associée à une hyperactivité du système endocannabinoïde avec des taux élevés dans la circulation et dans le tissu adipeux viscéral. Le système endocannabinoïde est impliqué dans la régulation de la balance énergétique et du métabolisme. Les endocannabinoïdes ont des effets centraux et stimulent l'appétit. Le système endocannabinoïde est aussi impliqué dans le développement des NAFLD (Marra and Lotersztajn 2013). Chez les patients obèses avec complications hépatiques l'expression des récepteurs endocannabinoïdes CB1 et 2 (hépatocytaires et adipocytaires) et le niveau plasmatique des ligands endocannabinoïdes sont augmentés. L'activation du récepteur CB1 hépatocytaire induit la stéatose par l'activation de SREBP1c qui augmente la lipogenèse, l'inhibition de l'AMPK (qui diminue l'oxydation des acides gras), et la diminution de l'export des triglycérides sous la forme de VLDL (Osei-Hyiaman, Liu et al. 2008). L'activation du récepteur CB1 adipocytaire favorise l'afflux d'acides gras vers le foie (Jourdan, Djaouti et al. 2010). Le récepteur CB2 participerait au développement de la stéatose en favorisant la résistance à l'insuline et l'inflammation du tissu adipeux. Cependant, dans le foie, CB2 aurait

un rôle protecteur, en polarisant les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer) en type anti-inflammatoire (M2), diminuant ainsi l'inflammation et le développement de la stéatose.

L'inflammation hépatique, et en particulier les cellules de Kupffer, participeraient également au développement de l'insulino-résistance hépatique et de la stéatose lors de l'obésité. A l'aide d'un modèle de souris soumises à un régime riche en graisse de courte durée (3 jours), il a été montré que la déplétion en cellules de Kupffer prévenait l'insulino-résistance hépatique (Lanthier, Molendi-Coste et al. 2010). Comme nous l'avons évoqué, l'insulino-résistance hépatique induit une stéatose hépatique. Des rats soumis à un régime riche en graisse développent une insulino-résistance hépatique et une stéatose. La déplétion en cellules de Kupffer prévient le développement de ces anomalies hépatiques. Des études *in vitro*, ont déterminé que les cellules de Kupffer, activées par le TNF α favorisent l'accumulation de triglycérides par les hépatocytes, l'estérification des acides gras, et diminuent l'oxydation des acides gras et la sensibilité à l'insuline (Huang, Metlakunta et al. 2010).

1.4.2. Stéatohépatite

1.4.2.1. Rôle de la stéatose

Lors des NAFLD, une première hypothèse suggère que la stéatose sensibiliserait les hépatocytes à certains facteurs comme le stress oxydatif mitochondrial, les cytokines inflammatoires, le stress du réticulum endoplasmique. Ces facteurs déclencheraient une réponse inflammatoire aboutissant à la constitution de la stéatohépatite et à l'apparition de fibrose.

Néanmoins, la stéatose pourrait au contraire avoir un rôle protecteur. En effet, les acides gras libres, non stockés sous la forme de triglycérides (lipides neutres), ont une toxicité hépatique, en augmentant le stress oxydatif et en activant directement la production de cytokines inflammatoires (Feldstein, Werneburg et al. 2004). Les souris génétiquement obèses et insulino-résistantes (*db/db*) et soumises à un régime MCD (methionine-choline déficient) développent une stéatose, une inflammation et une fibrose hépatique. En inhibant la synthèse de triglycérides, à l'aide d'un traitement par des oligonucléotides antisens ciblant DGAT2 (catalyseur de la dernière étape de la synthèse de triglycérides par les hépatocytes), il a été observé une amélioration de la stéatose hépatique, mais une augmentation des marqueurs du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique ainsi que de la nécrose, de

l'inflammation et de la fibrose hépatique (Yamaguchi, Yang et al. 2007). Ces résultats suggèrent que la synthèse des triglycérides pourrait jouer un rôle protecteur contre la lipotoxicité.

La stéatose pourrait être impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline. Cependant, la relation de causalité entre stéatose et résistance à l'insuline n'est pas encore établie. Les souris invalidées pour MTTP (microsomal triglyceride transfert protein) ou qui surexpriment DGAT1 (Diglyceride acyltransferase) ou DGAT2, qui catalysent la synthèse des triglycérides dans le foie, développent une stéatose hépatique mais elles présentent une tolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline normales (Monetti, Levin et al. 2007; Minehira, Young et al. 2008). Chez les souris génétiquement obèses (*ob/ob*), qui développent une stéatose, l'inhibition de l'expression de SREBP-1c ou Gpat1 (Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1), entraîne une diminution du contenu lipidique hépatique, mais ne modifie pas la glycémie à jeun, le taux d'insuline et la sensibilité à l'insuline. Ces résultats suggèrent que la stéatose n'est pas le seul facteur impliqué dans la résistance à l'insuline hépatique (Wendel, Li et al. 2010).

1.4.2.2. Rôle des cytokines inflammatoires

Les cytokines inflammatoires peuvent être produites par le tissu adipeux ou directement par le foie. Elles sont responsables d'une mort hépatocytaire (apoptose et nécrose) associée à un afflux de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes), caractérisant la stéatohépatite.

L'apoptose hépatocytaire serait aussi un important mécanisme de progression de la sévérité des hépatopathies métaboliques. L'apoptose hépatocytaire définie par l'activation des caspases apoptotiques est un marqueur de la NASH. Les deux voies de l'apoptose cellulaire contribueraient aux lésions hépatiques. La voie extrinsèque est activée par les récepteurs de mort cellulaire. La surexpression des récepteurs de mort cellulaire (Fas et TNF- α receptor) et du TNF- α a été rapportée au cours de la NASH (Malhi and Gores 2008). Le Fas soluble, les acides gras libres, le stress du réticulum endoplasmique, les cytokines et les adipokines pourraient également être impliqués (Malhi and Gores 2008). La voie intrinsèque est activée par des dysfonctions des organites intra-cellulaires, comme la mitochondrie, le lysozome, et le réticulum endoplasmique. Les acides gras libres pourraient être des facteurs déclenchant

de cette augmentation de l'apoptose hépatocytaire au cours de la NASH (Alkhoury, Carter-Kent et al. 2011).

Enfin, les hépatocytes apoptotiques sont phagocytés par les cellules de Kupffer favorisant leur activation. L'activation des cellules stellaires par la phagocytose des corps apoptotiques ou par le TGF- β produit par les cellules de Kupffer activées favorise la fibrose hépatique (Malhi and Gores 2008).

1.4.2.3. Rôle du microbiote intestinal

Le rôle du microbiote intestinal dans les NAFLD a été récemment mis en évidence. Le microbiote intestinal est composé de 10⁴ à 10⁵ milliards d'organismes majoritairement représentés par des bactéries. Le microbiote intestinal est propre à chaque individu. Ce système bactérien subit les influences de l'hôte (facteurs génétiques, antibiotiques, alimentation), et contribue à la régulation du métabolisme. Il a été montré que la composition du microbiote est différente entre les obèses et les minces (modèles murins et chez l'homme) (Ley, Turnbaugh et al. 2006; Turnbaugh, Ley et al. 2006; Zhang, DiBaise et al. 2009).

Des souris soumises à un régime riche en graisse présentent une augmentation pondérale, mais certaines ne développent pas de complications métaboliques ni d'atteinte hépatiques (souris non répondantes), alors que d'autres développeront ces complications (souris répondantes). Le transfert du microbiote des deux groupes de souris sur des souris axéniques soumises à un régime riche en graisse entraîne une réponse métabolique et une atteinte hépatique identique à celle observée chez la souris donneuse (Le Roy, Llopis et al. 2013).

Le rôle du microbiote sur le métabolisme est suggéré par plusieurs études rapportant que la transposition du microbiote de souris obèses sur des souris minces entraîne chez ces dernières des anomalies métaboliques observées lors de l'obésité. De même, la transposition du microbiote de sujets minces sur des sujets obèses améliore le métabolisme (Vrieze, Van Nood et al. 2012; Fei and Zhao 2013).

Une étude importante réalisée chez 292 sujets humains rapporte qu'une pauvreté bactérienne intestinale est associée à un surpoids, à des anomalies métaboliques (insulino-résistance, dyslipidémie) et à une inflammation chronique à bas bruit (Le Chatelier, Nielsen et al. 2013). De plus, l'effet d'un régime restrictif suivi pendant 6 semaines par des sujets obèses ou en surpoids est moins efficace sur le plan métabolique et sur l'inflammation

chronique chez les sujets avec peu de bactéries intestinales, que chez les sujets avec une richesse bactérienne intestinale supérieure (Cotillard, Kennedy et al. 2013).

Un des mécanismes pouvant expliquer l'influence du microbiote sur l'obésité et ses complications est que la composition du microbiote influencerait sur la perméabilité de la barrière intestinale. Le système microbien permettrait la translocation de lipopolysaccharides (LPS) dans le sang, appelée aussi endotoxémie métabolique (Clarke, Murphy et al. 2012). Le LPS est une molécule présente à la surface des bactéries à Gram négatif. Il stimule les voies de signalisation inflammatoire dans le tissu adipeux, ce qui contribue au premier stade du développement de l'inflammation chronique et des désordres métaboliques.

Via le système porte, le LPS va aussi atteindre le foie. Dans les cellules de Kupffer, le LPS entraîne la production de cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, contribuant alors à l'aggravation des lésions hépatiques (Yin, Wheeler et al. 1999; Uesugi, Froh et al. 2002).

La surexpression de molécules clés (CD14, toll-like receptor (TLR) 4) impliquées dans la voie de signalisation du LPS a été rapportée au cours des NAFLD (Cani, Amar et al. 2007). Outre le TLR-4, d'autres récepteurs reconnaissent le LPS. Ces récepteurs cytosoliques, les NLR (récepteurs de type NOD-nucleotide oligomerization domain) font partie d'un complexe nommé inflammasome, associant une protéine adaptatrice, l'ASC (Apoptosis-associated speck-like protein), et la caspase-1 (Henao-Mejia, Elinav et al. 2012). Après stimulation par des composants microbiens, les NLR forment des inflammasomes. L'activation de ces récepteurs entraîne un auto-clivage de la caspase-1, qui induit la maturation et l'activation des protéines pro-IL-1 β et pro-IL-18 (Strowig, Henao-Mejia et al. 2012)

Les activateurs de l'inflammasome incluent des agents pathogènes provenant du microbiote intestinal, les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) et des molécules provenant de cellules en souffrance, les DAMPs (damage-associated molecular patterns). La plupart des DAMPs déclenchent la production de ROS qui sont connus pour activer l'inflammasome NLRP3 (Zhou, Yazdi et al. 2011). Différents modèles de souris ayant des déficits de l'inflammasome (lignées de souris invalidées pour la caspase 1, NLRP3, ou IL-18) présentent des changements du microbiote intestinal associés à une exacerbation de la stéatose et de l'inflammation du fait de l'afflux d'agonistes des TLR4 et TLR9 dans la circulation portale. Cela mène à une augmentation de l'expression hépatique du $\text{TNF}\alpha$ et à la progression de la NASH. De plus, le partage des cages entre les souris ayant des déficits de l'inflammasome et

les souris sauvages résulte dans la transmission de la stéatose et de l'obésité, via une modification du microbiote des souris sauvages. Ainsi, la perturbation des interactions entre le microbiote intestinal et l'hôte, favorisé par un « sensing » défaillant des inflammasomes, favoriserait la progression des anomalies associées au syndrome métabolique. Cela souligne le rôle central du microbiote intestinal dans la pathogénie des maladies métaboliques (Hena-Mejia, Elinav et al. 2012; Strowig, Hena-Mejia et al. 2012).

Les acides gras libres sont eux aussi capables d'activer l'inflammasome dans les hépatocytes dans un modèle murin de stéatohépatite. De plus, les acides gras entraînent la production par les hépatocytes de DAMPs, responsables d'une activation de l'inflammasome dans les cellules immunes hépatiques (Csak, Ganz et al. 2011).

Le microbiote intestinal module aussi le système endocannabinoïde, qui serait impliqué dans la régulation de l'expression des protéines de jonctions. Le système endocannabinoïde diminuerait la perméabilité intestinale, améliorant ainsi l'endotoxémie et les complications métaboliques liées à l'obésité (Muccioli, Naslain et al. 2010).

1.4.3. Fibrose

Que ce soit au cours d'une stéatopathie d'origine alcoolique ou non alcoolique, l'évolution vers la fibrose pourrait être due à des facteurs identiques. Lors de la fibrogenèse, le dépôt en excès de matrice extracellulaire est principalement synthétisé par les cellules étoilées. Lorsqu'elles sont activées, ces cellules acquièrent un phénotype myofibroblastique.

L'activation des cellules étoilées est due aux neutrophiles, aux hépatocytes en souffrance, et aux cellules de Kupffer qui produisent des facteurs pro-fibrogéniques (TGFβ-transforming growth factor beta, PDGF-platelet derived growth factor-, IL-8, TNFα et ROS-reactive oxygen species) (Wang, Batey et al. 2006). De plus, les ROS diminuent l'action de métalloprotéinases de la matrice (MMP, enzyme dégradant la matrice extra-cellulaire) et augmentent la production d'inhibiteur de métalloprotéases, ce qui résulte en l'accumulation de collagène (Arthur, Iredale et al. 1999). Le LPS intervient dans la fibrogenèse en activant le récepteur TLR4 des cellules étoilées et des cellules endothéliales sinusoidales (Seki, De Minicis et al. 2007; Jagavelu, Routray et al. 2010).

Le récepteur endocannabinoïde CB1 participerait aussi à la fibrose hépatique. Dans un modèle de fibrose (souris traitées au CCl4), le récepteur CB1 induit une réponse pro-fibrosante en augmentant la production de TGFβ par les hépatocytes, alors que son invalidation protège de la fibrose. Cette protection serait due à une augmentation de

l'apoptose des myofibroblastes (Teixeira-Clerc, Julien et al. 2006). Le récepteur CB2 aurait au contraire un rôle anti-fibrosant. L'activation du récepteur entraîne une apoptose des myofibroblastes. De plus, CB2 favoriserait la survie hépatocellulaire, une polarisation anti-inflammatoire des cellules de Kupffer, et la diminution de la production de molécules pro-fibrosantes (IL-17) par les lymphocytes, diminuant ainsi l'activation des cellules étoilées (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2013).

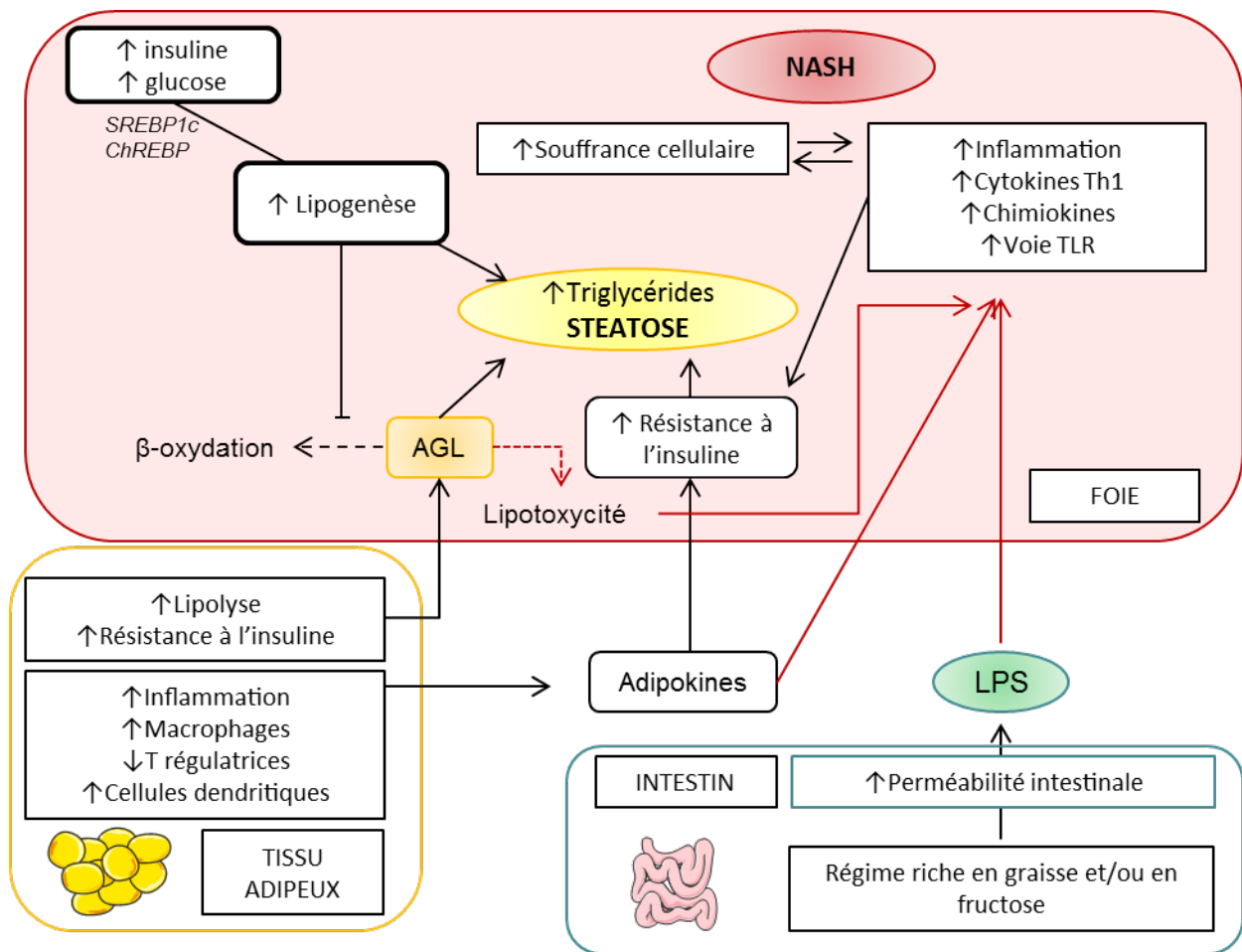


Schéma 2: Physiopathologie des maladies non alcooliques du foie (NAFLD)

Au cours de l'obésité, une augmentation de l'inflammation du tissu adipeux (diminution des Treg, accumulation des macrophages M1 et de cellules dendritiques) amène à une résistance à l'insuline et à une lipolyse excessive. Le relargage d'acides gras libres (AGL) et de cytokines/chimiokines modifierait l'inflammation du foie. Une alimentation riche en graisse et en fructose modifierait la perméabilité intestinale et favoriserait l'endotoxémie (LPS). Les acides gras libres, les adipokines et le LPS sont impliqués dans la modification de la voie de signalisation de l'insuline et de l'inflammation. L'augmentation de l'inflammation hépatique en présence d'une stéatose augmente la mort cellulaire (par apoptose ou par nécrose). L'augmentation de cytokines pro-inflammatoires Th1 et de chimiokines dont l'ostéopontine favoriserait la NASH (Non Alcoholic Steato-Hepatitis).

2. L'alcool

2.1. Généralités

La consommation excessive d'alcool est une cause majeure de mortalité et de morbidité dans le monde. Les données de la consommation mondiale d'alcool sont présentées dans la figure 5. L'alcool est responsable de nombreuses pathologies, les plus notables étant la dépendance, l'atteinte hépatique et le cancer.

Selon l'OMS, la consommation régulière d'alcool ne doit pas dépasser deux unités par jour pour les femmes et trois unités par jour pour les hommes. La consommation occasionnelle ne doit pas dépasser quatre unités d'alcool en une seule occasion. Une «unité alcool» équivaut à un verre standard, dont le contenu en alcool pur est égal à dix grammes.

La Société Française d'Alcoologie (SFA) propose d'utiliser les termes suivants:

- Le non-usage est défini par une absence de consommation de boissons alcoolisées.
- L'usage est défini par toute conduite d'alcoolisation ne posant pas de problème pour autant que la consommation reste modérée, c'est-à-dire inférieure ou égale aux seuils de dangerosité définis par l'OMS.
- Le mésusage: la SFA définit trois conduites d'alcoolisation problématique:
 - l'usage à risque caractérise toute conduite d'alcoolisation, ponctuelle ou régulière, où la consommation est supérieure aux seuils définis par l'OMS, et non encore associée à un quelconque dommage médical, psychique ou social, et/ou à une dépendance, mais susceptible d'en induire à court, moyen et/ou long terme.
 - l'usage nocif caractérise une consommation d'alcool induisant des dommages somatiques, psycho-affectifs ou sociaux, en l'absence de dépendance (utilisation nocive à la santé de la CIM 10 (Classification internationale des maladies) ou abus de la classification DSM IV).
 - l'usage avec dépendance de l'alcool (ou alcoolodépendance) caractérise la perte de liberté de s'abstenir de consommer, et le fait de poursuivre la consommation, tout en étant conscient des conséquences négatives (dépendance à une substance de la classification DSM IV (Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux)).

La consommation moyenne par habitant de plus de quinze ans en France diminue depuis les années 60 d'après les données de l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT). Cependant, l'importance de la consommation moyenne d'alcool par habitant

demeure très élevée. La France se situe aujourd'hui au sixième rang mondial de consommation d'alcool.

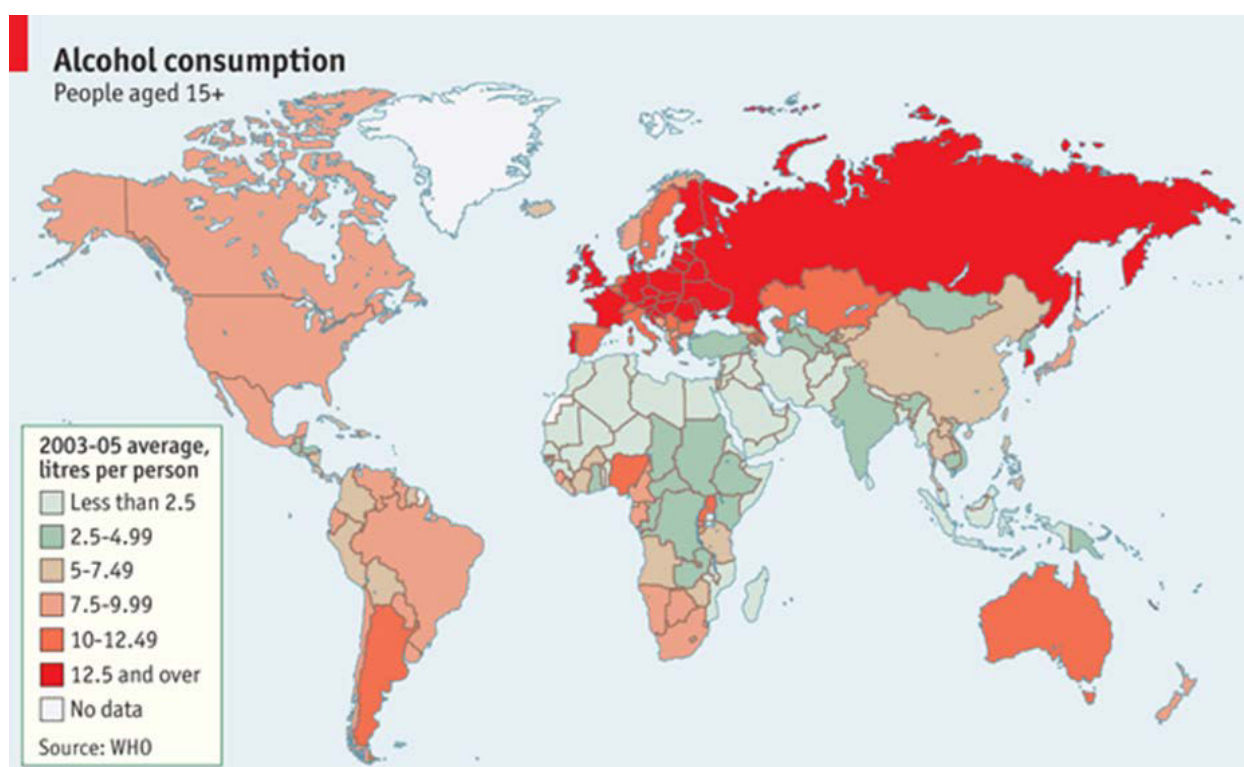


Figure 5 : Consommation mondiale d'alcool en litres par personne (World Health Organisation).

L'évolution de l'atteinte hépatique dépend évidemment de la consommation (quantité, durée, type d'alcool et schéma d'alcoolisation), mais également du sexe et de l'origine ethnique (Becker, Deis et al. 1996; Stewart 2002; O'Shea, Dasarathy et al. 2010). L'obésité, le régime alimentaire, ou une infection par un virus hépatotrope peuvent influencer sur l'évolution naturelle des lésions hépatiques. Des facteurs génétiques sont impliqués dans la susceptibilité à l'alcool des individus. Par exemple, des mutations sur les gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire (TNF α) ou dans le développement de la stéatose (PNPLA3) seraient associées à des lésions plus intenses (Marcos, Gomez-Munuera et al. 2009; Stickel, Buch et al. 2011).

Le nombre de décès liés à la consommation d'alcool a été évalué à 49000 en 2009. Parmi les causes de décès, le cancer, les maladies cardiovasculaires et les atteintes hépatiques, avec notamment le développement d'une cirrhose, prédominent (Guerin, Laplanche et al. 2013).

2.2. Epidémiologie des maladies alcooliques hépatiques

Jusqu'à 90% des buveurs excessifs présentent des lésions hépatiques. Pour la plupart, il s'agit d'une simple stéatose, asymptomatique et réversible à l'arrêt de l'alcool (Orman, Odena et al. 2013).

Si la consommation d'alcool est poursuivie, l'inflammation hépatique associée à une souffrance cellulaire, ou hépatite alcoolique survient. Le pronostic de l'hépatite alcoolique varie selon le degré de sévérité (Lucey, Mathurin et al. 2009). La prévalence de l'hépatite alcoolique n'est pas connue. 20% des patients hospitalisés présenteraient une hépatite alcoolique aiguë (Trabut, Plat et al. 2008).

Chez les alcooliques, 20 à 40% des patients développent une fibrose, et parmi eux, 2 à 20% développeront une cirrhose. A ce stade, le risque de complications comme une ascite, une rupture de varices œsophagiennes, une encéphalopathie hépatique ou la survenue d'infection bactérienne augmente (Adachi and Brenner 2005; Lucey, Mathurin et al. 2009). Le risque de développer un hépato carcinome sur une cirrhose est de 3 à 10%.

2.3. Histopathologie des maladies alcooliques du foie

2.3.1. Lésions élémentaires

Les lésions élémentaires observées sont identiques à celles décrites dans les NAFLD : stéatose, stéatohépatite (hépatite alcoolique) et fibrose. Bien que les lésions élémentaires soient identiques, des différences sont observées (Yeh and Brunt 2014), et il existe des éléments permettant de faire une distinction entre l'origine alcoolique ou non alcooliques de l'atteinte hépatique.

La stéatose est indispensable pour le diagnostic de stéatopathie dans les NAFLD, alors qu'elle n'est pas forcément présente lors de l'hépatite alcoolique aiguë (sévère en particulier). La stéatose microvacuolaire pure ne s'observe généralement pas dans les NAFLD. Dans les ALD, ce type de stéatose associé à la présence de méga-mitochondries évolue vers la fibrose (processus actif).

Lors de la stéatohépatite, le type d'inflammation lobulaire est différent selon l'étiologie: il s'agit de polynucléaires neutrophiles dans les ALD, et on observera plus volontiers des lymphocytes dans les NAFLD. La stéatohépatite alcoolique est un facteur parmi d'autre qui peut entraîner une fibrose. Au cours des NAFLD, seule la présence de stéatohépatite a été rapportée comme facteur de progression vers la fibrose.

2.3.2. Classifications des maladies alcooliques du foie

Il n'existe aucune classification histologique validée pour les maladies alcooliques du foie, cependant il est utile de grader l'activité histologique de l'hépatite alcoolique afin de décider de la prise en charge thérapeutique. En pratique, l'intensité des lésions est évaluée de façon qualitative (discrète, modérée ou sévère). Récemment, il a été proposé un score histologique à visée pronostique (Altamirano, Miquel et al. 2014). Les items inclus dans ce score sont la fibrose, la cholestase histologique, l'infiltration par des polynucléaires neutrophiles et la présence de mégamitochondries. Le score obtenu reflète la survie à 90 jours et pourrait être un élément pour la prise en charge thérapeutique (Tableau IV).

Fibrose		Cholestase histologique		Infiltration de polynucléaires neutrophiles		Méga mitochondrie	
Absente ou portale	0	Absente	0	Absente ou légère	2	Absente	2
Sinusoïdale étendue	0	Hépatocytaire	0	Sévère	0	Présente	0
Pont ou cirrhose	3	Canalaire	1				
		Canalaire et hépatocytaire	2				

Légère: 0-3, intermédiaire: 4-6, sévère: 7-9

Tableau IV : Score histologique à visée pronostique des hépatites alcooliques d'après Altamirano *et coll.*

2.4. Physiopathologie de l'atteinte hépatique lors de l'alcoolisme chronique

2.4.1. Métabolisme de l'éthanol

L'éthanol ingéré est absorbé par le tube digestif et rejoint le foie par la veine porte. L'essentiel du métabolisme de l'éthanol est réalisé dans le foie, par oxydation dans les hépatocytes. Une première oxydation entraîne la production d'acétaldéhyde. Cette oxydation peut se faire selon 3 voies enzymatiques localisées dans 3 compartiments cellulaires différents: la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) est cytoplasmique, la voie microsomale ou voie MEOS (Microsomal Ethanol-Oxidizing System) qui fait intervenir une isoenzyme du cytochrome P450 (2E1) se déroule au niveau du réticulum endoplasmique, et la voie de la catalase se déroulant dans les péroxysomes. L'acétaldéhyde est ensuite éliminé sous forme d'acétate, après une seconde oxydation par l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) dans le foie normal. Au cours de l'intoxication alcoolique, l'acétaldéhyde s'accumule et les capacités d'élimination sont dépassées.

2.4.2. Stéatose

Le développement de la stéatose lors de l'alcoolisme résulte de plusieurs mécanismes (Schéma 3). La consommation excessive d'alcool altère les mécanismes de régulation impliqués dans l'équilibre lipidique. L'alcool est responsable d'une augmentation de la synthèse d'acides gras et de triglycérides hépatiques, et d'une diminution de la lipolyse via la régulation négative de PPAR α et d'AMPK et positive de SREBP-1c (Everett, Galli et al. 2000; You, Fischer et al. 2002; Viollet, Guigas et al. 2009; Li, Xu et al. 2011). L'alcool entraîne également une augmentation de l'afflux d'acides gras provenant du tissu adipeux et de chylomicrons provenant de la muqueuse intestinale. Les réactions du métabolisme de l'éthanol entraînent une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ (NAD⁺ est le coenzyme de l'ADH et de l'ALDH). L'excès de NADH est responsable d'une inhibition de l'oxydation des acides gras ce qui favorise la lipogenèse et la stéatose (Lieber 2004). L'activité de la MTTP (microsomal triglyceride transfer protein) est diminuée lors de la consommation chronique d'alcool, favorisant la stéatose (Sugimoto, Yamashita et al. 2002). Dans l'alcoolisme comme dans les NAFLD, le système endocannabinoïde et ses récepteurs CB1 et CB2 participent à la stéatose. *In vitro*, l'invalidation de ces récepteurs inhibe la stéatose (Jeong, Osei-Hyiaman et al. 2008).

2.4.3. Stéatohépatite et fibrose

La stéatohépatite ou hépatite alcoolique correspond à un état d'inflammation du foie. La stéatohépatite alcoolique peut être symptomatique ou évoluer à bas bruit. La forme la plus grave, l'hépatite alcoolique aigüe sévère a un risque plus important d'évoluer vers la cirrhose et est associée à un risque de mortalité plus élevée.

Certains mécanismes participant au développement de la stéatohépatite et de la fibrose sont communs à ceux décrits lors des NAFLD. L'alcool possède de plus une toxicité propre dû à son métabolisme hépatique (Schéma 3). La toxicité de l'éthanol est due principalement à l'accumulation d'acétaldéhyde, à l'induction du CYT P450 2E1, et à la génération de radicaux libres. L'acétaldéhyde s'accumule lors de l'intoxication alcoolique chronique. Il se lie à l'ADN et aux protéines, formant alors des adduits protéiques. Ces derniers entraînent une peroxydation lipidique et une atteinte mitochondriale, conduisant à un stress oxydatif et à l'apoptose hépatocytaire (Farfan Labonne, Gutierrez et al. 2009; Setshedi, Wands et al. 2010). Les adduits protéiques agissent également comme des antigènes, activant le système immunitaire et l'infiltration hépatique par des cellules inflammatoires (Albano and Vidali 2010). Le cytochrome P450 (isoforme CYP2E1) est augmenté chez les consommateurs chroniques d'alcool et favorise le stress oxydatif. En effet, l'activité microsomale induit la production de radicaux libres (Bailey and Cunningham 1998).

Chez les patients alcooliques, l'inflammation se caractérise histologiquement par une infiltration de cellules inflammatoires, avec une prédominance de polynucléaires neutrophiles. La production de cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 β , l'IL-8 et l'OPN vont induire une infiltration des polynucléaires neutrophiles. L'acétaldéhyde et le LPS sont responsables de la production de ces cytokines pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$, IL-17, IL-8 et OPN), via les voies NK-kB, STAT ou JNK. (Lemmers, Moreno et al. 2009)

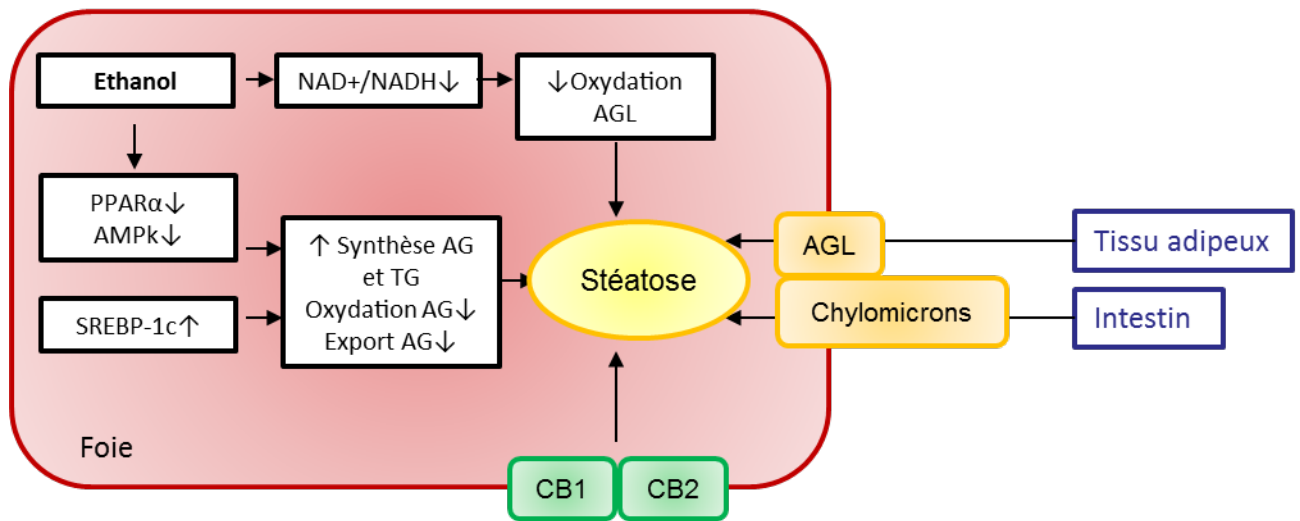
Comme dans les maladies du foie non alcooliques, l'alcool augmente la perméabilité intestinale, et la translocation de produits bactériens tels le LPS, qui favorise l'inflammation hépatique par le biais des macrophages, en se liant au récepteur TLR-4 et CD14 (Uesugi, Froh et al. 2001; Rao 2009). Les NLR appartenant à l'inflammasome sont aussi impliqués dans les maladies alcooliques du foie.

De la même façon, la polarisation et le recrutement des macrophages hépatiques participent au développement des lésions dues à l'alcool et à l'obésité. Une limitation de la polarisation des macrophages M1 diminue les atteintes hépatiques induites par l'alcool. De plus, les

cellules de Kupffer M2 préviennent à des stades précoces le développement des maladies alcooliques et non alcooliques du foie. Ces macrophages M2 produisent des cytokines anti inflammatoires (IL-10) et des facteurs hépatoprotecteurs (IL-6), qui tendent à protéger le foie des lésions induites par l'alcool (Miller, Wang et al. 2011). La sécrétion d'IL-10 induirait une apoptose des macrophages M1, pro-inflammatoires, par un mécanisme dépendant de l'activation de l'arginase (Wan, Benkdane et al. 2014). La sécrétion d'IL-6 induirait la sénescence des hépatocytes, les rendant ainsi résistants à la stéatose et à l'apoptose (Wan, Benkdane et al. 2014). Chez les patients alcooliques et obèses, une diminution des M2 corrèle avec les atteintes hépatiques et une diminution de l'apoptose des M1. Ce déséquilibre et ce dialogue entre les macrophages M2 et les macrophages M1 pourrait donc jouer un rôle important dans les étapes précoces du développement des complications hépatiques associées à l'alcool et à l'obésité (Wan, Benkdane et al. 2014).

La fibrose hépatique est induite par l'inflammation, par des mécanismes communs à plusieurs hépatopathies. Cependant, lors des maladies alcooliques du foie, la fibrose est favorisée par l'acétaldéhyde qui augmente directement la production de collagène par les cellules étoilées. De plus, les adduits protéiques maintiennent l'activation des cellules étoilées (Mello, Ceni et al. 2008). L'alcool inhibe l'action anti-fibrosante des cellules NKT. Les cellules NKT (Natural Killer) entraînent un arrêt du cycle des cellules étoilées, et leur apoptose via la production d'IFN γ (Muhanna, Abu Tair et al. 2011).

A: Développement de la stéatose



B: Développement de la stéatohépatite alcoolique

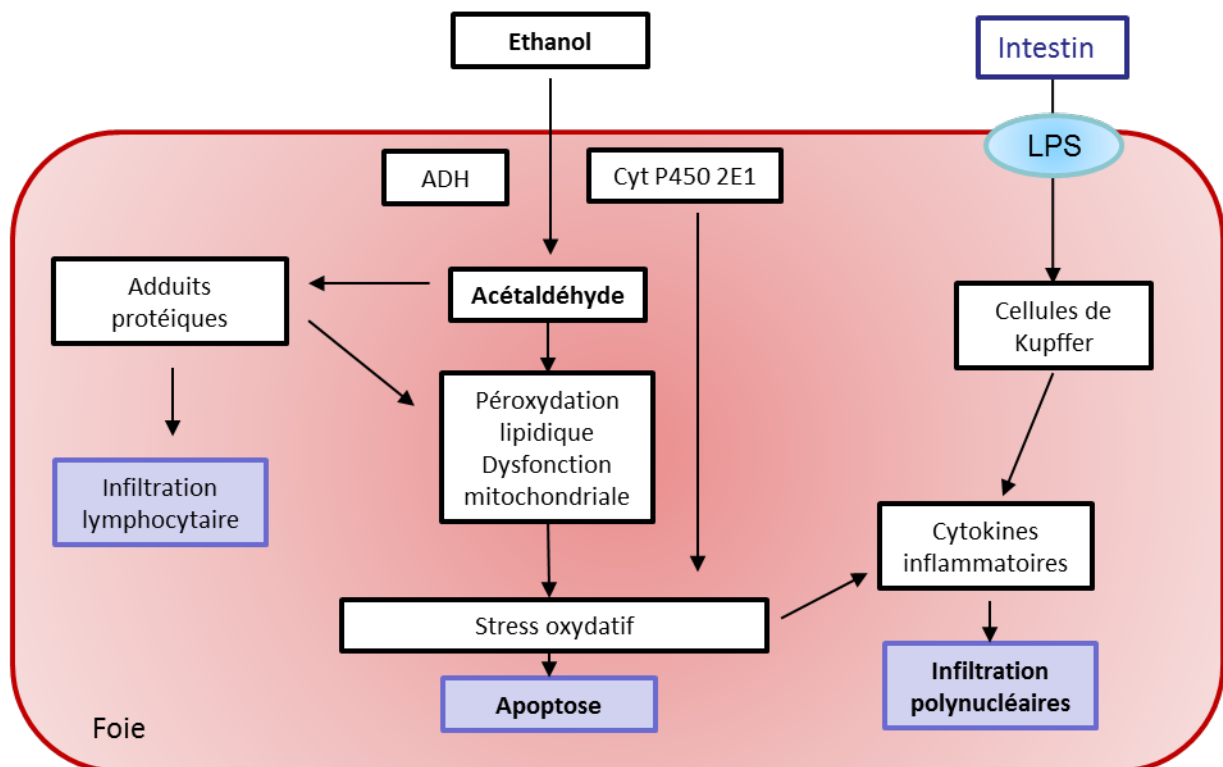


Schéma 3 : Physiopathologie des maladies alcooliques du foie

PARTIE 2 : L'OSTEOPONTINE

L'ostéopontine (OPN) est une molécule initialement identifiée comme une protéine de la matrice osseuse (Herring and Kent 1963) et considérée comme faisant le lien entre les cellules osseuses et la matrice extracellulaire (ostéo: os, pontine: pont) (Franzen and Heinegard 1985). L'OPN est produite dans de nombreux organes comme l'os par les ostéoblastes, le foie, le tissu adipeux ou le rein. Sous sa forme sécrétée, elle est détectée dans le lait, l'urine et la bile. Les fonctions de l'OPN sont pléiotropiques. L'OPN participe au remodelage tissulaire, à la régulation de l'immunité cellulaire et est impliquée dans plusieurs processus pathologiques inflammatoires chroniques (Maladie de Crohn, sclérose en plaque), la cancérogénèse et les maladies cardio-vasculaires.

Après avoir décrit la structure de l'OPN et son rôle dans l'inflammation, je rapporterais son implication dans les complications hépatiques liées à l'obésité, à l'alcoolisme et à l'ischémie-reperfusion.

1. Structure de l'ostéopontine (Figure 6)

1.1. Gène

L'OPN appartient à la famille des SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein). Tous les membres de la famille SIBLING ont en commun leur expression dans l'os ou la dent, et leur liaison à au moins un récepteur de la famille des intégrines.

Le gène humain de l'OPN (*spp1*) se localise sur le chromosome 4 chez l'homme (4q13), et sur le chromosome 5 chez la souris (locus *irc*) (Fet, Dickinson et al. 1989; Young, Kerr et al. 1990; Patarca, Saavedra et al. 1993).

Le gène humain comporte 7 exons et s'étend sur 7,8 kb. Les promoteurs de l'OPN ont été séquencés sur de nombreuses espèces. Les promoteurs conservés sont une TATA box, une CCAAT box inversée, une CG box et un élément de réponse à la vitamine D (Hijiya, Setoguchi et al. 1994; Sodek, Ganss et al. 2000). De plus, des sites de liaison pour les facteurs de transcriptions AP1 (activator protein 1), AP2, Ets1 (E twenty-six 1), SP1 (specificity protein 1), GATA1 (GATA binding protein 1), IRF1 (interferon regulatory factor 1), NFIL6 (nuclear factor interleukin 6) et PEA3 (polyoma enhancer activator 3) ont été identifiés (Hijiya, Setoguchi et al. 1994; Sodek, Ganss et al. 2000).

Le gène humain est sujet à un épissage alternatif, produisant trois transcrits:

- Opn a (945 bp cDNA), codant pour la forme complète de la protéine,
- Opn b (903 bp cDNA), dépourvu d'une séquence de 14 acides aminés (acides aminés (AA) : 58-71; correspondant à une séquence de 42 bp codée par l'exon 4),
- Opn c (864 bp cDNA), dépourvu d'une séquence de 27 acides aminés (AA : 31-57) (Young, Kerr et al. 1990).

Le rôle de ces différents transcrits n'est pas, à l'heure actuelle, clairement déterminé.

1.2. Protéine

Le gène humain de l'OPN est traduit en protéine de 33 kDa. Cette protéine est soumise à de nombreuses modifications post traductionnelles, incluant des phosphorylations sérine/thréonine, des glycosylations, des sulfatations et des fragmentations protéolytiques. Ces modifications résultent en isoformes dont le poids moléculaires varient de 25 à 75 kDa (Gimba and Tilli 2013; Musso, Paschetta et al. 2013).

Il existe deux formes de l'OPN: une forme sécrétée (sOPN) et une forme intracellulaire (iOPN). La traduction de la forme sécrétée est initiée à partir du codon AUG en N- terminal. Cette séquence signal permet à la protéine de se localiser dans des vésicules sécrétoires, afin d'être excrétée. La forme intracellulaire est générée à partir d'un site d'initiation alternatif, situé en aval de la séquence signal N-terminal, induisant la traduction et la localisation de l'OPN dans le cytoplasme (Shinohara, Lu et al. 2006).

L'expression de ces deux formes dépend du type cellulaire: les cellules dendritiques expriment fortement l'OPN intracellulaire et faiblement l'OPN sécrétée, alors que dans les lymphocytes T, c'est la forme sécrétée qui est la plus exprimée (Shinohara, Kim et al. 2008).

1.2.1. OPN sécrétée (OPNs)

L'OPN sécrétée agit en se liant à des récepteurs de surface. L'OPN contient plusieurs motifs de liaison cellulaire:

- un domaine RGD (arginine glycine aspartate, AA :145-147), présent sur plusieurs protéines de la matrice extra-cellulaire, et qui permet la liaison aux intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta5$ (Liaw, Lindner et al. 1995). Le domaine RGD comporte une séquence de 50 acides aminés similaire à celle du motif RGD de la fibronectine. Ce domaine possède un site de clivage par la thrombine (Patarca, Saavedra et al. 1993).

- un domaine SVVYGLR (serine-valine-valine-tyrosine-glycine-leucine-arginine: AA: 162-168 chez l'homme, 148-154 chez la souris), situé à l'extrémité C-terminale du domaine RGD. Il s'agit d'un site cryptique qui, après clivage par la thrombine, interagit avec l'intégrine $\alpha 9 \beta 1$ (Smith, Cheung et al. 1996; Yokosaki, Matsuura et al. 1999).
- un domaine LPV (leucine proline valine), situé en N-terminal qui interagit avec l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ (Bayless, Meininger et al. 1998)
- un domaine ELVTDFDLPAT interagissant avec $\alpha 4 \beta 1$ (Bayless and Davis 2001)
- un site de liaison à CD44, non encore identifié (Weber, Ashkar et al. 1996)
- un site de liaison au calcium (AA: 202-213)
- deux sites de liaison à l'héparine, situées en N-terminal (AA: 151-160 and 276-283) (Patarca, Saavedra et al. 1993), qui interviennent dans la liaison de l'OPN à la matrice extra cellulaire (Giachelli and Steitz 2000; O'Regan, Nau et al. 2000).

L'OPN contient également des sites de clivages:

- par la thrombine, qui permet la présentation de sites de liaison au domaine RGD et SVVYGLR
- par les protéinases de la matrice : MMP3 (stromelysine 1) et MMP7 (matrilysine), dont le rôle n'est pas encore élucidé (Agnihotri, Crawford et al. 2001).

L'OPNs produite par les cellules immunitaires est responsable de prolifération, d'adhésion, de migration, d'activation cellulaire. Elle a également un rôle anti apoptotique et favorise l'angiogenèse (Wang and Denhardt 2008; Inoue and Shinohara 2011).

1.2.2. OPN intra cellulaire (OPNi)

Alors que la forme sécrétée a fait l'objet de nombreuses études, le rôle de la forme intra-cellulaire de l'OPN reste encore à déterminer. L'OPNi peut être localisée sous la membrane cellulaire ou dans le noyau. L'OPNi membranaire est associée au complexe CD44-ERM (ezrin-radixin-moesin), et serait impliquée dans la motilité cellulaire et le réarrangement du cytosquelette (Shinohara, Kim et al. 2008). L'OPNi nucléaire participerait à la division cellulaire (Junaid, Moon et al. 2007). Mais surtout, l'OPNi interviendrait dans l'immunité innée. Par exemple, l'OPNi joue un rôle dans la production de cytokines inflammatoires dans

les cellules dendritiques plasmocytoïdes. L'OPNi est liée à MyD88 via TLR9. TLR9 entraîne la production d'IFN γ , de TNF α et d'IL-6 via IRF7 et NF- κ B. L'OPNi serait impliquée uniquement dans la voie dépendante d'IRF7 et n'aurait aucun rôle dans la voie NF- κ B (Shinohara, Lu et al. 2006; Uede 2011). L'OPNi inhibe la production d'IL-27 par les cellules dendritiques conventionnelles. Cette cytokine inhibe à son tour la polarisation des lymphocytes T en Th17 (Uede 2011).

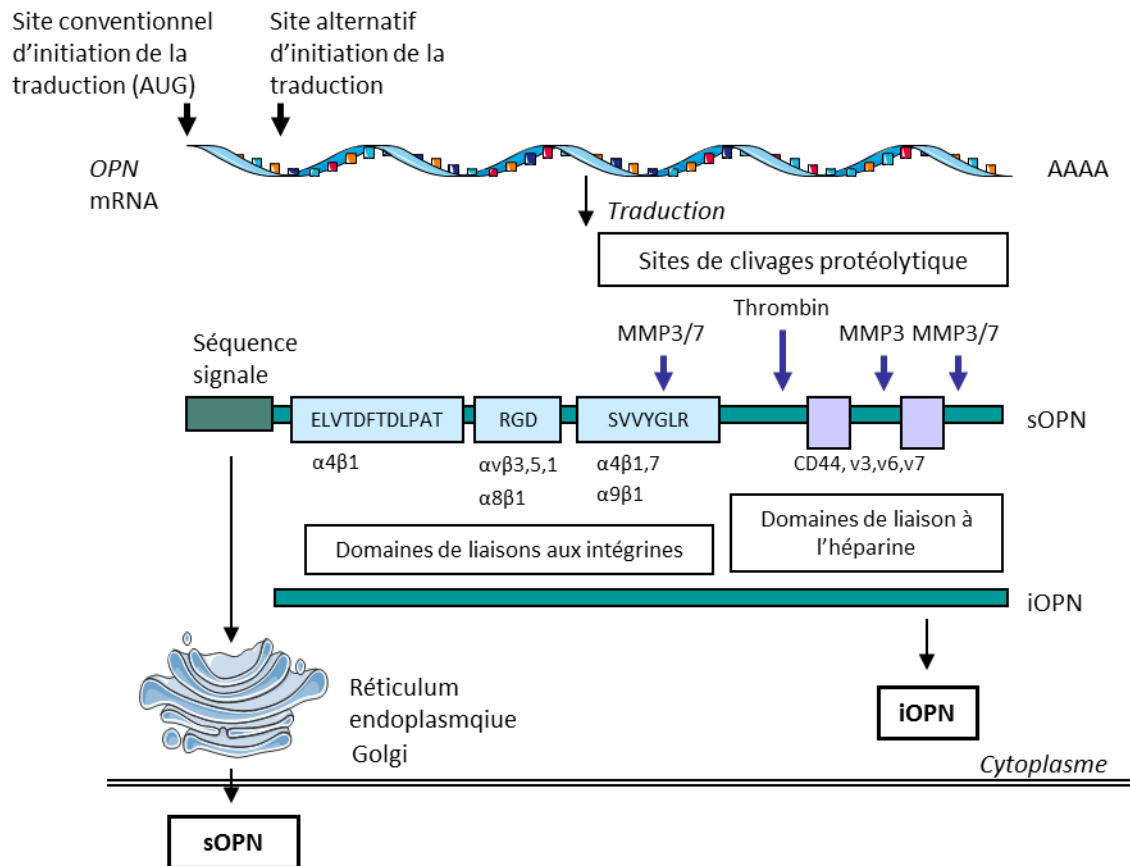


Figure 6 : Ostéopontine : traduction, structure moléculaire et interactions

La traduction de l'OPN sécrétée est initiée à partir du codon conventionnel AUG, situé à l'extrémité 5' du gène *Opn*. Ce fragment permet la direction de l'OPNs vers les vésicules sécrétoires. L'OPN intracellulaire est initiée à partir d'un site alternatif, ne possédant pas la séquence signal permettant la sécrétion de la protéine. iOPN reste donc localisée dans le cytoplasme de la cellule. L'ostéopontine se lie aux intégrines, des protéines dimériques trans-membranaires, composées de deux sous-unités (α et β). L'OPN possède plusieurs domaines d'interactions: ELVTDFDLPAT se lie à l'ITG $\alpha 4 \beta 1$, le domaine arginine–glycine–acide aspartique (RGD) interagit avec les intégrines $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 5$, et $\alpha 8 \beta 1$; le domaine sérine–valine–valine–tyrosine–glutamate–leucine–arginine (SVVYGLR) interagit avec les intégrines $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, and $\alpha 4 \beta 7$; deux domaines de liaison à l'héparine qui interagissent avec le récepteur CD44. L'OPN peut être clivée par deux classes de protéases: la thrombine et les métalloprotéases matricielles (MMPs).

2. OPN et carcinome hépatocellulaire

L'hépatocarcinome représente la troisième cause de décès par cancer dans le monde d'après l'OMS. Il est principalement dû au virus de l'hépatite C ou B et à l'alcoolisme chronique, responsables de cirrhose hépatique. Il est intéressant de noter que plus d'un tiers des hépatocarcinomes dus à l'obésité surviendrait sur un foie non cirrhotique (Baffy, Brunt et al. 2012). Les caractéristiques histopathologiques de ces hépatocarcinomes associés au syndrome métabolique ont été rapportées par Paradis *et coll.* (Paradis, Zalinski et al. 2009). Ils sont le plus souvent de plus grande taille, uniques, et bien différenciés, par rapport aux carcinomes dus aux autres hépatopathies chroniques. Dans cette étude portant sur 31 cas, le foie non tumoral était stéatosique, mais ne présentait pas de stéatohépatite le plus souvent. Enfin, comme nous l'avons dit, la fibrose était le plus fréquemment non significative ($F \leq 2$). Si la pathogénèse des hépatocarcinomes développés sur foie cirrhotique est bien comprise, les mécanismes de l'hépatocarcinome survenant sur un foie non cirrhotique restent à élucider. Dans certaines séries, jusqu'à 54% des hépatocarcinomes en général, se développeraient sur un foie non cirrhotique (Nzeako, Goodman et al. 1996; Brancatelli, Federle et al. 2002). Lors des maladies non alcooliques du foie, d'autres voies de la carcinogénèse seraient responsables de la survenue d'un hépatocarcinome sur foie non cirrhotique. Le $TNF\alpha$ pourrait être un facteur oncogénique, via l'activation de $NF-\kappa B$, JNK, et mTOR. L'IL-6 a des effets anti-apoptotiques et prolifératifs via l'activation du facteur de transcription STAT3. Ces deux cytokines pourraient être des acteurs dans la carcinogénèse non cirrhotique dépendante (Park, Lee et al. 2010). L'augmentation des acides gras libres dans le foie serait responsable d'une lipotoxicité qui contribuerait à la survenue d'un hépatocarcinome. Les acides gras libres altèreraient les voies normales de signalisation intra cellulaire et favoriseraient les mécanismes oncogéniques (Joshi-Barve, Barve et al. 2007; Vinciguerra, Carrozzino et al. 2009). Lors de la stéatose, les hépatocytes stockent dans leur cytoplasme des triglycérides. Il se pourrait que ces lipides, sources d'énergie, participent à la prolifération des cellules carcinomateuses. En effet, l'augmentation de la lipogenèse est corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire dans les hépatocarcinomes (Yamashita, Honda et al. 2009). Il a été rapporté que la résistance à l'insuline serait également impliquée dans la transformation carcinomateuse des hépatocytes (Bugianesi 2007). Dans le CHC, l'OPN est un marqueur diagnostique et pronostique et son expression

corrèle à la progression tumorale (Wan, Xu et al. 2014; Zhu, Guo et al. 2014). L'OPN participerait à la croissance tumorale et à la dissémination métastatique en favorisant l'angiogenèse tumorale, via la sécrétion de VEGF, la dégradation de la matrice extracellulaire, via la sécrétion de protéinases de la matrice, MMP et uPA (urokinase plasminogen activator) (Zhang, Pan et al. 2011), et en modulant la réponse immunitaire. L'OPN préviendrait aussi l'apoptose des cellules tumorales et favoriserait leur survie, en augmentant la production de Bcl-2 et en activant les voies PI3K/Akt et NF- κ B (Zhao, Dong et al. 2008; Cao, Li et al. 2012). Cependant, il a été rapporté que l'OPN pourrait être inactivée par clivage protéolytique par la caspase 8 et que les fragments clivés d'OPN induiraient la mort cellulaire via p53 (Kim, Lee et al. 2009).

3. Rôle de l'ostéopontine dans l'inflammation (Figure 7)

L'OPN contribue à la réponse inflammatoire induite lors d'agressions ou d'infections, en agissant comme une cytokine inflammatoire. L'OPN est augmentée en réponse aux lésions observées dans le tissu cardiaque, rénal, pulmonaire, osseux, articulaire, cérébral, hépatique et dans le système digestif (Wang and Denhardt 2008).

Elle est exprimée par de nombreuses cellules inflammatoires telles les macrophages, les lymphocytes B et T, les polynucléaires et les cellules dendritiques (Lund, Giachelli et al. 2009). L'OPN est produite par ces cellules et module leurs fonctions. Les cellules inflammatoires sont à la fois une source et une cible de l'OPN.

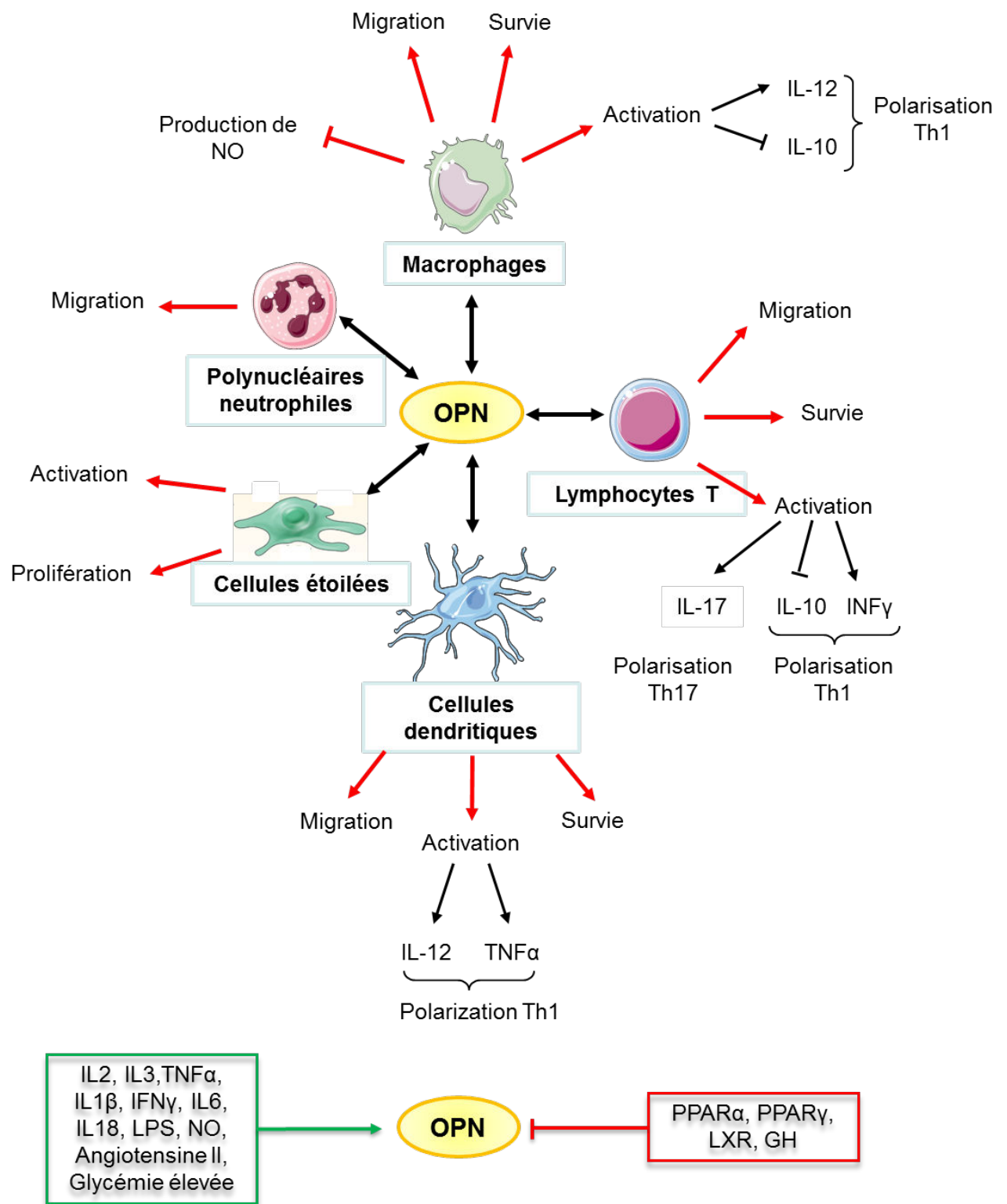


Figure 7 : Rôle et régulation de l'ostéopontine dans l'inflammation

3.1. Régulation de l'expression d'OPN lors de l'inflammation

Il a été rapporté que les cytokines inflammatoires (IL-2, IL-3, TNF α , IL-1 β , IFN γ et IL-6) et d'autres facteurs comme le LPS, l'angiotensine II ou le NO induisent la production d'OPN par les macrophages (Ogawa, Stone et al. 2005) (Denhardt, Mistretta et al. 2003; Gao, Guo et al. 2004). Plus récemment, il a été décrit que les toll like receptors (TLR) pourraient induire l'expression d'OPN dans les macrophages suite à une stimulation au LPS, via l'activation de PI3K, JNK (c-Jun N-terminal kinases), ERK (Extracellular signal-regulated kinases), AP-1 (activator protein 1) et NF- κ B (Zhao, Wang et al. 2010; Zhao, Wang et al. 2011). Lors de l'obésité et de l'insulino-résistance, l'utilisation d'anticorps ciblés contre IL-18 diminuait l'expression d'OPN, suggérant que IL-18 régulerait positivement OPN (Ahmad, Al-Mass et al. 2013). Une glycémie élevée augmenterait aussi l'expression d'OPN lors de l'inflammation (Samuvel, Sundararaj et al. 2010).

A l'inverse, l'expression d'OPN serait inhibée dans les macrophages par les agonistes des récepteurs nucléaires PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor), PPAR γ (Oyama, Kurabayashi et al. 2000; Oyama, Akuzawa et al. 2002; Nakamachi, Nomiyama et al. 2007) et LXR (liver X receptor). Cette inhibition serait médiée par l'inhibition d'AP-1 (Ogawa, Stone et al. 2005). Lors de l'inflammation due à l'obésité, il a été rapporté que l'hormone de croissance (GH) inhiberait l'expression d'OPN (Lu, Kumar et al. 2013).

3.2. Rôle chimioattractant

Durant la phase aigüe de l'inflammation, l'OPN agit comme une molécule chimioattractive. L'OPN va être capable d'induire la migration des macrophages (Giachelli, Lombardi et al. 1998), des polynucléaires neutrophiles (Koh, da Silva et al. 2007), des lymphocytes (Cao, Dai et al. 2008), et des cellules dendritiques (Weiss, Renkl et al. 2001).

Cette fonction se fait via les récepteurs aux intégrines et à CD44. La migration cellulaire serait facilitée par l'expression de protéinase de la matrice (MMP2 et 9) (Philip, Bulbule et al. 2001; Bruemmer, Collins et al. 2003).

Chez la souris, une injection sous cutanée d'OPN induit une accumulation de macrophages au niveau du site d'injection, et l'utilisation d'anticorps anti-OPN inhibe la migration des macrophages en réponse à d'autres agents chimioattractants. L'expression de CD44, essentielle pour la migration des macrophages, est augmentée en réponse à l'OPN. Le rôle de l'OPN sur le potentiel migrateur des macrophages pourrait être dû à CD44 (Giachelli,

Lombardi et al. 1998; Marroquin, Downey et al. 2004; Zhu, Suzuki et al. 2004). De plus, l'OPNi, qui fait partie du complexe d'attachement CD44-ERM est impliquée dans la migration cellulaire (Zohar, Suzuki et al. 2000).

Chez les souris déficientes en OPN, l'infiltration intrapéritonéale de polynucléaires neutrophiles après traitement au sodium de périodate est diminuée par rapport aux souris contrôles. L'injection d'OPN exogène restaure l'infiltration. *In vitro*, ce rôle chimioattractant de l'OPN exogène est démontré par la restauration de la vitesse de migration et la polarisation des polynucléaires après traitement à l'OPN de cellules invalidées pour l'OPN.

Le rôle chimioattractant de l'OPN sur les lymphocytes et les cellules dendritiques a été démontré dans plusieurs études, *in vivo* et *in vitro*, où l'invalidation de l'OPN diminue la migration de ces cellules (Weiss, Renkl et al. 2001; Cao, Dai et al. 2008; Schulz, Renkl et al. 2008).

L'implication de l'OPN dans les processus auto-immun serait due à cette propriété chimioattractive. Une expression excessive ou non régulée d'OPN a été rapportée dans différentes maladies auto immunes. L'OPN promeut l'inflammation en favorisant la migration et la rétention des cellules inflammatoires. Par exemple, l'expression d'OPN est associée à l'infiltration des lymphocytes T dans la sarcoïdose (O'Regan, Chupp et al. 1999). L'OPN est un bio marqueur dans la sclérose en plaque (Wen, Liu et al. 2012; Szalardy, Zadori et al. 2013), et dans le lupus (Briggs 2013; Quaglia, Chiochetti et al. 2014). Dans l'arthrite rhumatoïde, l'OPN reflète la sévérité de l'inflammation et la destruction osseuse (Shio, Kobayashi et al. 2010; Iwadate, Kobayashi et al. 2014).

3.3. Rôle sur la prolifération et la survie cellulaire

L'OPN favorise la survie et la prolifération cellulaire, permettant la réparation tissulaire.

L'OPN est un facteur de survie pour les cellules immunes. En effet, les macrophages n'exprimant pas l'OPN sont plus sensibles à l'apoptose. Cet effet est dû à la différenciation des monocytes en macrophages. Les monocytes sont connus pour être plus sensibles à l'apoptose que les macrophages. De plus, l'OPN favorise la production de protéines anti-apoptotiques, via la voie Akt (Nystrom, Duner et al. 2007). L'activation de cette voie pourrait réguler la survie cellulaire via Mcl-1 (Induced myeloid leukemia, appartenant à la famille Bcl-2 et inhibant l'apoptose), indépendamment des caspases et de NF- κ B (Liu, Perlman et al. 2001).

Pour les lymphocytes T, l'OPN prévient leur mort en inhibant la synthèse de protéines pro-apoptotiques et induit la survie en activant la voie NF- κ B (Hur, Youssef et al. 2007; Fan, Dai et al. 2008).

Enfin, l'apoptose des cellules dendritiques augmente en présence d'anticorps anti-OPN (Kawamura, Lyonaga et al. 2005).

3.4. Rôle sur la modulation de la réponse inflammatoire

Durant la phase chronique de l'inflammation, l'OPN induit une réponse de type Th1, pro-inflammatoire, via la régulation de cytokines: elle induit la production d'IL-12, de TNF α et d'IFN γ , cytokine pro-inflammatoires, et bloque la production d'IL-10, anti-inflammatoire par les macrophages et les lymphocytes T (Ashkar, Weber et al. 2000). L'OPN, aussi nommée «eta-1» (early T cell activation factor gene 1), est exprimée à la phase précoce de l'activation des lymphocytes T (Patarca, Freeman et al. 1989). L'expression du gène *Opn* dans les lymphocytes T est dépendante du facteur de transcription T-bet et induit une réponse de type Th1, pro-inflammatoire (Shinohara, Jansson et al. 2005).

Dans les cellules dendritiques l'OPN induit la sécrétion du TNF α et de l'IL-12 (Renkl, Wussler et al. 2005). De plus, OPNi dans les cellules dendritiques prévient la production et la sécrétion d'IL-17, qui inhibe la polarisation de lymphocytes T en Th17 (Uede 2011).

En revanche, l'OPN exogène n'aurait pas de fonction quant à la capacité de génération de ROS et de production de cytokines pro-inflammatoire par les polynucléaires (Koh, da Silva et al. 2007).

3.5. Rôle sur la différenciation des cellules inflammatoires

L'OPN n'est pas exprimée par les monocytes circulants mais son expression est fortement induite au cours de leur différenciation en macrophages (Krause, Rehli et al. 1996). L'OPN joue un rôle dans la différenciation des macrophages via CD44 (Atkins, Berry et al. 1998). OPN active la voie Akt, primordiale dans la différenciation macrophagique et constitutivement active dans les macrophages différenciés chez l'homme, via son interaction avec CD44 (Nystrom, Duner et al. 2007; Liu, Zheng et al. 2012).

Au cours de la différenciation des cellules dendritiques myéloïdes (Kawamura, Lyonaga et al. 2005; Schulz, Renkl et al. 2008), et de l'activation des cellules T naïves (Shinohara, Jansson et al. 2005), l'expression de l'OPN est fortement augmentée.

4. Ostéopontine et obésité

L'implication de l'OPN dans l'obésité a été rapportée, notamment au niveau du tissu adipeux et du foie. Les modèles murins d'obésité les plus utilisés sont les souris génétiquement modifiées présentant une déficience en leptine (*ob/ob*) ou en récepteur de la leptine (*db/db*) et les souris sauvages soumises à un régime riche en graisse (HFD). Ces souris développent une obésité, une inflammation de bas grade, une résistance à l'insuline et une stéatose hépatique. Un modèle murin de complications hépatiques aussi utilisé, consiste à nourrir les souris sauvages avec un régime déficient en méthionine et choline (MCD). Un régime MCD entraîne une stéatose (par défaut d'export des triglycérides hépatiques), une stéatohépatite (NASH) due à un afflux de macrophages et une augmentation des cytokines inflammatoires hépatiques, et une fibrose. Ce modèle n'est cependant pas associé à une obésité ou une insulino-résistance.

4.1. Taux plasmatiques

4.1.1. Homme

Chez l'homme, le taux d'OPN circulant est plus élevé chez les patients obèses ou en surpoids que chez les patients minces. Cette augmentation est corrélée à la masse grasse (Gomez-Ambrosi, Catalan et al. 2007; Bertola, Deveaux et al. 2009).

Dans l'obésité morbide, le taux circulant d'OPN est augmenté par rapport au taux observé chez des sujets minces ou en surpoids (Kiefer, Zeyda et al. 2008).

Après perte de poids suite à un régime restrictif, il a été rapporté que le taux d'OPN diminuait (Gomez-Ambrosi, Catalan et al. 2007). Après perte de poids suite à une prise en charge chirurgicale, le taux circulant d'OPN ne diminue pas, mais augmente (Bertola, Deveaux et al. 2009; Lancha, Moncada et al. 2014). Il a été proposé que l'os soit à l'origine des concentrations plasmatiques élevées de l'OPN après chirurgie bariatrique. En effet, l'OPN est sécrétée par les ostéoblastes et les ostéoclastes et joue un rôle essentiel dans le remodelage osseux (Denhardt and Noda 1998). En effet, il a été montré que la chirurgie bariatrique est associée à une carence, une augmentation des marqueurs du renouvellement osseux et à une diminution de la masse osseuse (Coates, Fernstrom et al. 2004; Gomez-Ambrosi, Catalan et al. 2007).

4.1.2. Souris

Une faible augmentation de l'OPN plasmatique chez les souris rendues obèses par un régime HFD a également été rapportée (Nomiya, Perez-Tilve et al. 2007; Bertola, Deveau et al. 2009). Cependant, une autre étude rapporte que l'OPN plasmatique n'était pas modifiée chez les souris génétiquement obèses et diabétiques (*db/db*) (Kiefer, Zeyda et al. 2008). Il est cependant important de souligner que la production locale d'OPN (foie et tissu adipeux) est fortement augmentée dans ces modèles murins. De plus, ces souris ne présentent pas de complications hépatiques sévères (fibrose) qui pourraient expliquer cette faible augmentation d'OPN circulant (Ceci sera discuté plus tard).

4.2. Tissu adipeux

4.2.1. Homme

Notre équipe a montré que l'expression génique de l'OPN était augmentée dans le tissu adipeux sous-cutané de patients obèses. Cette augmentation était corrélée à l'infiltration macrophagique. Lors de la perte de poids, l'expression de l'OPN et l'infiltration macrophagique du tissu adipeux diminuait (Bertola, Deveau et al. 2009). Dans cette étude l'augmentation de l'OPN était indépendante de l'insulino-résistance.

Cependant, le lien avec l'insulino-résistance reste à clarifier. Il a été rapporté que l'expression génique et protéique de l'OPN est augmentée dans le tissu adipeux viscéral chez les obèses et se majore lorsqu'un diabète est associé à l'obésité (Gomez-Ambrosi, Catalan et al. 2007). Dans l'étude de Chapman *et coll.*, l'augmentation de l'OPN observée chez des patients insulino-résistants diminue après traitement médicamenteux améliorant l'insulino-sensibilité (TZD-Thiazolidinedione, agonistes de PPAR γ utilisés comme antidiabétique oraux) (Chapman, Miles et al. 2010).

4.2.2. Modèles murins

Il a été rapporté que l'expression génique de l'OPN était augmentée dans le tissu adipeux épидidymaire et sous-cutané de rats rendus obèses et insulino-résistants par un régime riche en graisse (Chapman, Miles et al. 2010), et dans le tissu adipeux épидidymaire de souris obèses (génétiquement obèses et soumises à un régime riche en graisse) (Kiefer, Zeyda et al. 2008).

Afin de définir le rôle de l'OPN, plusieurs études ont rapporté les effets de l'inactivation de l'OPN lors de l'obésité.

- L'OPN régulerait les fonctions des adipocytes

Des souris invalidées pour l'OPN ont été soumises à un régime riche en graisse (de 20 à 25 semaines). Aucune différence de prise de poids n'a pas été observée par rapport aux souris contrôles par différentes équipes (Nomiyama, Perez-Tilve et al. 2007; Kiefer, Neschen et al. 2011). Cependant, Lancha *et coll.* ont récemment rapporté que les souris invalidées présentaient un poids inférieur par rapport aux souris sauvages, avec des adipocytes de plus petite taille. L'extension du tissu adipeux, reflétée par l'activité des protéinases de la matrice MMP2 et MMP9 était moins importante chez les souris invalidées pour l'OPN (Lancha, Rodriguez et al. 2014).

Il semblerait que l'OPN pourrait directement réguler les fonctions des adipocytes à des étapes précoces.

Lorsque des souris ont été soumises à un régime HFD pendant seulement 2 à 4 semaines, elles ne présentaient pas d'obésité, mais une hypertrophie des adipocytes. Chez les souris invalidées pour l'OPN les adipocytes étaient de taille normale (Chapman, Miles et al. 2010). OPN pourrait inhiber *in vitro* la différenciation adipocytaire mise en évidence par une faible diminution de l'expression de peroxydase proliférateur-activated receptor γ (PPAR γ) et de l'adiponectine (Zeyda, Gollinger et al. 2011). Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence que l'OPN exogène inhibe aussi le transport de glucose induit par l'insuline (Zeyda, Gollinger et al. 2011). Mais il semblerait que l'OPN régule de préférence les fonctions des adipocytes indirectement en favorisant l'inflammation du tissu adipeux.

- L'OPN favoriserait l'inflammation du tissu adipeux

L'invalidation de l'OPN des souris soumises à un régime riche en graisse diminue l'inflammation systémique et du tissu adipeux, avec notamment une diminution de l'infiltration macrophagique (Nomiyama, Perez-Tilve et al. 2007).

Réciproquement, chez les souris obèses (HFD), l'injection d'un anticorps dirigé contre l'OPN, favorise une diminution de l'infiltration des macrophages et une diminution de l'expression des gènes de l'inflammation dans le foie et le tissu adipeux épидидymaire (Kiefer, Zeyda et al. 2010).

L'OPN interviendrait précocement dans l'inflammation du tissu adipeux. En effet, chez des souris soumises à un régime riche en graisse de courte durée (2 semaines), l'invalidation de l'OPN prévient la mise en place d'une inflammation du tissu adipeux épидидymaire (Chapman, Miles et al. 2010).

- L'OPN favoriserait la résistance à l'insuline

Suite à un régime riche en graisse, les souris obèses développent une insulino-résistance. L'inactivation génique de l'OPN ou la neutralisation de l'OPN rendent ces souris plus sensibles à l'insuline (Nomiya, Perez-Tilve et al. 2007; Chapman, Miles et al. 2010; Kiefer, Zeyda et al. 2010). Les auteurs suggèrent que l'OPN interviendrait très précocement dans le développement de l'insulino-résistance. En effet, des souris soumises à un régime riche en graisse pendant une courte durée (2 semaines) développent une insulino-résistance du tissu adipeux et hépatique, une inflammation du tissu adipeux mais sans prise de poids par rapport aux souris avec un régime normal. L'inactivation de l'OPN chez les souris rendues obèses améliore la sensibilité à l'insuline, diminue l'inflammation du tissu adipeux, soulignant le lien entre OPN, inflammation du tissu adipeux et insulino-résistance à des stades précoces (Chapman, Miles et al. 2010).

- L'OPN favoriserait la fibrose du tissu adipeux

Récemment, Lancha *et coll.* ont mis en évidence que l'inactivation de l'OPN pourrait prévenir la fibrose du tissu adipeux épидидymaire chez des souris mises sous régime riche en graisse pendant 20 semaines. Cependant, cette fibrose est peu marquée et il est difficile de déterminer si c'est un effet direct de l'OPN. En effet, les souris invalidées pour l'OPN présentent une prise de poids plus faible que les souris contrôles (Lancha, Rodriguez et al. 2014).

4.3. Maladies non alcooliques du foie

L'augmentation de l'OPN aurait un rôle sur les lésions hépatiques observées lors de l'obésité (stéatose, inflammation et fibrose).

4.3.1. Stéatose

4.3.1.1. Homme

L'expression génique hépatique de l'OPN est augmentée chez les patients avec une NAFLD (Lima-Cabello, Garcia-Mediavilla et al. 2011).

Notre équipe a aussi rapporté que l'expression hépatique génique et protéique d'OPN était corrélée au degré de stéatose et à l'insulino-résistance (HOMA-IR) chez les patients obèses. Cette augmentation pourrait être secondaire à l'accumulation de triglycérides (Bertola, Deveau et al. 2009).

4.3.1.2. Souris

Chez la souris, un régime MCD entraîne les lésions hépatiques observées au cours des NAFLD. L'expression protéique de l'OPN augmente dès le premier jour d'un régime MCD, et l'expression génique augmente à partir de la quatrième semaine (Sahai, Malladi et al. 2004). Chez la souris obèse, l'expression hépatique de l'OPN est augmentée et corrèle à la stéatose et au contenu en triglycéride (Bertola, Deveau et al. 2009).

- L'OPN favoriserait la stéatose

L'inactivation de l'OPN chez les souris soumises à un régime riche en graisse prévient la stéatose hépatique, en diminuant la synthèse hépatique de triglycérides et en favorisant le stockage des acides gras dans le tissu adipeux, prévenant ainsi leur accumulation ectopique dans le foie (Kiefer, Neschen et al. 2011). De plus, l'inactivation de l'OPN diminue l'expression de molécules impliquées dans l'accumulation des lipides comme PPAR γ , DGAT2 et Cidec (cell-death inducing DFFA-like effector c, impliquée dans la formation des gouttelettes lipidiques) (Lancha, Rodriguez et al. 2014). Chez ces souris invalidées pour l'OPN, la sensibilité à l'insuline hépatique est aussi améliorée, ainsi que la voie de signalisation de l'insuline, favorisant une amélioration de l'homéostasie lipidique et glucidique hépatique (Kiefer, Zeyda et al. 2010; Kiefer, Neschen et al. 2011).

4.3.2. Inflammation et fibrose

4.3.2.1. Homme

Chez un petit nombre de patients obèses, Syn *et coll.* ont rapporté une augmentation de l'expression hépatique d'OPN avec les NAFLD et plus spécifiquement avec la fibrose (Syn, Choi et al. 2011). L'OPN hépatique est plus exprimée lorsque la fibrose est avancée. Le taux d'OPN plasmatique reflète également le degré de fibrose (Syn, Agboola et al. 2012).

La protéine, mise en évidence par immunohistochimie, est plus importante au sein d'un parenchyme hépatique fibreux. Elle est principalement exprimée par les cellules biliaires, les cellules inflammatoires et les cellules étoilées (Lee, Seo et al. 2004).

4.3.2.2. Modèles murins

- L'OPN favoriserait l'inflammation hépatique

Chez les souris génétiquement obèses (*ob/ob* et *db/db*), le traitement à la D-galactosamine (hépatotoxique) s'accompagne d'une augmentation de l'OPN hépatique. Lorsque ces souris sont traitées avec un anticorps dirigé contre l'OPN, les lésions hépatiques inflammatoires et

l'infiltration hépatique par les macrophages sont diminuées (Kwon, Won et al. 2010). Lors d'un régime MCD, les souris invalidées pour l'OPN présentent une diminution de l'inflammation et de la fibrose hépatique associée à une diminution du taux de transaminases (Sahai, Malladi et al. 2004). De même, lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisse, l'inflammation hépatique est moins importante chez les souris n'exprimant pas OPN (Kiefer, Neschen et al. 2011). La neutralisation d'OPN avec un anticorps dirigé contre OPN corrige aussi cette inflammation hépatique chez les souris obèses. Mais ce traitement est aussi associé à une diminution de l'inflammation du TA (Kiefer, Zeyda et al. 2010).

Ces études soulignent encore une fois le lien entre OPN, inflammation et insulino-résistance du tissu adipeux et les lésions hépatiques.

- L'OPN favoriserait la fibrose hépatique

Différentes études ont mis en évidence le rôle de l'OPN sur la fibrose hépatique.

Dans un modèle de fibrose hépatique induite sur des rats traités au CCl₄, l'expression génique de l'OPN augmente avec la fibrose (Lee, Seo et al. 2004). L'augmentation de l'OPN lors du développement de la fibrose dans un modèle murin de NASH (souris soumises à un régime MCD) a été rapportée par Sahai *et coll.* L'invalidation de l'OPN protégeait partiellement du développement de la fibrose hépatique (Sahai, Malladi et al. 2004). Plus récemment, Syn *et coll.* ont rapporté que chez les souris soumises à un régime MCD, la surexpression de l'OPN aggrave la fibrose (Syn, Choi et al. 2011).

L'invalidation de l'OPN diminue aussi la fibrose hépatique induite par un régime riche en graisse, avec une diminution de l'expression de gènes du collagène (Col1a1, Col6a1 et Col6a3) (Lancha, Rodriguez et al. 2014). Cependant, la prise de poids et l'inflammation du tissu adipeux sont diminuées chez ces souris invalidées pour l'OPN.

L'OPN serait une cible de la voie de signalisation Hedgehog (Hh), responsable des réponses pro-fibrogéniques (Schéma 4, d'après (Machado and Cortez-Pinto 2011)). Les ligands Hh sont produits par les cellules inflammatoires, notamment les NKT (Syn, Choi et al. 2011), ainsi que par les hépatocytes ballonisés présents lors de la NASH (Rangwala, Guy et al. 2011). Les cytokines profibrogéniques (la leptine, le PDGF/platelet-derived growth factor, et TGF β) induiraient la production d'Hh via la PI3k (phosphoinositide 3-kinase) sur ces hépatocytes (Machado and Cortez-Pinto 2011). Les ligands Hh augmenteraient à leur tour la production d'OPN dans les cellules progénitrices et étoilées via la voie patch (récepteur des Hh)/Gli-2

(facteur de transcription)/Sox9 (SRY (sex determining region Y)-box 9) (Pritchett, Harvey et al. 2012). La voie Hh entraîne la différenciation des cellules étoilées en myofibroblastes via OPN. La voie Hh induit également sur les cellules progénitrices hépatiques à la fois une différenciation en hépatocytes, et une différenciation en myofibroblastes par activation de la transition épithélio-mésenchymateuse. L'OPN produite par les cellules des canaux biliaires, les cellules étoilées, et également les cellules T NK, serait responsable d'une activation des cellules étoilées en myofibroblastes (Syn, Agboola et al. 2012).

Une étude réalisée sur des cellules étoilées hépatiques de rat, rapporte une augmentation de l'expression génique et protéique de l'OPN lors de l'activation de ces cellules en myofibroblastes. De plus, l'OPN induit la prolifération et la migration des cellules étoilées. L'OPN favoriserait la migration des cellules en remodelant la matrice extracellulaire, notamment en augmentant l'expression de la protéinase de la matrice MMP2 (matrix metalloproteinase 2), et MTI-MMP (membrane type 1 matrix metalloproteinase, un activateur de l'enzyme MMP2) et du collagène de type 1 (Lee, Seo et al. 2004).

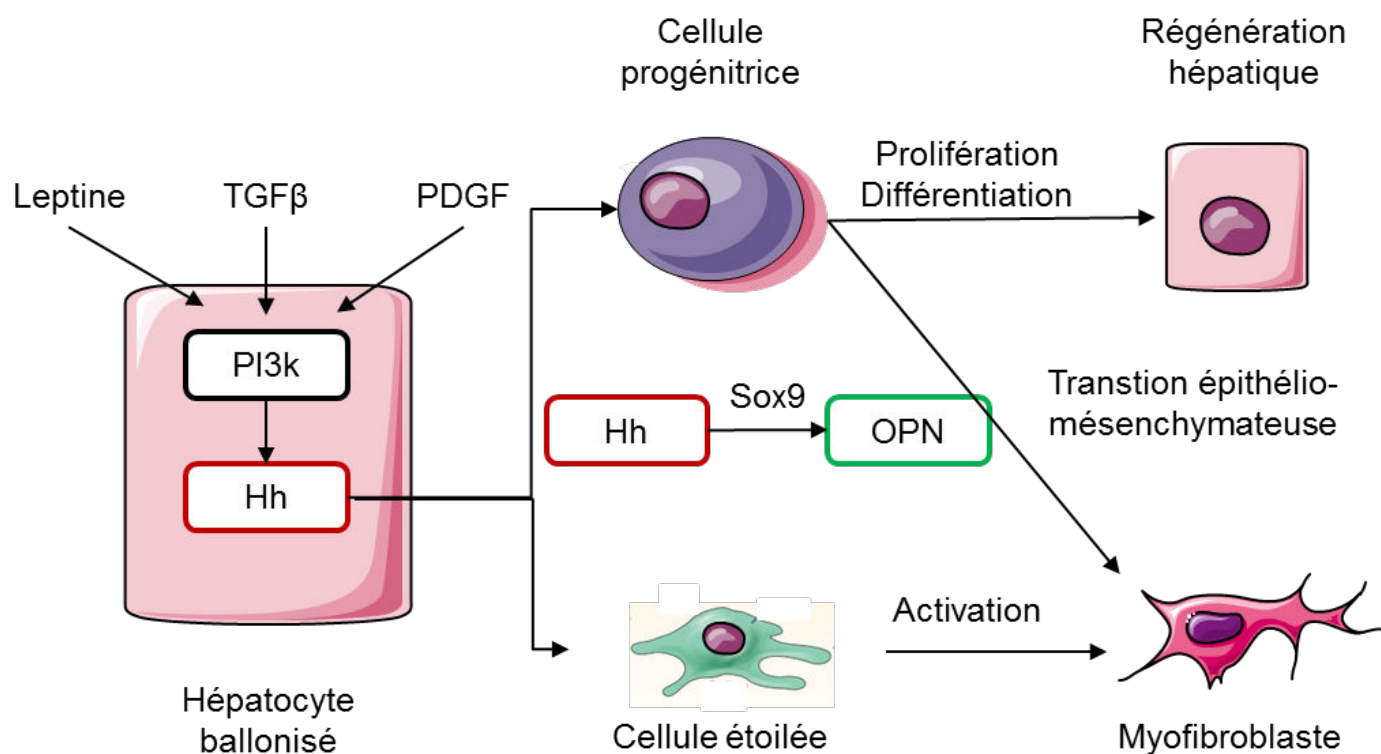


Schéma 4: OPN et fibrose hépatique, d'après Machado et coll.

Les hépatocytes ballonnés produisent le ligand Hedgehog (Hh) qui agit sur les cellules progénitrices et les cellules étoilées. Les cellules progénitrices vont assurer la régénération cellulaire en se différenciant en hépatocytes, mais vont également subir une transition épithélio-mésenchymateuse et se différencier en myofibroblastes. Les cellules étoilées vont être activées et se différencier en myofibroblastes. Les cytokines pro-fibrosantes vont induire la production de Hh, via PI3k (phosphoinositide 3-kinase). L'OPN est induit par la voie Hh, probablement via Sox9 (SRY (sex determining region Y)-box 9), et participerait à la régénération et la fibrose hépatique.

5. Ostéopontine et alcool

Comme nous l'avons vu dans la première partie, la consommation chronique d'alcool est responsable de lésions hépatiques. Dans un premier temps la stéatose se développe. Une infiltration du parenchyme par des cellules inflammatoires, notamment des polynucléaires neutrophiles, associée à des lésions hépatocellulaires surviennent. Il s'agit de lésions d'hépatite alcoolique. L'évolution se fait ensuite vers la fibrose et la cirrhose (Orman, Odena et al. 2013). Le rôle de l'OPN dans la survenue et l'évolution de ces lésions hépatiques a été mis en évidence dans plusieurs études.

5.1. Patients

Différentes études rapportent une augmentation de l'OPN lors de la consommation chronique d'alcool chez l'homme.

En 2006, il a été montré sur un petit nombre de patients que l'expression génique de l'OPN augmentait dans le foie de patients avec une hépatite alcoolique aiguë par rapport aux patients alcooliques avec stéatose et par rapport aux patients contrôles (Seth, Gorrell et al. 2006).

Plus récemment, en étudiant le transcriptome de 15 patients alcooliques, il a été rapporté que l'expression d'OPN était augmentée par rapport aux foies normaux (Affo, Dominguez et al. 2013).

Une étude postérieure à mon travail de thèse (Patouraux, Bonnafous et al. 2012) a mis en évidence chez 49 patients alcooliques que le taux plasmatique et l'expression génique hépatique d'OPN augmentent chez les patients avec une hépatite alcoolique. Le taux plasmatique et l'expression génique sont corrélés, et augmentent avec la sévérité des lésions hépatiques, et également lors du stade de cirrhose. Par étude immunohistochimique, les auteurs ont montré que la protéine OPN était plus exprimée dans les foies de patients alcooliques. La protéine se localise principalement dans les zones de fibrose. De plus, l'expression plasmatique et génique de l'OPN prédit la mortalité des patients alcooliques. Enfin, l'expression génique de l'OPN est corrélée à l'expression de chimiokines telle l'IL-8, responsable de l'afflux de polynucléaires neutrophiles (Morales-Ibanez, Dominguez et al. 2013).

Enfin, une étude publiée en 2014 rapportait que l'expression de l'isoforme OPNc augmentait dans le foie de patients alcooliques présentant une stéatose, une stéatohépatite

et une cirrhose par rapport à des sujets contrôles. Le taux d'OPN plasmatique étudié sur une autre cohorte était plus élevé chez les patients alcooliques cirrhotiques que chez les sujets contrôles (Seth, Duly et al. 2014).

5.2. Modèles murins

5.2.1. Inflammation et souffrance hépatique

Les rats nourris pendant 6 semaines avec un régime liquide de type Lieber-DeCarli contenant de l'éthanol (EtOH) développent une stéatose hépatique. L'injection de LPS entraîne des lésions identiques à celles observées dans l'hépatite alcoolique aigüe (Apte, Banerjee et al. 2005). Dans ce modèle, l'expression hépatique de l'OPN (génique et protéique) et le taux plasmatique d'OPN ont été étudiés.

Lors de la stéatose, l'OPN augmente modérément dans le foie, mais son taux plasmatique n'est pas modifié. Lors de l'hépatite alcoolique aigüe, les niveaux d'OPN hépatique et plasmatique sont fortement augmentés (Apte, Banerjee et al. 2005). L'expression génique d'OPN est corrélée à son expression protéique. L'ARNm de l'OPN est exprimée initialement surtout dans les cellules des canalicules biliaires. L'ARNm augmente précocement et précède l'infiltration des polynucléaires (Banerjee, Burghardt et al. 2006).

Dans le sérum c'est la forme clivée par la thrombine qui est augmentée. Cette augmentation est corrélée à l'infiltration hépatique par les polynucléaires neutrophiles (Apte, Banerjee et al. 2005). En utilisant un anticorps neutralisant l'OPN, il a été montré que l'infiltration de polynucléaires était moindre (Banerjee, Apte et al. 2006).

L'infiltration des polynucléaires dans le foie et les lésions associées seraient dues au domaine de liaison aux intégrines N-terminal de l'OPN. Les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$ situées sur les polynucléaires neutrophiles se lient à ce domaine. L'expression génique et protéique de ces intégrines augmente avec la sévérité des lésions hépatiques induites par l'alcool. Le traitement par un anticorps neutralisant l'OPN diminue cette expression (Banerjee, Lee et al. 2008).

Afin de déterminer un lien entre OPN et lésions hépatiques, l'expression de l'OPN a été étudiée chez des rats mâles et femelles soumis à un régime contenant de l'EtOH. Dans ce modèle, les femelles présentent des lésions plus importantes que les mâles, et l'expression génique hépatique d'OPN était plus élevée chez les femelles que chez les mâles. La

sensibilité supérieure des femelles aux lésions induites par l'alcool serait due à l'expression supérieure d'OPN par rapport aux mâles (Banerjee, Apte et al. 2006).

Cette expression serait régulée en partie par les œstrogènes. Sur des rats femelles ayant subi une ovariectomie et soumises à un régime contenant de l'EtOH, de faibles doses d'œstrogènes diminuent l'expression génique et protéique d'OPN dans le foie, alors que de fortes doses l'augmentent. Par ce mécanisme, les œstrogènes auraient un rôle protecteur sur les lésions hépatiques, mais cette fonction serait dépassée avec de fortes doses (Banerjee, Rose et al. 2009).

Chez la souris, un régime contenant de l'éthanol ou son métabolite, l'acétaldéhyde, est suffisant pour induire une hépatite alcoolique. Chez des souris invalidées pour l'OPN et soumises à un régime contenant de l'EtOH, les lésions hépatiques étaient moins importantes que celles observées chez les souris contrôles. L'expression des cytokines pro-inflammatoires était diminuée. L'infiltration des polynucléaires était diminuée, mais pas celle des macrophages. Par des approches cellulaires, les auteurs ont mis en évidence que les cellules étoilées et les macrophages seraient une source de production d'OPN (Morales-Ibanez, Dominguez et al. 2013).

5.2.2. Fibrose hépatique

Il a été montré que l'OPN est augmentée dans les cellules étoilées isolées de foie de patients cirrhotiques (Sancho-Bru, Bataller et al. 2005). Dans cette étude réalisée sur 10 patients, 2 présentaient une cirrhose d'origine alcoolique, 8 avaient une cirrhose secondaire à une infection par le virus C.

A partir de modèles murins de fibrose hépatique, l'implication de l'OPN dans ce processus a été approfondie. Un traitement au long cours par du CCl₄ ou une ligature des voies biliaires sont des modèles de fibrose hépatique chez les souris et les rats.

La protéine OPN, identifiée par immunohistochimie, est plus exprimée dans les cellules étoilées des foies de rats traités au CCl₄ que dans les foies de rats contrôles (Kawashima, Mochida et al. 1999). L'expression génique de l'OPN dans les cellules étoilées isolées à partir de foie de souris est augmentée chez les souris ayant eu un traitement pro-fibrosant (De Minicis, Seki et al. 2007). Chez des souris invalidées pour l'OPN, la nécrose et la fibrose sont moins importantes que chez les souris sauvages après traitement pro-fibrosant (Lorena, Darby et al. 2006). Inversement, des souris transgéniques surexprimant l'OPN au niveau des hépatocytes et traitées au CCl₄ pendant 4 semaines présentaient une fibrose plus

importante que les souris sauvages. La nécrose et l'inflammation n'étaient pas différentes entre les deux groupes. Au bout d'un an, les souris transgéniques surexprimant l'OPN présentaient une fibrose péricentrolobulaire, périportale et sinusoidale spontanée, sans traitement pro-fibrosant (Urtasun, Lopategi et al. 2012).

Les mécanismes par lesquels l'OPN pourrait favoriser la fibrose ont été étudiés.

Le traitement de fibroblastes par la cytokine TGF β induit leur différenciation en myofibroblastes, comme en témoignent l'augmentation du marqueur myofibroblastique actine muscle lisse et la production de fibronectine. Les cellules invalidées pour l'OPN ne se différencient pas après traitement au TGF β , suggérant que l'OPN est nécessaire à la différenciation des myofibroblastes (Lenga, Koh et al. 2008). Une autre approche *in vitro* suggère que le LPS augmenterait l'expression de l'OPN dans les cellules étoilées, et favoriserait leur action fibrosante (Morales-Ibanez, Dominguez et al. 2013).

Il a été rapporté que l'OPN induirait une augmentation de la production de collagène 1 par les cellules étoilées hépatiques. Cette activation des cellules étoilées se ferait via l'intégrine $\alpha 5 \beta 3$ et par la voie PI3K/AKT/NF- κ B, d'après l'étude *in vitro* réalisée par Urtasun *et coll.* De même, les cellules étoilées isolées de foie de souris invalidées pour l'OPN auraient des capacités fibrogéniques moindres que cellules des souris sauvages (Urtasun, Lopategi et al. 2012).

Plus récemment, le rôle et les mécanismes d'actions de l'OPN lors de la fibrose hépatique due à l'alcool ont été mis en évidence. Les auteurs rapportent que l'OPN hépatique (génique et protéique, forme totale et clivée) était augmentée après une alcoolisation aigüe unique des souris, et que l'expression génique et protéique de l'OPN était augmentée dans une lignée de cellules étoilées traitées à l'alcool pendant 4 heures. Cette augmentation était associée à l'augmentation des récepteurs de l'OPN, CD44 et l'intégrine $\alpha 5 \beta 3$, et à l'augmentation de la phosphorylation des protéines Akt et Erk. Cette augmentation était associée à une régulation de gènes impliqués dans la fibrogenèse (TGF β , PAI-1, collagènes) et dans le remodelage de la matrice extracellulaire (plasmine, uPA, MMP) et à une augmentation de la migration des cellules étoilées. L'inhibition de l'OPN (souris invalidées pour l'OPN et utilisation d'anticorps anti-OPN dans les cellules étoilées) inhibait partiellement la phosphorylation des protéines Akt et Erk, l'activation et la migration des cellules étoilées. L'expression de gènes impliqués dans la fibrogenèse et le remodelage de la matrice extracellulaire était modifiée en l'absence d'OPN. L'ensemble de ces résultats

suggèrent que l'OPN, augmentée lors d'une alcoolisation aiguë, serait un acteur clé dans le rôle pro-fibrogénique des cellules étoilées en réponse à l'alcool. L'OPN régulerait l'expression de gènes impliqués dans le développement de la fibrose. Cette régulation complexe favoriserait le développement de la fibrose (Seth, Duly et al. 2014).

Enfin, le rôle des cellules canaliculaires biliaires a été étudié. Il existe une relation entre la prolifération ductulaire et le développement de la fibrose hépatique. Dans le foie des souris invalidées pour l'OPN traitées au thioacétamide (hépatotoxique), la prolifération des cellules canaliculaires et la fibrose étaient diminuées par rapport aux souris sauvages. Pour étudier le lien entre OPN, prolifération ductulaire et fibrose, des co-cultures ont été réalisées avec des cellules étoilées. Ce seraient les cellules biliaires qui favoriseraient l'activation et l'action fibrogénique des cellules étoilées via OPN et TGF β (Wang, Lopategi et al. 2014).

5.3. Rôle protecteur de l'OPN dans l'alcoolisme chronique

D'après de nombreuses données de la littérature, l'OPN favoriserait les complications hépatiques lors de l'obésité et de l'alcoolisme. Mais l'OPN est une protéine complexe qui peut avoir un rôle anti-inflammatoire dans certaines conditions. Deux études suggèrent un rôle protecteur de l'OPN dans les lésions hépatiques induites par l'alcool. Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'alcool est responsable d'une perte de l'intégrité de la muqueuse intestinale, permettant une translocation de LPS favorisant l'inflammation hépatique. L'OPN pourrait agir au niveau du tube digestif et du foie.

L'OPN est détectée dans le lait, et serait absorbée et localisée dans la muqueuse intestinale. L'administration par voie orale de l'OPN purifiée à partir du lait diminue les lésions hépatiques induites par l'alcool chez la souris. L'OPN aurait, dans la muqueuse digestive un rôle anti-inflammatoire et préserverait l'intégrité de la muqueuse intestinale (Ge, Lu et al. 2013).

Au niveau hépatique, la surproduction d'OPN pourrait se lier au LPS, bloquant alors l'activation des macrophages, la production de ROS et de TNF α . De plus, l'excrétion d'OPN par les canaux biliaires ciblerait l'intestin, source du LPS. Cette capacité à prévenir l'inflammation et l'endotoxémie est mise en évidence dans un modèle murin surexprimant l'OPN dans les hépatocytes, chez qui la stéatose, l'infiltration de macrophages et l'expression du TNF α étaient diminuées lors de la prise d'alcool (Ge, Leung et al. 2014).

Il avait déjà été rapporté un rôle anti-inflammatoire de l'OPN au niveau digestif, dans les colites aiguës. Dans un modèle murin de colite aiguë, l'invalidation de l'OPN est associée à

des lésions digestives plus marquées que chez les souris sauvages. L'administration *per os* de l'OPN du lait lors d'une colite aiguë s'accompagne d'une diminution de l'infiltrat inflammatoire (macrophages et polynucléaires neutrophiles) du tube digestif, d'une diminution de la production de médiateurs pro-inflammatoires, et d'une diminution de la perte de poids.

Il semblerait que l'activation par l'OPN de l'immunité acquise préviennent les lésions de colites aiguës et favorise la réparation tissulaire. Au stade chronique, l'OPN favoriserait une réponse inflammatoire de type Th1 (da Silva, Ellen et al. 2009; Heilmann, Hoffmann et al. 2009).

Il semblerait que l'OPN puisse aussi avoir dans certaines conditions un rôle anti-inflammatoire dans les macrophages. Le mécanisme impliqué serait dû à la capacité de l'OPN à inhiber la production de NO (Rollo, Laskin et al. 1996; Rittling and Denhardt 1999). iNOS induit la production de NO, une molécule de défense contre les agents pathogènes, mais qui est toxique. iNOS est systématiquement exprimée dans plusieurs types cellulaires, dont les macrophages, durant l'inflammation. Il a été montré que le NO effectue un rétro control négatif sur sa propre synthèse en augmentant l'expression d'OPN. L'OPN inhiberait iNOS, en augmentant l'ubiquitination et la dégradation de STAT-1, nécessaire à la production d'iNOS (Guo, Cai et al. 2001; Gao, Guo et al. 2007; Guo, Wai et al. 2008).

Comme nous venons de le voir, l'OPN peut avoir un rôle protecteur. Le développement de la stéatose et de l'inflammation au cours des maladies non alcooliques du foie, ainsi que le développement de la fibrose au cours de l'alcoolisme sont des processus chroniques.

6. Ostéopontine et ischémie reperfusion

L'ischémie-reperfusion est un modèle de souffrance aigüe, où l'implication de l'OPN a été étudiée. Après avoir exposé les mécanismes lésionnels de l'ischémie-reperfusion, je rapporterai l'implication de l'OPN dans ce modèle de souffrance aigüe. Si le rôle de l'ostéopontine a été étudié dans plusieurs organes soumis à une ischémie-reperfusion, peu d'études rapportent son implication dans l'ischémie-reperfusion hépatique.

6.1. L'ischémie reperfusion (IR)

6.1.1. Définition de l'ischémie-reperfusion

L'ischémie est la diminution de l'apport sanguin artériel à un organe. Cette diminution entraîne essentiellement une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organe en dessous de ses besoins et la perturbation, voire l'arrêt, de sa fonction.

Lorsque la température de l'organe est de 37°C, on parle d'ischémie normothermique (ou ischémie chaude). Lors de la transplantation d'organe, un refroidissement est nécessaire afin d'assurer la préservation de l'organe. L'ischémie froide correspond à la phase où l'organe qui n'est plus vascularisé est maintenu à une température de 4°C, entre le moment du prélèvement et la revascularisation. Les lésions d'ischémie chaude lors de la transplantation sont liées à une anoxie soit chez le donneur avant le prélèvement, soit chez le receveur lors d'un retard à une bonne revascularisation.

Le syndrome de reperfusion correspond à l'ensemble des conséquences de la revascularisation de l'organe.

6.1.2. Ischémie-reperfusion hépatique

La chirurgie hépatique peut nécessiter une interruption transitoire du flux sanguin qui induit des lésions d'ischémie et de reperfusion. Cette IR est responsable de modifications histologiques, métaboliques, enzymatiques et cellulaires qui font toute la gravité des lésions. Ces deux phases impliquent l'activation de nombreuses voies et mécanismes complexes ayant des effets délétères sur le tissu hépatique, aboutissant à la mort cellulaire.

Ces lésions s'observent lors des procédures chirurgicales comme la résection hépatique partielle, mais également au cours d'un choc hypovolémique, de maladie veino-occlusive ou du syndrome de Budd-Chiari. Elles peuvent aussi être induites par certains toxiques.

Plus de 900 greffes de foie sont effectuées chaque année en France, 5 000 en Europe. La transplantation hépatique est indiquée dans les cirrhoses décompensées, les hépatites

fulminantes, et en cas d'insuffisance hépatique grave. Lors de la transplantation hépatique, une ischémie froide est intentionnellement appliquée pour réduire l'activité métabolique du greffon avant son implantation et sa reperfusion chez le receveur. Les cellules non parenchymateuses (cellules endothéliales des sinusoides, cellules de Kupffer, cellules étoilées et épithélium biliaire) sont plus sensibles à cette ischémie (Churchill, Cheetham et al. 1994). Les hépatocytes ne meurent pas au cours de l'ischémie froide, mais subissent des modifications (Ikeda, Yanaga et al. 1992).

6.1.3. Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion (Schéma 4)

Les mécanismes moléculaires conduisant à ces lésions induites par l'ischémie-reperfusion (IR) sont multi-factoriels, complexes et touchent tous les composants cellulaires du foie.

6.1.3.1. Phase ischémique

Durant la phase ischémique, l'anoxie des hépatocytes (cellules dépendantes de l'oxygène) est clairement l'un des processus prédominants. Le manque d'apport en oxygène et en nutriments entraîne:

- une déplétion en ATP, due à la carence en nutriments et à l'hydrolyse de l'ATP (conversion de l'ATP synthétase en ATP hydrolase au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale),
- l'activation de la glycolyse anaérobie, voie de production d'ATP, qui entraîne la production de lactate, hydrolysé en ions H⁺ (Allen and Xiao 2003),
- une diminution du pH (par augmentation des ions H⁺), entraînant une altération des pompes ioniques Na/Ca/H, conduisant à une augmentation du sodium et du calcium intra cytoplasmique et mitochondrial (Riess, Camara et al. 2002; Allen and Xiao 2003).

A terme, ces processus entraînent une perte de la polarité membranaire, un gonflement cellulaire, une désorganisation du cytosquelette et la nécrose cellulaire.

Au niveau hépatique, au décours d'une phase d'ischémie de courte durée, il a été observé une hyperémie réactionnelle avec vasodilatation, tandis qu'après une période ischémique prolongée apparaissent des altérations micro-vasculaires avec réduction ou arrêt de la perfusion capillaire.

6.1.3.2. Phase de reperfusion

Durant la phase de reperfusion, le rétablissement du flux sanguin au niveau de l'organe, s'accompagne d'effets néfastes. La ré-oxygénation s'accompagne d'une production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS). Les principaux mécanismes impliqués dans la production de ROS sont:

- l'ATP en excès qui est dégradé en hypoxanthine, générateur de ROS,
- la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, dépendant de l'augmentation du calcium intra cytoplasmique, qui induit la réduction de l'oxygène, aboutissant à la formation d'anions superoxydes,
- l'activation des neutrophiles dont l'enzyme NADPH-oxydase catalyse la réduction de l'oxygène et produit de grandes quantités d'anions superoxydes.

Les ROS sont produits initialement par les cellules de Kupffer, et les hépatocytes à un moindre degré, puis par les cellules NKT et plus tardivement par les polynucléaires neutrophiles. Cet excès de ROS a des effets délétères pour le fonctionnement cellulaire. Les ROS induisent un stress oxydatif intra-cellulaire qui conduit à la nécrose cellulaire.

Un autre type de mort cellulaire, l'apoptose s'observe également lors de la reperfusion. La surcharge calcique, le stress oxydant et la correction de l'acidose entraînent un phénomène de transition de perméabilité membranaire mitochondriale. Cette perméabilité de la membrane de la mitochondrie conduit à la libération du cytochrome c, qui dans le cytoplasme, va activer la voie des caspases apoptotiques et conduire à l'apoptose (Crompton 2000).

La reperfusion s'accompagne aussi d'une augmentation de l'inflammation hépatique. En effet, les ROS activent l'inflammation via la voie NF- κ B, la production de TNF α et d'IL-1. Cette réponse inflammatoire aggrave les lésions hépatocytaires. La surproduction de TNF α par les cellules de Kupffer peut induire une mort hépatocytaire (Schwabe and Brenner 2006; de Groot and Rauen 2007; Peralta, Jimenez-Castro et al. 2013).

La production importante de NO par les macrophages entrainerait également la mort hépatocytaire. En effet, l'inhibition d'iNOS améliore les lésions observées lors de IR hépatique (Taniai, Hines et al. 2004; Hamada, Duarte et al. 2009). L'agression de l'endothélium vasculaire par les ROS entraîne une obstruction vasculaire micro-circulatoire.

Les lésions induites par l'IR impliquent donc de nombreux partenaires dont les hépatocytes, les cellules de Küpffer, les cellules endothéliales, les neutrophiles, les lymphocytes et des

réponses spécifiques comme le stress oxydatif (radicaux libres de l'oxygène, radicaux libres du nitrogène), l'inflammation (TNF α) et la mort cellulaire. Cependant, une grande partie des mécanismes et des acteurs impliqués dans les lésions hépatiques induites par l'IR sont encore inconnus ou imprécis.

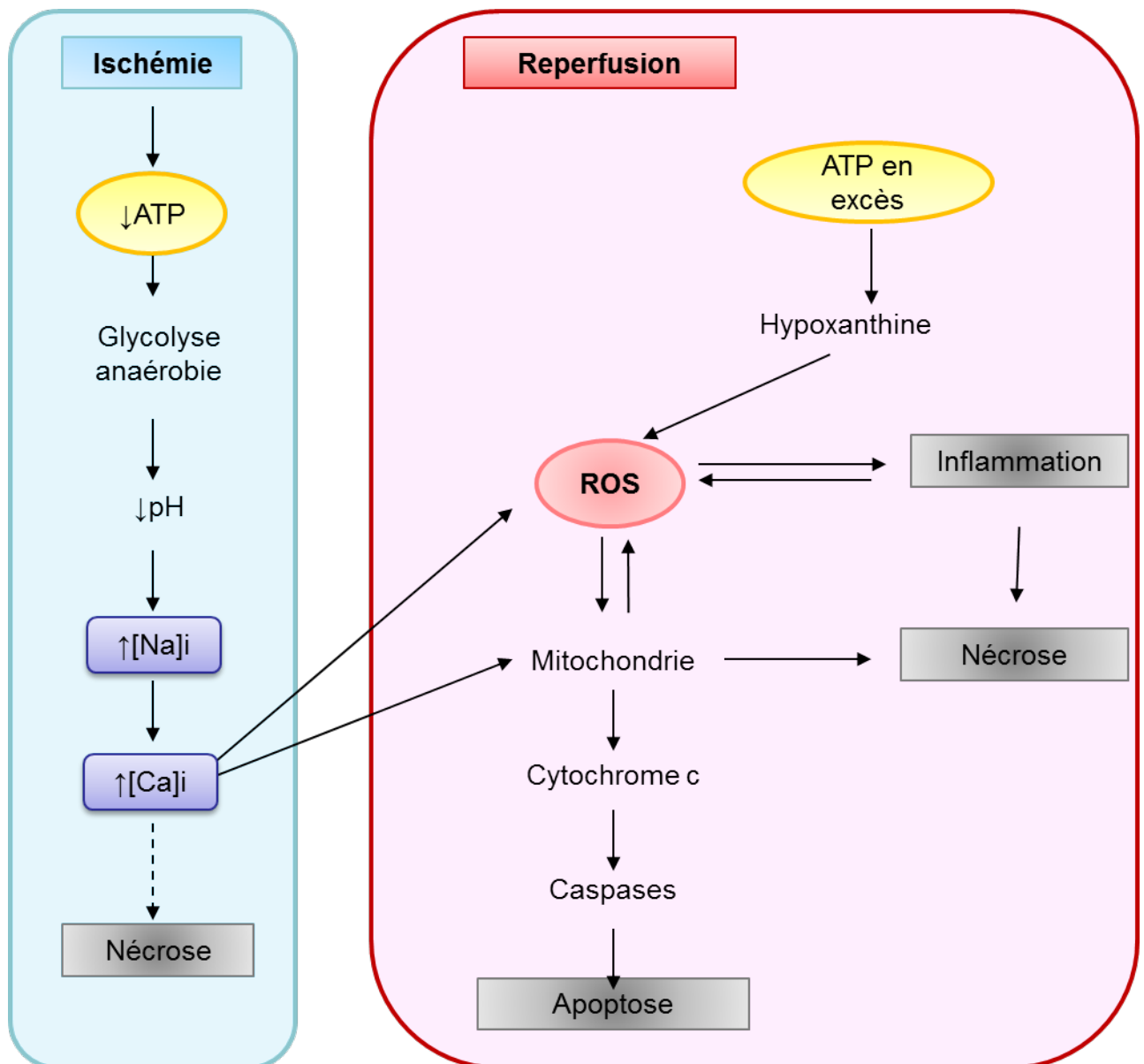


Schéma 5 : Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion

Pendant l'ischémie, la production d'ATP diminue. La glycolyse anaérobie devient alors la principale source de production d'ATP. Ceci entraîne une acidose qui active l'échangeur Na^+/H^+ , afin de restaurer le pH intracellulaire. L'entrée de sodium active à son tour l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, aboutissant à une surcharge calcique. Lorsque l'ischémie se prolonge, cette acidose inactive finalement la glycolyse anaérobie. La cellule va alors se nécroser. La reperfusion réintroduit brutalement de l'oxygène et de l'ATP. La chaîne respiratoire mitochondriale, endommagée par l'ischémie, ne produit pas de l'ATP mais des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS). La surcharge sodique et calcique entraîne la production de ROS. De plus, l'hypoxanthine, produit de dégradation de l'ATP, induit également une surproduction de ROS. Cet excès de ROS conduit à des lésions des membranes cellulaires et à une activation indirecte de l'inflammation en recrutant les leucocytes et en stimulant la production de cytokines. Par ailleurs, des cellules irrémédiablement lésées par l'ischémie évolueront vers l'apoptose.

6.1.4. Aspects histopathologiques

L'hépatite ischémique se caractérise par une nécrose centrolobulaire des hépatocytes sans infiltrat inflammatoire, associée à une distension des veines centrolobulaires et des sinusoides. Une congestion hémorragique des sinusoides peut s'observer.

Lors de la transplantation hépatique, une biopsie hépatique dite «de reperfusion» (biopsie à J0) est le plus souvent réalisée. Ainsi, les lésions dues à l'ischémie-reperfusion peuvent être évaluées. On observera une infiltration par des cellules inflammatoires; polynucléaires neutrophiles initialement, puis macrophages. Ces cellules prédominent dans les sinusoides et autour des veines centro-lobulaires. Il peut s'y associer une nécrose de coagulation hépatocytaire, initialement dans les régions centro-lobulaires, mais pouvant être plus étendue. Lorsqu'elle est importante, cette nécrose peut être responsable d'un dysfonctionnement primaire du greffon. La stéatose microvacuolaire peut également être la conséquence de l'ischémie-reperfusion. Dans les espaces portes, on notera une réaction ductulaire légère à modérée.

La reperfusion d'un greffon macrostéatosique entraîne une altération du flux sanguin sinusoidal et la lyse des triglycérides intra-cytoplasmiques. Les lipides se localisent alors dans les sinusoides, sous la forme de gouttelettes, associées à de la fibrine, des polynucléaires neutrophiles et une congestion.

6.2. Ostéopontine et ischémie-reperfusion

De façon intéressante, le rôle de l'OPN dans la survenue des lésions d'IR hépatique n'a pas encore été étudié. L'augmentation de son expression a déjà été rapportée dans les cellules ganglionnaires rétinienne de rats et de souris soumis à une ischémie-reperfusion du nerf optique (Chidlow, Wood et al. 2008), dans un modèle d'ischémie-reperfusion ex vivo de cardiomyocytes de porc (Kossmehl, Schonberger et al. 2005) et dans des cultures de cellules musculaires lisses aortiques de rats soumises à une hypoxie (Sodhi, Phadke et al. 2001). Même si dans le foie, de nombreux types cellulaires l'expriment, à l'heure actuelle, les seules données concernant son implication dans la survenue et l'intensité des lésions d'IR sont rapportées dans le rein. En effet, l'invalidation de l'OPN dans un modèle de souris soumis à une IR rénale entraînerait dans les phases tardives une diminution de l'infiltration macrophagique, une diminution de la fibrose et une augmentation des phénomènes apoptotiques (Ophascharoensuk, Giachelli et al. 1999; Persy, Verhulst et al. 2003).

6.2.1. Rein

Le rôle de l'OPN lors de l'IR a été principalement rapporté au niveau rénal. L'OPN est exprimée constitutivement par les cellules tubulaires distales chez l'homme et le rongeur (Xie, Sakatsume et al. 2001). L'OPN augmente lors de l'IR rénale. Cependant son rôle n'est pas encore clairement établi. L'OPN est en effet responsable d'une infiltration de macrophages, ayant un effet délétère, mais possède également des propriétés anti-apoptotiques et pro régénératives, permettant la protection rénale.

6.2.1.1. Le rôle chimioattractant de l'OPN lors de l'ischémie-reperfusion

L'expression de l'OPN augmente lors de lésions rénales induites dans des modèles murins et dans certaines pathologies rénales chez l'homme. Cette augmentation est associée à l'infiltration macrophagique (Okada, Moriwaki et al. 2000; Okada, Moriwaki et al. 2000).

Il a été montré sur un modèle murin que durant les 7 jours suivant une IR, l'OPN favoriserait le recrutement des macrophages dans le rein post-ischémique. Cet afflux de macrophages a un rôle délétère, mais serait compensé par les mécanismes protecteurs de l'OPN, qui seront développés dans les paragraphes suivants (Persy, Verhulst et al. 2003).

L'OPN a aussi été étudiée dans le rejet aigu et il a été rapporté que les taux d'OPN plasmatique et urinaire sont augmentés chez les patients ayant un rejet aigu, par rapport aux patients greffés sans rejet et aux sujets contrôles. Le rejet est caractérisé par une infiltration cellulaire interstitielle, et l'expression d'OPN était corrélée à cet infiltrat. Il est

suggéré que le rôle délétère de l'OPN serait dû à sa propriété chimioattractive (Alchi, Nishi et al. 2005; Wang, Tang et al. 2013).

Une étude plus récente rapporte que les souris invalidées pour l'OPN présentaient moins de lésions induites par l'IR (45 min d'ischémie suivie de 4h de reperfusion) et une diminution de l'infiltration des cellules NKT. L'expression de l'OPN par les cellules épithéliales des tubules rénaux augmenterait, et régulerait les lésions induites par les lymphocytes NKT lors de l'IR (Zhang, Shek et al. 2010).

6.2.1.2. L'OPN est un facteur de survie des cellules des tubules rénaux

Les mécanismes impliqués dans la survie cellulaire seraient l'inhibition de l'apoptose et l'inhibition de la synthèse de NO, toxique pour les cellules rénales.

En effet, l'invalidation de l'OPN ne modifie pas la fonction rénale après un accident ischémique aigu, mais inhibe l'apoptose (Persy, Verhulst et al. 2003).

Il a aussi été rapporté que les rats Brown Norway sont plus résistants à l'IR rénale. La surexpression de l'OPN via l'hyper-activation de la voie de signalisation Wnt détectée dans les cellules de rein de rats Brown Norway, joue un rôle critique dans le maintien de leur résistance à l'ischémie intrinsèque. L'activation de l'OPN diminue la libération mitochondriale de cytochrome c et l'activité de la caspase 3, ce qui prévient l'apoptose après IR (Vinas, Sola et al. 2010). Le rôle anti-apoptotique de l'OPN se ferait également par sa capacité à activer la voie NF- κ B, comme cela a été démontré, dans des cellules tubulaires proximales soumises à une hypoxie (Noiri, Dickman et al. 1999).

La survie cellulaire serait due également à l'inhibition de la synthèse de NO par l'OPN. Il a été rapporté qu'après une ischémie rénale de 30 minutes, les souris invalidées pour l'OPN présentaient une fonction rénale diminuée après 24 heures. De plus, la nécrose tubulaire était plus importante chez les souris n'exprimant pas OPN que chez les souris contrôles. L'invalidation d'OPN s'accompagnait d'une augmentation d'iNOS, suggérant que l'OPN aurait un rôle protecteur en inhibant iNOS (Noiri, Dickman et al. 1999). L'inhibition de la production d'iNOS par les cellules des tubules rénaux proximaux a été rapportée dès 1994 *in vitro*. L'OPN inhibait iNOS via l'intégrine $\alpha 5\beta 3$, et donc la synthèse de NO après stimulation au LPS et à l'IFN γ (Hwang, Lopez et al. 1994). Une autre étude a aussi mis en évidence que l'OPN pouvait induire une diminution de la transcription d'iNOS suite à une stimulation par le TNF α dans les cellules mésangiales glomérulaires. La synthèse de NO par des cellules mésangiales

rénales était diminuée lors de l'ajout d'OPN, et un anticorps anti-OPN augmentait la synthèse de NO dans ces cellules (Nagasaki, Ishimura et al. 1999).

6.2.1.3. L'OPN est associée à la régénération cellulaire après ischémie reperfusion

Le niveau d'expression génique et protéique de l'OPN est augmenté après une ischémie dans les cellules des tubes proximaux régénératifs (Padanilam, Martin et al. 1996). L'augmentation de l'OPN aux niveaux de ces cellules régénératives a été rapportée dans un modèle d'IR sur des rats. Cinq à sept jours après l'ischémie, l'expression d'OPN est associée à des modifications morphologiques régénératives (Persy, Verstrepen et al. 1999). L'expression génique est augmentée jusqu'à 3 jours après l'IR, et la protéine se détecte jusqu'à 7 jours (Lewington, Padanilam et al. 2000). La détection de l'OPN dans les cellules tubulaires en régénération s'observe également lors de lésions induites par des agents néphrotoxiques, comme cela a été mis en évidence chez des rats traités à la gentamycine (Xie, Nishi et al. 2001).

6.2.2. Cerveau

Comme dans le rein, le rôle protecteur de l'OPN après IR prédominerait grâce à ses propriétés anti-apoptotiques.

L'invalidation de l'OPN dans un modèle d'infarctus cérébral chez la souris n'entraîne pas de modification de la zone infarctée, mais est responsable d'une dégénération accrue du thalamus homolatéral, associé à une augmentation de l'activation macrophagique et de l'expression des gènes de l'inflammation (Schroeter, Zickler et al. 2006). Il a été montré que l'apport d'OPN *in vitro* augmentait la survie des cellules cérébrale lors de l'hypoxie. Cette propriété dépendrait du domaine de liaison aux intégrines RGD. L'OPN entrainerait une augmentation de la phosphorylation d'Akt et de l'activation de la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). L'activation de ces voies entrainerait l'inhibition de la protéine Bad, pro-apoptotique. De plus, il s'associerait une synthèse accrue de protéine de survie. Dans cette étude, là encore, l'invalidation de l'OPN ne modifiait pas l'infarctissement, mais l'injection intra-cérébrale d'OPN améliorait la survie cellulaire (Meller, Stevens et al. 2005). Les mécanismes conduisant aux lésions hépatiques observées après IR normothermique sont complexes et les protagonistes semblent nombreux. Cependant, l'OPN peut être identifié comme un acteur potentiellement impliqué dans la constitution de ces lésions.

OBJECTIFS

Ce travail de thèse porte sur le rôle de l'ostéopontine dans le développement des complications hépatiques liées à l'obésité, à l'alcoolisme, et à l'ischémie-reperfusion.

La recherche de facteurs impliqués dans le développement des maladies du foie non alcooliques et alcooliques fait à l'heure actuelle l'objet de nombreux travaux.

L'OPN est une protéine impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, et apparaît comme un acteur important dans les complications associées à l'obésité et à l'alcoolisme.

Les objectifs de ce travail étaient les suivants :

1. Étudier le rôle de l'ostéopontine dans l'inflammation du tissu adipeux et hépatique lors de l'obésité.

Les travaux de l'équipe ont permis de mettre en évidence le rôle de l'OPN sur l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité. La poursuite de ces travaux et le rôle de l'OPN sur les complications hépatiques associées à l'obésité sont présentés dans la première partie des résultats.

2. Étudier l'expression de l'ostéopontine dans la fibrose hépatique chez les patients alcooliques.

Les lésions histopathologiques observées dans les maladies non alcooliques et alcooliques du foie sont identiques. Si le développement de la stéatose et de l'inflammation dépendent de mécanismes en partie différents, la fibrose est une réponse commune à l'inflammation et la souffrance hépatique. L'expression de l'OPN lors de la fibrose hépatique chez des patients alcooliques a fait l'objet d'une publication, présentée dans la deuxième partie des résultats.

3. Étudier le rôle de l'ostéopontine dans les lésions hépatiques induites par l'ischémie-reperfusion.

Le rôle de l'OPN dans l'ischémie-reperfusion a été étudié dans le rein principalement. A la différence de ce que nous avons observé dans le foie, l'OPN semble avoir un rôle protecteur lors de l'ischémie-reperfusion rénale. Nous avons voulu déterminer si l'OPN hépatique pouvait avoir un rôle protecteur lors de l'ischémie-reperfusion hépatique. Ce travail est présenté dans la troisième partie des résultats.

RESULTATS

PARTIE 1 : OPN ET OBESITE

L'OPN favorise le développement de la NASH en modulant la fonction des lymphocytes T dans le tissu adipeux et le foie

L'obésité est caractérisée par une augmentation du tissu adipeux. L'inflammation et l'insulino-résistance de ce dernier jouent un rôle important dans le développement des complications hépatiques de l'obésité.

Lors de l'obésité, l'accumulation des macrophages, mais également des cellules dendritiques et des lymphocytes dans le tissu adipeux participe à l'inflammation, à l'insulino-résistance et au développement de la stéatose hépatique. Ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui altèrent la signalisation de l'insuline dans les adipocytes, ce qui conduit à une augmentation de la lipolyse et à la libération d'acides gras libres dans la circulation favorisant à son tour la résistance à l'insuline hépatique et la stéatose hépatique.

Parmi les différents acteurs impliqués dans l'inflammation du tissu adipeux et les complications hépatiques liées à l'obésité, l'ostéopontine (OPN) a cette propriété de réguler le recrutement et les fonctions des macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques. Nous et d'autres équipes avons pu mettre en évidence le rôle de l'OPN dans le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux, dans la stéatose et la fibrose hépatique dans l'obésité et les maladies chroniques du foie (Sahai, Malladi et al. 2004; Nomiyama, Perez-Tilve et al. 2007; Bertola, Deveaux et al. 2009; Kiefer, Zeyda et al. 2010; Syn, Choi et al. 2011). Nous poursuivons l'étude de l'OPN dans les NAFLD et en particulier son rôle dans la régulation du recrutement et de l'activité des LT qui contribuent à l'inflammation du tissu adipeux et du foie.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Human studies: Morbidly obese patients (n=55) were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Nice hospital) where they underwent bariatric surgery for their morbid obesity. Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with French guidelines. Exclusion criteria were: presence of a hepatitis B or hepatitis C infection, excessive alcohol consumption (>20g/d) or another cause of chronic liver disease as previously described (Anty, Bekri et al. 2006; Bekri, Gual et al. 2006; Bertola, Deveaux et al. 2009). The characteristics of the study groups are described in Table 1. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure alanine amino transferase (ALT), aspartate aminotransaminase (AST), glucose, insulin and HbA1c. Insulin resistance was calculated using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) index (Wallace, Levy et al. 2004). Surgical liver and subcutaneous adipose tissue (SCAT) biopsies were obtained during surgery and no ischemic preconditioning had been performed. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner et al. (Kleiner, Brunt et al. 2005). Four histopathological features were semi-quantitatively evaluated: grade of steatosis (0, <5%; 1, 5%-30%; 2, >30%-60%; 3, >60%), lobular inflammation (0, no inflammatory foci; 1, <2 inflammatory foci per 200x field; 2, 2-4 inflammatory foci per 200x field; 3, >4 inflammatory foci per 200x field), hepatocellular ballooning (0, none; 1, few balloon cells; 2, many cells/prominent ballooning), and stage of fibrosis (from 0, none to 4, cirrhosis). In addition, abdominal subcutaneous adipose tissue was obtained from 6 women before (age, 40.7±3.1 years; BMI, 43.1±2.0 kg/m²) and 2 years after (BMI, 26.0±3.8 kg/m²) weight loss following bariatric surgery (mean weight loss: 44.3±11.4 kg). Serum was obtained from 25 patients before (BMI, 43.9±5.3 kg/m²) and 1 year after (BMI, 27.9±3.8 kg/m²) weight loss following bariatric surgery (mean weight loss: 42.3±12.3 kg). The second surgery was performed for cosmetic purpose.

Control subjects: Liver tissue was obtained from 5 lean subjects (5 women; age, 44±9 years; BMI, 21±1.9 kg/m²) undergoing partial hepatectomy for benign tumors (neighbour tissues from four adenoma and one focal nodular hyperplasia). Three subjects were undergoing a left lobectomy or a bisegmentectomy without ischemic preconditioning and two patients were undergoing a right hepatectomy with a potential ischemic preconditioning (missing data). Liver samples did not display any hepatic steatosis, inflammation or fibrosis. Control

subcutaneous adipose tissue was obtained from 4 lean subjects (2 females and 2 males; age 37.3 ± 11.5 years; BMI 20.9 ± 0.5 kg/m²) undergoing lipectomy for cosmetic purposes.

All subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice" approved the study (07/04:2003, N° 03.017).

Animals and study design. Two-month-old male Wild-type (Wt) and OPN-deficient (OPN KO) (B6.129S6(cg)-spp1 tm1Blh/J from Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) C57BL/6 male mice were acclimated to our animal facilities under a 12/12-h light/dark cycle at a temperature of 21 ± 2 °C and were fed ad libitum either a HFD (45 kcal % fat, 35 kcal % carbohydrate, 20 kcal % protein) (D12451; Research Diets) or normal diet (ND) for 33 weeks.

LPS challenge: Wt and OPN KO Mice (6 mice per group) were injected intraperitoneally once with LPS (2 µg/g of body weight) or saline buffer. After 6h, the blood was collected, mice were immediately sacrificed and the liver removed. One part of the biopsy was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed. The second part was fixed in buffered formalin, paraffin-embedded, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin-safran and picro-sirius red. And the last part was used for flow cytometric analysis. **OPN treatment:** Wild-type C57BL/6 male mice (n=6/group, 7-8 weeks of age) were treated with either intra-peritoneal daily injections of OPN (4 µg or 8 µg endotoxin-free recombinant mouse OPN, R&D Systems) or vehicle for 6 days. At the time of sacrifice, white epididymal adipose tissue pads were removed and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until gene expression analyzed. The guidelines of laboratory animal care were followed, and the local ethical committee approved the animal experiments.

Intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT). Mice were fasted for 8 h with free access to water. Conscious mice received an intraperitoneal injection of a glucose solution (1 g/kg body weight; 250 mg/ml) and blood glucose levels were determined before (baseline) and every 30 min for 120 min using a glucometer optium (Xceed; Abbott).

Circulating levels of transaminases and OPN. Determination of plasma transaminases (AST/ALT) was performed using in vitro test with pyridoxal phosphate activation on

Roche/Hitachi cobas c systems (ASTPM, ALTPM, cobas, Meylan, France). Roche/Hitachi cobas c systems automatically calculate the analyte concentration of each sample. Plasma OPN levels were evaluated with the Quantikine ELISA Mouse/Rat OPN Immunoassay (R&D Systems), as per manufacturer's instructions.

Isolation of non parenchymal fraction from liver: Mouse livers were perfused first with a HEPES buffer containing 8 g/L NaCl, 33 mg/L Na₂HPO₄, 200 mg/L KCl and 2,38 g/L HEPES, pH 7.65 for 2 min at 5 ml/min and then with HEPES buffer supplemented with 1,5g/L CaCl₂ and 25mg/L liberase (Roche Diagnostics) for 7 min at 5 ml/min. Livers were then carefully removed, minced and the resultant cell suspension was then filtered (100 µm). The non parenchymal cells in the supernatant of first centrifugation were collected by centrifugation for 5 min at 450 × g and then incubated in NaCl 0.9% buffer supplemented with 0,02% pronase E (Sigma) for 20 min at 37 °C under gentle agitation. Finally, cells were collected by centrifugation at 450 × g for 5 min and used for flow cytometric analysis

Preparation of the stromal vascular fraction from adipose tissue: In mice studies, white epididymal AT pads were removed, immediately cut into small pieces, and rinsed in a buffer containing 120 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KH₂PO₄, 1 mmol/L MgSO₄, 750 µM CaCl₂, 10 mmol/L NaHCO₃, and 30 mmol/L HEPES (pH 7.4). Explants were incubated at 37°C for 30 min in 15 mL of the above buffer supplemented with 1% BSA, 280 mM glucose, and 15 mg of type-1 collagenase (Worthington Biochemical Corporation). Adipocytes were then collected by filtration and floatation. The stromal vascular fraction (SVF) was collected by centrifugation for 15 min at 260g. In human studies, AT was immediately processed after removal and digested using collagenase (250 units/ mL in PBS13, 2% BSA [pH 7.4]) for 30 min under constant shaking. After centrifugation (300g, 10 min), the pellet containing the SVF was resuspended in erythrocyte lysis buffer (155 mmol/L NH₄Cl, 5.7 mmol/L K₂HPO₄, 0.1 mmol/L EDTA) for 10 min. Finally and after successive filtration through 100-, 70-, and 40-µm sieves, the cells were resuspended in PBS plus 2% FCS. The SVF was analyzed by flow cytometry or used to separate the different cellular fractions.

Antibodies and flow cytometric analysis: Antibodies against mouse CD45 (clone 30-F11), CD3e (clone 145-2C11), CD4 (clone RM4-5), CD8α (clone 53-6.7), FoxP3 (clone FJK-16s) IFNγ

(clone XMG1.2) were purchased from Becton–Dickinson or eBioscience. For intracellular staining of IFN γ and FoxP3, the FoxP3 transcription factor staining buffer set (eBioscience) was used according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry was performed on a FACS-Canto and analyzed using FACSDiva version 6.0 software (BD-Bioscience).

Real-time quantitative PCR analysis. Cell or total liver RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen, Hilden, Germany) and treated with Turbo DNA-free (AM 1907, Thermo Fisher scientific Inc.) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNA were determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano Kit (5067-1511, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA (1 mg) was reverse transcribed with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher scientific Inc.). Real-time quantitative PCR was performed in duplicate for each sample using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific Inc.) as previously described (Anty, Bekri et al. 2006; Bekri, Gual et al. 2006). TaqMan gene expression assays were purchased from Thermo Fisher scientific Inc. Gene expression was normalized to the mouse housekeeping gene RPLP0 and calculated based on the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Statistical analysis. Statistical significance of differential gene expression between two study groups was determined using the nonparametric Mann–Whitney test with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of each group. Other data from mice and cell preparations were statistically analyzed using the Mann–Whitney test or the Student t-test. Data from cell lines were statistically analyzed using the Student t-test. Correlations were analyzed using the Pearson's correlation test. $P < 0.05$ was considered as significant.

Résultats

1. Étude chez l'homme

Des biopsies hépatiques et du tissu adipeux sous-cutané (TASC) ont été réalisées chez 55 patients obèses morbides lors d'une intervention de chirurgie bariatrique. Les caractéristiques clinico-biologiques des patients obèses sont présentés dans le Tableau I. Les groupes de patients constitués pour le TASC sont : des sujets minces (n=4), des sujets obèses normo-glycémiques (n=10) et des sujets obèses atteints de diabète de type II (n=10). Les groupes de patients pour le foie sont : des sujets contrôles (n=4), des sujets obèses sans complications hépatiques (n=9), des sujets obèses avec une stéatose (n=15) et des sujets obèses avec une stéatohépatite (n=12). Deux ans plus tard, 6 de ces patients ont bénéficié d'une chirurgie à visée esthétique, au cours de laquelle du tissu adipeux sous-cutané a été prélevé. Les sujets contrôles étaient des patients minces, 5 ayant eu un prélèvement hépatique au cours d'une intervention pour tumeur bénigne hépatique, 4 ayant eu un prélèvement de tissu adipeux sous cutané au cours d'une intervention à visée esthétique.

Tableau 1. Caractéristiques clinico-biologiques des patients obèses

	SCAT						Liver				
	Obese			T2D			Without NAFLD		Steatosis		NASH
n	10			10			8		15		12
Age (years)	34.6	±	2.8	47.4	±	2.0 ^{\$}	37.7	±	4.4	34.0 ± 4.3	41.3 ± 3.0
BMI (kg/m ²)	42.8	±	2.0	46.9	±	1.9	43.4	±	0.5	44.2 ± 1.2	44.2 ± 1.7
	±			±							
ALT (IU/L)	20.2	±	2.9	29.7	±	4.3 ^{\$}	17.3	±	2.9	31.2 ± 2.8*	91.7 ± 21.8**
AST (IU/L)	19.2	±	1.5	31.2	±	7.8 ^{\$}	20.7	±	2.9	23.2 ± 1.4	57.9 ± 11.9**
Fasting insulin (mIU/L)	9.6	±	1.1	23.3	±	4.6 ^{\$}	9.7	±	2.4	15.4 ± 3.3	38.3 ± 7.9**
Fasting glucose (mmol/L)	5.0	±	0.1	9.3	±	1.2 ^{\$}	4.8	±	0.1	5.3 ± 0.1*	7.6 ± 1.2*
HOMA-IR	2.1	±	0.2	9.8	±	2.5 ^{\$}	2.0	±	0.4	3.7 ± 0.8	12.7 ± 3.0**
HbA1c (%)	5.4	±	0.1	7.8	±	0.6 ^{\$}	5.3	±	0.1	5.6 ± 0.1	6.7 ± 0.4**
NAFLD Activity Score (n)							0 (8)		2 (5) 3 (10)		5 (12)
Grade of steatosis (n)							0 (8)		2 (6) 3 (9)		3 (12)
Lobular inflammation (n)							0 (8)		0 (15)		1 (12)
Hepatocellular ballooning (n)							0 (8)		0 (15)		1 (12)

SCAT: Subcutaneous adipose tissue; T2D: obese diabetics patients; Without NAFLD: patients with normal liver histology; Steatosis: patients with steatosis; NASH: patients with severe steatosis and NASH. Data are expressed as mean ± SEM and compared using the non parametric Mann Whitney test: \$ p<0.05 compared with obese non-diabetics; * P<0.05 compared with Without NAFLD and # P<0.05 compared with Steatosis.

BMI: Body mass index; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; HOMA-IR: Homeostasis model assessment estimated insulin resistance; HbA1c: Glycated haemoglobin; NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease.

1.1. Expression de l'OPN et des marqueurs de cellules inflammatoires dans le tissu adipeux chez l'homme lors de l'obésité

Parmi les patients obèses, certains ne développent pas de résistance à l'insuline (diabète de type II). Ils correspondent à un groupe particulier de patients obèses métaboliquement sains. Dans le tissu adipeux sous-cutané (TASC), l'expression génique de l'OPN est progressivement augmentée chez les patients obèses puis chez les patients obèses diabétiques (Figure 1A). De même, il existe une augmentation progressive de l'expression de marqueurs de macrophage (CD68), de LT (CD4 et CD8a) (Figure 1A) et des cellules dendritiques (CD1c) (Bertola, Ciucci et al. 2012) avec l'obésité et l'insulino-résistance. L'expression de l'OPN corrèle avec celle des marqueurs de macrophages (CD68), de cellules dendritiques (CD1c), de lymphocytes T totaux, CD8 et CD4 (Table 2).

Deux ans après la chirurgie bariatrique, les patients présentent une perte de poids et une diminution de l'inflammation systémique, reflétée par le niveau de CRP (Figure 2A), ainsi que du niveau d'expression génique d'IL-6 et de CCL2 (Chemokine ligand 2 ou Monocyte chemo-attractant protein 1 -MCP1) dans le TASC. L'expression de Glut 4 (Glucose transporter type 4, témoin de la sensibilité à l'insuline) est quant à elle augmentée (Figure 2B). L'expression génique de l'OPN, des marqueurs de monocytes/macrophage (CD11b/CD68), de LT CD8, et de CD44 (marqueur de LT activés) est diminuée après la perte de poids. L'expression de l'OPN est corrélée à celle de ces marqueurs (Figure 2D). L'expression des marqueurs de cellules dendritiques CD1c et de LT CD4 n'est pas modifiée (Figure 2C). La diminution de l'inflammation du TASC pourrait être associée à une diminution des monocytes/macrophages et une diminution de l'activation des LT (diminution de l'expression de CD44, augmentation des Treg).

1.2. Expression de l'OPN et des marqueurs de cellules inflammatoires dans le foie chez l'homme lors de l'obésité

Dans le foie, l'expression de l'OPN augmente légèrement chez des patients avec une stéatose et plus intensément lors de l'inflammation (NASH) (Figure 1B). A la différence du TA, il n'y a pas de modification dans l'expression des marqueurs des cellules immunes avec l'obésité ou la stéatose hépatique. Ce n'est qu'en présence de NASH (inflammation hépatique) que nous observons une augmentation de l'expression des marqueurs des cellules dendritiques (CD1c), des macrophages (CD68), et des LT CD8 mais non des LT CD4

(Figure 1B). Par ailleurs, tous ces marqueurs sont corrélés avec l'expression de l'OPN dans le foie de ces patients (Table 2).

Nous avons pu montrer que l'expression de l'OPN et des cellules inflammatoires augmentait en fonction de l'obésité et de l'insulino-résistance dans le TA et en fonction de la stéatose et de la NASH dans le foie. L'OPN pourrait jouer un rôle prépondérant dans le recrutement des cellules inflammatoires dans le tissu adipeux, participant ainsi à l'insulino-résistance, et une régulation plus fine (polarisation) dans le foie lors des complications de l'obésité.

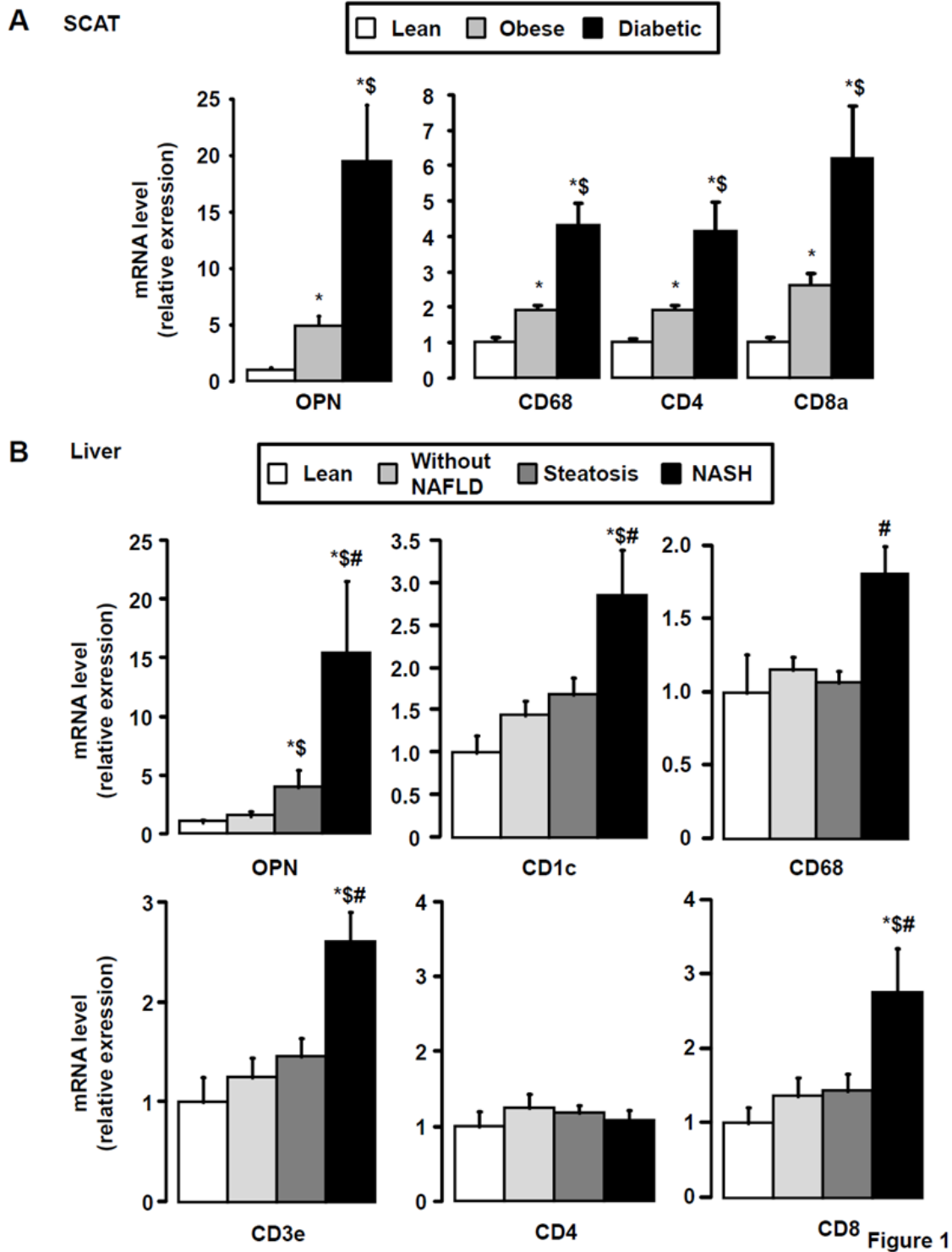


Figure 1: Upregulation OPN and markers of immune cells with T2D and NAFLD in SCAT and liver, respectively, in obese patients. (A) SCAT OPN, CD68, CD4 and CD8a mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lean patients (n=4), in morbidly obese patients without (n=10) and with T2D (n=10). **(B)** Liver OPN, CD1c, CD68, CD3e, CD4 and CD8a mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lean patients (n=4), in morbidly obese patients without NAFLD (n=7-8), with hepatic steatosis (n=13-15) and with NASH (n=9-12). The gene expression was normalized to the mRNA levels of RPLP0. Results are expressed relative to the expression level in controls and expressed as means±SEM. *P<0.05, compared with controls; ^{\$}P<0.05, compared with obese patients without T2D (A) or Without NAFLD (B); [#]P<0.05, compared with obese patients with hepatic steatosis.

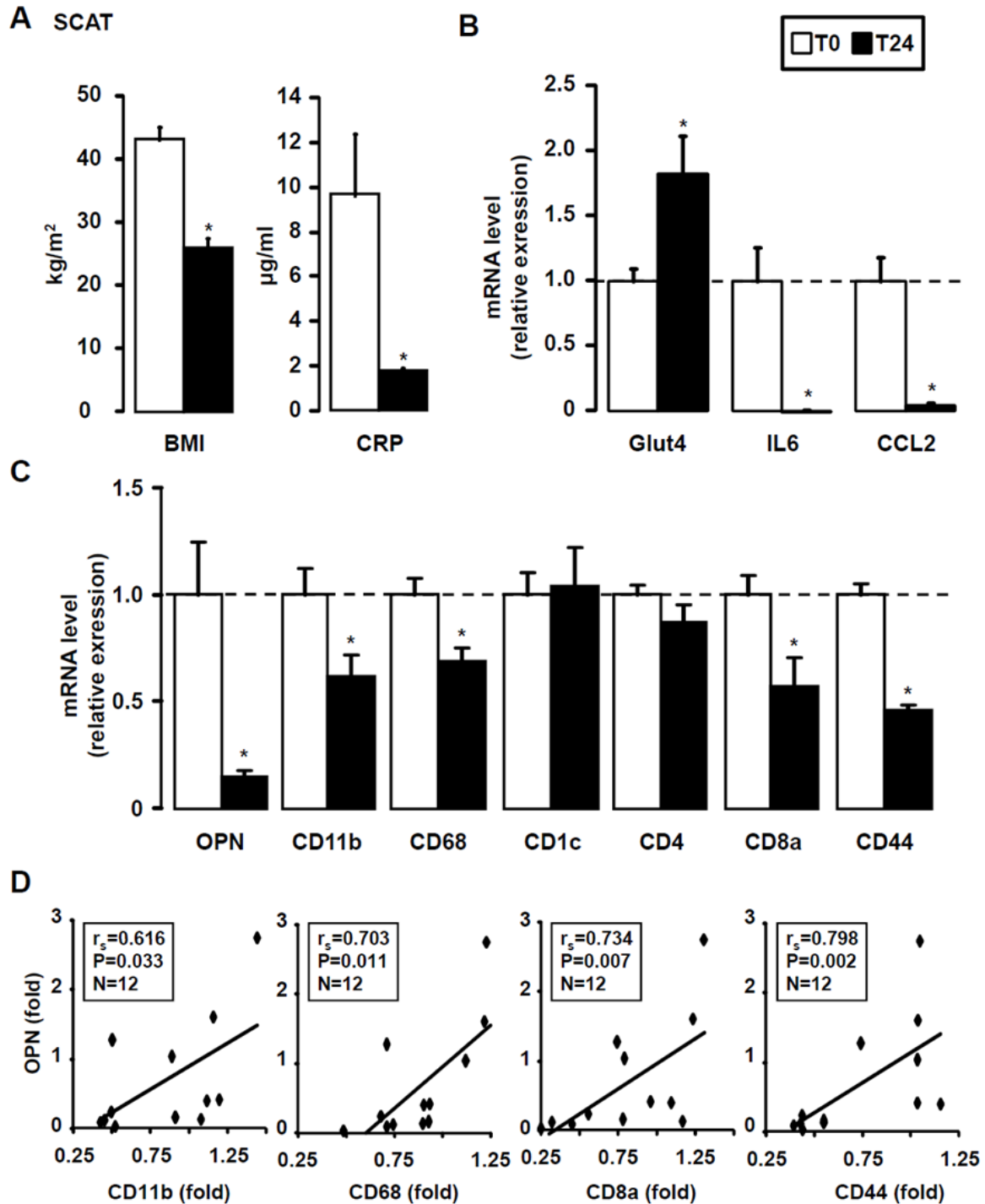


Figure 2: Weight loss in obese patients is associated with a strong decrease in the gene expression of OPN, markers of macrophage and CD8 T cells in the subcutaneous adipose tissue in patients. (A) Six patients were studied before and two years after bariatric surgery for BMI and systemic inflammation (as evaluated by the circulating levels of CRP). **(B)** Glut4, IL6, CCL2 and **(C)** OPN, makers of monocytes/macrophages (CD11b, CD68), dendritic cells (CD1c) and T cells (CD4, CD8a and CD44) mRNA expressions were analyzed by real-time quantitative PCR in subcutaneous adipose tissue obtained from these patients before and after weight loss. Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05. **(D)** Correlations between OPN and CD11b, CD68, CD8a and CD44 mRNA expression levels (fold versus lean) were analyzed using the Pearson's correlation test.

Table 2. Correlation between hepatic and subcutaneous adipose tissue OPN expression and markers of immune cells in obese patients.

OPN	CD68			CD1c			CD3e			CD4			CD8a		
	r_s	P	N	r_s	P	N	r_s	P	N	r_s	P	N	r_s	P	N
Liver	0.214	0.21	36	0.645	<0.001	37	0.384	0.021	36	0.044	0.800	38	0.527	0.001	38
SCAT	0.780	<0.001	24	0.625	0.001	24	0.498	0.013	24	0.730	<0.001	24	0.777	<0.001	24

Spearman's rank correlation test.

Correlations between OPN, CD68, CD1c, CD3e, CD4 and CD8a mRNA expression levels (fold versus lean) in SCAT of morbidly obese patients without (n=10) or with T2D (n=10) and in liver of morbidly obese patients without (n=7-8) or with NAFLD (Steatosis n=13-15, NASH n=9-12) were analyzed using the Pearson's correlation test.

2. Étude chez la souris

Afin de déterminer le rôle de l'OPN, dans le recrutement et/ou l'activation des cellules immunes, nous avons étudié les effets de l'inactivation de l'OPN dans le tissu adipeux et le foie de souris rendues obèses après un régime riche en graisse.

2.1. Effets de l'inactivation de l'OPN sur la prise de poids et la résistance à l'insuline du tissu adipeux

Les souris invalidées pour l'OPN rendues obèses par un régime riche graisse (24% en grammes ou 45% en kcal de gras, 24% en grammes ou 20% en kcal de protéines, 41% en grammes ou 35% en kcal d'hydrates de carbone) pendant 33 semaines présentent la même courbe de poids que les souris sauvages (Figure 3A). Cependant, leur glycémie à jeun est moins élevée que celle des souris sauvages (Figure 3B), et leur tolérance au glucose n'est pas significativement différente de celle observée chez les souris contrôles (minces) (Figure 3C). L'expression des gènes impliqués dans l'insulino-résistance du tissu adipeux épидidimaire (TAE) est améliorée chez les souris invalidées pour l'OPN. Elles ont une expression de GLUT4 augmentée par rapport aux souris sauvages. L'inactivation de l'OPN entraîne également une augmentation de PNPLA2 (patatin-like phospholipase domaincontaining 2) qui code pour l'ATGL (adipose triglyceride lipase) et le gène LIPE qui code pour l'HSL (Hormone-sensitive lipase), toutes deux impliquées dans la lyse des triglycérides (Figure 4). Comme attendu, nous avons donc pu mettre en évidence que chez les souris obèses, l'inactivation de l'OPN prévient l'hyperglycémie, l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance du TAE provoquée par un régime riche en graisse, sans modification de la prise de poids (Nomiyama, Perez-Tilve et al. 2007; Chapman, Miles et al. 2010; Kiefer, Zeyda et al. 2010).

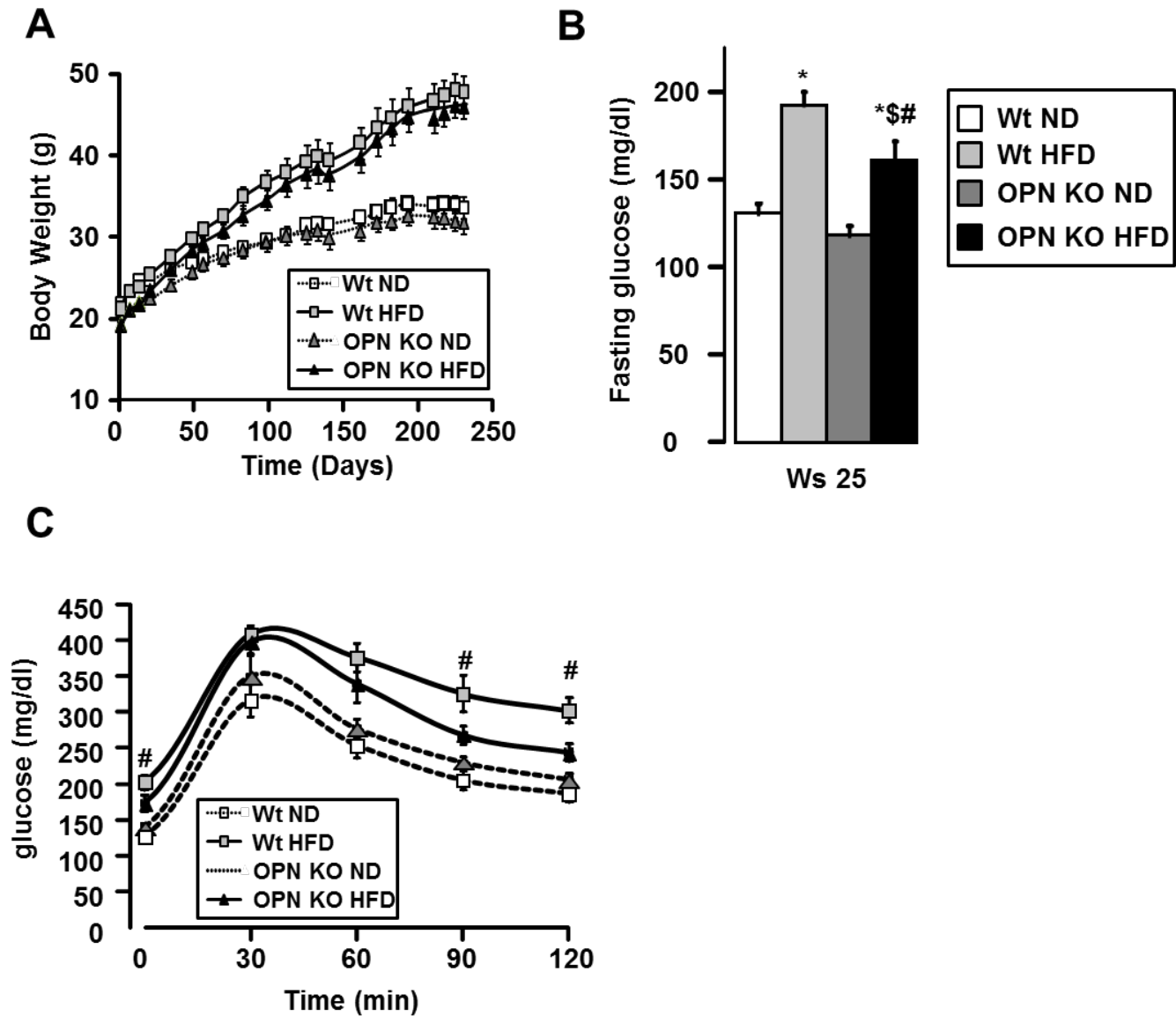


Figure 3: OPN deficiency prevents HFD-induced hyperglycemia and glucose intolerance without changing weight gain. Wild-type OPN^{+/+} (Square, n = 20) and OPN^{-/-} (triangle, n = 19) mice fed a normal diet (ND) or high fat diet (HFD). (A) Weight gain was followed for 33 weeks. (B) To the week 25, the fasting glucose level has been evaluated and (C) an intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT) has been performed. Mice were first fasted for 8 h with free access to water and then received an intraperitoneal injection of a glucose solution (1 g/kg body weight; 250 mg/ml) and blood glucose levels were determined before (baseline) and every 30 min for 120 min. Data expressed as mean $\pm$ SEM.

EAT

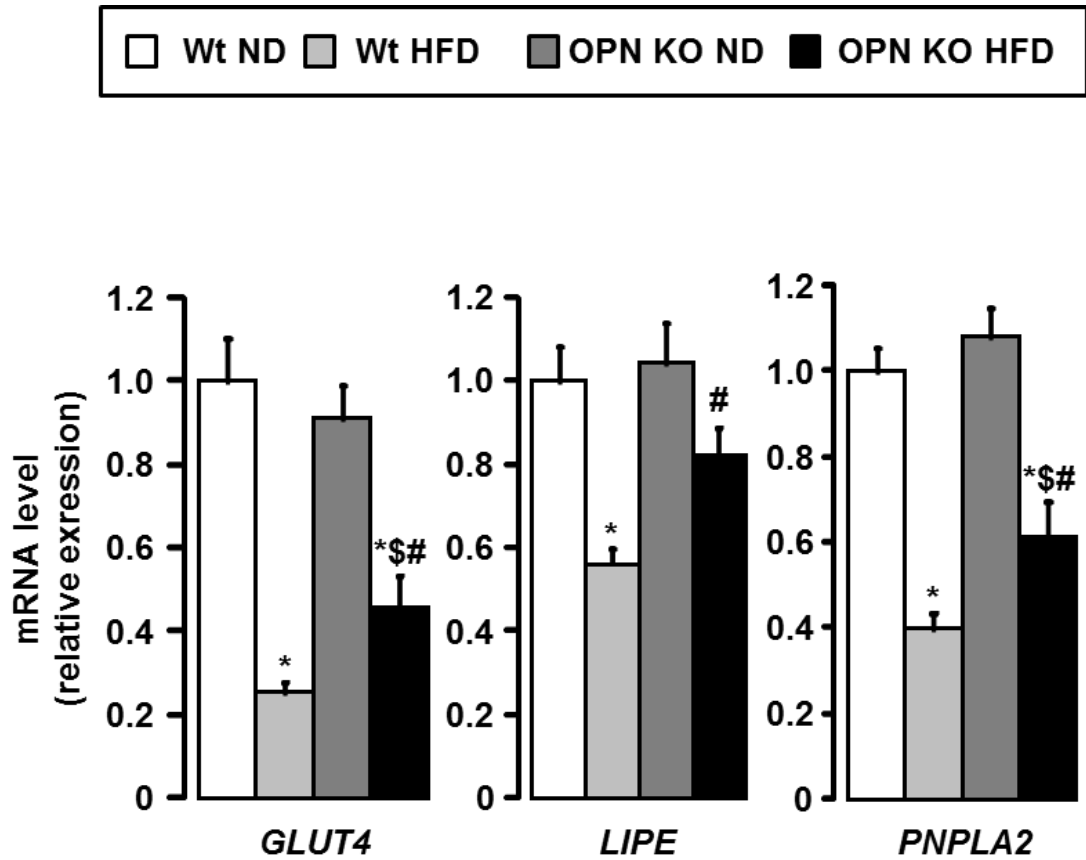


Figure 4: OPN deficiency prevents HFD-induced adipose tissue insulin resistance and systemic inflammation. EAT GLUT4, LIPE and PNPLA3 mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in ND Wt (n=8), HFD WT (n=9) Wt, ND OPN^{-/-} (n=8) and HFD OPN^{-/-} (n=11) mice. Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means±SEM. *P<0.05, compared with ND Wt mice; \$P<0.05, compared with ND OPN^{-/-}; #P<0.05, compared with HFD Wt mice

2.2. Effets de l'invalidation de l'OPN sur l'inflammation du tissu adipeux

L'expression génique de l'OPN est fortement augmentée dans le TAE de souris sauvages soumises à un régime riche en graisse (Figure 5A). Chez ces souris rendues obèses, l'invalidation de l'OPN prévient l'infiltration des LT totaux (CD3), CD4 et CD8 dans le TAE (Figure 5B) et la polarisation des LT en Th1 (type pro-inflammatoire), mis en évidence par un marquage intra-cytoplasmique de l'IFN γ dans les LT CD4 (Figure 5C). Les analyses de cytométrie en flux nous ont aussi permis de mettre en évidence que l'invalidation de l'OPN prévient la diminution des Treg (expression de FOXP3 dans les LT CD4) (Figure 5B). Enfin, l'augmentation de l'expression génique de marqueur de macrophages (F4/80) pro-inflammatoire M1 (CD11c) est prévenue chez les souris obèses invalidées pour l'OPN (Figure 5D).

L'invalidation de l'OPN diminue bien le recrutement des macrophages, comme déjà mis en évidence par différents groupes (Nomiyama, Perez-Tilve et al. 2007), mais aussi des LT et prévient la polarisation pro-inflammatoire (Th1) des cellules CD4 et la diminution des Treg.

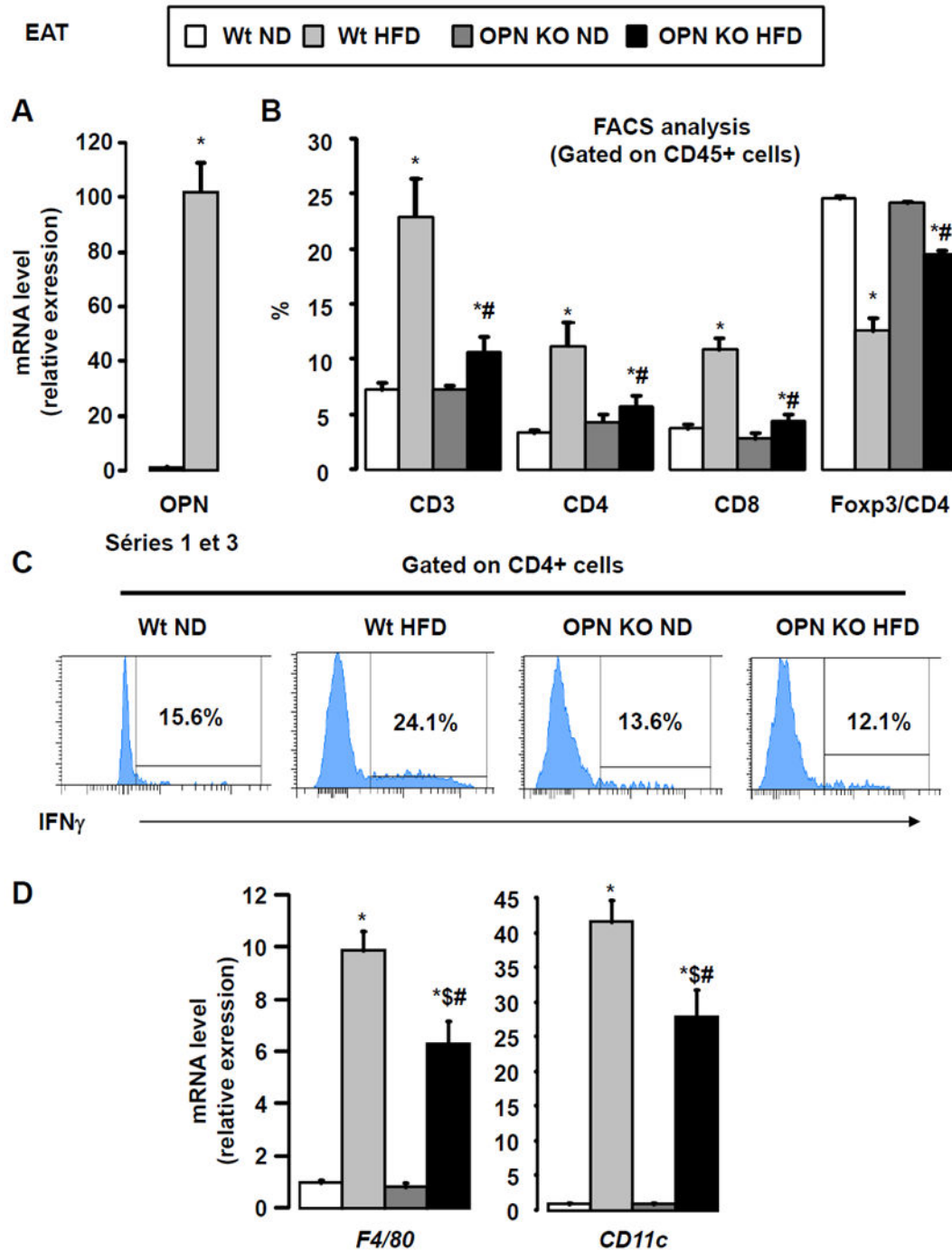


Figure 5: OPN deficiency prevents the recruitment and the Th1 polarization of the T cells and the decrease in Treg in the epididymal white adipose tissue (EAT) in response to HFD. (A) EAT OPN mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in ND (n=8) and HFD (n=9) Wt mice. (B) Epididymal fat pads were isolated from lean (ND) and obese (HFD) Wt and OPN^{-/-} (after 33 weeks of diet, 4-5 mice per group), and the SVF was stained for CD3, CD4, CD8 and Foxp3. (C) Cytokine profiles of activated T cells by intra-cytoplasmic analysis for IFN- γ . (D) EAT F4/80 and CD11c mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in ND Wt (n=8), HFD WT (n=9) Wt, ND OPN^{-/-} (n=8) and HFD OPN^{-/-} (n=11) mice. Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05, compared with ND Wt mice; \$P<0.05, compared with ND OPN^{-/-}; #P<0.05, compared with HFD Wt mice.

2.3. Effets de l'OPN sur le recrutement des cellules immunes

Afin de déterminer si l'OPN seule pouvait entraîner une infiltration de cellules immunes dans le tissu adipeux, nous avons réalisé une injection d'OPN en intrapéritonéale chez des souris minces (1 injection de 4 ou 8 µg par jour pendant 6 jours). Nous observons une augmentation de l'expression de marqueurs de monocytes/macrophages (CD11b, F4/80), de M1/cellules dendritiques (CD11c), de lymphocytes T (CD4, CD8), de Th1 (Tbet) et de l'expression de TNFα dans le TAE de ces souris (Figure 6A et B).

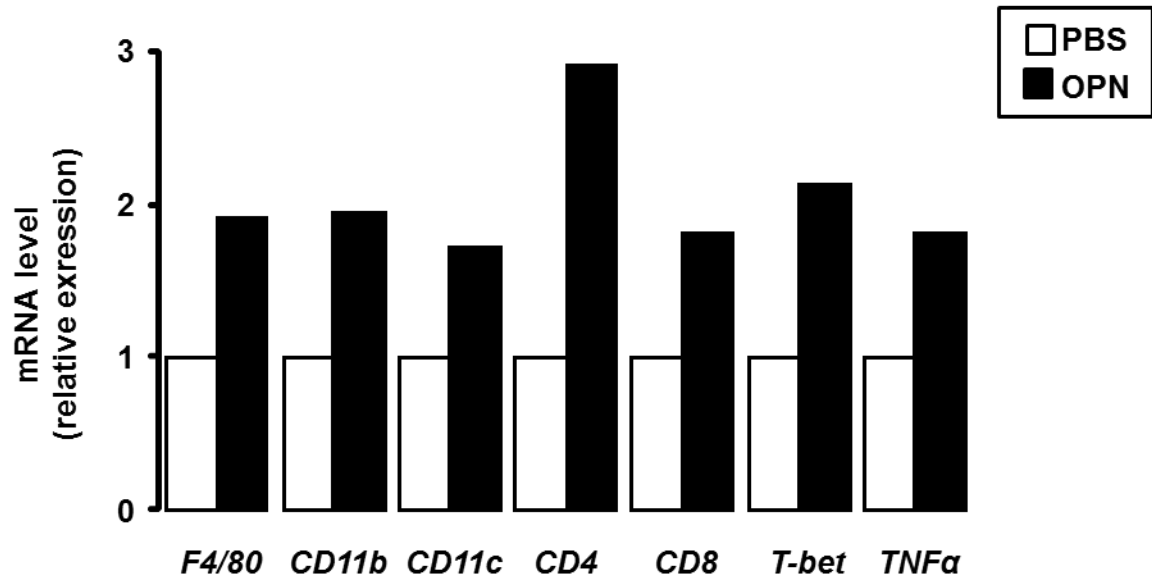
Ces résultats indiquent qu'une forte augmentation de l'OPN est capable d'induire une inflammation associée à un enrichissement du TAE en macrophages mais aussi en LT.

Nous avons voulu ensuite déterminer si la diminution de l'inflammation et de l'insulino-résistance du TA lors de l'inactivation de l'OPN étaient associées à une prévention des complications hépatiques.

EAT

A

C57BL6 +/- OPN (8 µg/Day for 6 Days) (pool of 6 mice/group)



B

C57BL6 +/- OPN (4 µg/day for 6 Days) (pool of 6 mice/group)

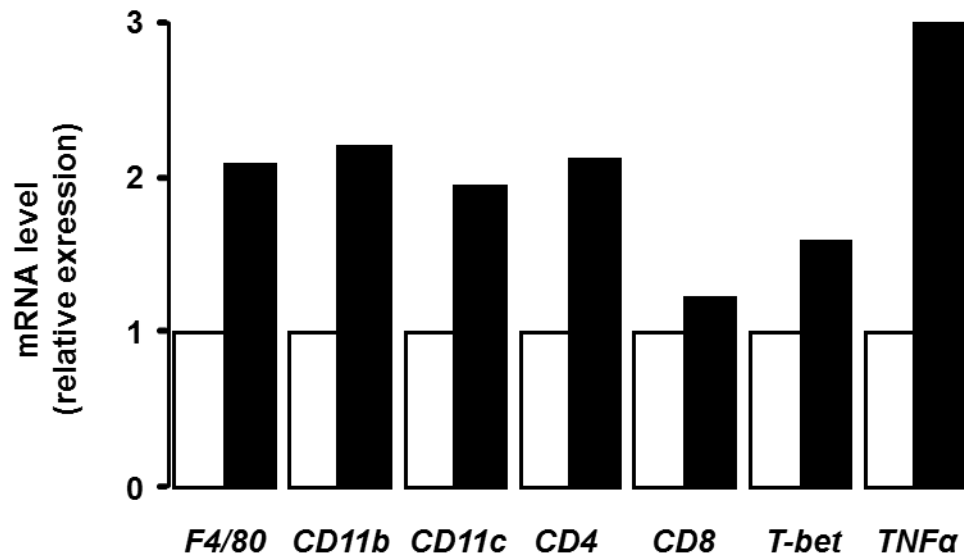


Figure 6: OPN injection promotes the enrichment of immune cells into EAT as evaluated by the gene expression of markers in lean mice. Wild-type C57BL/6 male mice (n=6/group, 7-8 weeks of age) were treated with either intra-peritoneal daily injections of OPN (4 µg (A) or 8 µg (B) endotoxin-free recombinant mouse OPN, R&D Systems) or vehicle for 6 days. EAT mRNA expression levels of markers of macrophages (F4/80, CD11b), dendritic cell (CD11c) and T cells (CD4, CD8, T-bet) and TNFα were analyzed by real-time quantitative PCR. Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means±SEM.

2.4. Effets de l'invalidation de l'OPN sur l'inflammation hépatique

2.4.1. Modèle de stéatose hépatique

Dans le foie, lors d'un régime riche en graisse, la souffrance hépatique, reflétée par les transaminases, et la stéatose sont augmentées (Figure 7A et B). L'inflammation hépatique augmente, avec une élévation des marqueurs de macrophages (EMR1/F4/80) pro-inflammatoires (CD11c), de lymphocytes T (CD3) et de cytokines inflammatoires Th1 (IFN γ , IL-12 β et TNF α) (Figure 7 D et E). L'expression génique hépatique de l'OPN est aussi augmentée lors d'un régime riche en graisse (Figure 7D).

L'invalidation de l'OPN prévient la souffrance hépatique (ALAT/ASAT) (Figure 7A), et la stéatose hépatique (Figure 7B et C). L'invalidation de l'OPN n'a aucun effet sur le recrutement des macrophages (EMR1/F4/80) et des LT au niveau du foie après un régime HF. Par contre, l'activation des macrophages (CD11c+) et l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , IL-12 β et TNF α) sont fortement diminuées (Figure 7D et E).

Nous avons mis en évidence que l'invalidation de l'OPN diminuait la stéatose et l'inflammation hépatique au cours de l'obésité. Les effets pourraient être dus à une diminution de l'inflammation du TAE. Afin de déterminer le rôle de l'OPN sur cette polarisation des LT dans le foie, nous avons induit une inflammation hépatique en réponse à une injection de LPS (intra-péritonéale).

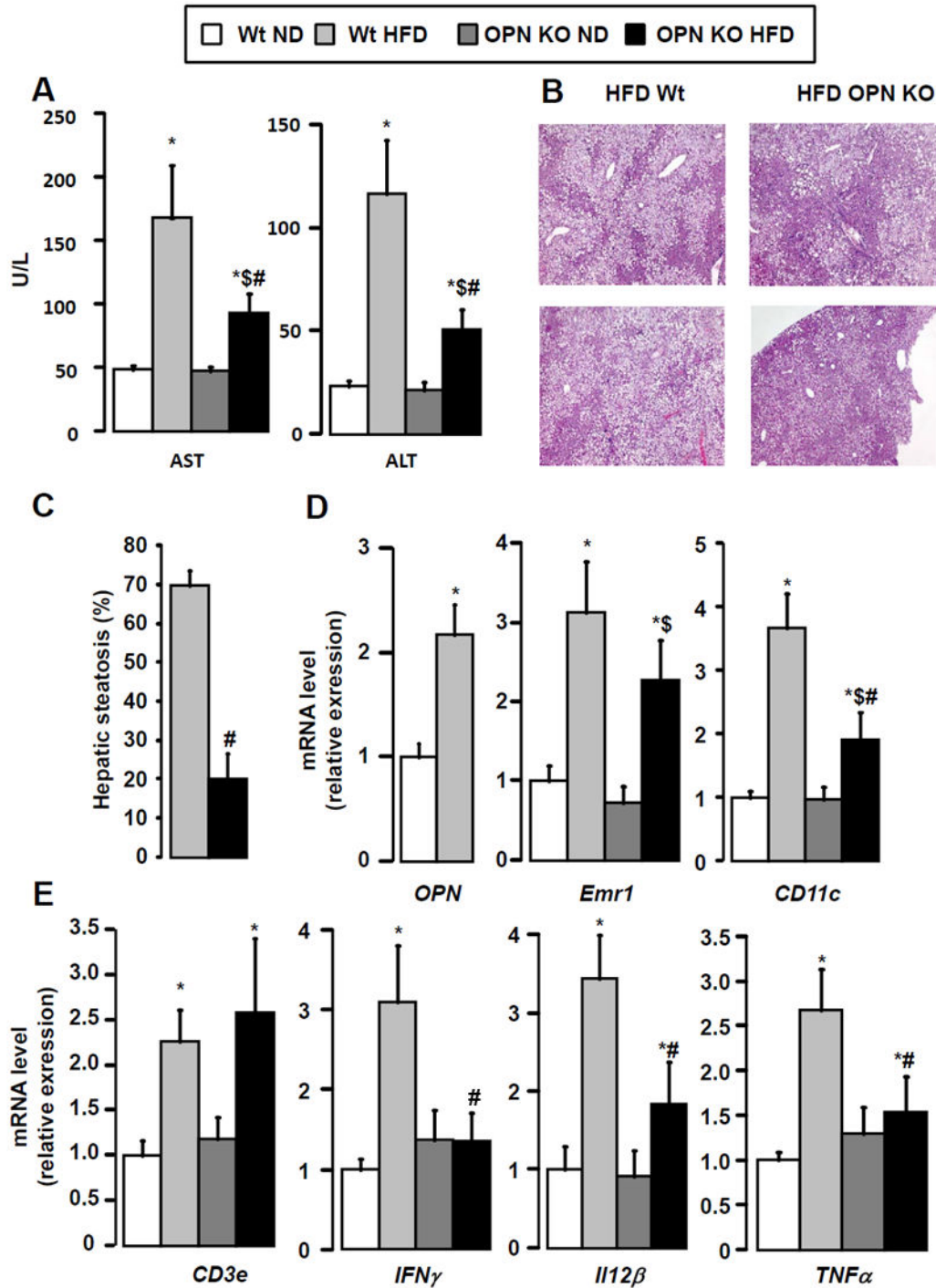


Figure 7: OPN deficiency prevents HFD-induced hepatic injury, steatosis and inflammation (Th1 response). Wt and OPN^{-/-} mice fed a normal diet (ND) or high fat diet (HFD). (A) The plasma level of ALT and AST was evaluated after 25 weeks of ND or HFD (9 mice /group). Results were expressed as means $\pm$ SEM. (B) H&E staining of liver samples from Wt and OPN^{-/-} after 25 weeks of ND or HFD as indicated. Typical pictures are shown. (C) Quantification of hepatic steatosis of HFD Wt and HFD OPN^{-/-} mice. Results were expressed as means $\pm$ SEM. (D and E) hepatic OPN, Emr1, CD11C CD3e, IFN γ , IL12 β , and TNF α mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR. Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05, compared with ND Wt mice; ^{\$}P<0.05, compared with ND OPN^{-/-}; [#]P<0.05, compared with HFD Wt mice.

2.4.2. Inflammation induite par endotoxémie (LPS)

Chez les souris minces, l'OPN plasmatique est augmentée après injection de LPS (2µg/g de souris pendant 6h) (Figure 8A), et s'accompagne d'une forte augmentation de l'expression hépatique des marqueurs de la voie Th1 lymphocytaire (T-bet/CD4, IFN γ , IL-12 β , TNF α) (Figure 8C), mais également des voies anti-inflammatoires Th2 (GATA3/CD4, IL-10) et Treg (FoxP3/CD4) (Figure 8B). La voie Th17 (IL-17) est également activée et détectable seulement en présence de LPS chez les souris sauvages.

L'invalidation de l'OPN ne modifie pas la réponse Th2 et Treg (Figure 8B). Il apparaît clairement que l'invalidation de l'OPN prévient la polarisation Th1 des lymphocytes T (Figure 8C). Concernant la réponse Th17, il est clair que l'invalidation de l'OPN prévient la production de l'IL-17 mais pas celle de l'IL-22 (Figure 8D). De plus, il semble que l'action de l'OPN soit en aval du facteur de transcription ROR γ T (RAR-related orphan receptor gamma) (Figure 8D).

Nous montrons donc que l'invalidation de l'OPN diminue l'inflammation hépatique en réponse au LPS, en favorisant la polarisation Th1 des lymphocytes T, et la production de l'IL-17 (facteur pro-inflammatoire et pro-fibrosant).

Il reste cependant à déterminer si l'effet de l'OPN sur cette polarisation est direct ou indirect; en agissant directement sur les LT naïfs, avec l'augmentation de son expression dépendante de T-bet ou en régulant les cellules présentatrices d'antigènes qui favoriseront une polarisation Th1/Th17 des lymphocytes naïfs.

Nous déterminerons si l'invalidation de l'OPN ou l'apport d'OPN exogène modifie la polarisation *in vitro* des LT. De plus nous évaluerons si les cellules dendritiques du TAE des souris minces et obèses de souris sauvages ou invalidées pour l'OPN induisent la même polarisation des LT naïfs *ex vivo*.

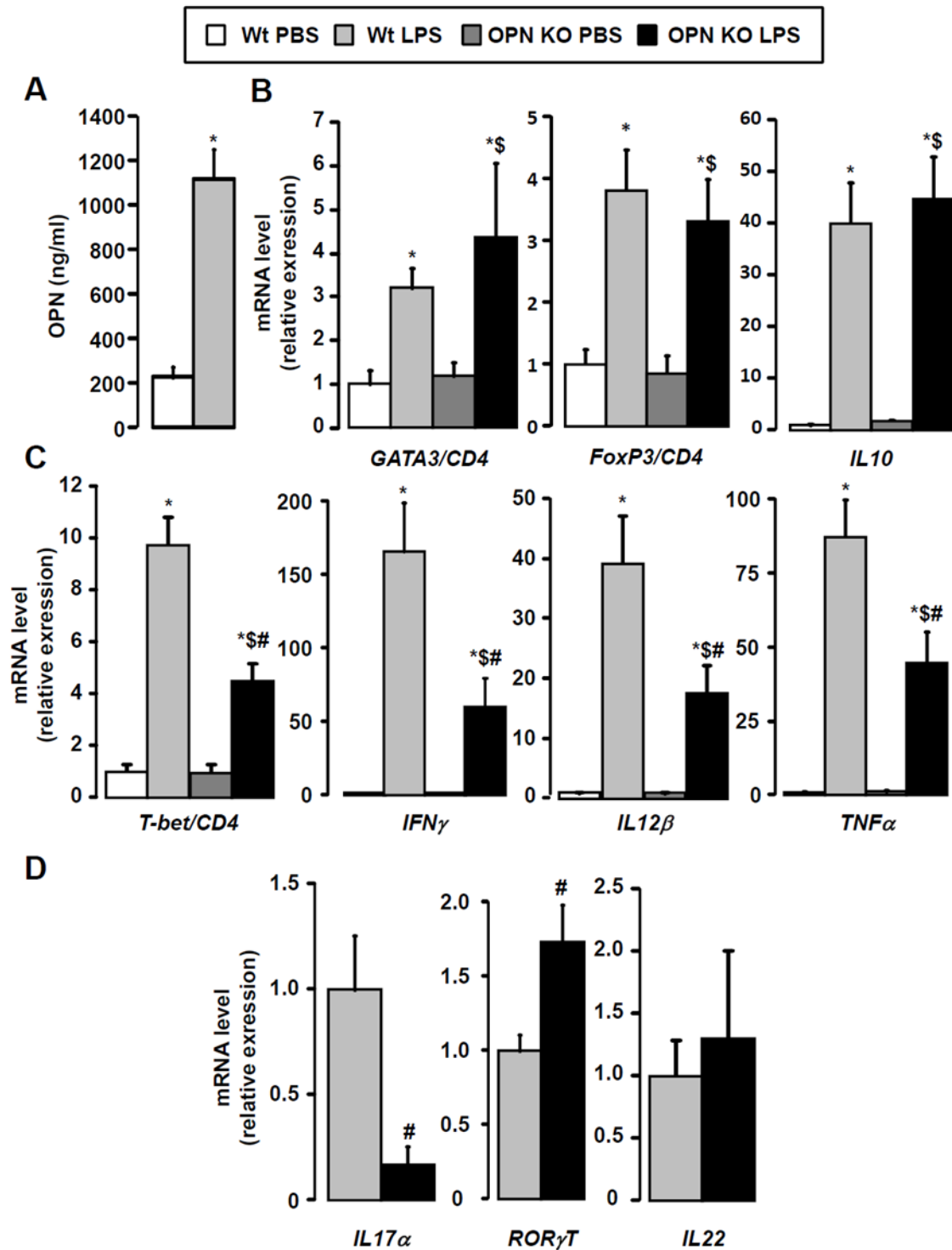


Figure 8: OPN deficiency prevents LPS-induced Th1 and Th17 responses in liver. Lean male Wt and OPN^{-/-} mice were treated with PBS or LPS (2 μ g/g) for 6h (6 mice per group). (A) The plasma level of OPN was evaluated after PBS or LPS challenge in Wt mice. Data are expressed as means $\pm$ SEM. (B) Hepatic mRNA expression levels of markers of Th2/Treg responses (GATA3, FoxP3, IL10), of Th1 response (T-bet, IFN γ , IL12 β , TNF α) and Th17 response (IL17 α , ROR γ T, IL22) were analyzed by real-time quantitative PCR. Data are presented as relative mRNA normalized to RPLP0 mRNA and are expressed as means $\pm$ SEM. *P<0.05, compared with ND Wt mice; ^{\$}P<0.05, compared with ND OPN^{-/-}; #P<0.05, compared with HFD Wt mice.

L'inflammation du tissu adipeux participe au développement de l'insulino-résistance et aux complications hépatiques dues à l'obésité. Dans les maladies non alcooliques du foie, alors que la stéatose est considérée comme bénigne, l'inflammation, ou stéatohépatite, est associée à une augmentation du risque de fibrose, de cirrhose, et d'insuffisance hépatique. Nos résultats montrent que l'OPN est impliquée dans l'inflammation et les fonctions du tissu adipeux et du foie (Schéma 6):

Dans le tissu adipeux, l'OPN favoriserait le recrutement des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes T, et favoriserait la voie pro-inflammatoire Th1 au dépend de la voie anti-inflammatoire Treg. Cette inflammation participe à la mise en place de l'insulino-résistance du TA et la libération d'acides gras (AG) et d'adipokines. Ces facteurs peuvent agir sur le foie via le système porte et favorisent la stéatose hépatique.

Dans le foie, l'augmentation de l'OPN pourrait favoriser une polarisation de type pro-inflammatoire M1 et Th1, sans être impliquée dans le recrutement de ces cellules (macrophages et lymphocytes T). L'inflammation du foie associée à celle du TA au cours de l'obésité participe au développement des NAFLD (stéatose, stéatohépatite (NASH) et fibrose hépatique).

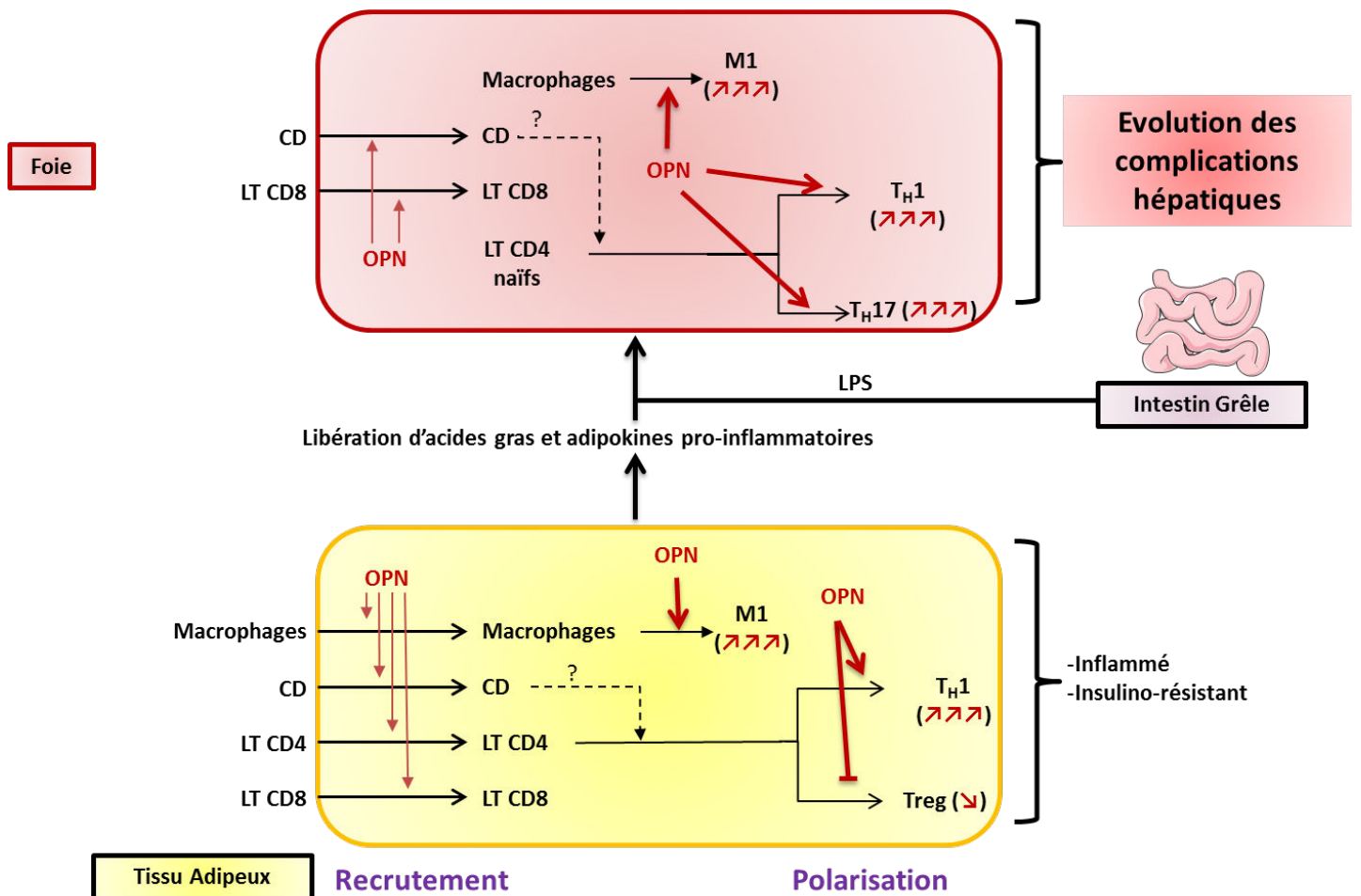


Schéma 6 : Impact de l'OPN sur l'inflammation du tissu adipeux et des complications hépatiques au cours de l'obésité

PARTIE 2: OPN ET ALCOOL

The Osteopontin Level in Liver, Adipose Tissue and Serum Is Correlated with Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease

Stéphanie Patouraux*, Stéphanie Bonnafeous*, Cosmin S. Voican, Rodolphe Anty, Marie-Christine Saint-Paul, Maria-Alessandra Rosenthal-Allieri, Hélène Agostini, Micheline Njike, Nadège Barri-Ova, Sylvie Naveau, Yannick Le Marchand-Brustel, Pascal Veillon, Paul Calès, Gabriel Perlemuter, Albert Tran, Philippe Gual

* : co-first authors

PLoS ONE 7(4): e35612. doi:10.1371/journal.pone.0035612

Le niveau d'ostéopontine sérique, hépatique et du tissu adipeux est corrélé à la fibrose hépatique chez les patients alcooliques

La consommation excessive d'alcool est la troisième cause de décès, après les cancers et les maladies cardio-vasculaires aux Etats-Unis. La consommation régulière d'alcool est responsable de lésions hépatiques, et reste la cause principale de cirrhose du foie. Jusqu'à 40% des patients atteints d'hépatite alcoolique aiguë sévère meurent dans les six mois. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la progression de cette pathologie au niveau hépatique et l'identification de nouveaux acteurs potentiels de la pathogenèse des maladies alcooliques du foie sont donc des défis importants.

L'OPN, capable de réguler le recrutement et les fonctions des cellules inflammatoires, possède également des propriétés pro-fibrogéniques (Kawashima, Mochida et al. 1999; Lee, Seo et al. 2004; Sahai, Malladi et al. 2004; Lorena, Darby et al. 2006; De Minicis, Seki et al. 2007; Lenga, Koh et al. 2008). L'OPN peut donc être considérée comme un acteur potentiel dans les complications hépatiques induites par l'alcool. D'autres facteurs impliqués dans la pathogénie des maladies alcooliques du foie peuvent provenir de sites extra-hépatiques, en particulier le tissu adipeux. Il a été rapporté en effet que le surpoids est un facteur de risque indépendant de stéatose, d'hépatite alcoolique aiguë et de cirrhose chez les patients alcooliques (Naveau, Giraud et al. 1997). L'indice de masse corporel (IMC) est un facteur de risque indépendant de fibrose, et un facteur prédictif de stéatose chez les patients alcooliques (Raynard, Balian et al. 2002; Naveau, Thauray et al. 2009). Plus récemment, Naveau *et coll.* ont rapporté que l'inflammation du tissu adipeux corrélait avec la sévérité des lésions hépatiques chez les patients alcooliques (Naveau, Cassard-Doulcier et al. 2010). Réciproquement, la consommation alcoolique augmente le risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients obèses. Il existe donc un lien entre tissu adipeux et foie, dans les maladies alcooliques et non alcooliques du foie.

Les objectifs de ce travail étaient :

- d'évaluer le niveau d'OPN dans le sérum, le foie et le tissu adipeux de patients alcooliques, et de chercher une corrélation avec la sévérité de l'atteinte hépatique,
- d'évaluer la performance de l'OPN à estimer la fibrose hépatique.

Résumé des résultats obtenus

Le taux d'OPN sérique a été mesuré à partir de deux cohortes de patients alcooliques ; l'une rétrospective de 109 patients (82 hommes et 27 femmes), l'autre prospective de 95 patients (73 hommes et 22 femmes). Les patients alcooliques avaient une consommation d'alcool supérieure à 80g par jour depuis plus de 5 ans.

Pour chaque patient un prélèvement sanguin et une biopsie hépatique par voie transpariétale ont été réalisés. Certains ont fait l'objet de congélation. Tous ont été analysés histologiquement. Le grade de stéatose, d'inflammation et de fibrose a été évalué pour chaque patient. Des prélèvements de sérum, de foie et de tissu adipeux sous cutané de 38 autres patients alcooliques provenant du Département d'Hépatogastroentérologie de l'Hôpital Universitaire Antoine Béchère (Clamart, France) ont été utilisés.

Le niveau d'expression de l'OPN a été évalué dans le foie de 34 patients dans le groupe rétrospectif, et dans le foie et le tissu adipeux de 38 autres patients alcooliques ayant eu une biopsie hépatique et du tissu adipeux.

Nous avons pu montrer que l'augmentation de l'expression de l'ostéopontine dans le foie, le tissu adipeux et le sérum de patients alcooliques est corrélée à la fibrose hépatique.

L'expression sérique de l'OPN augmentait faiblement en fonction de l'inflammation hépatique et progressivement avec la sévérité de la fibrose hépatique.

Le niveau d'expression génique hépatique de l'OPN était corrélé avec l'inflammation hépatique, la fibrose, l'expression de TGF β et avec le niveau sérique d'OPN. Le niveau sérique d'OPN et son niveau d'expression génique étaient corrélés à l'infiltrat à polynucléaires neutrophiles hépatique, évalué par immunohistochimie.

De façon intéressante, nous avons pu montrer que l'expression génique de l'OPN dans le tissu adipeux était corrélée avec le degré de fibrose hépatique, même après 7 jours de sevrage.

Nous avons pu montrer que le taux d'OPN plasmatique était un facteur prédictif de fibrose hépatique modérée.

Un taux sérique d'OPN élevé apparaissait comme un facteur prédictif indépendant de la fibrose hépatique (de grade supérieure ou égal à 2), dans un modèle combinant les taux d'alkaline phosphatase, d'albumine, d'hémoglobine, d'OPN et le FibroMeter®. L'OPN était un facteur prédictif de fibrose modérée avec une aire sous la courbe ROC (receiving operator curve) de 0,89 et 0,88 dans les groupes rétrospectif et prospectif respectivement. L'OPN, l'acide hyaluronique (AUROC : 0,88), le fragment de la kératine 18 (AUROC: 0,83) et le FibroMeter® (AUROC: 0,90) peuvent prédire la fibrose modérée avec la même efficacité dans le groupe rétrospectif. L'OPN est augmentée dans le foie, le tissu adipeux et le sérum en fonction de la fibrose hépatique chez les patients alcooliques.

Nous avons ensuite voulu étudier le niveau d'OPN chez des patients avec une hépatite chronique d'origine virale C (cohorte constituée par Pr Paul Calès, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers). Nous avons évalué le niveau d'OPN sérique chez 86 patients pour lesquels le grade de fibrose évalué par examen histopathologique était connu. Le niveau d'OPN sérique était significativement plus élevé lorsque la fibrose était supérieure ou égale à 2. Le niveau d'OPN sérique était corrélé avec la fibrose et l'inflammation hépatique. Le niveau d'OPN sérique pour une fibrose significative était moins élevé chez les patients avec hépatite virale C que chez les patients alcooliques. Dans l'hépatite C, l'OPN est un marqueur prédictif de fibrose également (AUROC : 0,75 et 0,81, pour $F \geq 2$ et $F \geq 3$ respectivement).

En conclusion, nous montrons que l'OPN est un nouveau bio-marqueur de fibrose hépatique modérée chez les patients alcooliques. L'OPN pourrait alors être un acteur important dans la pathogenèse de cette hépatopathie chronique. De plus, ce marqueur de fibrose pourrait être utilisé dans d'autres hépatopathies chroniques.

The Osteopontin Level in Liver, Adipose Tissue and Serum Is Correlated with Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease

Stéphanie Patouraux^{1,2,3,9}, Stéphanie Bonnafeous^{1,4,9}, Cosmin S. Voican^{5,6,10}, Rodolphe Anty^{1,2,4}, Marie-Christine Saint-Paul^{1,2,3}, Maria-Alessandra Rosenthal-Allieri⁸, Hélène Agostini^{5,6,7}, Micheline Njike^{5,6,7}, Nadège Barri-Ova^{5,6,7}, Sylvie Naveau^{5,6,7}, Yannick Le Marchand-Brustel^{1,2,4}, Pascal Veillon⁹, Paul Calès⁹, Gabriel Perlemuter^{5,6,7}, Albert Tran^{1,2,4}, Philippe Gual^{1,2,4*}

1 INSERM, U1065, Equipe 8 «Complications hépatiques de l'obésité», Nice, France, **2** Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet, Département de Biologie, Nice, France, **4** Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet, Département Digestif, Nice, France, **5** INSERM, U996, IPSIT, Clamart, France, **6** Univ. Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France, **7** AP-HP, Hôpital Antoine Bécclère, Service d'hépatogastroentérologie, Clamart, France, **8** Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet, Département d'Immunologie, Nice, France, **9** Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Service d'Hépatologie, Angers, France, **10** Universitatea de Medicina si Farmacie Craiova, Craiova, Romania

Abstract

Background: Osteopontin (OPN) plays an important role in the progression of chronic liver diseases. We aimed to quantify the liver, adipose tissue and serum levels of OPN in heavy alcohol drinkers and to compare them with the histological severity of hepatic inflammation and fibrosis.

Methodology/Principal Findings: OPN was evaluated in the serum of a retrospective and prospective group of 109 and 95 heavy alcohol drinkers, respectively, in the liver of 34 patients from the retrospective group, and in the liver and adipose tissue from an additional group of 38 heavy alcohol drinkers. Serum levels of OPN increased slightly with hepatic inflammation and progressively with the severity of hepatic fibrosis. Hepatic OPN expression correlated with hepatic inflammation, fibrosis, TGF β expression, neutrophils accumulation and with the serum OPN level. Interestingly, adipose tissue OPN expression also correlated with hepatic fibrosis even after 7 days of alcohol abstinence. The elevated serum OPN level was an independent risk factor in estimating significant ($F \geq 2$) fibrosis in a model combining alkaline phosphatase, albumin, hemoglobin, OPN and FibroMeter[®] levels. OPN had an area under the receiving operator curve that estimated significant fibrosis of 0.89 and 0.88 in the retrospective and prospective groups, respectively. OPN, Hyaluronate (AUROC: 0.88), total Cytokeratin 18 (AUROC: 0.83) and FibroMeter[®] (AUROC: 0.90) estimated significance to the same extent in the retrospective group. Finally, the serum OPN levels also correlated with hepatic fibrosis and estimated significant ($F \geq 2$) fibrosis in 86 patients with chronic hepatitis C, which suggested that its elevated level could be a general response to chronic liver injury.

Conclusion/Significance: OPN increased in the liver, adipose tissue and serum with liver fibrosis in alcoholic patients. Further, OPN is a new relevant biomarker for significant liver fibrosis. OPN could thus be an important actor in the pathogenesis of this chronic liver disease.

Citation: Patouraux S, Bonnafeous S, Voican CS, Anty R, Saint-Paul M-C, et al. (2012) The Osteopontin Level in Liver, Adipose Tissue and Serum Is Correlated with Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease. PLoS ONE 7(4): e35612. doi:10.1371/journal.pone.0035612

Editor: Wing-Kin Syn, Institute of Hepatology London, United Kingdom

Received: August 22, 2011; **Accepted:** March 18, 2012; **Published:** April 18, 2012

Copyright: © 2012 Patouraux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire de Nice), and charities (AFEF/Schering-Plough and AFEF/ROCHE to PG and AT). SP was supported by the Fondation Recherche Médicale. PG is the recipient of an Interface Grant from Centre Hospitalier Universitaire de Nice. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: PC has mentioned potential conflict of interest due to stock ownership in a company (BioLiveScale) that owns the license for FibroMeters, which is patented by the University of Angers. PC has consultancy and stock ownership with BioLiveScale. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials..

* E-mail: gual@unice.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Excessive alcohol consumption is the third leading preventable cause of death in the United States [1]. Regular alcohol use can result in hepatic steatosis, which eventually progresses to steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis. Up to 40% of patients with

severe acute alcoholic hepatitis die within six months [1]. A better understanding of the molecular mechanisms leading to the progression of liver disease and the identification of new potential actors of the pathogenesis of alcoholic liver diseases (ALD) are thus important challenges. Modification of gut permeability, production of acetaldehyde, NADH and ROS, activation of Endoplasmic

Reticulum stress, recruitment of immune cells into the liver and hepatocyte apoptosis may be key mechanisms of alcohol-induced liver injury [1,2]. In line with the involvement of death of hepatocytes, we recently showed that serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of advanced fibrosis in patients with alcoholic liver disease [3]. Others factors involved in the pathogenesis of ALD can originate from extra-hepatic sites, particularly adipose tissue. The pioneers in this field have reported excess weight to be an independent risk factor for steatosis, acute alcoholic hepatitis (AAH) and cirrhosis in patients with ALD [4]; body mass index (BMI) is an independent risk factor for fibrosis in non-obese alcoholic patients [5] and high blood pressure, apolipoprotein A-1 concentration and BMI are predictive of steatosis [6]. More recently, Naveau *et al.* demonstrated that adipose tissue inflammation correlated with the severity of pathological features in the liver of alcoholic patients [7].

Recently, altered hepatic expression of osteopontin (OPN), a Th1 cytokine, chemokine and profibrogenic extracellular matrix protein, has been reported in an animal model of alcohol-induced liver injury [8,9,10] and in the liver of patients with alcoholic hepatitis and fibrosis [11,12]. In female rats fed an ethanol containing Lieber-DeCarli liquid diet for 6 weeks and then challenged with LPS, the elevated circulating and hepatic levels of OPN play an important role in neutrophil accumulation and liver injury [8,10,13,14]. OPN could also be involved in fibrogenesis. Indeed, OPN was upregulated in rodent liver fibrosis models [15,16,17] and in activated hepatic stellate cells [17,18,19]. OPN was required for myofibroblast differentiation [20] and upregulation of OPN expression in the liver of patients with ALD-cirrhosis was recently reported [12].

Similarly, OPN appears to play an important role in the occurrence of liver complications in a mouse model of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [15,21,22,23]. We also reported recently that the elevated expression of OPN was associated with adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in humans [24] and evidence of OPN overexpression with progressive NAFLD has been confirmed recently [12].

Based on the evidence that OPN can be considered as a potential actor in alcohol-induced hepatic complications in rodents, we focused our study on serum, liver and adipose tissue OPN levels in patients with ALD and searched for a correlation with the disease severity. The evaluation of this marker in estimating significant fibrosis was also examined

Materials and Methods

Study population

1) Alcoholic patients. Estimation group: From October 1997 to June 1998, 109 consecutive heavy alcohol drinkers (82 males, 27 females, 47 ± 1 years old) admitted to our Liver unit for detoxification and/or inpatient rehabilitation were entered into this study as previously described [3,25,26]. **Validation group:** 95 additional consecutive heavy alcohol drinkers (73 males, 22 females, 48 ± 9 years old) were entered into this study from November 2006 to December 2009. All patients had consumed over 80 g ethanol per day for more than 5 years. All patients were negative for circulating hepatitis B surface antigen, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus. No patient had osteoarthritis or rheumatoid arthritis. Fasting blood samples were obtained and used to measure alanine amino transferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (γ GT). A needle liver biopsy was performed in all patients by the transperitoneal approach. Biopsies were processed routinely and stained with hematoxylin-eosin-saffron and Sirius Red. The quality of biopsies was sufficient

for interpretation [27]. The length of the liver biopsy was over 15 mm. Histopathological features were semi-quantitatively evaluated (**Table 1**): the grade of steatosis (0, $<5\%$; 1, $5\%–30\%$; 2, $>30\%–60\%$; 3, $>60\%$) and stage of fibrosis (from 0, none, to 4, cirrhosis). The grading of hepatic inflammation was done according to the Activity score of Orrego *et al.* [28]. Briefly, hepatic inflammation was determined by the presence (I1) or absence (I0) of hepatocellular necrosis and ballooning degeneration, alcoholic Mallory's hyaline bodies, associated with an inflammatory reaction. Sera and liver tissues were stored at -80°C until use.

Second gene group: 38 consecutive heavy alcohol drinkers admitted to the Hepatogastroenterology Department of Antoine Bécère University Hospital, Clamart, France, due to alcoholism and ALD, were prospectively included into this study. All patients underwent ultrasound-guided liver biopsy at admission. One specimen of liver tissue was used for histological analysis and another was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent RNA extraction. Specimens were stained with hematoxylin-eosin-saffron, Masson's trichrome and picosirius red. All biopsy samples were evaluated by a pathologist blind to the patient's clinical and biological data and to the duration of alcoholism and daily alcohol intake. Histopathological features were evaluated semi-quantitatively as described above (**Table 1**). Subcutaneous adipose tissue biopsies were performed at admission and after 7 days of abstinence from ethanol consumption. Adipose tissue samples were removed by needle aspiration as previously described [7]. **2) Patients with chronic viral hepatitis C.** 86 patients with chronic viral hepatitis C were included from June 1999 to May 2009. Anti-HCV antibodies and HCV RNA were detected in their serum. Selected patients had an available liver biopsy and some blood markers. Fasting blood samples were collected immediately before or no more than 12 months after liver biopsy. Exclusion criteria comprised additional causes of liver disease, particularly HBV and HIV infections, complicated cirrhosis, anti-fibrotic treatment in the previous 6 months, alcohol consumption of more than 30 g/day in the five years prior to inclusion. Liver biopsies were performed using Menghini's technique with a 1.4–1.6 mm diameter needle. Biopsy specimens were fixed in a formalin-alcohol-acetic solution and embedded in paraffin; 5- μm thick sections were then cut and stained with hematoxylin-eosin-saffron. Liver fibrosis was staged from F0 to F4 according to the Metavir staging system [29]. The diagnostic target, significant fibrosis, was defined as follows: F2+F3+F4. Readings were performed by independent, senior pathologists specialized in hepatology. These pathologists were blinded to blood tests. **3) Obese patients.** Obese patients were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation, where they underwent bariatric surgery for morbid obesity (Nice and Paris hospitals). Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with the French Guidelines for surgery for obesity. Briefly, they had a BMI of 40 or 35 kg/m^2 with at least one complication. Exclusion criteria were as follows: presence of a hepatitis B or hepatitis C virus infection, excessive alcohol consumption ($>20 \text{ g/day}$), or another cause of chronic liver diseases (primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, Wilson disease, genetic hemochromatosis, or biliary disease). Fasting blood samples were obtained before surgery. Surgical liver biopsies were obtained at the time of bariatric surgery. Liver bridging fibrosis was assessed by sirius red staining and was classified into five stages as follows: absent, mild, significant (incomplete septa), advanced (with complete septa) and cirrhotic.

All subjects gave their informed written consent to participate in this research study according to French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusat law, the "Comité

Table 1. Characteristics of the Estimation, Second Gene and Validation groups.

	Estimation group		Second gene group	Validation group
	Serum	Liver	Adipose tissue and liver	Serum
N (female/male)	109 (27/82)	34 (5/29)	38 (7/31)	95 (22/73)
Age (years)	47±1	47±1	47±1	49±1
Alcohol (g/day)	163±10	169±16	148±17	159±9
AST (IU/L)	95±10	98±13	152±31	98±8
ALT (IU/L)	70±15	61±9	98±15	76±7
AST/ALT	1.8±0.1	1.8±0.2	1.5±0.1	2±0.1
γGT (IU/L)	361±38	429±73	472±65	379±43
Fibrosis n(%)				
F0	16(15)	6(17.6)	9(23.7)	9(9.5)
F1	49(45)	14(41.2)	13(34.2)	38(40)
F3	15(14)	6(17.6)	7(18.4)	8(8.4)
F3	23(21)	3(8.8)	5(13.2)	39(41.1)
F4	6(6)	5(14.7)	4(10.5)	1(1.1)
Inflammation n(%)	26(24)	6(17.6)	12(31.6)	
Steatosis n(%)				
<5%	8(7)	1(2.9)	4(10.5)	
5–30%	62(57)	18(52.9)	10(26.3)	
>30–60%	27(25)	9(26.5)	12(31.6)	
>60%	12(11)	6(17.6)	12(31.6)	

Data are expressed as Means ± SEM or N (%). AST: aspartate amino-transferase; ALT: alanine amino-transferase; γGT: Gamma Glutamyl Transpeptidase.
doi:10.1371/journal.pone.0035612.t001

Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice” (N°03.613)(DGS 2003/0395), the “Ethics committee of Bicêtre Hospital” and “Ethics committee of Centre Hospitalier Universitaire of Angers Hospital” (N°2010-01) approved this study).

Circulating levels of OPN, Leptin and FibroMeter®

Circulating OPN levels were evaluated with an ELISA (R&D Systems, Lille, France), as described in the manufacturer's instructions. All samples were analyzed in duplicate, in random order and blinded to the clinical/pathological data. The CV (%) of intra-assay precision and inter assay precision ranged from 2.6 to 4 and 5.4 to 6.6, respectively. The minimum detectable dose of OPN ranged from 0.006 to 0.024 ng/mL. Serum was validated for use in this assay as indicated by the manufacturer. However, serum values are approximately 50% of the plasma values because of proteolytic cleavage by thrombin during the clotting process. Leptin was assessed in the serum by MILLIPLEX MAP Human Adipokine Panel A kit (HADK1-61K-A, Millipore) using a Luminex instrument (Luminex) according to manufacturer's recommendations. The FibroMeter® index of fibrosis was calculated using an algorithm including hyaluronate, the pro-thrombin index, α2-macroglobulin and platelets [30].

Immunostaining

Liver biopsies were fixed in 4% buffered formol, paraffin embedded and sectioned at a thickness of 2 micron Slides were then dewaxed at pH = 6 using PT link (cycle :start at 65°C, 20' at 95°C, back to 65°C), and washed for 5 minutes in Envision Flex Wash Buffer. Immunohistochemical staining was done using Autostainer Link, with anti-CD15 antibodies (347420 BD Biosciences) as the primary antibody, and diaminobenzidine

(DAB) as activated chromogen. Nuclear counterstaining was done with Hematoxylin. CD15+ cells were counted in 2 or 3 portal spaces for each patient at 400× magnification. Counting was performed blindly by one observer.

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from human tissues using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The samples were treated with Turbo DNA-free™ (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) or RNase-free DNase kit (Qiagen) following the manufacturer's protocols. The quality of the isolated RNA was determined using the Agilent 2100 Bioanalyser with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Massy, France). Total RNA (0.5 or 0.35 µg) was reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) or with the RT² First Strand kit (SABiosciences) for the “estimation” and “second gene” groups, respectively. For the estimation group, real-time quantitative PCR was performed using the ABI PRISM 7500 Fast Real Time PCR System and FAM™ dyes (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's protocols in C3M Genomics facilities. The TaqMan® gene expression assays were purchased from Applied Biosystems: OPN, (Hs00167093_m1); TGFβ (Hs00171257_m1), RPLP0 (Hs99999902_m1) and 18S (Hs99999901_s1). For the second gene group, real-time quantitative PCR was performed using a custom-made PCR array (SABiosciences) in the Light-Cycler® 480 instrument (Roche) with the RT² SYBR® Green qPCR Master Mix (SABiosciences) according to the manufacturer's instructions. Gene expression values were normalized to the value of the housekeeping gene *RPLP0* (Ribosomal Phosphoprotein Large P0) or *18S* and calculated based on the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) as previously described [24,31].

Statistical analysis

Statistical significance of the differential gene expression or circulating levels between the two study groups was determined using the non-parametric Mann-Whitney test with the ΔCt or amount for each group, respectively. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the comparison of more than two study groups. $P < 0.05$ was considered as significant. As a post-hoc correction for Kruskal-Wallis test, the Scheffe's test has been performed (data not shown). Correlations were analyzed using the Spearman's rank correlation test. Comparisons were done using the Chi² test or Fischer's exact tests for nominal data and by two-sample t tests for continuous data. Multivariate analyses were performed using binary logistic regression with estimation of odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI). Diagnostic performance was determined by constructing a "receiver-operating characteristic" (ROC) curve and calculating the area under the ROC (AUROC) curve for determination of patients with significant fibrosis ($F \geq 2$) for serum OPN. From these curves, the best cut-off values were established for OPN, which were the values that maximized the sum of the sensitivity and specificity to identify patient status. Statistical analyses were performed using NCSS 2007 software.

Results

Clinical Characteristics of Patients

Two cohorts of heavy alcohol drinkers were included in this study, which examines retrospective (estimation cohort) and prospective (validation cohort) data. In the estimation cohort (109 patients), 36% of the patients had moderate or severe steatosis ($S \geq 2$), 24% presented with hepatic inflammation, 14% with moderate fibrosis ($F = 2$) and 27% with advanced fibrosis ($F \geq 3$) (**Table 1**). The estimation (**Table 1**) and validation (95 patients) cohorts were similar in terms of age, gender, alcohol consumption, AST, AST/ALT, γ GT and hepatic fibrosis. The serum OPN level was evaluated in all patients, while OPN gene expression was evaluated in the liver of 34 patients from the estimation group (**Table 1: Liver**) and in the liver and adipose tissue in 38 patients from the second group (**Table 1: Second gene group**).

The serum and hepatic OPN level increased with liver fibrosis in patients with alcoholic liver diseases

We first evaluated the serum OPN levels in the estimation cohort of 109 alcoholic patients. While hepatic steatosis had no effect on the serum OPN level (**Figure 1A**), the level was increased in patients with hepatic inflammation (I1) compared with patients without liver inflammation (I0) (**Figure 1B**) and was progressively increased in association with the stage of fibrosis (**Figure 1C**). The serum OPN concentrations of F0/F1 alcoholic patients (14 F0 and 51 F1) were comparable to those found in 16 lean subjects without diagnosed liver complications ($BMI = 21 \pm 1 \text{ kg/m}^2$) and in 14 morbidly obese patients ($BMI = 43 \pm 1 \text{ kg/m}^2$) with a minimal stage of fibrosis (4 F0 and 10 F1) and without hepatic steatosis, inflammation and ballooning (**Figure S1**). The serum OPN level further correlated strongly with fibrosis ($r_s = 0.681$, $P < 0.001$) and, to a lesser extent with the hepatic inflammation ($r_s = 0.193$, $P = 0.047$). We then evaluated the hepatic expression level of OPN and TGF β , a pro-fibrogenic factor [32], in 34 alcoholic patients from the estimation group (**Table 1**). Gene expression of OPN was increased in patients with moderate (F2) and advanced fibrosis (F3/F4) compared with patients with no fibrosis (F0) (**Figure 2A**). The liver OPN and TGF β expression correlated with each other and with the grade of fibrosis (**Figures 2A and 2B**). The serum OPN level also

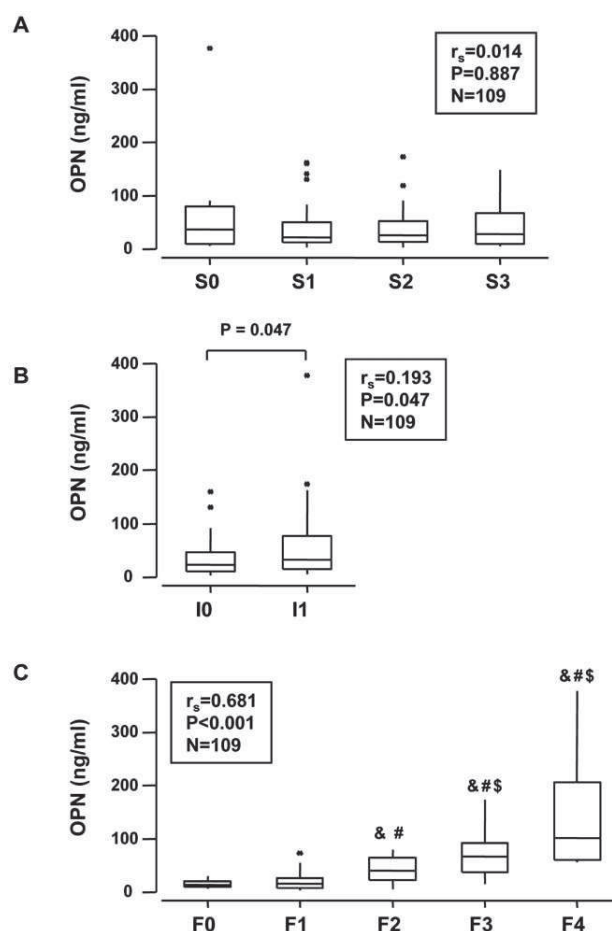


Figure 1. The serum OPN level correlated with fibrosis and steatohepatitis in 109 alcoholic patients (estimation cohort).

The circulating levels of OPN were measured in the serum of 109 alcoholic patients (Table 1) and analyzed according to the grade of steatosis (S0, S1, S2, S3)(A), the presence of hepatic inflammation (I0, I1) (Hepatic inflammation was determined by the presence (I1) or absence (I0) of hepatocellular necrosis and ballooning degeneration, alcoholic Mallory's hyaline bodies, associated with an inflammatory reaction) (B) and the stage of fibrosis (F0, F1, F2, F3, F4)(C) (as described in Materials and Methods). Results were expressed as the median (25th, 75th percentile). The Kruskal-Wallis test was used to compare the 4 groups S0, S1, S2 and S3, $P = 0.900$ and the 5 groups F0, F1, F2, F3 and F4, $P < 0.001$. The Mann Whitney test compared A0 A1: $P = 0.047$. The Mann Whitney test compared the two groups (C): &, $P < 0.015$, compared with F0; #, $P < 0.028$, compared with F1; \\$, $P = 0.007$, compared with F2. Correlations between the serum OPN level with hepatic steatosis, hepatitis or fibrosis were analyzed using the Spearman's rank correlation test.

doi:10.1371/journal.pone.0035612.g001

correlated with its hepatic expression. Since OPN plays an important role in neutrophil accumulation and liver injury in the rat model of ASH [8,10,13,14], we then evaluated OPN expression compared to the accumulation of neutrophil in the liver of patients with different grades of hepatic fibrosis ($N = 11$). The number of neutrophils in the portal space correlated with the circulating and hepatic OPN level ($r_s = 0.917$, $P < 0.001$; $r_s = 0.907$, $P < 0.001$; respectively) (**Figure 2C**). These results indicate that the circulating OPN level could reflect its hepatic expression and that there is a strong link between hepatic OPN expression and fibrogenesis.

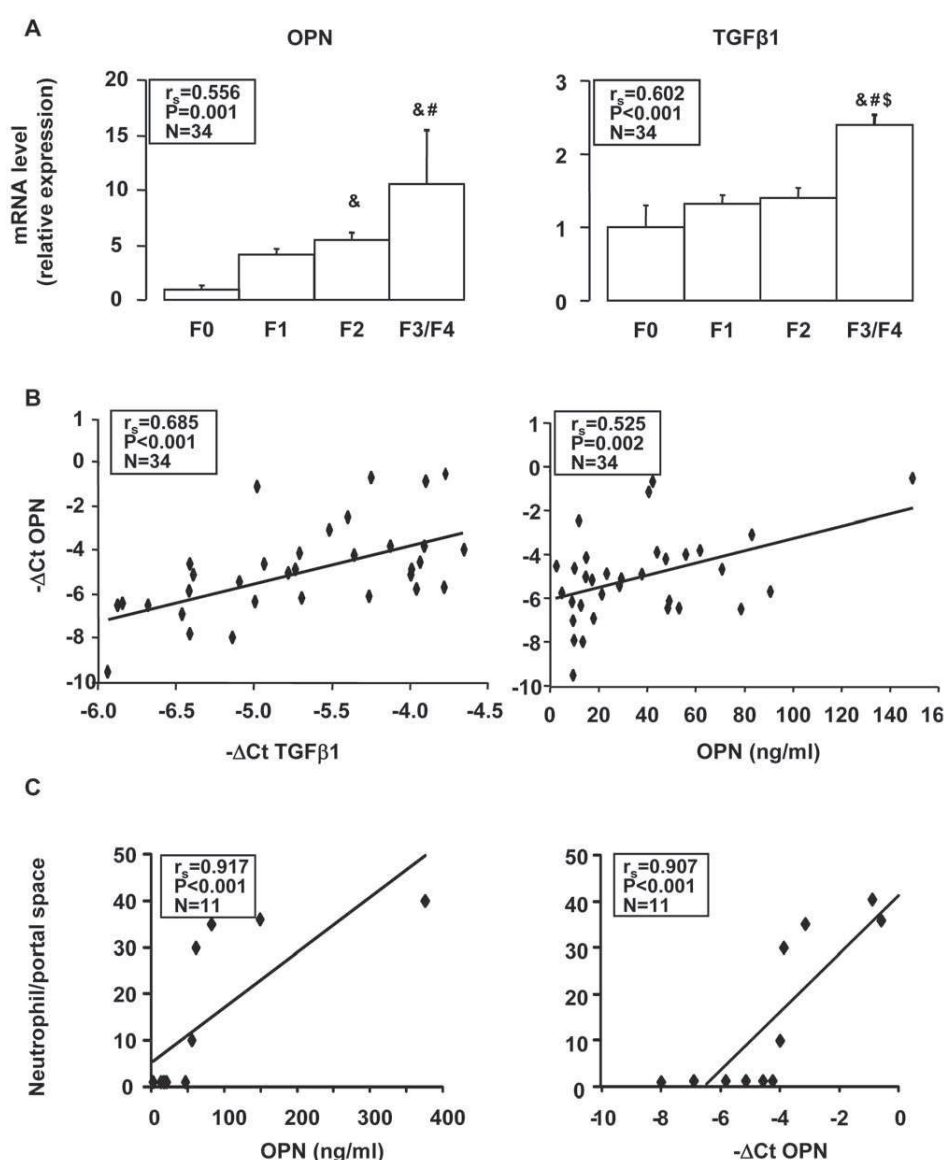


Figure 2. Hepatic OPN expression correlated with hepatic TGFβ expression, portal space neutrophils and the serum OPN level. A) Hepatic OPN and TGFβ1 expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in 34 alcoholic patients from the estimation group without (F0) (N=6) or with mild (F1) (N=14), moderate (F2) (N=6) or advanced (F3/4) (N=8) fibrosis. The mRNA levels were normalized to the mRNA levels of RPLP0. Results are expressed relative to the expression levels in F0 patients and expressed as means $\pm$ SEM. The Kruskal-Wallis test compared the 4 groups F0, F1, F2 and F3/4: OPN, $P = 0.037$; TGFβ1, $P = 0.002$. Mann Whitney test compared the two groups: &, $P \leq 0.011$, compared with F0; #, $P \leq 0.029$, compared with F1; \\$, $P = 0.008$, compared with F2. **B)** Correlation between hepatic OPN gene expression (ΔCt) and either the hepatic TGFβ1 expression level (ΔCt) or the serum OPN level were analyzed using the Spearman's rank correlation test. **C)** Correlation between the number of portal space neutrophils (Cf. Materials and methods) and serum OPN level or hepatic OPN gene expression (ΔCt) in 11 alcoholic patients (2F0/3F1/1F2/5F4) were analyzed using the Spearman's rank correlation test.
doi:10.1371/journal.pone.0035612.g002

The adipose tissue OPN level increased with liver fibrosis in patients with alcoholic liver diseases

Since adipose tissue inflammation correlated with the severity of pathological features in the liver [7], we evaluated OPN expression in 38 ongoing alcoholic patients in both liver and adipose tissue biopsies (BMI = 24 ± 4 kg/m²) (**Table 1: Second gene group**). In adipose tissue, the OPN level was already increased in patients with mild fibrosis (F1) compared with patients without liver fibrosis (3.10 ± 0.51 fold increase, $P = 0.0082$) and correlated with hepatic fibrosis but not with liver steatosis and inflammation (**Table 2**).

OPN level in adipose tissue did not correlate with BMI ($r_s = 0.073$, $P = 0.689$, $N = 37$) and the leptin level in adipose tissue ($r_s = 0.138$, $P = 0.415$, $N = 37$) or serum ($r_s = 0.099$, $P = 0.577$, $N = 34$). Expression in the liver correlated with fibrosis, as found in the estimation group (**Figure 1**), and with steatosis and inflammation (**Table 2**). Because recent alcohol intake could influence these results, the adipose tissue OPN expression was evaluated after 7 days of alcohol abstinence. Its expression still correlated with liver fibrosis (**Table 2**). Since OPN is mainly expressed by the inflammatory and immune cells in adipose tissue [22,24], the

Table 2. Correlation between hepatic and adipose tissue OPN expression and hepatic steatosis, inflammation and fibrosis in alcoholic patients (the second gene group).

OPN expression in	Steatosis			Inflammation			Fibrosis		
	r_s	P	N	r_s	P	N	r_s	P	N
Liver	0.432	0.007	38	0.712	<0.001	38	0.766	<0.001	38
Adipose tissue	0.077	0.652	37	0.117	0.492	37	0.361	0.028	37
Adipose tissue after 7 days of alcohol abstinence	0.063	0.722	34	0.170	0.337	34	0.342	0.048	34

Spearman's rank correlation test.

doi:10.1371/journal.pone.0035612.t002

adipose tissue of alcoholic patients could be inflamed at the early stage of liver fibrogenesis.

The serum OPN level was an independent risk factor in estimating significant ($F \geq 2$) liver fibrosis in patients with alcoholic liver diseases

Since the circulating level of OPN was higher in patients with moderate fibrosis (F_2) compared with patients with no or mild fibrosis (F_0/F_1) (Figure 1C), we investigated the pertinence of the serum OPN level for the estimation of significant fibrosis ($F \geq 2$). Using the univariate analysis (Table 3), patients with significant fibrosis ($F \geq 2$) were older and had a higher levels of OPN, γ GT, alkaline phosphatase, bilirubin, hyaluronate and of the FibroMeter® index of fibrosis and lower levels of platelets, albumin, red blood cells, hemoglobin and of the prothrombin index compared to patients with mild fibrosis ($F < 2$) (Table 3). In contrast, the gender, AST and ALT were not associated with $F \geq 2$. In a multivariate analysis including the OPN, alkaline phosphatase, albumin, hemoglobin and FibroMeter® level, OPN and FibroMeter® were the only independent variables when $F \geq 2$ was the

judgment criterion (Table 4). Since FibroMeter® is a test that combines analysis for hyaluronate, the prothrombin index, α_2 -macroglobulin and platelets, we did not include these items in this analysis. The serum OPN level could thus be considered as an independent factor in estimating significant liver fibrosis in patients with alcoholic liver disease.

The serum OPN levels estimated significant fibrosis in alcoholic patients

As shown in Figure 3, the area under the ROC curve in the estimation and validation cohorts for discrimination between $F < 2$ and significant ($F \geq 2$) fibrosis with the serum OPN level was 0.89 (95% CI: 0.81–0.94) and 0.88 (95% CI: 0.79–0.93), respectively. Thus, the retrospective (estimation cohort) and prospective (validation cohort) studies led to the same result. Several cut-off values were calculated for the serum OPN level for the prediction of $F \geq 2$ in the estimation group (Table S1). For example, the cut-off point at 29 ng/mL estimated $F \geq 2$ with a sensitivity of 84%, a specificity of 81%, a Positive and Negative Predictive Value of 75.5% and 88.3%, respectively. To validate the performance of OPN in estimating significant fibrosis, we compared the OPN to the FibroMeter® level, a specific blood test using four biomarkers to predict fibrosis in ALD [30], and hyaluronate, serum cell death (Cytokeratin 18 total) and apoptotic markers (caspases generated cytokeratin 18 fragment), single biomarkers reflecting increased fibrogenesis [3,33]. The area under the ROC curve in the estimation cohort for discriminating $F < 2$ from significant ($F \geq 2$) fibrosis with the FibroMeter®, hyaluronate, cell death marker and apoptotic marker was 0.90 (95% CI: 0.82–0.95), 0.88 (95% CI: 0.79–0.94), 0.83 (95% CI: 0.73–0.89) and 0.74 (95% CI: 0.63–0.82), respectively. While OPN was more efficient than the apoptotic marker in estimating significant fibrosis (OPN AUROC

Table 3. Univariate analysis of the Estimation group according to the severity of the liver disease.

Data	$F < 2$ (N = 65)	$F \geq 2$ (N = 44)	P
Age (years)	45.4±8.2	49.8±8.2	0.008279
Gender (female/male)	14/51	13/31	0.342053
Platelets ($10^9/L$)	208.5±82.4	161.4±72.5	0.002715
AST (IU/L)	79.7±57.4	116.3±139.6	0.060470
ALT (IU/L)	62.0±45.1	82.1±240.2	0.512052
γ GT (IU/L)	247.1±301.8	527.9±464.9	0.000221
Bilirubin (μ mol/L)	9.8±5.97	56.2±94.6	0.000142
Alkaline phosphatase (IU/L)	85.2±37.7	142.7±68.2	<0.000001
Red blood cells ($10^{12}/L$)	4.2±0.4	3.5±0.5	<0.000001
Albumin (g/L)	48.4±4.2	37.9±8.3	<0.000001
Prothrombin index (%)	98.4±3.9	75.9±22.4	<0.000001
Hemoglobin (g/dL)	13.8±1.6	11.9±1.7	<0.000001
OPN (ng/mL)	18.6±14.1	73.0±65.5	<0.000001
Hyaluronate (μ g/L)	40.7±30.4	293.6±309.9	<0.000001
FibroMeter®	0.18±0.15	0.72±0.33	<0.000001

Patients were classified according to Fibrosis (F) < 2 or ≥ 2 . Quantitative results are expressed as means $\pm$ standard deviations. AST: aspartate amino-transferase; ALT: alanine amino-transferase; γ GT: Gamma Glutamyl Transpeptidase; OPN: Osteopontin.

doi:10.1371/journal.pone.0035612.t003

Table 4. Multivariate analysis of the Estimation group for the assessment of significant hepatic fibrosis.

Data	$F \geq 2$ (N = 44) versus $F < 2$ (N = 65)		
	P	OR	95% CI
Alkaline phosphatase	0.925	0.999	0.9842–1.0143
Albumin	0.684	0.962	0.8018–1.1559
Hemoglobin	0.269	0.778	0.4987–1.2143
OPN	0.033	1.044	1.0033–1.0865
FibroMeter®	0.001	59.405	4.7129–748.7968

Patients were classified according to Fibrosis (F) < 2 or ≥ 2 . Multivariate analysis was realized using logistic regression.

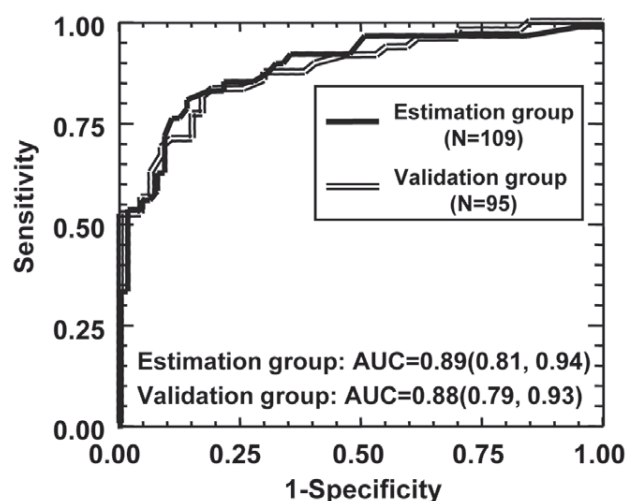


Figure 3. Levels of serum OPN for diagnosis of significant fibrosis ($F \geq 2$) in cohorts of alcoholic patients. The area under the ROC curves are shown for the performance of serum OPN levels in evaluating significant fibrosis ($F \geq 2$) in estimation (109 patients) and validation (95 patients) cohorts.
doi:10.1371/journal.pone.0035612.g003

versus serum apoptotic marker AUROC: $P = 0.0011$), OPN, FibroMeter®, hyaluronate and cell death marker levels estimated significant fibrosis with the same accuracy (OPN AUROC versus FibroMeter® AUROC: $P = 0.752$; versus hyaluronate AUROC: $P = 0.791$, versus cell death marker AUROC: $P = 0.100$) indicating that OPN should be an important actor or manifestation of liver fibrosis induced by chronic alcohol consumption.

The serum OPN levels correlated with hepatic fibrosis and estimated significant ($F \geq 2$) fibrosis in patients with chronic viral hepatitis C

To explore whether the previous findings were specific to ALD, we evaluated the serum OPN levels in 86 patients with chronic viral hepatitis C including 25 patients with mild fibrosis (F1), 34 patients with moderate fibrosis (F2), 19 patients with severe fibrosis (F3) and 8 patients with cirrhosis (F4). The OPN level was increased in patients with moderate, severe fibrosis or cirrhosis compared with patients with mild fibrosis (F1) (Figure 4A). The serum OPN level further correlated strongly with fibrosis ($r_s = 0.617$, $P < 0.001$) (Figure 4A) and, to a lower extent with hepatic inflammation ($r_s = 0.360$, $P = 0.047$). However, the serum OPN level in patients with chronic viral hepatitis C and significant fibrosis ($F \geq 2$) was lower than in alcoholic patients with significant fibrosis ($F \geq 2$) (HCV group: OPN median = 43.2 ng/mL, $N = 61$; Alcoholic group (estimation cohort): OPN median = 59.5 ng/mL, $N = 44$; Mann-Whitney test: $P = 0.005$). As shown in Figure 4B, the area under the ROC curve in patients with chronic viral hepatitis C to estimate significant ($F \geq 2$) and advanced ($F \geq 3$) fibrosis with the serum OPN level were 0.75 (95% CI: 0.62–0.84) and 0.81 (95% CI: 0.68–0.89), respectively. This indicated that circulating OPN could be a conserved response to chronic liver injury induced, *per se*, by alcohol and HCV.

Discussion

We report here for the first time that the serum OPN level correlated with hepatic inflammation and fibrosis in heavy alcohol drinkers. The hepatic OPN expression level strongly correlated

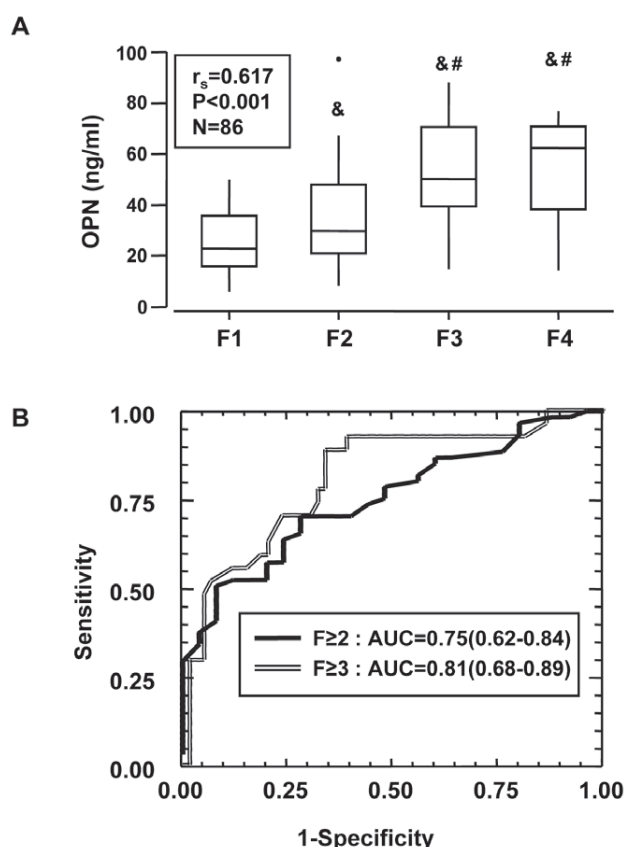


Figure 4. Levels of serum OPN in patients with chronic viral hepatitis C. (A) The circulating levels of OPN were measured in the serum of 86 patients with chronic hepatitis C (25 F1, 34 F2, 19 F3, 8 F4) and analyzed according to the stage of fibrosis. Results were expressed as the median (25th, 75th percentile). The Kruskal-Wallis test was used to compare the 4 groups F1, F2, F3 and F4: $P < 0.001$. The Mann-Whitney test compared the two groups: &, $P \leq 0.048$, compared with F1; #, $P \leq 0.026$, compared with F2. Correlation between the serum OPN level with hepatic fibrosis was analyzed using the Spearman's rank correlation test. (B) The areas under the ROC curves are shown for the performance of serum OPN levels in estimating significant fibrosis ($F \geq 2$) or advanced fibrosis ($F \geq 3$) in this cohort.
doi:10.1371/journal.pone.0035612.g004

with hepatic neutrophils accumulation, the pro-fibrogenic factor TGF β and hepatic fibrosis. Expression of OPN in adipose tissue correlated with hepatic fibrosis reinforcing the concept that adipose tissue was also inflamed in ALD. The serum level of OPN was an accurate independent factor in estimating significant liver fibrosis in both the estimation and validation cohort.

OPN expression detected in adipose tissue and in the liver of alcoholic patients was enhanced by the presence of hepatic fibrosis. The relative contribution of these two tissues in circulating OPN is difficult to estimate. While hepatic OPN expression correlated with the serum OPN level in our patients, further studies will be required to determine the relative role of these two tissues in modulating circulating OPN concentrations. Although the cellular origin of the increased hepatic OPN expression has not been precisely determined, increased OPN gene expression has been reported in macrophages, Kupffer cells, stellate cells, biliary epithelial cells and in inflammatory cells of the necrotic areas in rodent liver fibrosis models [15,16,18]. The observation that hepatic inflammation was associated with elevated serum OPN

levels is in favor of a role for OPN in liver inflammation. Recent studies have highlighted the role of OPN in inflammatory liver diseases such as alcoholic and non alcoholic liver diseases and T cell-mediated hepatitis [8,10,13,15,23,34,35,36,37]. In rodent models of alcoholic liver diseases, neutrophils accumulation in the liver was mediated by OPN [8,10,13]. In agreement with these reports, we showed in a small number of patients that hepatic and systemic OPN expression correlated with neutrophil infiltration in the portal space. OPN also facilitated the infiltration and accumulation of macrophages at sites of injury during the initial steps after carbon tetrachloride intoxication [16]. The recruitment and activation of the inflammatory and immune cells by OPN could enhance hepatic inflammation, which in turn may activate hepatic stellate cells and fibrogenesis. In agreement with this mechanism, the invalidation of the OPN gene decreased hepatic inflammation and consequently fibrosis in mice fed a choline-methionine-deficient diet [12,15]. Furthermore, it has been suggested that OPN could have fibrogenic properties. OPN expression was increased in activated hepatic stellate cells [17,18,19] and was required for myofibroblast differentiation [20]. OPN was regulated by the hedgehog pathway and directly promoted pro-fibrogenic responses [12]. The upregulation of OPN has been reported in the liver of patients with ALD-cirrhosis but also with NASH-cirrhosis, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis, which suggested that OPN induction is a conserved response to chronic liver injury [12]. Excess weight was as an independent risk factor for fibrosis and cirrhosis in patients with ALD [4,5]. More recently, Naveau *et al.* demonstrated that adipose tissue inflammation correlated with the severity of pathological features in the liver [7]. The increase in the production of OPN in adipose tissue could result from the activation of adipose tissue macrophages by LPS and cytokines such as TNF α and IL6. The latter were strongly increased in serum and adipose tissue of heavy alcohol drinkers [1,7]. OPN plays an important role in the infiltration and accumulation of macrophages in the early stages of obesity. Indeed, we recently reported that elevated OPN expression in adipose tissue paralleled with adipose tissue macrophage infiltration and both phenomena were reversed after weight loss in obese patients [24]. While further investigation is necessary to determine the molecular mechanism of adipose tissue inflammation, adipose tissue OPN expression could lead to enrichment of adipose tissue in macrophages and to increased adipose tissue inflammation. The OPN level in adipose tissue could be related more to inflammation than adipose tissue gain. Indeed, OPN expression in adipose tissue did not correlate with BMI, leptin expression and leptinemia.

We have shown for the first time that the serum OPN level was an independent factor that estimates significant fibrosis in two independent cohorts of patients with ALD. A larger group of alcoholic patients with all the data allowing to repeat the univariate and multiple regression modeling will be done in the future. Since circulating OPN could increase in obese individuals and that obesity is also associated with a higher propensity to fibrosis and progression of chronic liver diseases, we analyzed 60 alcoholic patients with available BMI to determine an independent association between OPN and fibrosis. In these patients (39% with a significant fibrosis ($F \geq 2$)), serum OPN correlated with hepatic fibrosis ($r_s = 0.497$, $P < 0.001$, $N = 60$) but not with BMI ($r_s = 0.128$, $P = 0.328$, $N = 60$). Using the univariate analysis, OPN but not BMI was associated with $F \geq 2$ (Table S2). In a multivariate analysis including the OPN, γ GT and BMI, OPN was the only independent variable when $F \geq 2$ was the judgment criterion (Table S3). The serum OPN level could thus be considered as an independent factor estimating significant liver fibrosis. However, additional validations on a large number of

alcoholic patients, controls subjects and morbidly obese group included patients with the full range of liver fibrosis with available BMI will be required. Liver biopsy remains the gold standard for assessment of liver fibrosis. However, problems with liver biopsy include sampling error and inter-observer variability. Fibroscan and the currently available blood-algorithm tests (Fibrotest[®], FibroMeter[®]) or direct biomarker (Hyaluronate) can differentiate between mild and advanced disease [2,33,38,39]. In the case of borderline results two or more methods can be combined. However, identification of novel markers is needed to improve blood-algorithm tests leading to quantification of fibrosis and to monitor the dynamic nature of fibrosis.

Interestingly, the OPN and FibroMeter[®] levels were the only independent variables when the $F \geq 2$ was the judgment criterion in a multivariate analysis including OPN, alkaline phosphatase, albumin, hemoglobin and FibroMeter[®] levels. Furthermore, OPN, FibroMeter[®] and hyaluronate estimated significant fibrosis with the same accuracy. OPN was a good marker in both retrospective (AUROC = 0.89 (0.81, 0.94)) and prospective (AUROC = 0.88 (0.79, 0.93)) studies. Moreover, the serum OPN levels accurately estimated advanced fibrosis ($F \geq 3$: AUROC = 0.91 (0.83, 0.95)) and cirrhosis ($F = 4$: AUROC = 0.91 (0.80, 0.96)) in alcoholic patients (from the estimation group).

Circulating levels of OPN were also modified in patients with liver complications related to the hepatitis C and B viruses. An elevated circulating OPN level was an excellent predictor of cirrhosis in patients with a hepatitis B infection [40]. The circulating levels of OPN were also modified in patients with liver complications induced by a hepatitis C infection. Indeed, we report here that the serum OPN in patients with chronic viral hepatitis C correlates with hepatic fibrosis, as previously reported for plasma of hepatitis C virus infected subjects [41]. OPN enhanced tumor development and metastases, since OPN was highly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and correlated with worse prognosis [42]. However, the role of OPN in these diseases is still poorly understood. It was recently proposed that OPN could be a potential target for the control of HCC [43,44].

In summary, circulating levels of OPN estimate, with good accuracy, significant fibrosis in heavy alcohol drinkers. Hepatic OPN also correlated with serum OPN and with hepatic inflammation, neutrophils infiltration, fibrosis and TGF β expression. Infiltration of liver by parenchymal neutrophils is a prominent feature of Alcoholic Hepatitis [45]. Up-regulation of OPN in liver could contribute to this infiltration and the severity of Alcoholic Hepatitis. Multiple factors stimulate parenchymal and nonparenchymal cells to produce this chemokine including LPS, IL6 and TNF α . Adipose tissue of alcoholic patients was further inflamed, as evaluated by OPN expression. OPN adipose tissue level also correlated with hepatic fibrosis. Since TNF α and IL6 were strongly increased in adipose tissue and serum of heavy alcohol drinkers [1,7], cytokines secreted by adipose tissue could enhance the inflammation and up-regulation of OPN in liver. The recruitment and activation of the inflammatory and immune cells by OPN could also enhance hepatic inflammation, which in turn may activate hepatic stellate cells and fibrogenesis. Furthermore, it has been suggested that OPN could have fibrogenic properties [12,15,16,17,18,19,20]. Studies focusing on the role of OPN in liver and adipose tissue function will be appropriate approaches to acquire more insight into the pathogenesis of human ALD.

Supporting Information

Figure S1 The serum OPN level in lean, obese and alcoholic patients with minimal stage (F0–F1) of fibrosis.

The circulating levels of OPN were measured in the serum of 16 lean subjects (**Lean**) without diagnosed liver complications ($\text{BMI} = 21 \pm 1 \text{ kg/m}^2$); of 14 morbidly obese patients (**Obese**) ($\text{BMI} = 43 \pm 1 \text{ kg/m}^2$) with a minimal stage of fibrosis (4 F0 and 10 F1) and without hepatic steatosis, inflammation and ballooning; and of 61 alcoholic patients (**Alcoholic**) with a minimal stage of fibrosis (14 F0 and 51 F1). Results were expressed as the median (25^{th} , 75^{th} percentile). The Kruskal-Wallis test was used to compare the 3 groups $P = 0.55$. (TIF)

Table S1 Osteopontin levels for significant fibrosis ($F \geq 2$) assessment in the Estimation group. (DOCX)

Table S2 Univariate analysis of 60 patients from Validation group according to the severity of liver disease. (DOCX)

References

- Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR (2009) Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 360: 2758–2769.
- Battaller R, Rombouts K, Altamirano J, Marra F (2011) Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25: 231–244.
- Lavallard VJ, Bonnafous S, Patoureaux S, Saint-Paul MC, Rousseau D, et al. (2011) Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 6: e17599.
- Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, et al. (1997) Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 25: 108–111.
- Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, et al. (2002) Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 35: 635–638.
- Naveau S, Thauray J, Barri-Ova N, Balian A, Dauvois B, et al. (2009) Predictive factors for pure steatosis in alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 1104–1110.
- Naveau S, Cassard-Doulcier AM, Njike-Nakseu M, Bouchet-Delbos L, Barri-Ova N, et al. (2010) Harmful effect of adipose tissue on liver lesions in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 52: 895–902.
- Apte UM, Banerjee A, McRee R, Wellberg E, Ramaiah SK (2005) Role of osteopontin in hepatic neutrophil infiltration during alcoholic steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 25–38.
- Banerjee A, Burghardt RC, Johnson GA, White FJ, Ramaiah SK (2006) The temporal expression of osteopontin (SPP-1) in the rodent model of alcoholic steatohepatitis: a potential biomarker. *Toxicol Pathol* 34: 373–384.
- Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK (2006) Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J Pathol* 208: 473–485.
- Seth D, Gorrell MD, Cordoba S, McCaughan GW, Haber PS (2006) Intrahepatic gene expression in human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 45: 306–320.
- Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, et al. (2011) Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 53: 106–115.
- Banerjee A, Lee JH, Ramaiah SK (2008) Interaction of osteopontin with neutrophil $\alpha(4)\beta(1)$ and $\alpha(9)\beta(1)$ integrins in a rodent model of alcoholic liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 233: 238–246.
- Koh A, da Silva AP, Bansal AK, Bansal M, Sun C, et al. (2007) Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology* 122: 466–475.
- Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF (2004) Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G264–273.
- Lorena D, Darby IA, Gadeau AP, Leen LL, Rittling S, et al. (2006) Osteopontin expression in normal and fibrotic liver: altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J Hepatol* 44: 383–390.
- De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, et al. (2007) Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 132: 1937–1946.
- Kawashima R, Mochida S, Matsui A, YouLuTu ZY, Ishikawa K, et al. (1999) Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 527–531.
- Lee SH, Seo GS, Park YN, Yoo TM, Sohn DH (2004) Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 68: 2367–2378.
- Lenga Y, Koh A, Perera AS, McCulloch CA, Sodek J, et al. (2008) Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res* 102: 319–327.
- Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, et al. (2004) Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G1035–1043.
- Nomiyama T, Perez-Tilve D, Ogawa D, Gizard F, Zhao Y, et al. (2007) Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 117: 2877–2888.
- Kiefer FW, Neschen S, Pfau B, Legerer B, Neuhofer A, et al. (2011) Osteopontin deficiency protects against obesity-induced hepatic steatosis and attenuates glucose production in mice. *Diabetologia* 54: 2132–2142.
- Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, Rousseau D, Anty R, et al. (2009) Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 58: 125–133.
- Tran A, Benzaken S, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Hastier P, et al. (2000) Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12: 989–993.
- Tran A, Hastier P, Barjoan EM, Demuth N, Pradier C, et al. (2000) Non invasive prediction of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 24: 626–630.
- Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD (2009) Liver biopsy. *Hepatology* 49: 1017–1044.
- Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Medline A (1987) Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 92: 208–214.
- (1994) Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 20: 15–20.
- Cales P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, et al. (2005) A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 42: 1373–1381.
- Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patoureaux S, Saint-Paul MC, et al. (2010) Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 5: e13577.
- Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134: 1655–1669.
- Manning DS, Afdhal NH (2008) Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 134: 1670–1681.
- Kiefer FW, Zeyda M, Gollinger K, Pfau B, Neuhofer A, et al. (2010) Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 59: 935–946.
- Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, et al. (2004) Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21: 539–550.
- Mimura S, Mochida S, Inao M, Matsui A, Nagoshi S, et al. (2004) Massive liver necrosis after provocation of imbalance between Th1 and Th2 immune reactions in osteopontin transgenic mice. *J Gastroenterol* 39: 867–872.
- Kon S, Ikesue M, Kimura C, Aoki M, Nakayama Y, et al. (2008) Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med* 205: 25–33.
- Naveau S, Gaude G, Asnacios A, Agostini H, Abella A, et al. (2009) Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 49: 97–105.
- Nguyen-Khac E, Chatelain D, Tramier B, Decrombecque C, Robert B, et al. (2008) Assessment of asymptomatic liver fibrosis in alcoholic patients using

- fibroscan: prospective comparison with seven non-invasive laboratory tests. *Aliment Pharmacol Ther* 28: 1188–1198.
40. Zhao L, Li T, Wang Y, Pan Y, Ning H, et al. (2008) Elevated plasma osteopontin level is predictive of cirrhosis in patients with hepatitis B infection. *Int J Clin Pract* 62: 1056–1062.
 41. Huang W, Zhu G, Huang M, Lou G, Liu Y, et al. (2010) Plasma osteopontin concentration correlates with the severity of hepatic fibrosis and inflammation in HCV-infected subjects. *Clin Chim Acta* 411: 675–678.
 42. Ramaiah SK, Rittling S (2008) Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci* 103: 4–13.
 43. Zhao J, Dong L, Lu B, Wu G, Xu D, et al. (2008) Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. *Gastroenterology* 135: 956–968.
 44. Sun BS, Dong QZ, Ye QH, Sun HJ, Jia HL, et al. (2008) Lentiviral-mediated miRNA against osteopontin suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48: 1834–1842.
 45. Gao B, Bataller R (2011) Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141: 1572–1585.

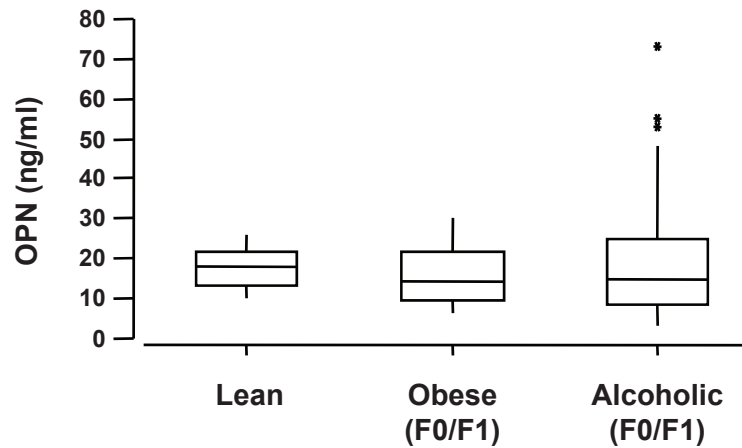


Figure S1. The serum OPN level in lean, obese and alcoholic patients with minimal stage (F0-F1) of fibrosis. The circulating levels of OPN were measured in the serum of 16 lean subjects (**Lean**) without diagnosed liver complications (BMI=21±1 kg/m²); of 14 morbidly obese patients (**Obese**) (BMI=43±1 kg/m²) with a minimal stage of fibrosis (4 F0 and 10 F1) and without hepatic steatosis, inflammation and ballooning; and of 61 alcoholic patients (**Alcoholic**) with a minimal stage of fibrosis (14 F0 and 51 F1). Results were expressed as the median (25th, 75th percentile). The Kruskal-Wallis test was used to compare the 3 groups $P=0.55$.

Table S1. Osteopontin levels for significant fibrosis ($F \geq 2$) assessment in the Estimation group.

Cut-off Value	Sensitivity	Specificity	Likelihood Ratio	PPV (Prev. 0.4)	NPV (Prev. 0.4)
OPN (ng/mL)					
15	0.977	0.492	1.925	0.566	0.970
20	0.932	0.646	2.633	0.641	0.933
29	0.841	0.815	4.555	0.755	0.883
36	0.773	0.892	7.175	0.829	0.853

PPV: Positive Predictive value, NPV: Negative Predictive value; Prev: Preva

Table S2: Univariate analysis of 60 patients from Validation group according to the severity of liver disease.

Data	F<2 (N=43)	F≥2 (N=17)	P
Age (years)	44.2 ± 7.8	49.3 ± 9.1	0.034043
Gender (female/male)	9/34	2/15	0.408354
Platelets (10⁹/L)	216.0 ± 66.5	295.6 ± 396.7	0.208681
AST (IU/L)	86.6 ± 76.4	122.5 ± 83.0	0.116856
ALT (IU/L)	95.2 ± 86.6	87.1 ± 58.7	0.724900
γGT (IU/L)	358.9 ± 336.0	706.0 ± 606.4	0.006378
Bilirubin (μmol/L)	9.5 ± 5.9	17.7 ± 15.1	0.003239
OPN (ng/mL)	35.6 ± 14.6	76.8 ± 54.1	0.000021
BMI (kg/m²)	24.4 ± 4.5	25.4 ± 5.2	0.450423

Patients were classified according to Fibrosis (F) <2 or ≥2. Quantitative results are expressed as means ± standard deviations. AST: aspartate amino-transferase; ALT: alanine amino-transferase; γGT: Gamma Glutamyl Transpeptidase; OPN: Osteopontin.

Table S3: Multivariate analysis in 60 patients from Validation group for the estimation of significant hepatic fibrosis.

Data	F $\geq$ 2 (N=17) versus F <2 (N=43)		
	P	OR	95% CI
γ GT	0.05717	1.00148	0.99995-1.0030
BMI	0.17226	1,10141	0.95877-1.26527
OPN	0.00609	1.04987	1.01399-1.08702

Patients were classified according to Fibrosis (F) <2 or $\geq$ 2. Multivariate analysis was realized using logistic regression.

PARTIE 3: OPN ET ISCHEMIE-REPERFUSION

Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia–reperfusion in mice

S Patouraux, D Rousseau, A Rubio, S Bonnafeous, VJ Lavallard, J Lauron, M-C Saint-Paul, B Bailly-Maitre, A Tran, D Crenesse and P Gual

Cell Death and Disease (2014) 5, e1208; doi:10.1038/cddis.2014.174

L'invalidation de l'ostéopontine aggrave les lésions hépatiques induites par l'ischémie-reperfusion chez la souris

Les lésions induites par l'ischémie-reperfusion (IR) hépatique sont la principale cause de dommages survenant au cours des procédures chirurgicales comme la transplantation hépatique ou la résection hépatique partielle. Les mécanismes moléculaires conduisant à ces lésions induites par l'ischémie reperfusion sont multi- factoriels, complexes et touchent tous les composants cellulaires du foie. Par exemple, les hépatocytes sont fortement affectés par l'IR. Durant la phase ischémique, l'anoxie des hépatocytes (cellules dépendantes de l'oxygène) est clairement l'un des processus prédominants. Durant la phase de reperfusion, une réponse inflammatoire est initiée, aggravant les lésions hépatocytaires. En effet, la surproduction de TNF α par les cellules de Kupffer peut induire plusieurs voies de mort cellulaire hépatocytaire. Cependant, une grande partie des mécanismes et des acteurs impliqués dans les lésions hépatiques induites par l'IR sont encore inconnus ou imprécis.

Dans le foie, l'ostéopontine (OPN) est exprimée par les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie), les cellules étoilées et les hépatocytes. Malgré le fait que l'OPN hépatique a été impliquée dans un grand nombre de pathologies hépatiques, son rôle dans IR n'a pas encore été étudié. Le rôle de l'OPN lors de l'IR a été principalement rapporté au niveau rénal. L'OPN favorise le recrutement des macrophages dans le rein post- ischémique, inhibe l'apoptose et stimule le développement de la fibrose rénale après un accident ischémique aigu.

A partir d'un modèle murin d'IR et de souris déficientes en OPN, nous avons évalué l'expression de l'OPN en réponse à l'IR chaude et étudié son rôle dans les lésions hépatiques induites par l'IR.

Résumé des résultats obtenus

L'invalidation de l'ostéopontine aggrave les lésions hépatiques induites par l'ischémie reperfusion (IR) chez la souris.

L'IR du foie induit une augmentation de l'expression hépatique et systémique de l'OPN chez la souris. Les marqueurs de souffrance hépatocytaire (dosage sérique des transaminases ASAT et ALAT) étaient fortement augmentés chez les souris OPN^{-/-} en comparaison aux souris sauvages après IR. La présence d'une nécrose hépatocytaire est aussi plus étendue sur les coupes de foie de souris invalidées pour l'OPN par rapport aux souris contrôles après IR. L'apoptose ne serait pas modifiée lors de l'invalidation de l'OPN, comme en témoignent l'étude TUNEL et le dosage de la caspase-3. Le foie des souris OPN^{-/-} après IR présente aussi une inflammation plus importante évaluée par l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ , et IL-6) et d'iNOS par rapport au souris sauvages.

L'OPN préviendrait la mort hépatocytaire.

Le rôle de l'OPN a été ensuite évalué sur des hépatocytes isolés à partir de foie de souris. A l'état basal, nous observions une diminution de la viabilité cellulaire et une augmentation de la toxicité cellulaire sur les cellules n'exprimant pas l'OPN. Ces effets étaient associés à une diminution de l'expression génique et protéique de Bcl-2, protéine anti-apoptotique. Le niveau protéique de Bcl-2 était également diminué après ischémie-reperfusion dans le foie des souris déficientes à l'OPN par rapport aux souris sauvages.

Pour mieux comprendre le rôle protecteur de l'OPN, nous avons utilisé des hépatocytes, issus des lignées hépatocytaires murines (AML-12). Après extinction de l'expression de l'OPN (siRNA) dans les hépatocytes, nous avons utilisé un modèle de déprivation en oxygène et en glucose (OGD). Les cellules ont été traitées par du KCN (cyanure de potassium), qui empêche l'utilisation d'oxygène par la cellule, dans un milieu dépourvu de glucose pendant 1h, suivi d'une période de récupération avec glucose de 16h. En absence d'OPN, la viabilité cellulaire était diminuée, et la cytotoxicité et l'apoptose étaient augmentées. Nous avons mis en évidence que le niveau d'ATP diminuait et que le stress oxydatif augmentait à l'état basal après invalidation de l'OPN. Ces effets étaient amplifiés dans des conditions de déprivation en glucose et en oxygène.

Des hépatocytes issus de lignées murines ont été aussi traités au TNF α . Le TNF α est augmenté après ischémie-reperfusion. Bien que le TNF α n'induit pas de modifications de la viabilité cellulaire dans les hépatocytes contrôles, l'extinction de l'expression de l'OPN entraîne une diminution de la viabilité cellulaire et une augmentation de la cytotoxicité après traitement au TNF α .

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'OPN aurait un rôle hépato-protecteur à l'état basal et lors de la déprivation en glucose et en oxygène, et lors de la réponse au TNF α , en augmentant l'expression de Bcl-2, protéine anti-apoptotique et en augmentant l'ATP cellulaire.

L'OPN préviendrait la production de cytokines inflammatoires et de NO par les macrophages.

Dans les macrophages (RAW 264.7), l'extinction de l'expression de l'OPN est associée à une augmentation de l'expression des gènes de l'inflammation (iNOS, IL-6, IL-1 β ,) à l'état basal et après stimulation au LPS (6h) par rapport aux cellules contrôles (iNOS, TNF α , IL-6, IL-1 β).

Ces résultats indiquent que l'OPN pourrait prévenir la nécrose et l'inflammation hépatique induits par l'IR. Ceci pourrait être dû à sa capacité à prévenir la mort hépatocytaire et la production toxique de NO dépendant d'iNOS dans les macrophages. Nous rapportons pour la première fois que l'OPN hépatique et plasmatique est augmentée lors de l'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris, et que l'OPN préviendrait les lésions dues à l'ischémie-reperfusion.

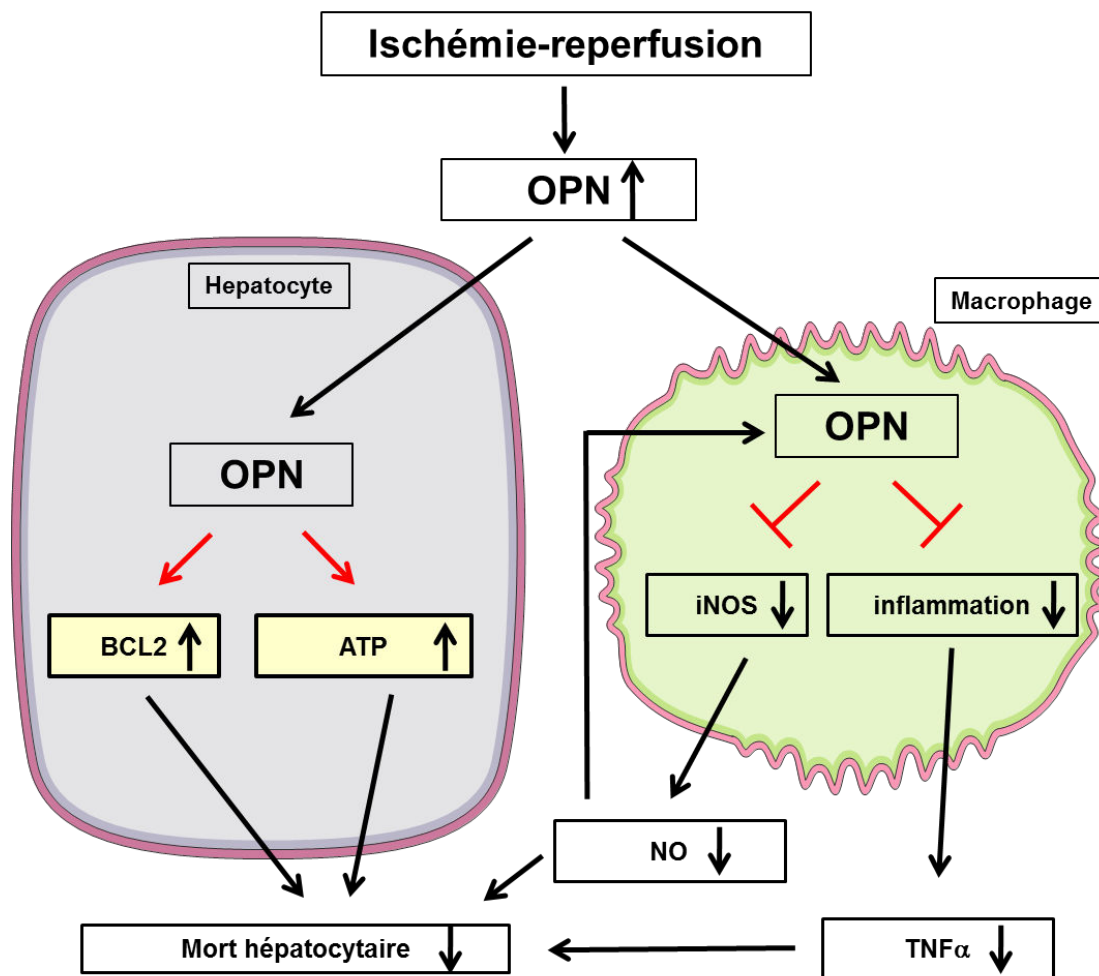


Schéma 7 : Rôles potentiels de l'OPN lors de l'ischémie-reperfusion hépatique

Une ischémie hépatique de 45min suivie de 4h de reperfusion chez la souris induit une augmentation de l'expression d'OPN et met en évidence son rôle protecteur. L'OPN endogène hépatocytaire confère une résistance partielle à la mort cellulaire induite par une déprivation en glucose et en oxygène et par le $\text{TNF}\alpha$. Cet effet pourrait être médié par la régulation de l'expression de Bcl2 et du niveau d'ATP par l'OPN. L'OPN endogène macrophagique régule négativement la production de NO dépendante d'iNOS. L'OPN limite aussi partiellement l'activation des macrophages et leur production de $\text{TNF}\alpha$ en réponse au LPS. La diminution de la mort hépatocytaire participerait aussi à la diminution de l'activation des macrophages et ainsi diminuerait leur production et sécrétion de NO et de $\text{TNF}\alpha$. Enfin, cette diminution de NO et de $\text{TNF}\alpha$ préviendrait la mort hépatocytaire secondaire à l'inflammation.

Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia–reperfusion in mice

S Patouraux^{1,2,3,6}, D Rousseau^{1,2,6}, A Rubio^{1,2,6}, S Bonnafous^{1,2,4}, VJ Lavallard^{1,2}, J Lauron^{1,2}, M-C Saint-Paul^{1,2,3}, B Bailly-Maitre^{1,2}, A Tran^{1,2,4}, D Crenesse^{1,2,5} and P Gual^{*,1,2}

Osteopontin (OPN) is a multifunctional protein involved in hepatic steatosis, inflammation, fibrosis and cancer progression. However, its role in hepatic injury induced by ischemia–reperfusion (I–R) has not yet been investigated. We show here that hepatic warm ischemia for 45 min followed by reperfusion for 4 h induced the upregulation of the hepatic and systemic level of OPN in mice. Plasma aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels were strongly increased in *Opn*^{−/−} mice compared with wild-type (Wt) mice after I–R, and histological analysis of the liver revealed a significantly higher incidence of necrosis of hepatocytes. In addition, the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin 6 (IL6) and interferon- γ were strongly upregulated in *Opn*^{−/−} mice versus Wt mice after I–R. One explanation for these responses could be the vulnerability of the OPN-deficient hepatocyte. Indeed, the downregulation of OPN in primary and AML12 hepatocytes decreased cell viability in the basal state and sensitized AML12 hepatocytes to cell death induced by oxygen–glucose deprivation and TNF α . Further, the downregulation of OPN in AML12 hepatocytes caused a strong decrease in the expression of anti-apoptotic Bcl2 and in the ATP level. The hepatic expression of Bcl2 also decreased in *Opn*^{−/−} mice versus Wt mice livers after I–R. Another explanation could be the regulation of the macrophage activity by OPN. In RAW macrophages, the downregulation of OPN enhanced iNOS expression in the basal state and sensitized macrophages to inflammatory signals, as evaluated by the upregulation of iNOS, TNF α and IL6 in response to lipopolysaccharide. In conclusion, OPN partially protects from hepatic injury and inflammation induced in this experimental model of liver I–R. This could be due to its ability to partially prevent death of hepatocytes and to limit the production of toxic iNOS-derived NO by macrophages.

Cell Death and Disease (2014) 5, e1208; doi:10.1038/cddis.2014.174; published online 8 May 2014

Subject Category: Experimental Medicine

Hepatic ischemia–reperfusion (I–R) injury is the main cause of liver damage that occurs during surgical procedures such as hepatic resection and transplantation. The molecular mechanisms leading to liver damage on I–R are complex, multi-factorial and affect all liver cellular components. In the ischemic phase, anoxic injury of hepatocytes (cells dependent on oxygen) is clearly the predominant process leading to injury, which is associated with an alteration in ATP homeostasis. In the reperfusion phase, an inflammatory response is initiated and enhances hepatocyte injury. Over-production and release of tumor necrosis factor- α (TNF α) from hepatic resident macrophages (Kupffer cells) may activate TNF receptors on hepatocytes to induce several pathways that promote hepatocyte death.^{1–3} The production of toxic nitric oxide (NO) by macrophage inducible NO synthase (iNOS) was also deleterious and the iNOS deficiency reduced liver injury after hepatic I–R.^{4,5} However, the mechanisms and actors involved in hepatic I–R injury are still unknown or unclear.

Osteopontin (OPN) is expressed in a variety of liver cells including hepatic macrophages (resident Kupffer cells and

infiltrated macrophages), stellate cells and hepatocytes^{6–9} and is a versatile modulator of liver diseases. OPN has an important role in hepatic inflammation and fibrogenesis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.^{9,10} OPN is also linked to progression and metastasis of hepatocellular carcinoma.⁹ In addition, we previously reported that hepatic expression of OPN correlated with hepatic steatosis, the level of alanine aminotransferase (ALT) and insulin resistance in morbidly obese patients.⁶ Hepatic OPN also increased with liver fibrosis in alcoholic patients and its circulating level was predictive of liver fibrosis in patients with alcoholic liver disease and chronic hepatitis C.¹⁰

The upregulation of OPN has been reported in rat retina that activated microglia on I–R,¹¹ in cardiomyocytes in an *ex-vivo* hemoperfused working porcine heart model,¹² in the brain during early cerebral I–R in rats¹³ but also in cultured rat aortic vascular smooth muscle cells in response to hypoxia.¹⁴ The role of OPN in I–R injury has largely been reported in the kidney and could have an unexpected protective and deleterious role. OPN may act as a ‘survival factor’ for the

¹INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de médecine Moléculaire (C3M), Équipe 8 « Complications hépatiques de l’obésité », Nice, France; ²Université de Nice-Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France; ³Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle Biologique, Hôpital Pasteur, Nice, France; ⁴Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle Digestif, Hôpital L’Archet, Nice, France and ⁵Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpitaux Pédiatriques CHU Lenval, Nice, France

*Corresponding author: P Gual, INSERM, U1065, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Team 8 “Hepatic complications in obesity”, 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 03, France. Tel: +33 48 9064 223; Fax: +33 48 9064 221; E-mail: gual@unice.fr

⁶These authors participated equally to this work.

Keywords: osteopontin; ischemia–reperfusion; hepatic injury; hepatocyte; macrophage

Abbreviations: I–R, ischemia–reperfusion; OPN, osteopontin; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LPS, lipopolysaccharide; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IFN, interferon

Received 09.10.13; revised 26.2.14; accepted 18.3.14; Edited by C Munoz-Pinedo

renal tubule, either through inhibition of iNOS¹⁵ or through inhibition of apoptosis.^{16,17} The deficiency in OPN reduced tolerance to acute renal ischemia associated with increased iNOS, NO and I–R injury at 24 h after reperfusion.¹⁸ OPN also stimulated the development of renal fibrosis after acute ischemic insult.¹⁹ The overexpression of OPN via hyperactivation of Wnt (Wingless) signaling, as detected in Brown Norway rats, is also critical for the maintenance of their inherent ischemic resistance. OPN reduces mitochondrial cytochrome c release and caspase 3 activity after renal I–R.²⁰ It has also been reported that OPN expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney I–R injury.²¹

Despite the fact that hepatic OPN is involved in a large number of liver diseases, its role in hepatic I–R injury has not yet been investigated. We focused our study on the expression of OPN in response to I–R and on its role in I–R-induced liver injury and inflammation using *Opn*^{−/−} mice. We then examined hepatocytes and macrophages *in vitro* to better understand the potential roles of OPN.

Results

Liver I–R induced the upregulation of plasma and hepatic expression of OPN. We first estimated the circulating and hepatic level of OPN on I–R in wild-type (Wt) mice. The plasma level of OPN was evaluated before and after ischemia for 45 min followed by 4 h of reperfusion. As shown in Figure 1a, the circulating level of the OPN protein was strongly increased in response to I–R. The hepatic expression of OPN was also evaluated in the Wt I–R mice compared with SHAM mice. The expression of OPN in the liver markedly increased in response to I–R (Figure 1b). Hepatic I–R thus caused upregulation of OPN expression and abundance in the liver and in the systemic circulation.

OPN deficiency increased the liver injury induced by hepatic I–R. The role of OPN in liver injury induced by I–R was then investigated using mice deficient for OPN. The plasma was collected before and after I–R of Wt and *Opn*^{−/−} mice and in SHAM mice. As expected, post-I–R was associated with elevated aspartate aminotransferase (AST) and ALT levels in Wt mice (Figure 1c). The *Opn*^{−/−} mice showed more liver damage on I–R as shown by the higher aminotransferase levels (AST, ALT). Further, histological analysis displayed extensive areas of necrosis (as indicated by arrows) in the liver of *Opn*^{−/−} mice compared with livers of Wt mice after I–R (Figure 1d). The OPN deficiency seems to be more associated with necrosis than apoptosis in these experimental conditions. Indeed, apoptosis evaluated by TUNEL-positive cells (Figure 1e and data not shown) and the level of caspase 3 activity (Figure 1f) were not significantly aggravated with the deletion of OPN in response to I–R. These results indicated that the OPN deficiency resulted in aggravation of the liver injury induced by I–R.

OPN deficiency aggravated the liver inflammation induced by I–R. Immune and inflammatory cells including macrophages (Kupffer cells), neutrophils, CD4⁺ T lymphocytes are activated in response to reperfusion.^{2,3} Several of the compounds released during the inflammatory response,

such as high concentrations of NO and the cytokine TNF α , may produce cytotoxicity and induce additional cell injury from those induced by ischemia. We first analyzed the expression of iNOS in the liver of SHAM mice and in hepatic lobes that underwent ischemia and then reperfusion of Wt (Wt I–R) and *Opn*^{−/−} (*Opn*^{−/−} I–R) mice. As shown in Figure 2a, the gene expression of iNOS increased significantly in *Opn*^{−/−} I–R compared with SHAM and Wt I–R mice. Furthermore, the iNOS expression relative to the vascularized lobe of Wt mice (Ctr: internal control lobe) was already upregulated in *Opn*^{−/−} mice. Inflammation was also evaluated from the expressions of TNF α , interleukin 6 (IL6) and interferon- γ (IFN γ). The relative expression to the internal control lobe of Wt mice (Ctr), of TNF α , IL6 and IFN γ , was increased in response to I–R with a more marked rise in *Opn*^{−/−} mice (Figures 2b–d). In the vascularized lobes, the OPN deficiency also mediated an increase in IFN γ expression. The OPN deficiency was thus associated with more pronounced inflammation in response to I–R.

OPN deficiency decreased hepatocyte viability and Bcl2 expression. We first evaluated the viability of hepatocytes freshly isolated from Wt and *Opn*^{−/−} mice. As shown in Figure 3a, the *Opn*^{−/−} versus Wt hepatocytes were more sensitive to cellular damage associated with the hepatocyte isolation procedure. Furthermore, the silencing of OPN by siRNA in AML12 hepatocytes caused reduced cell viability (Figure 3b) and increased cytotoxicity (lactate dehydrogenase (LDH) release) (Figure 3c). Interestingly, we found that the decrease in viability of AML12 hepatocytes after OPN silencing was associated with a substantial decrease in anti-apoptotic Bcl2 expression at the mRNA (Figure 3d) and protein level (Figure 3e). The knock out or silencing of OPN expression in primary hepatocytes also caused a decrease in gene expression of Bcl2 (*Opn*^{−/−} versus Wt hepatocytes: Bcl2=0.32, *n*=1; si OPN versus si Ctr hepatocytes: Bcl2=0.57, *n*=1). Furthermore, the *in vivo* level of the Bcl2 protein decreased significantly in the *Opn*^{−/−} I–R lobe compared with the Wt I–R lobe and SHAM liver in mice (Figures 3f and g).

OPN silencing sensitized AML12 hepatocytes to cell death induced by oxygen–glucose deprivation. To then explore the effect of the OPN deficiency on the sensitivity of hepatocytes to I–R, we used an *in vitro* model of oxygen–glucose deprivation (OGD).²² An initial short phase of OGD was performed by culturing the Ctr or OPN-silenced AML12 cells in a medium without glucose and supplemented with KCN (2.5 to 10 mM) for 1 h, followed by an overnight restoration phase. As OPN silencing affected basal cell viability, the following results were expressed as a percentage of basal state, as indicated. Compared with Ctr AML12 cells, the OPN-silenced AML12 cells displayed more sensitivity to OGD-induced cell death (significant at KCN at 10 mM) as evaluated by the reduced cell viability (MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay evaluated at 10 mM KCN) (Figure 4a) and the increased cytotoxicity (LDH release) (Figure 4b). To better evaluate the cell death mechanisms (apoptosis versus necrosis), less stringent conditions with KCN at 2.5 or

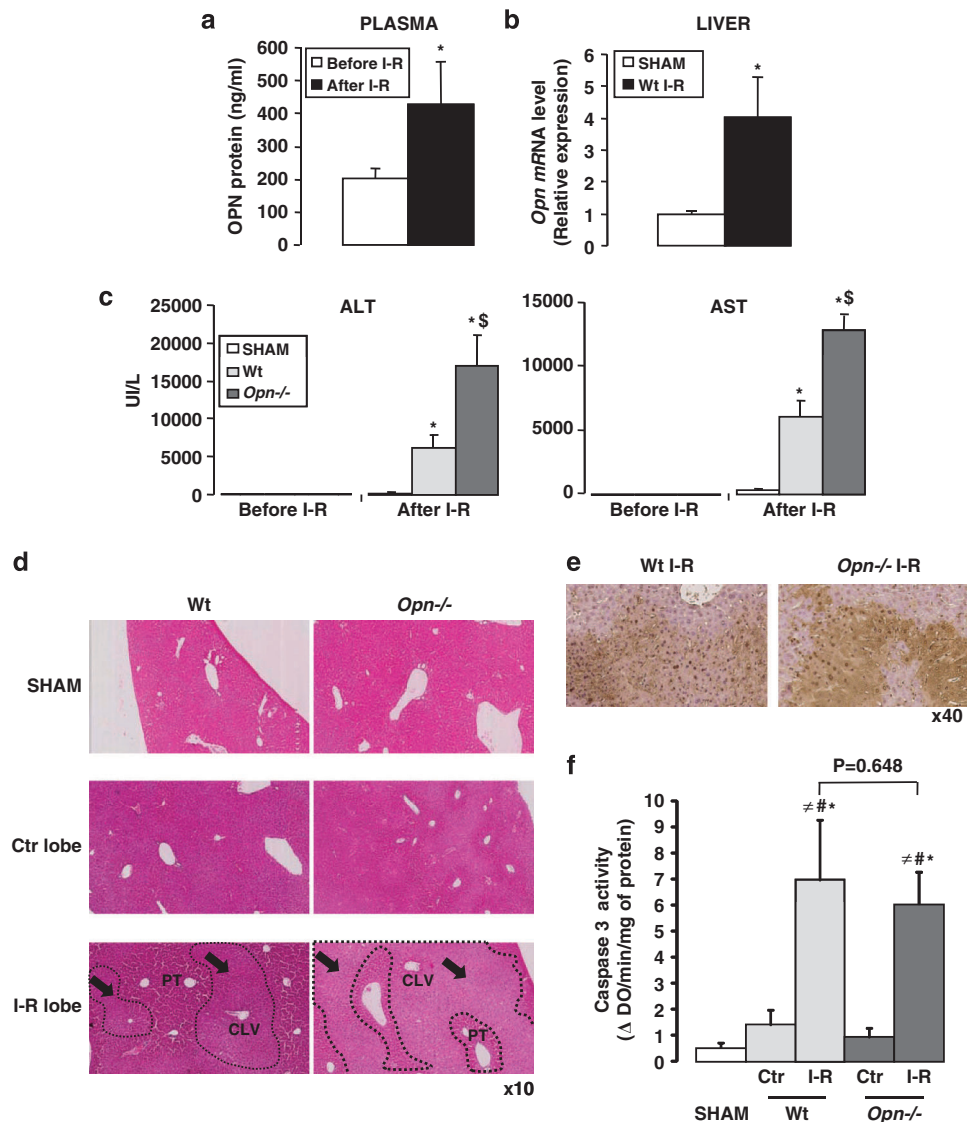


Figure 1 Plasma and hepatic OPN expression is increased in response to liver I-R and the OPN deficiency increased hepatic I-R injury. Wt ($n=8-10$) and $Opn^{-/-}$ ($Opn^{-/-}$) ($n=5$) mice underwent ischemia for 45 min followed by 4 h of reperfusion. SHAM controls ($n=4-6$) underwent the same procedure but without vascular occlusion. (a) The plasma level of OPN was evaluated before and after I-R in Wt mice. (b) Hepatic expression of OPN was evaluated in I-R lobes from Wt mice (Wt I-R) versus SHAM mice. (c) The plasma level of ALT and AST was evaluated before and after I-R in Wt, $Opn^{-/-}$ and in SHAM mice. Results were expressed as means $\pm$ S.E.M. Data were statistically analyzed using the Mann–Whitney test. *versus before I-R (a) or SHAM (b and c); ^{\$}versus Wt I-R (c). $P<0.05$. (d) H&E staining of liver samples from Wt, $Opn^{-/-}$ after I-R and SHAM mice. Typical pictures are shown. Dotted lines and arrows limit areas of necrosis; PT indicates portal triad; CLV indicates centrolobular vein. (e) The TUNEL assay was performed on liver sections as described in the Materials and Methods section. The liver sections were then counterstained with hematoxylin. Typical pictures are shown. (f) The level of caspase 3 activity was evaluated from a total lysate of control and I-R lobes from Wt (Wt Ctrl; Wt I-R) ($n=7$), $Opn^{-/-}$ ($Opn^{-/-}$ Ctrl; $Opn^{-/-}$ I-R) ($n=5$) and SHAM mice ($n=5$). Results were expressed as means $\pm$ S.E.M. Data were statistically analyzed using the Mann–Whitney test. [≠]versus SHAM, [#]versus Wt Ctrl and *versus $Opn^{-/-}$ Ctrl. $P<0.05$

5 mM and only a 2-h restoration phase were performed. In these experimental conditions, the OPN-silenced AML12 cells exhibited more apoptosis, when evaluated from the levels of annexin V-PE-positive cells (Figure 4c) and activated (cleaved) caspase 3 (p17) (Figure 4d) in response to OGD versus Ctrl AML12 hepatocytes.

OPN silencing in AML12 hepatocytes altered the ATP level and could enhance oxidative stress. In addition to the low expression level of Bcl2 (Figures 3d and e), the drop-off in cell viability of OPN-silenced AML12 hepatocytes in

response to OGD could not only be due to an alteration in the recovery of ATP stores but also due to defense response against oxidative stress. We thus evaluated the cellular level of ATP and the NRF2-dependent antioxidant response including nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) quinone oxidoreductase 1 (NQO1) as an indirect indicator of oxidative stress. In the basal state, OPN silencing mediated a decrease in the ATP level (at 2 h-restoration period: Figure 4e) and an increase in NQO1 expression (at 16 h-restoration period: Figure 4f; at 2 h-restoration period: $+3.28 \pm 0.64$, $P=0.01$). These responses were further

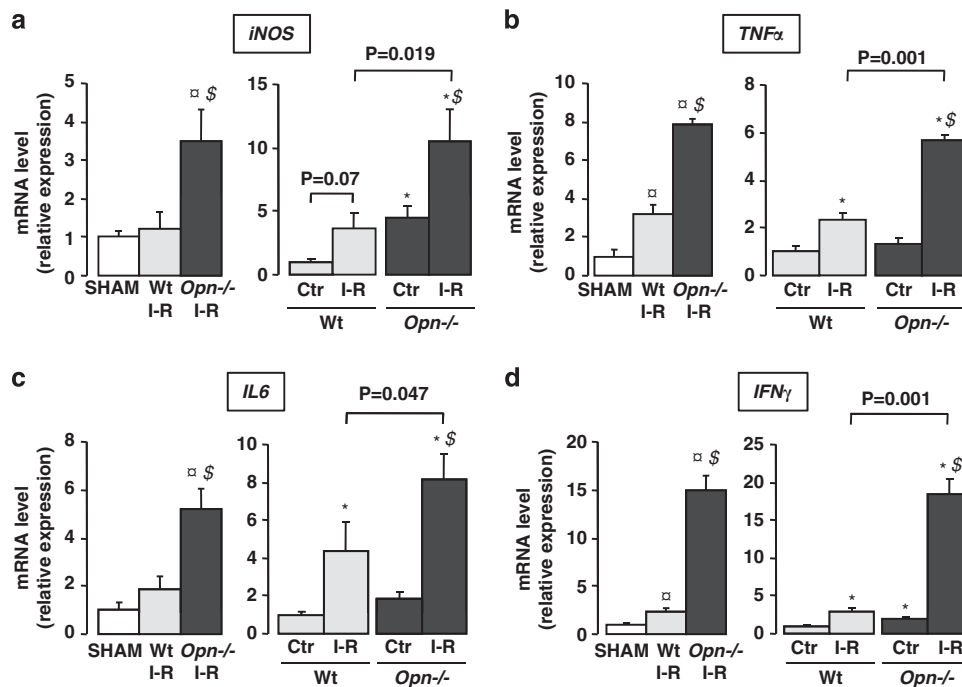


Figure 2 OPN deficiency aggravated the liver inflammation induced by I–R. The gene expression of iNOS (a), TNF α (b), IL6 (c) and IFN γ (d) was evaluated for control and ischemic-reperfused lobes (ischemia for 45 min and then 4 h of reperfusion) from Wt (Wt Ctr; Wt I–R) ($n = 8–10$), *Opn*^{−/−} (*Opn*^{−/−} Ctr; *Opn*^{−/−} I–R) ($n = 5$) and SHAM mice ($n = 4–6$). The mRNA levels were normalized to RPLP0 mRNA levels and expressed as fold stimulation $\pm$ S.E.M. versus SHAM or Wt Ctr. Data were statistically analyzed using the Mann–Whitney test. [□]versus SHAM, *versus Wt Ctr, [§]versus Wt I–R and [#]versus *Opn*^{−/−} Ctr. $P < 0.05$

amplified by the OGD treatment (Figures 4e and f). The regulation of NQO1 by OPN silencing and OGD treatment was abolished by the silencing of NRF2 with siRNA (data not shown). This indicated that OPN silencing in AML12 hepatocytes altered the ATP level and could enhance oxidative stress.

The OPN deficiency sensitized hepatocytes to cell death induced by TNF α . As TNF α was strongly upregulated in the liver of *Opn*^{−/−} mice on I–R (Figure 2b) and could mediate hepatocyte death, we then evaluated the effect of the OPN deficiency on the sensitivity to cell death induced by TNF α . As OPN silencing affected basal cell viability (Figure 3b), the following results were expressed as a percentage of basal state, as indicated. Although treatment of cells with TNF α alone was without an effect on cell viability and cytotoxicity, the downregulation of OPN sensitized AML12 hepatocytes to cell death as evaluated by the MTT assay (Figure 5a) and LDH release induced by TNF α (Figure 5b). Taken together, these results indicated that OPN had a hepatoprotective role under basal conditions and in response to OGD and TNF α .

OPN silencing increased iNOS expression in the basal state and sensitized RAW macrophages to inflammatory signals. Liver macrophages are activated in response to I–R, which leads to cell injury that is mainly due to the high production of NO and the cytokine TNF α .³ As we reported that OPN was strongly upregulated on I–R (Figures 1a and b) and that OPN regulates motility, NO production and cytokine expression in macrophages,^{9,23,24} we first investigated the effect of the OPN silencing in RAW macrophages on

expression of integrins and inflammatory markers. As shown in Figure 6a, OPN silencing with siRNA caused substantial modifications to integrin and CD44 expression. Under basal conditions, the expression of α V, β 1 and CD44 decreased and the expression of β 3 increased after silencing of OPN. OPN silencing of RAW cells also displayed upregulation of iNOS, IL1 β and IL6 compared with control cells in the basal state (Figure 6b). This response was also strongly amplified by inflammatory signals such as endotoxin (lipopolysaccharide (LPS)). A higher expression of iNOS ($\times 2.3 \pm 0.3$), TNF α ($\times 1.7 \pm 0.3$), IL1 β ($\times 2.3 \pm 0.3$) and particularly IL6 ($\times 52.4 \pm 13.6$) was detected in OPN-silenced versus Ctr RAW cells in response to LPS (Figure 6c). Although validation in isolated hepatic macrophages (Kupffer cells) has to be assessed, these results could indicate that the deficiency in OPN modified the properties of macrophages with higher production of NO as evaluated by iNOS expression and higher responsiveness to inflammatory signals.

Discussion

We first described that hepatic I–R promoted the upregulation of hepatic and plasma OPN. Interestingly, it has been reported that OPN could be regulated by I–R in other organs. For example, OPN was elevated in renal I–R injury,²¹ in the brain during early cerebral I–R in rats¹³ and in the porcine heart during hemoperfusion.¹² In the liver, the cellular origin of increased OPN expression in response to I–R has not been investigated. A large number of liver cells could express OPN and its upregulation was first reported in activated

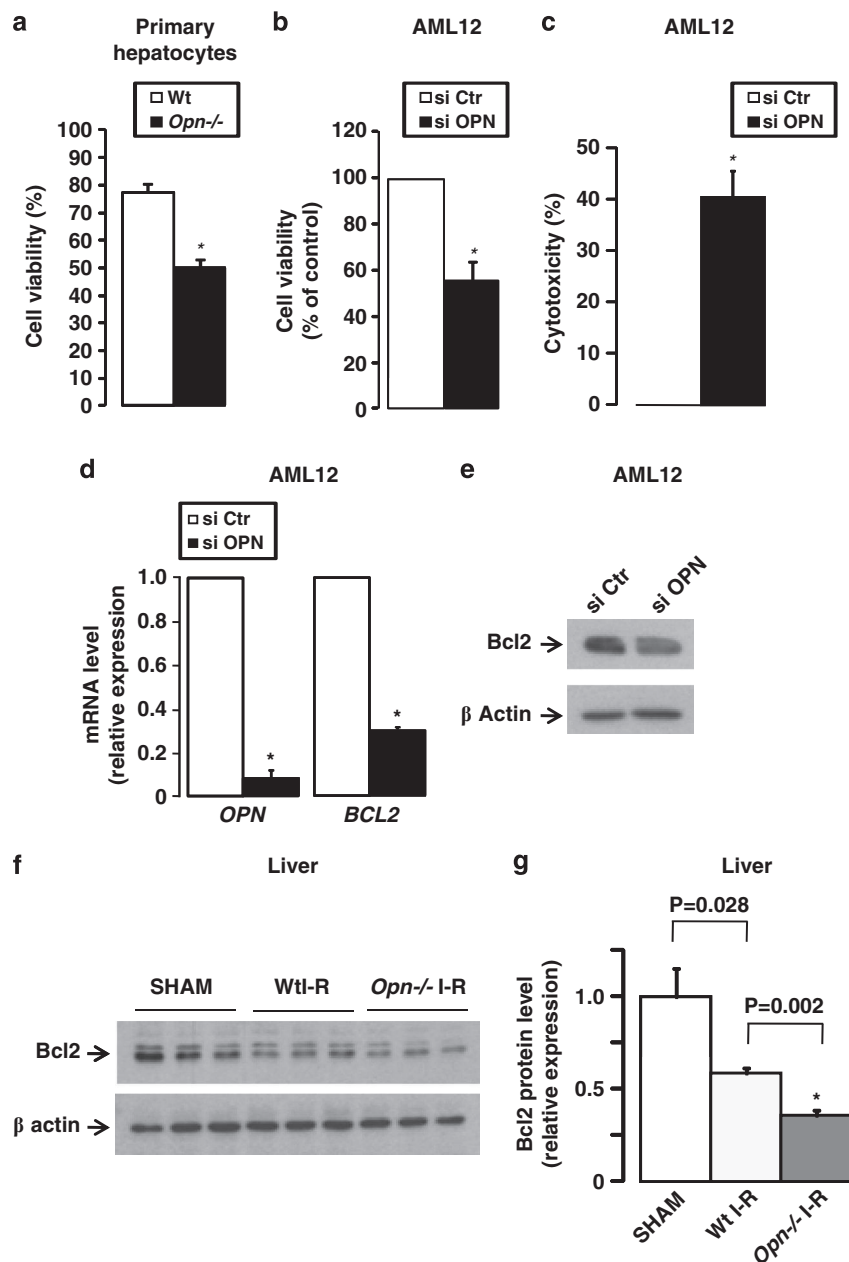


Figure 3 OPN deficiency decreased primary and AML12 hepatocyte viability and caused decreased Bcl2 expression. (a) The viability of hepatocytes freshly isolated from *Opn*^{+/+} ($n = 10$) and Wt livers ($n = 4$) was evaluated by trypan blue exclusion. (b–e) After silencing of OPN with siRNA in AML12 cells, the cell viability (MTT assay) (b) and LDH release (c) were evaluated after 16 h in DMEM, 4.5 g/l glucose supplemented with 0.5% BSA ($n = 6$). Expression of Bcl2 was also evaluated at the mRNA (d), ($n = 3$) and protein levels (e), ($n = 2$). (f–g) Hepatic expression of Bcl2 was evaluated in I–R lobes from *Opn*^{-/-} and Wt mice (Wt I–R) versus SHAM mice by immunoblotting (f), three mice per group. Results from (f) were analyzed by densitometry (g). (a–d and g) Results were expressed as means $\pm$ S.E.M. Data were statistically analyzed using the Mann–Whitney or Student's *t*-test. * $P < 0.05$

macrophages and stellate cells after intoxication with carbon tetrachloride.⁸ We and others have shown that hepatocytes could also be a source of OPN^{6,7,25} and TNF α enhanced its expression *in vitro* in hepatocytes.⁷ Future investigation is necessary to identify the source and the molecular mechanism responsible for this response. However, we report here that induction of OPN is associated with hepatic I–R injury (elevated AST/ALT, hepatocyte death) and this seems to be a conserved response to liver injury. Indeed, the upregulation of

hepatic OPN has also been reported in the liver of patients with nonalcoholic fatty liver, alcoholic and nonalcoholic liver cirrhosis, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis.^{6,26} Recent reports further suggested that systemic OPN levels were predictive of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B, chronic hepatitis C, alcoholic and nonalcoholic liver disease.^{9,10}

We then reported that OPN provides endogenous protection of the liver from I–R injury. The OPN deficiency

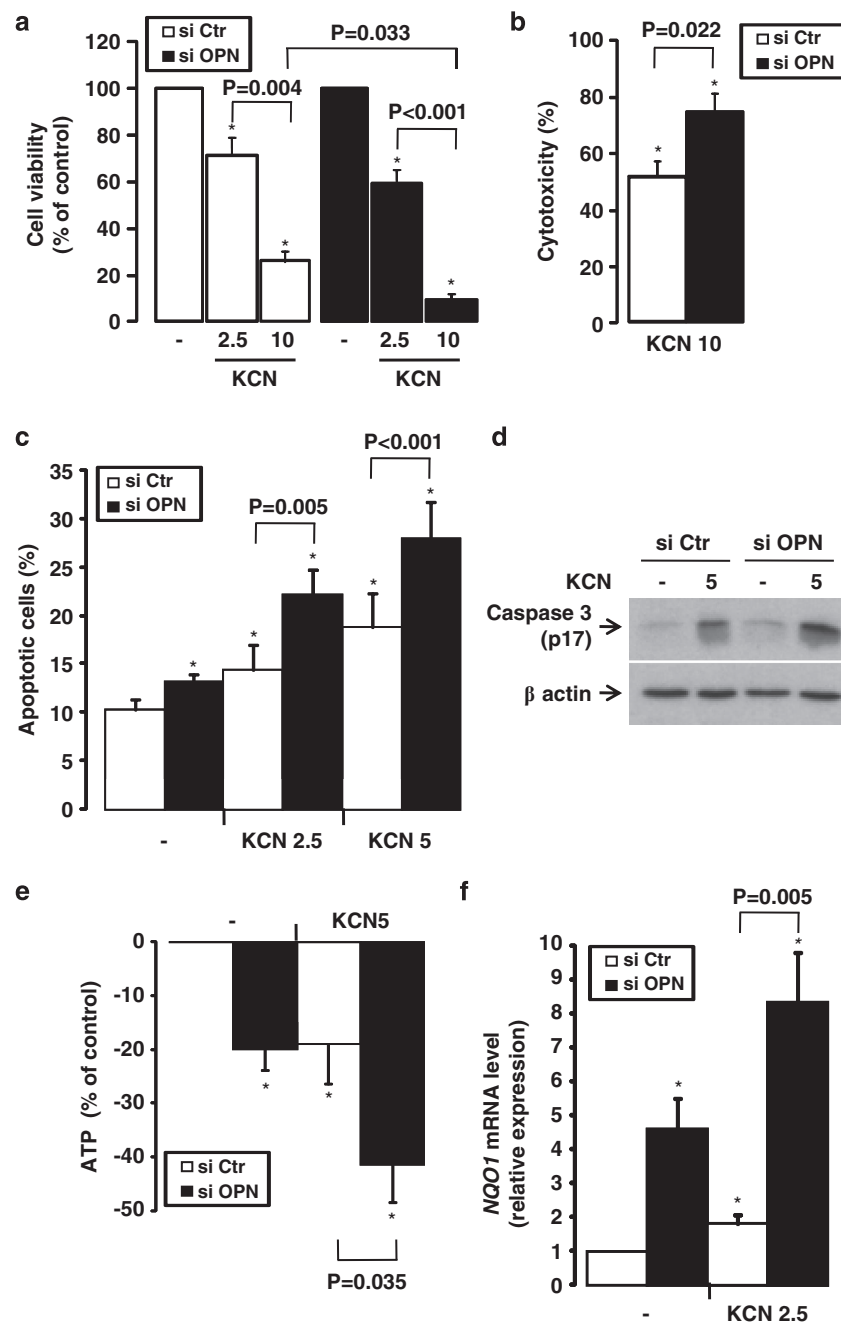


Figure 4 OPN silencing sensitized AML12 hepatocytes to cell death induced by OGD and caused increased NQO1 expression and decreased ATP levels. After silencing of OPN with siRNA in AML12 cells, cell viability (MTT assay) (**a**) ($n=6$), LDH release (**b**) ($n=6$), cell apoptosis (**c**) ($n=4$), cleaved caspase 3 level (**d**) ($n=2$), the ATP level (**e**) ($n=4$) and gene expression of NQO1 (**f**) ($n=3$) were evaluated in the basal state and in response to KCN (2.5, 5 or 10 mM as indicated) after 1 h in DMEM without glucose, followed by a 16- (**a**, **b** and **f**) or 2-h (**c**, **d** and **e**) restoration period in DMEM, 4.5 g/l glucose supplemented with 0.5% BSA. Results relative to either its own control (si Ctr or si OPN) (**a** and **b**) or si Ctr (**c**, **d** and **f**) were expressed as means $\pm$ S.E.M. Data were statistically analyzed using Student's *t*-test. * $P<0.05$

aggravated liver injury induced by I-R as evaluated by the elevated AST and ALT levels and extensive areas of necrosis in the liver. Under these experimental conditions, the protective effect of OPN seems to be more associated with prevention of necrosis than apoptosis. Indeed, apoptosis evaluated with the TUNEL assay and from the level of caspases 3 activity were not aggravated after ablation of OPN. However, we cannot rule out the protective effect of

OPN on cell apoptosis. This protective effect could occur in early stages and necrosis, in some circumstances, can also be viewed as aborted apoptosis, due to insufficient ATP as induced by I-R to drive the apoptotic program.²⁷ In accordance with this, our *in vitro* studies have shown that an OPN deficiency caused more apoptosis in low stringent conditions of OGD. The OPN deficiency also caused a strong decrease in the ATP level, which was amplified in response to

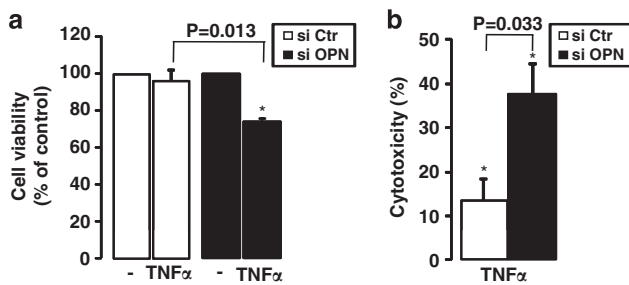


Figure 5 OPN silencing sensitized AML12 hepatocytes to cell death induced by TNF α . After silencing of OPN with siRNA in AML12 cells, the cell viability (MTT assay) (a) and LDH release (b) were evaluated in response to TNF α (20 ng/ml) for 16 h in DMEM, 4.5 g/l glucose supplemented with 0.5% BSA ($n=3$). As OPN silencing affected the basal cell viability, the results were expressed as a function of the corresponding basal state (si Ctr or si OPN, respectively) and as means $\pm$ S.E.M. Data were statistically analyzed using Student's *t*-test. * $P<0.05$

OGD. Interestingly, the protective effect of OPN on liver injury has also been reported with carbon tetrachloride intoxication. OPN-deficient mice were more susceptible to carbon tetrachloride treatment, displaying more necrosis and higher ALT levels during the initial steps.²⁸ In contrast, liver necrosis and ALT levels were lower in the transgenic mice overexpressing OPN in hepatocytes when treated with carbon tetrachloride.²⁹

A protective effect of OPN against cardiac and renal ischemic injury has also been reported. Wang *et al.* reported that patients undergoing mitral valve replacement and with high plasma OPN levels had more activated transcription factors, nuclear factor kappa B and signal transducer and activator of transcription 3, higher expression of effector proteins and better cardioprotective effects. Further, OPN treatment displayed cardioprotective effects on neonatal cardiomyocytes 24 h after anoxia–reoxygenation injury, when assessed from cell viability, LDH activity, MDA content and SOD activity.³⁰ OPN has the potential to modulate different phases of injury, healing and myocardial remodeling. Genetically engineered mouse studies provide evidence that increased expression of OPN may have a protective role against left ventricular dilation after myocardial infarction. However, in the infarct remodeling stage, OPN may exacerbate unfavorable fibrosis.³¹ In renal ischemic injury, a protective role for OPN is supported by the finding that increased OPN expression occurs in the distal tubules, which contain cells that are resistant to ischemic injury. In contrast, proximal tubules, which are less tolerant of ischemic injury, show very little OPN expression after ischemia.³² The deficiency in OPN reduced the tolerance to acute renal ischemia associated with increased I–R injury at 24 h after reperfusion.¹⁸ The overexpression of OPN via the hyperactivation of Wnt signaling, as detected in Brown Norway rats, is also critical for the maintenance of their inherent ischemic resistance.²⁰ However, OPN again stimulated the development of renal fibrosis after acute ischemic insult.¹⁹

In the current study, this protective role of OPN from I–R injury was first associated with the protection of hepatocytes from cell death. The OPN deficiency decreased hepatocyte viability *in vitro* and further sensitized hepatocytes to cell death induced by OGD and TNF α . The OPN deficiency in AML12 hepatocytes enhanced apoptosis and the level of

activated caspase 3. Interestingly, we found that the decrease in viability of primary and AML12 hepatocytes after OPN silencing was associated with a substantial decline in Bcl2 expression (Figure 3). In addition, a deficiency in OPN aggravated hepatic Bcl2 downregulation on I–R (Figure 3). It is well documented that Bcl2 is important for liver development by preventing apoptosis³³ and its hepatic overexpression prevented the liver cell necrosis induced by hypoxia.³⁴ Hepatic I–R in our mice was also associated with substantial upregulation of TNF α (Figure 2b), which is also involved in cell injury. As Bcl2 protects hepatocytes from TNF α -induced apoptosis,³⁵ its downregulation induced by silencing of OPN could also sensitize hepatocytes to cell death induced by TNF α . Importantly, the regulation of Bcl2 by OPN seemed to be specific to hepatocytes, as silencing of OPN in RAW macrophages was without any effect on Bcl2 expression (data not shown). This association between OPN and Bcl2 expression was recently reported in liver carcinoma cells.³⁶ Indeed, OPN silencing resulted in strong downregulation of the anti-apoptotic Bcl2 family members, including Bcl2. This response has been associated with a blockade of NF- κ B activation and induction of mitochondria-mediated apoptosis.³⁶

The level of OPN induction is thus determinant and its high expression conferred resistance of cells to hypoxia–reoxygenation injury. The cell survival role of OPN in hypoxia–reoxygenation-induced cell death has recently been reported for cancer cells. The upregulation of OPN in response to hypoxia–reoxygenation mediated the protective function of OPN via sustained AKT activation. However, OPN could be inactivated via proteolytic cleavage by caspase 8 and accumulation of caspase-generated OPN fragments could induce cell death via p53.³⁷ In Brown Norway rats with inherent ischemic resistance, the overexpression of OPN reduced mitochondrial cytochrome c release and caspase 3 activity after renal I–R.²⁰

The aggravation of liver injury in OPN null mice could also be due to the more pronounced inflammatory response induced by I–R. In the current study, we report that the deficiency in OPN was associated with a higher hepatic expression of TNF α , IL6, IFN γ and iNOS compared with the littermate mice on I–R. This massive release of TNF α and of iNOS-derived NO could induce hepatocyte damage. It is well established that TNF α is a crucial mediator in hepatic reperfusion injury and the inhibition of TNF α signaling by TNF α antiserum or genetic inactivation of TNF-receptor 1 ameliorated hepatic reperfusion injury and prolonged survival.^{1,38,39} iNOS-derived NO was also deleterious and the iNOS deficiency reduced liver injury (the AST/ALT level and hepatic areas of necrosis) after hepatic I–R.⁴ Ablation of iNOS or treatment with a specific iNOS inhibitor also resulted in complete protection against hypoxia–reperfusion-induced ALT release.⁵

iNOS and iNOS-derived NO were enhanced by inflammatory signals (DAMPs, dead cell-induced macrophage activation) but could also be negatively regulated by OPN. In *Opn*^{−/−} mice, iNOS was already upregulated in the internal control lobe compared with Wt mice and strongly increased on I–R. The silencing of OPN in RAW macrophages also resulted in an increase in iNOS in the basal state and in response to an

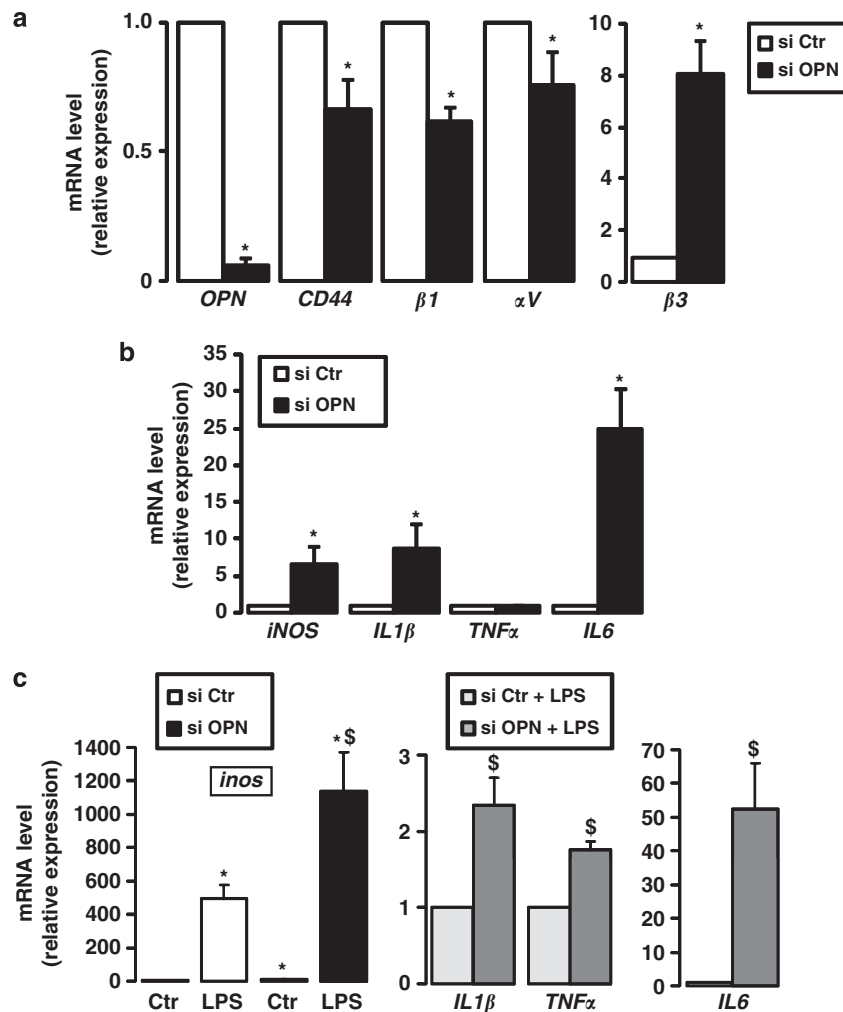


Figure 6 OPN deficiency increased iNOS expression in the basal state and sensitized macrophages to inflammatory signals. After silencing of OPN with siRNA in RAW macrophages, the gene expression of OPN, its receptors (CD44, integrins $\beta 1$, αV and $\beta 3$) (a) and inflammation (iNOS and the cytokines IL1 β , TNF α and IL6) (b) were evaluated in the basal state ($n = 3$). (c) After silencing of OPN with siRNA, RAW macrophages were incubated or not with LPS (100 ng/ml) for 6 h. The gene expression of iNOS, IL1 β , TNF α and IL6 was then evaluated ($n = 3$). The mRNA levels were normalized to RPLP0 mRNA levels and expressed as fold stimulation $\pm$ S.E.M. versus si Ctr or si Ctr plus LPS. Data were statistically analyzed using the Mann–Whitney or Student's *t*-test. *versus si Ctr and ^{\$}versus si Ctr plus LPS. $P < 0.05$

inflammatory signal (LPS). This role of OPN in the negative regulation of iNOS was recently described in macrophages. In response to inflammation, the iNOS-derived NO-increased OPN expression leads to the degradation of STAT1 and consequently inhibition in STAT1-dependent iNOS expression.²⁴ OPN thus mediated negative feedback of iNOS expression and limited iNOS-derived NO synthesis in response to inflammation in macrophages. We also report that silencing of the OPN deficiency in macrophages resulted in an increase in pro-inflammatory cytokine synthesis in the basal state and in response to LPS.

In primary mouse kidney proximal tubule epithelial cells, OPN also suppressed iNOS-derived NO synthesis induced by the inflammatory mediators IFN γ and LPS. The inflammatory mediators increased iNOS and recombinant human OPN inhibited this response after neutralization of OPN. The inhibition of NO synthesis by OPN could be mediated via $\alpha v \beta 3$ integrin, which is known to be an OPN receptor.¹⁵ Further, the deficiency in OPN reduced tolerance

to acute renal ischemia associated with increased iNOS, NO and I–R injury at 24 h after reperfusion.¹⁸

In conclusion, the hepatic I–R with 45 min of ischemia followed by 4 h of reperfusion induced upregulation of OPN and revealed its protective role in I–R injury (Figure 7). Endogenous OPN in hepatocytes conferred partial resistance to the cell death induced by OGD and TNF α . This could be mediated by the regulation of Bcl2 and the ATP level by OPN. This decreased rate of death of hepatocytes could consequently decrease the activation of liver macrophages and thus macrophage-mediated NO and TNF α release. Finally, lowering TNF α and NO levels could prevent additional hepatocyte injury induced by inflammation. Interestingly, this vicious cycle in I–R injury has been reported in mice with complete absence of NF- κ B activation in hepatocytes (inactivation of NEMO).⁴⁰ Endogenous OPN in macrophages also mediated negative feedback in iNOS-derived NO production and partially limited macrophage activation in response to an inflammatory signal. Therefore, OPN is an important factor in I–R-induced injury

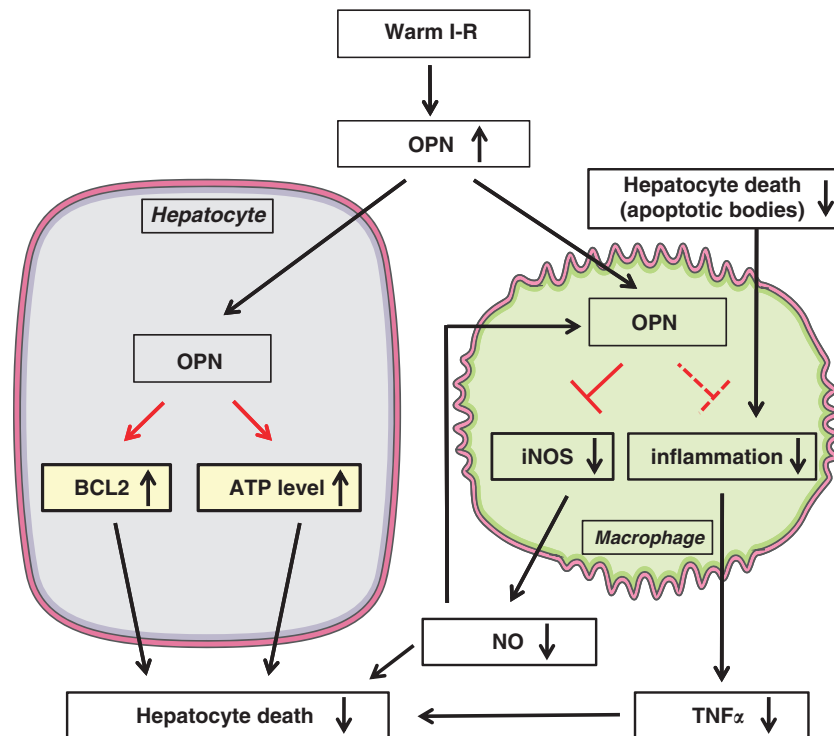


Figure 7 Schematic representation showing the potential roles of OPN in hepatic I–R injury. The hepatic I–R with 45 min of ischemia followed by 4 h of reperfusion induced upregulation of OPN and revealed its protective role in I–R injury. Endogenous OPN in hepatocytes conferred partial resistance to cell death induced by OGD and TNF α . This could be mediated by the regulation of the Bcl2 and ATP levels by OPN. Endogenous OPN in macrophages also mediated negative feedback on iNOS-derived NO production and partially limited liver macrophage activation and TNF α production in response to an inflammatory signal. The decreased rate of death of hepatocytes could consequently decrease the activation of liver macrophages and thus macrophage-mediated NO and TNF α release. Finally, lowering TNF α and NO levels could prevent additional hepatocyte injury induced by inflammation

and additional studies need to carefully delineate the role of OPN in parenchymal and non-parenchymal cells as a function of the experimental model of liver I–R used (long lasting *versus* short period of ischemia and/or reperfusion). As OPN has an important role in immune responses, in tissue remodeling and in hepatic fibrosis, the role of OPN in late adverse post-ischemic effects has to be investigated.

Materials and Methods

Animals and surgical protocol. Wt and OPN-deficient mice (*Opn*^{−/−}) (B6.129S6(cg)-spp1 tm1Blh/J from Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) C57BL/6 male mice (10–12 weeks of age) had free access to water and were fed a normal diet *ad libitum*. Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg/kg) and blood was collected from the tail (200 μ l). After laparotomy, an atraumatic clip (FD562; Aesculap, Tuttlingen, Germany) was used to interrupt the arterial and portal venous blood supply to the left and middle liver lobes. The right lobe of the liver continued to be vascularized and was used as internal control lobe (Ctr lobe). The abdominal wall was closed with a running suture. After 45 min of partial warm ischemia, the clamp was removed to initiate hepatic reperfusion. Mice were killed 4 h after reperfusion. Blood was collected from the inferior vena cava. Left and middle liver lobes (I–R lobes) and the right liver lobe (Ctr lobe) were differentiated, and for each, one part was fixed in 4% formaldehyde and the other one was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . SHAM controls underwent the same procedure but without vascular occlusion. No differences have been noted between SHAM Wt and SHAM *Opn*^{−/−} mice (data not shown). The partial warm I–R is referred to as I–R throughout the manuscript. The guidelines of laboratory animal care were followed, and the local ethical committee approved the animal experiments.

Circulating levels of transaminases and OPN. Determination of plasma transaminases (AST/ALT) was performed using *in vitro* test with pyridoxal

phosphate activation on Roche/Hitachi cobas c systems (ASTPM, ALTPM, cobas, Meylan, France). Roche/Hitachi cobas c systems automatically calculate the analyte concentration of each sample. Plasma OPN levels were evaluated with the Quantikine ELISA Mouse/Rat OPN Immunoassay (R&D Systems), as per manufacturer's instructions.

Light microscopy. For conventional light microscopy, liver lobes were fixed in 4% neutral-buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin. Sections (4 μ m thick) were stained with hematoxylin eosin safran. Histopathological features were observed: localization and the extent of hepatocyte injury were evaluated.

TUNEL assay. Liver biopsies were incubated in formol, paraffin embedded and sectioned. The TUNEL assay was performed as per manufacturer's instructions of ApopTag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection kit (Millipore, Meylan, France). The liver sections were then counterstained with Mayer's hematoxylin (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Specimens were evaluated by light microscopy.

Cellular models and treatments. Mouse hepatocytes were isolated with a two-step collagenase procedure. Briefly, mouse livers were perfused with HEPES buffer containing 8 g/l NaCl, 33 mg/l Na₂HPO₄, 200 mg/l KCl and 2.38 g/l HEPES, pH 7.5, supplemented with 0.5 mM EGTA for 3 min at 3 ml/min, then with HEPES buffer for 3 min at 3 ml/min and finally with HEPES buffer supplemented with 1.5 g/l CaCl₂ and 0.026% collagenase type IV (Sigma-Aldrich; C5138, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 7 min at 3 ml/min. Livers were then carefully removed and minced in Williams' E medium (Life Technologies, St Aubin, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Vélizy-Villacoublay, France), 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.02 U/ml insulin (Umulin, Lilly France, Neuilly-sur-Seine, France). The cell suspension was then filtered (250 μ m) and hepatocytes were collected by centrifugation at $50 \times g$ for 5 min. Viability was evaluated by trypan blue exclusion (Sigma-Aldrich). Mouse AML12

hepatocytes (CRL-2254, ATCC, Manassas, VA, USA) and RAW 264.7 macrophages (TIB-71, ATCC) were cultured in 'cell medium' (DMEM, 4.5 g/l glucose, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories), under 5% CO₂ at 37 °C.

Cells were transfected with OPN siRNA (MSS209393, Life Technologies) (referred to as si OPN) or control siRNA (Life Technologies) (referred to as si Ctr) at 30 nM using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. After 48 h, cells were treated as indicated: (a) with TNF α (20 ng/ml) (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA) for 16 h in 'cell medium' supplemented with 0.5% bovine serum albumin; (b) with KCN (60179, Fluka chemika, Buchs, Switzerland) (2.5, 5 or 10 mM) for 1 h in DMEM without glucose and supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.5% bovine serum albumin, followed by a 2- or 16-h restoration period (with oxygen and glucose) as indicated, in 'cell medium' supplemented with 0.5% bovine serum albumin; (c) with LPS (L3024, Sigma-Aldrich) (100 ng/ml) for 6 h in 'cell medium' supplemented with 0.5% bovine serum albumin.

The si Ctr corresponds to a RNAi duplex designed with a comparable GC content (%GC = 68) as the OPN RNAi duplex (si OPN) (%GC = 52). The si Ctr is used as a negative control in the RNAi experiment as suggested by the manufacturer. To validate it, we evaluated the expression of gene including OPN, iNOS, TNF α and IL6 after transfection with si Ctr versus without the RNAi duplex (mock). The si Ctr did not modify the expression of these genes in RAW cells (OPN: mock: 1, si Ctr: 0.95 $\pm$ 0.06, P = 0.229; iNOS: mock: 1, si Ctr: 1.05 $\pm$ 0.06, P = 0.435; TNF α : mock: 1, si Ctr: 1.04 $\pm$ 0.06, P = 0.275; IL6: mock: 1, si Ctr: 1.23 $\pm$ 0.46, P = 0.320; n = 3) and the expression of OPN in AML12 cells (OPN: mock: 1, si Ctr: 0.96, n = 1).

LDH release assay. The cytotoxicity induced by TNF α and KCN was assessed by LDH release into the 'cell medium'. Following treatment as indicated, the cell medium was collected and centrifuged at 50 $\times$ g for 5 min to obtain a cell-free supernatant. The activity of LDH in the medium was determined using the cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was recorded at 490 nm using a microplate spectrophotometer system (ELX800, Bio-TEK instruments, Colmar, France) and the results are expressed as a percentage of cytotoxicity ((treated cells DO – control cells DO)/(maximum LDH release DO – control cells DO) $\times$ 100). Reagents did not interfere with the determination of LDH.

MTT assay. The assay is dependent on the ability of viable cells to metabolize a water-soluble tetrazolium salt into a water-insoluble formazan product. Following treatment as indicated, cells were incubated for 2 h with 0.5 mg/ml MTT in serum-free medium (DMEM). After removing the supernatant, DMSO was added to completely dissolve the formazan product. Aliquots of the resulting solutions were transferred to 96-well plates and the absorbance was recorded at 550 nm using the microplate spectrophotometer system (ELX800, Bio-TEK instruments). Results are presented as a percentage of the control values.

Cell apoptosis. Cell apoptosis was evaluated by flow cytometry following double staining with annexin V-PE and 7-AAD according the manufacturer's instructions (Annexin V-PE apoptosis detection kit I, BD Biosciences, Pont de Claix, France).

ATP measurement. Cells were lysed in lysis buffer (see 'Immunoblotting'). Lysates were diluted in the dilution buffer according to the manufacturer's instructions (ATP Bioluminescence Assay Kit HS II, Roche Diagnostics) and then loaded in duplicate on a dark 96-well plate (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France). Luciferase was added and the luminescence measured immediately using a luminometer (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany). The ATP content was evaluated for each sample, which was standardized to the protein content.

DEVDase activity measurement. After the indicated treatments, cells were lysed in lysis buffer (see 'Immunoblotting'). Lysates were standardized to the protein content and loaded onto a black 96-well plate (Greiner Bio-One) in the presence of 0.2 mmol/l caspase 3 substrate Ac-DEVD-AMC diluted in the following buffer: 50 mmol/l HEPES (pH 7.5), 150 mmol/l NaCl, 20 mmol/l EDTA and 10 mmol/l DTT. The caspase activity was determined on a fluoroscan at 460 nm with or without 1 µmol/l Ac-DEVD-CHO, and the specific activity was expressed as the change in absorbance per minute per milligram of protein.

Immunoblotting. Cells or frozen tissues were solubilized in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM pyrophosphate, proteases inhibitors cocktail, and 1% Triton X-100) for 45 min at 4 °C. Lysates were cleared (14 000 r.p.m., 15 min). Proteins were quantified (BCA Protein assay kit, 23225, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and separated by SDS-PAGE and immunoblotted as described.⁴¹ The proteins were probed with anti-bcl2 ((50E3) 2870, Cell signaling, Danvers, MA, USA), anti- β actin ((C4) sc-47778, Santa Cruz Biotechnologies Inc., Dallas, TX, USA) and anti-caspase 3 (9662, Cell signaling) antibodies (1 µg/ml).

Real-time quantitative PCR analysis. Cell or total liver RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen, Hilden, Germany) and treated with Turbo DNA-free (AM 1907, Thermo Fisher scientific Inc.) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNA were determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano Kit (5067-1511, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher scientific Inc.). Real-time quantitative PCR was performed in duplicate for each sample using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific Inc.) as previously described.^{41,42} TaqMan gene expression assays were purchased from Thermo Fisher scientific Inc.: *RPLP0* (ribosomal protein, large, P0) (Mm99999223_gH); *TNF α* (Mm00443258_m1); *IL1 β* (Mm00434228_m2); *OPN* (Mm00436767_m1); *iNOS* (Mm01309897_m1); *IL6* (Mm00446190_m1); *IFN γ* (Mm01168134_m1); *CD44* (Mm01277163_m1); *β 1 integrin* (Mm01253227_m1); *α V integrin* (Mm00434506_m1); *β 3 integrin* (Mm00443980_m1); *NQO1* (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1) (Mm00500821_m1) and *Bcl2* (Mm00477631_m1). Gene expression was normalized to the mouse housekeeping gene *RPLP0* and calculated based on the comparative cycle threshold C_t method (2^{– $\Delta\Delta C_t$}).

Statistical analysis. Statistical significance of differential gene expression between two study groups was determined using the nonparametric Mann–Whitney test with the ΔC_t of each group. Other data from mice and cell preparations were statistically analyzed using the Mann–Whitney test or the Student t -test. Data from cell lines were statistically analyzed using the Student t -test. P < 0.05 was considered as significant.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Dr MC Brahimi-Horn for editorial correction. We thank Véronique Corcelle and the INSERM U1065 animal facility staff for their excellent care of mice; E Gouze and Y Le Marchand-Brustel are thanked for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the INSERM (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire de Nice) and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/LFB and European Foundation for the study of Diabetes/Lilly European Diabetes Research Programme to PG). This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE: program reference #ANR-11-LABX-0028-01. VJL was supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire de Nice) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (France). SP was supported by the Fondation Recherche Médicale.

- Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G583–G589.
- de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 2007; **39**: 481–484.
- Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol* 2013; **59**: 1094–1106.
- Hamada T, Duarte S, Tsuchihashi S, Busuttil RW, Coito AJ. Inducible nitric oxide synthase deficiency impairs matrix metalloproteinase-9 activity and disrupts leukocyte migration in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2009; **174**: 2265–2277.
- Taniai H, Hines IN, Bharwani S, Maloney RE, Nimura Y, Gao B *et al*. Susceptibility of murine periportal hepatocytes to hypoxia-reoxygenation: role for NO and Kupffer cell-derived oxidants. *Hepatology* 2004; **39**: 1544–1552.

6. Bertola A, Deveaux V, Bonnafeux S, Rousseau D, Anty R, Wakkach A *et al*. Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 2009; **58**: 125–133.
7. Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; **287**: G264–G273.
8. Kawashima R, Mochida S, Matsui A, YouLuTu ZY, Ishikawa K, Toshima K *et al*. Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **256**: 527–531.
9. Nagoshi S. Osteopontin: versatile modulator of liver diseases. *Hepatol Res* 2014; **44**: 22–30.
10. Patouraux S, Bonnafeux S, Voican CS, Anty R, Saint-Paul MC, Rosenthal-Allieri MA *et al*. The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 2012; **7**: e35612.
11. Chidlow G, Wood JP, Manavis J, Osborne NN, Casson RJ. Expression of osteopontin in the rat retina: effects of excitotoxic and ischemic injuries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**: 762–771.
12. Kossmehl P, Schonberger J, Shakibaei M, Faramarzi S, Kurth E, Habighorst B *et al*. Increase of fibronectin and osteopontin in porcine hearts following ischemia and reperfusion. *J Mol Med (Berl)* 2005; **83**: 626–637.
13. Baliga SS, Merrill GF, Shinohara ML, Denhardt DT. Osteopontin expression during early cerebral ischemia-reperfusion in rats: enhanced expression in the right cortex is suppressed by acetaminophen. *PLoS One* 2011; **6**: e14568.
14. Sodhi CP, Phadke SA, Battle D, Sahai A. Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. *Diabetes* 2001; **50**: 1482–1490.
15. Hwang SM, Lopez CA, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL, Laskin JD *et al*. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 711–715.
16. Truong LD, Sheikh-Hamad D, Chakraborty S, Suki WN. Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy. *Semin Nephrol* 1998; **18**: 641–651.
17. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1083–1093.
18. Noiri E, Dickman K, Miller F, Romanov G, Romanov VI, Shaw R *et al*. Reduced tolerance to acute renal ischemia in mice with a targeted disruption of the osteopontin gene. *Kidney Int* 1999; **56**: 74–82.
19. Persy VP, Verhulst A, Ysebaert DK, De Greef KE, De Broe ME. Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. *Kidney Int* 2003; **63**: 543–553.
20. Vinas JL, Sola A, Jung M, Mastora C, Vinuesa E, Pi F *et al*. Inhibitory action of Wnt target gene osteopontin on mitochondrial cytochrome c release determines renal ischemic resistance. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **299**: F234–F242.
21. Zhang ZX, Shek K, Wang S, Huang X, Lau A, Yin Z *et al*. Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 2010; **185**: 967–973.
22. Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F, Droin N, Luciano F, Ricci JE *et al*. Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 2809–2814.
23. Guo H, Cai CQ, Schroeder RA, Kuo PC. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *J Immunol* 2001; **166**: 1079–1086.
24. Gao C, Guo H, Mi Z, Grusby MJ, Kuo PC. Osteopontin induces ubiquitin-dependent degradation of STAT1 in RAW264.7 murine macrophages. *J Immunol* 2007; **178**: 1870–1881.
25. Sahai A, Pan X, Paul R, Malladi P, Kohli R, Whittington PF. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and osteopontin in steatosis and aminotransferase release by hepatocytes treated with methionine-choline-deficient medium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **291**: G55–G62.
26. Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH *et al*. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2011; **53**: 106–115.
27. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; **43**(2 Suppl 1): S31–S44.
28. Lorena D, Darby IA, Gadeau AP, Leen LL, Rittling S, Porto LC *et al*. Osteopontin expression in normal and fibrotic liver: altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J Hepatol* 2006; **44**: 383–390.
29. Koh HS, Matsui A, Mimura S, Inao M, Saitoh E, Ohno A *et al*. Increased cytoprotective function in the liver of transgenic mice expressing osteopontin in hepatocytes. *Hepatol Res* 2005; **32**: 46–51.
30. Wang Y, Chen B, Shen D, Xue S. Osteopontin protects against cardiac ischemia-reperfusion injury through late preconditioning. *Heart Vessels* 2009; **24**: 116–123.
31. Okamoto H, Imanaka-Yoshida K. Matricellular proteins: new molecular targets to prevent heart failure. *Cardiovasc Ther* 2012; **30**: e198–e209.
32. Persy VP, Verstrepen WA, Ysebaert DK, De Greef KE, De Broe ME. Differences in osteopontin up-regulation between proximal and distal tubules after renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 1999; **56**: 601–611.
33. Lacroque V, Mignon A, Fabre M, Viollet B, Rouquet N, Molina T *et al*. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat Med* 1996; **2**: 80–86.
34. Yamabe K, Shimizu S, Kamiike W, Waguri S, Eguchi Y, Hasegawa J *et al*. Prevention of hypoxic liver cell necrosis by in vivo human bcl-2 gene transfection. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **243**: 217–223.
35. Neuman MG. Apoptosis in diseases of the liver. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; **38**: 109–166.
36. Zhao J, Dong L, Lu B, Wu G, Xu D, Chen J *et al*. Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis. *Gastroenterology* 2008; **135**: 956–968.
37. Kim HJ, Lee HJ, Jun JI, Oh Y, Choi SG, Kim H *et al*. Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 15326–15331.
38. Colletti LM, Remick DG, Burch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr.. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; **85**: 1936–1943.
39. Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002; **122**: 202–210.
40. Beraza N, Ludde T, Assmus U, Roskams T, Vander Borcht S, Trautwein C. Hepatocyte-specific IKK gamma/NEMO expression determines the degree of liver injury. *Gastroenterology* 2007; **132**: 2504–2517.
41. Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A *et al*. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 2006; **101**: 1824–1833.
42. Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B *et al*. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006; **131**: 788–796.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

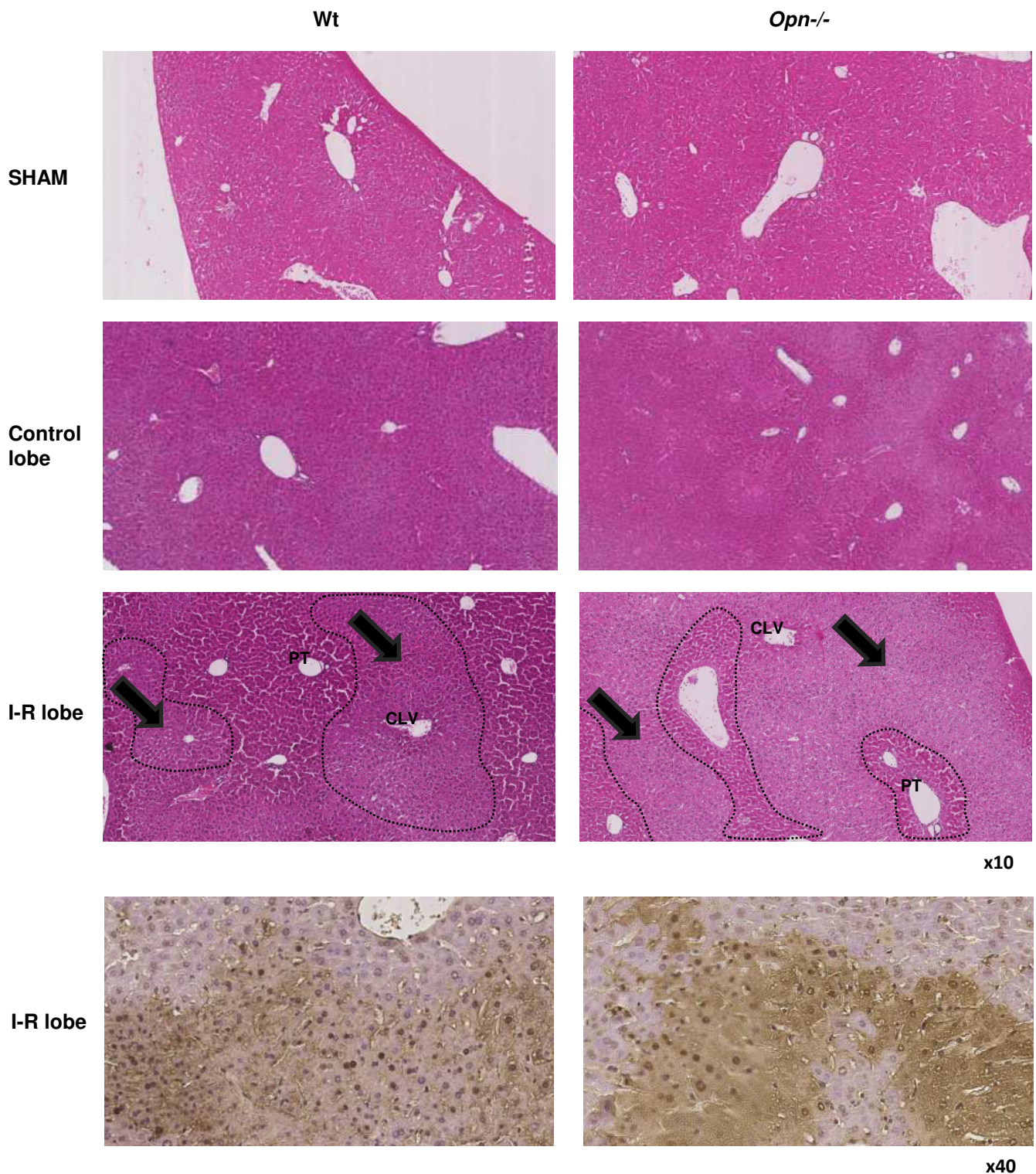


Figure S1. H&E staining of liver samples from Wt, *Opn*^{-/-} after I-R and SHAM mice. Typical pictures are shown. Dotted lines and arrows limit areas of necrosis; PT indicates portal triad; CLV indicates centrolobular vein. The TUNEL assay was performed on liver sections as described in the Materials and Methods section. The liver sections were then counterstained with hematoxylin. Typical pictures are shown.

DISCUSSION

Dans ce travail de thèse, nous montrons que l'expression d'OPN plasmatique, hépatique, et du tissu adipeux augmente lors des complications hépatiques associées à l'obésité et à l'alcoolisme chronique (stéatose, inflammation et fibrose) chez l'homme. L'expression d'OPN hépatique est aussi augmentée lors de l'ischémie-reperfusion dans un modèle murin.

Il apparaît que son rôle serait différent dans l'obésité et l'alcoolisme chronique (rôle plutôt délétère) et dans l'ischémie-reperfusion (rôle protecteur).

- Rôle délétère de l'OPN dans l'obésité et l'alcoolisme chronique

L'OPN favorise l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux et du foie et est un marqueur de fibrose hépatique dans l'obésité et l'alcoolisme.

- OPN : inflammation et insulino-résistance du tissu adipeux

Le lien entre l'OPN, l'inflammation et l'insulino-résistance observé sur notre cohorte de patients obèses morbides corrobore les données de la littérature (Gomez-Ambrosi, Catalan et al. 2007; Kiefer, Zeyda et al. 2008; Bertola, Deveau et al. 2009; Lima-Cabello, Garcia-Mediavilla et al. 2011; Morales-Ibanez, Dominguez et al. 2013). Les premiers résultats obtenus sur notre modèle murin, rapportant une diminution de l'inflammation et de l'insulino-résistance chez les souris déficientes en OPN, sans modification de la prise de poids, sont comparables avec plusieurs études (Nomiyama, Perez-Tilve et al. 2007; Chapman, Miles et al. 2010; Kiefer, Neschen et al. 2011; Aouadi, Tencerova et al. 2013). D'après la littérature, l'OPN semble participer à l'hypertrophie des adipocytes des souris soumises à un régime riche en graisse (Chapman, Miles et al. 2010; Lancha, Rodriguez et al. 2014). Dans ces études, la taille des adipocytes des souris invalidées pour l'OPN était inférieure à celle des souris sauvages. Les protéines impliquées dans la lipogenèse et la lipolyse n'étaient pas modifiées, alors que l'activité des protéinases de la matrice (MMP) était diminuée, suggérant un rôle de l'OPN dans l'expansion du tissu adipeux dû à l'obésité. Lors de l'obésité, l'OPN pourrait agir directement sur les adipocytes, en inhibant leur différenciation et leur sensibilité à l'insuline, notamment par l'activation de JNK. L'OPN activerait également les voies de l'inflammation dans les adipocytes lors de l'obésité, favorisant un stress cellulaire (Zeyda, Gollinger et al. 2011).

L'obésité est associée à une augmentation de macrophages dans le tissu adipeux. Notre équipe a démontré que l'OPN corrélait à l'infiltration macrophagique du tissu adipeux

(Bertola, Deveau et al. 2009). Les facteurs responsables de cette infiltration sont encore mal connus. Les adipocytes nécrotiques favorisent le recrutement des macrophages, dont la fonction sera de phagocyter les débris cellulaires (Cinti, Mitchell et al. 2005). La participation de chimiokines comme MCP1 (ou CCL2) et de son récepteur CCR2 reste controversée. Certaines études rapportent que la surexpression de MCP-1 entraîne une augmentation des macrophages (Kamei, Tobe et al. 2006) et que l'invalidation de CCR2 s'accompagne d'une diminution de l'infiltration macrophagique du tissu adipeux lors d'un régime riche en graisses (Weisberg, Hunter et al. 2006). Cependant, d'autres études suggèrent que d'autres facteurs seraient impliqués. Il a été rapporté que l'expression de MCP-1 augmentait au cours de l'obésité, mais que son invalidation ne modifiait pas l'infiltrat macrophagique (Chen, Mumick et al. 2005), et que l'invalidation de MCP-1 n'entraînait pas de diminution des macrophages lors d'un régime riche en graisse (Inouye, Shi et al. 2007). L'injection par voie intra veineuse de monocytes invalidés pour le récepteur CCR2 dans des souris obèses, ou l'injection de monocytes non modifiés dans des souris obèses déficientes en MCP-1 montrait une diminution de seulement 40% des macrophages dans le tissu adipeux (Oh, Morinaga et al. 2012). Ces études suggèrent que d'autres facteurs participeraient au recrutement des macrophages dans le tissu adipeux. Nos résultats montrent que l'OPN favoriserait l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux lors de l'obésité, en accord avec l'étude de Nomiya et coll. L'OPN produite au sein du tissu adipeux pourrait participer à l'attraction des macrophages. Mais surtout, il se pourrait que l'OPN exprimée par les macrophages facilite leur migration induite par MCP-1. En effet, les macrophages invalidés pour l'OPN présentent un défaut de migration en réponse à MCP-1 (Zhu, Suzuki et al. 2004; Nomiya, Perez-Tilve et al. 2007).

D'après nos résultats, dans l'obésité, l'OPN favoriserait l'infiltration macrophagique, mais également une polarisation pro-inflammatoire des macrophages. La polarisation des macrophages est dépendante de plusieurs facteurs. Au cours de l'obésité, les macrophages du tissu adipeux sont principalement de type pro-inflammatoire (Lumeng, Bodzin et al. 2007). CCR2 et les acides gras polyinsaturés favoriseraient une polarisation M1, (Lumeng, Bodzin et al. 2007; Nguyen, Favelyukis et al. 2007), alors que PPAR γ favoriserait une polarisation M2 (Bouhrel, Derudas et al. 2007). Il est intéressant de noter que PPAR γ régulerait négativement l'OPN (Nomiya, Perez-Tilve et al. 2007). Le rôle de l'OPN sur les

macrophages du tissu adipeux viscéral participerait également au développement de la résistance à l'insuline. L'invalidation de l'OPN dans les macrophages du tissu adipeux epididymaire de souris obèses améliore la sensibilité à l'insuline générale, sans modifier la production de cytokines inflammatoires. L'OPN améliorerait l'insulino-sensibilité par sa fonction paracrine, comme en témoigne l'augmentation de l'activation de la voie Akt par l'insuline lors de son invalidation (Aouadi, Tencerova et al. 2013).

Nous avons étudié en parallèle l'infiltration et la polarisation des lymphocytes du tissu adipeux lors de l'obésité. Nous montrons que chez l'homme, l'infiltration du tissu adipeux par les lymphocytes T augmente progressivement lors de l'obésité et de l'insulino-résistance et corrèle avec le niveau d'expression génique d'OPN. Dans notre modèle murin, l'invalidation de l'OPN prévient l'enrichissement du tissu adipeux en lymphocytes T, et favorise une polarisation anti-inflammatoire des cellules immunitaires. Réciproquement, l'injection d'OPN entraîne une infiltration de cellules inflammatoires dans le tissu adipeux et favorise une polarisation de type Th1, pro-inflammatoire. L'infiltration du tissu adipeux par les lymphocytes T au cours de l'obésité a récemment été rapportée. Les lymphocytes T CD8 au contact des macrophages interagissent avec ces cellules (Monney, Sabatos et al. 2002; Wu, Ghosh et al. 2007; Rausch, Weisberg et al. 2008; Nishimura, Manabe et al. 2009). Cet infiltrat précéderait l'infiltration d'un nouveau pool de macrophages M1 et initierait l'insulino-résistance du tissu adipeux (Kintscher, Hartge et al. 2008). Il se pourrait que les LT attirent les monocytes et les polarisent en M1, via la sécrétion d'IFN γ (Rocha, Folco et al. 2008). Si lors de l'obésité, les lymphocytes sont majoritairement CD8, les lymphocytes T CD4 sont également présents. Comme nous l'avons vu, les lymphocytes T CD4 (ou auxiliaires) peuvent être polarisés. Lors de l'obésité, il existe une augmentation des lymphocytes T de type Th1 et Th17, pro-inflammatoires et une diminution des lymphocytes Th2 et Treg (Gutcher and Becher 2007). Cette diminution des Treg favoriserait l'inflammation et l'insulino-résistance (Feuerer, Herrero et al. 2009; Winer, Chan et al. 2009). Le rôle de l'OPN dans la polarisation des lymphocytes T est connu. L'OPN entraîne une polarisation des lymphocytes T en type Th1, pro-inflammatoire (Ashkar, Weber et al. 2000). Aucune étude n'a mis en évidence le rôle de l'ostéopontine sur l'infiltration et la polarisation des lymphocytes T dans l'obésité. Ceci pourrait contribuer à augmenter l'infiltration macrophagique et leur polarisation en type inflammatoire.

Dans l'obésité, l'OPN pourrait favoriser le recrutement de LT et modulerait leur polarisation en type pro-inflammatoire (Th1, augmentation de l'expression d'IFN γ), et une diminution des Treg dans le TA. L'OPN favoriserait donc l'inflammation et l'insulino-résistance directement via les macrophages, mais également via les lymphocytes T, qui à leur tour pourront favoriser le recrutement de nouveaux macrophages M1 et moduler leur réponse.

➤ OPN et complications hépatiques liées à l'obésité et à l'alcoolisme

Nous montrons que l'OPN joue un rôle dans les complications hépatiques liées à l'obésité et à l'alcoolisme chronique. Nous rapportons chez les patients alcooliques une corrélation entre l'expression de l'OPN et l'infiltrat en polynucléaires neutrophiles. Il a été rapporté que l'expression hépatique et plasmatique de l'OPN était augmentée dans les lésions hépatiques induites par l'alcool sur un modèle murin et participerait à l'infiltration par les polynucléaires neutrophiles (Banerjee, Apte et al. 2006; Banerjee, Burghardt et al. 2006; Koh, da Silva et al. 2007; Kohan, Bader et al. 2007; Banerjee, Lee et al. 2008). Au cours de l'obésité, nous montrons que l'expression hépatique de l'OPN est augmentée et que son invalidation améliore la stéatose et l'inflammation hépatique. Nos résultats sont en accord avec la littérature (Sahai, Malladi et al. 2004; Kiefer, Zeyda et al. 2010; Kwon, Won et al. 2010; Kiefer, Neschen et al. 2011).

Dans le foie, chez l'homme, c'est lors de l'inflammation (NASH) que la corrélation entre l'expression génique de l'OPN et l'infiltration par des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD8, peut s'observer. Dans notre cohorte, le nombre de lymphocytes T CD4 n'est pas augmenté avec la stéatohépatite. Il se pourrait que chez l'homme, l'OPN joue un rôle prépondérant sur la polarisation des LT CD4, et non sur leur migration vers le foie. En effet, nous avons mis en évidence le rôle de l'OPN sur la polarisation des lymphocytes T dans des modèles murins de stéatose et de stéatohépatite.

Dans la stéatohépatite, le recrutement des lymphocytes vers le foie pourrait être dû à la stéatose, et à la capacité intrinsèque des lymphocytes à migrer vers le foie. Le LPS, augmenté dans l'obésité, favoriserait cette capacité migratoire des lymphocytes (Bigorgne, Bouchet-Delbos et al. 2008). Des souris surexprimant l'OPN au niveau des hépatocytes développent spontanément une hépatite associée aux lymphocytes T CD8 et à une augmentation des marqueurs de la voie Th1 (Mochida, Yoshimoto et al. 2004). Nous n'avons cependant pas pu observer d'effet de l'invalidation de l'OPN dans le recrutement des

lymphocytes T hépatiques. D'après nos résultats, l'OPN favoriserait le développement de l'inflammation hépatique en modulant une réponse inflammatoire Th1. Le rôle de l'OPN sur l'évolution des complications hépatiques (stéatose vers NASH) est aussi dépendant de l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux. Cette notion a été rapportée par une étude sur des souris obèses diabétiques (*db/db*) soumises à un régime MCD, induisant une NASH. L'inflammation, la souffrance et la fibrose hépatique et l'expression de l'OPN étaient supérieures chez ces souris que chez les souris obèses non-insulino-résistantes (*ob/ob*) soumises à ce même régime (Sahai, Malladi et al. 2004).

L'invalidation de l'OPN diminue aussi la sécrétion d'IL-17. Il a été récemment montré que l'IL-17 favorise la fibrose hépatique en augmentant l'inflammation pro-fibrosante (IL-6, TGF β , TNF α , IL-8) ou en activant directement les cellules stellaires (Meng, Wang et al. 2012; Tan, Qian et al. 2013). L'IL-22 sécrétée par les lymphocytes lors d'une réponse de type Th17 n'est pas modifiée chez les souris invalidées pour l'OPN. Il a été rapporté que l'IL22 diminuerait la fibrose hépatique en induisant la sénescence des cellules stellaires du foie et la prolifération des hépatocytes (Kong, Feng et al. 2012; Kong, Feng et al. 2013). L'OPN pourrait donc faciliter le développement de la fibrose hépatique en stimulant la production d'IL-17. Il serait intéressant de déterminer si cette forte augmentation de l'expression de l'OPN dans le TA ne pourrait pas aussi favoriser la fibrose du TA via l'IL-17.

En effet, la stéatohépatite évoluera vers la fibrose hépatique, mais peu de nos patients obèses présentent une fibrose avancée ou une cirrhose. Nous avons donc étudié l'OPN à partir de patients alcooliques, chez qui la fibrose avancée et la cirrhose sont plus représentées.

Nos résultats rapportent l'augmentation de l'OPN lors de l'inflammation et de la fibrose hépatique chez les patients alcooliques. Récemment, il a été rapporté que l'expression hépatique de l'OPN était altérée dans le foie de patients alcooliques présentant une hépatite et une fibrose (Seth, Gorrell et al. 2006; Morales-Ibanez, Dominguez et al. 2013). A partir de modèles murins, plusieurs études ont rapportés le rôle de l'OPN dans l'inflammation hépatique, notamment l'infiltration par des polynucléaires neutrophiles. L'OPN serait sécrétée par les cellules des canalicules biliaires, les macrophages et les cellules étoilées (Apte, Banerjee et al. 2005; Banerjee, Apte et al. 2006; Banerjee, Burghardt et al. 2006; Banerjee, Lee et al. 2008; Morales-Ibanez, Dominguez et al. 2013).

L'OPN est impliqué dans la fibrogénèse hépatique. L'invalidation de l'OPN prévient la fibrose induite par un régime MCD (méthionine choline déficient) dans un modèle murin (Sahai, Malladi et al. 2004; Syn, Choi et al. 2011). Les mécanismes impliqués dans le rôle profibrogénique de l'OPN seraient communs à plusieurs facteurs étiologiques de fibrose hépatique. L'augmentation de l'OPN lors de la cirrhose a en effet été rapportée dans les maladies alcooliques et non alcooliques du foie, dans la cirrhose biliaire primitive, dans la cholangite sclérosante primitive et dans les hépatites auto-immunes. Nous rapportons que l'OPN circulant est corrélée au degré de fibrose chez les patients porteurs du virus C. Lors de l'hépatite B, l'OPN plasmatique est aussi un excellent facteur prédictif de cirrhose (Zhao, Li et al. 2008). La sécrétion de l'OPN par les cellules canaliculaires biliaires, les cellules NKT et les cellules étoilées favoriserait la fibrose hépatique. L'expression de l'OPN dans ces cellules serait dépendante de la voie hedgehog (Hh) (Syn, Choi et al. 2011; Syn, Agboola et al. 2012). L'OPN sécrétée aurait alors une fonction paracrine ou autocrine sur les cellules étoilées, qui entrainerait le développement de la fibrose. En effet, l'OPN est nécessaire à la différenciation en myofibroblastes. Son expression est augmentée dans cellules étoilées activées (Kawashima, Mochida et al. 1999; Lee, Seo et al. 2004; Lenga, Koh et al. 2008) et entraîne la production de collagène et l'augmentation de l'expression du TGF β *in vitro* (Lee, Seo et al. 2004). De plus, l'OPN, sous la dépendance de la voie Hh induirait dans les cellules progénitrices une différenciation en hépatocytes, permettant la régénération cellulaire en réponse à la perte cellulaire, mais également une différenciation en myofibroblastes, par l'activation du mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, l'OPN agirait sur les cellules étoilées, mais également sur les hépatocytes. Sous l'influence du TGF β , les hépatocytes subissent une transition épithélio-mésenchymateuse. Leur différenciation en fibroblastes participerait à la fibrose hépatique (Zeisberg, Yang et al. 2007). L'OPN pourrait être impliquée dans cette transition épithélio-mésenchymateuse des hépatocytes. Dans le VHC, il a été récemment décrit que l'OPN entrainerait une transition des hépatocytes, exprimant un marqueur épithélial, la E-cadherine, en cellules mésenchymateuses, exprimant la N-cadherine. Cette transition se ferait via l'activation et la phosphorylation d'Akt, ce qui permet la stabilisation de la β -caténine et son accumulation nucléaire. Cette dernière active la transcription de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Iqbal, McRae et al. 2013; Iqbal, McRae et al. 2014). La voie Hh serait activée par des cytokines profibrogéniques, et le ligand Hh serait produit par les hépatocytes en souffrance, les cellules

étoilées et les cellules immunes du foie (Machado and Cortez-Pinto 2011). La voie Hh induirait la production d'OPN via Sox9 (Pritchett, Harvey et al. 2012).

D'autres facteurs impliqués dans la pathogenèse des maladies alcooliques du foie peuvent provenir de sites extra-hépatiques, en particulier le tissu adipeux. Sur notre cohorte de patients alcooliques, le niveau d'expression de l'OPN du tissu adipeux augmente avec le degré de fibrose. Il a été rapporté que l'excès de poids était un facteur de risque indépendant de stéatose, d'hépatite alcoolique aiguë et de cirrhose chez les patients avec une hépatopathie alcoolique (Naveau, Giraud et al. 1997). L'indice de masse corporelle (IMC) est un facteur de risque indépendant de la fibrose chez les patients alcooliques non obèses (Raynard, Balian et al. 2002). Lors de l'alcoolisme chronique, il existe une inflammation du tissu adipeux. L'expression de cytokines inflammatoires (LPS, l'IL-6, TNF α) est augmentée dans le tissu adipeux de patients alcooliques. Plus récemment, Naveau *et coll.* ont démontré que l'inflammation du tissu adipeux était corrélée avec la sévérité des lésions observées dans le foie des patients alcooliques (Naveau, Cassard-Doulcier et al. 2010). L'augmentation de l'OPN dans le tissu adipeux pourrait être due à l'activation des macrophages du tissu adipeux par le LPS ou par des cytokines inflammatoires comme le TNF α ou l'IL-6, augmentés chez les alcooliques (Lucey, Mathurin et al. 2009; Naveau, Cassard-Doulcier et al. 2010). Les mécanismes impliqués dans l'inflammation du tissu adipeux restent à préciser, mais il se pourrait que l'OPN favorise le recrutement de macrophages dans le tissu adipeux et l'inflammation, comme nous l'avons rapporté au cours de l'obésité. Dans le cas des patients alcooliques, l'augmentation de l'expression de l'OPN ne serait pas secondaire à l'hypertrophie du tissu adipeux, mais à l'inflammation. Cela est conforté par le fait que le niveau d'OPN n'est pas corrélé avec l'IMC. Dans notre étude, l'OPN est facteur prédictif indépendant de fibrose hépatique. A partir d'un groupe de 60 patients, nous avons observé que l'IMC n'était pas corrélé au degré de fibrose hépatique. Cependant, un plus grand nombre de patients seraient nécessaires afin de confirmer ces résultats.

De plus en plus de patients associent deux facteurs de risque de développer une atteinte hépatique : l'obésité et l'alcoolisme chronique. L'association de ces deux facteurs favorise le développement et la sévérité des complications hépatiques.

- L'OPN plasmatique comme marqueur prédictif de fibrose

Dans notre travail, les niveaux d'expression de l'OPN du foie et du tissu adipeux augmentent avec le degré de fibrose chez les patients alcooliques et l'OPN plasmatique est un facteur prédictif indépendant de fibrose chez les alcooliques (fibrose ≥ 2). Une étude récente a confirmé cette augmentation de l'OPN plasmatique chez les patients alcooliques (Morales-Ibanez, Dominguez et al. 2013) et plusieurs études rapporte cette augmentation lors de l'obésité (Gomez-Ambrosi, Catalan et al. 2007; Bertola, Deveau et al. 2009). Les modèles murins d'hépatite alcoolique présentent eux aussi une augmentation du taux plasmatique d'OPN (Apte, Banerjee et al. 2005), et dans des modèles murins de fibrose hépatique, l'expression d'OPN est augmentée dans le sérum (Sahai, Malladi et al. 2004; Lorena, Darby et al. 2006; De Minicis, Seki et al. 2007). A contrario, dans l'obésité, l'augmentation du niveau d'OPN plasmatique est sujette à controverse chez la souris (Nomiya, Perez-Tilve et al. 2007; Kiefer, Zeyda et al. 2008; Lancha, Moncada et al. 2014). A l'heure actuelle, l'implication du foie et du tissu adipeux dans le niveau d'OPN plasmatique n'est pas encore établie. Dans l'obésité, notre équipe a démontré que l'OPN produite par le tissu adipeux n'était pas sécrétée dans la circulation générale et aurait une action locale (Bertola, Deveau et al. 2009). Le niveau d'expression hépatique de l'OPN est corrélé au niveau d'OPN plasmatique dans notre travail sur les patients alcooliques. Ces résultats suggèrent que l'OPN plasmatique a une origine hépatique. L'OPN est exprimée par plusieurs types cellulaires présents dans le foie : hépatocytes, macrophages, cellules de Kupffer, cellules étoilées, cellules épithéliales biliaires, et cellules inflammatoires (Sahai, Malladi et al. 2004; Lorena, Darby et al. 2006; De Minicis, Seki et al. 2007). Il reste à déterminer quel type cellulaire participe à la sécrétion d'OPN dans la circulation et quelle est la fonction de l'OPN plasmatique.

Dans les maladies hépatiques liées à l'alcool ou à l'obésité, comme dans les autres causes d'hépatopathies, l'évaluation de la fibrose est nécessaire. Elle permet de définir la prise en charge du patient (simple surveillance, mise en place d'un traitement, surveillance des complications liées à une fibrose avancée ou à la cirrhose), et de surveiller l'évolution naturelle ou sous traitement de la pathologie hépatique. Elle permet aussi de définir le pronostic du patient. La biopsie hépatique est la méthode de référence pour évaluer la fibrose hépatique. Toutefois la biopsie a certains inconvénients. Il s'agit d'un geste invasif, entraînant des complications de type douleur dans 30%, des complications plus sévères

(hémorragies en particulier) dans 0.3% des cas et un décès dans 0.03% (Cadranel, Rufat et al. 2000). Les limites de l'interprétation histopathologique sont dues aux biais d'échantillonnage (la biopsie intéresse 0.002% du volume total du foie et ne reflète pas forcément l'atteinte globale du foie), et à la variabilité intra et inter observateur (Ratziu, Charlotte et al. 2005).

Devant les risques et les limites de la biopsie hépatique, plusieurs marqueurs de fibrose ont été identifiés et des modèles ont été mis au point (Chrostek and Panasiuk 2014). La plupart des méthodes sont performantes pour le diagnostic de fibrose à un stade avancé (F3, F4), mais demeurent insuffisantes pour discerner les différents stades précoces de fibrose (F0, F1, F2). Nous rapportons que l'OPN est un marqueur prédictif indépendant de fibrose ≥ 2 chez les patients alcooliques. Nous avons aussi montré que les marqueurs sériques d'apoptose et de mort hépatocytaires sont des bio-marqueurs non invasifs de fibrose chez les patients ayant une hépatopathie alcoolique (Lavallard, Bonnaïous et al. 2011). L'étude de Naveau *et coll.* rapportait que le Fibrotest®, le Fibromètre® et l'Hépatoscore avaient une bonne capacité à prédire une fibrose modérée (≥ 2), et une excellente capacité à prédire la cirrhose. De plus, ces modèles corrélaient avec le degré de fibrose (Naveau, Gaude et al. 2009). Ils prédisent également la mortalité indépendante des complications hépatiques. Il serait intéressant d'étudier la valeur pronostic sur la survie de l'OPN.

Le FibroTest® est le test le plus utilisé en France. Il a été initialement mis au point pour diagnostiquer la fibrose significative dans les hépatites chroniques virales C et B, et alcooliques. Par la suite, il été validé pour les maladies du foie non alcooliques (Imbert-Bismut, Ratziu et al. 2001; Naveau, Raynard et al. 2005; Thabut, Naveau et al. 2006; Poynard, Morra et al. 2007). Il existe un certain nombre de causes assez bien identifiées de faux positifs et faux négatifs du FibroTest®, dues à une modification d'un des différents paramètres indépendamment de l'atteinte hépatique (hémolyse, maladie de Gilbert, cholestase, inflammation aiguë). Ce test est recommandé en première intention dans l'hépatite virale C, avant la biopsie hépatique, pour l'évaluation de la fibrose. Les FibroMètres® sont des tests permettant d'évaluer le degré de fibrose et l'aire de fibrose à l'aide de paramètres variables selon l'étiologie (Cales, Oberti et al. 2005). Le dosage de l'OPN pourrait être un élément intéressant dans l'évaluation de la fibrose hépatique, évitant le recours à la biopsie hépatique.

- Rôle protecteur de l'OPN dans l'ischémie-reperfusion hépatique

Notre travail est la première étude sur l'OPN lors de l'ischémie-reperfusion hépatique. Nous rapportons que l'OPN hépatique et plasmatique est augmentée lors de l'ischémie-reperfusion hépatique chez la souris, et que l'OPN préviendrait les lésions dues à l'ischémie-reperfusion, dans nos conditions (45min d'ischémie suivie de 4h de reperfusion). Les effets de l'OPN dans des conditions plus stringentes et des temps de reperfusion plus long, associés à une fibrose, restent à être étudiés. L'expression de l'OPN et son rôle lors de l'ischémie-reperfusion a été étudiée dans d'autres organes, comme le rein, le cerveau et le cœur.

- OPN et survie hépatocytaire

Dans l'étude de Koh *et coll.*, des souris ont été traitées avec du tétrachlorure de carbone (CCl₄). Les souris surexprimant l'OPN présentaient moins de lésions hépatiques après l'administration de CCl₄ comparées aux souris sauvages contrôles (Koh, Matsui et al. 2005). Les souris invalidées pour l'OPN présentaient une nécrose hépatique et une fibrose plus importante que les souris sauvages (Lorena, Darby et al. 2006). Dans ce modèle de souffrance hépatique, l'OPN favoriserait la survie des hépatocytes et diminuerait l'inflammation.

Les mécanismes impliqués dans la survie cellulaire ne sont pas complètement élucidés. *In vivo*, l'effet protecteur de l'OPN prédomine sur la prévention de la nécrose cellulaire. Il se pourrait que la nécrose observée lors de l'ischémie-reperfusion soit le résultat d'une apoptose avortée, en raison du manque d'ATP. Nous avons pu mettre en évidence que l'OPN augmente le niveau d'ATP, comme le suggère la baisse de ce niveau dans les cellules invalidées pour l'OPN. Il a été rapporté que l'OPN augmenterait la production d'ATP par activation de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les cellules carcinomateuses mammaires circulantes. Ces cellules tumorales quittent la tumeur primaire et rejoignent la circulation sanguine et/ou lymphatique afin de disséminer dans l'organisme sous la forme de métastases. Sans matrice, elles sont alors soumises à un défaut d'énergie et de production d'ATP. L'OPN favoriserait leur survie en augmentant le niveau de glucose intracellulaire et en augmentant la production d'ATP (Shi, Mirza et al. 2014; Shi, Wang et al. 2014). De plus, l'invalidation de l'OPN diminue l'expression de Bcl-2, protéine anti apoptotique. Il avait été rapporté que Bcl-2 prévient l'apoptose hépatocytaire et la nécrose cellulaire induite par

l'ischémie-reperfusion (Lacronique, Mignon et al. 1996; Yamabe, Shimizu et al. 1998; Neuman 2001). L'OPN protège aussi de la mort hépatocytaire induite par le TNF α (Neuman 2001), dont l'expression est augmentée après ischémie-reperfusion dans notre modèle. L'OPN pourrait donc prévenir la mort hépatocytaire induite par ischémie-reperfusion en augmentant Bcl-2, ce qui rendrait moins sensibles les hépatocytes au TNF α . Cette association entre l'OPN et l'expression de Bcl2 a été rapporté dans le carcinome hépatocellulaire. L'OPN préviendrait l'apoptose des cellules tumorales et favoriserait leur survie, en augmentant la production de Bcl-2 et en activant les voies Akt et NF- κ B (Zhao, Dong et al. 2008; Cao, Li et al. 2012).

➤ OPN : propriétés anti-inflammatoires

Le rôle protecteur de l'OPN pourrait également être dû à ses propriétés anti-inflammatoires. Dans notre travail, l'inactivation de l'OPN s'accompagne d'une augmentation de l'expression hépatique de cytokines inflammatoires et d'iNOS. Il a été clairement montré que le TNF α et le NO, produit par iNOS sont responsables de lésions hépatiques lors de l'ischémie-reperfusion (Taniai, Hines et al. 2004; Hamada, Duarte et al. 2009). L'OPN induit dans les macrophages une inhibition d'iNOS via la dégradation de STAT-1, et donc la diminution de l'expression de NO (Gao, Mi et al. 2007). Nous mettons en évidence que l'OPN diminue la production de cytokines inflammatoires par les macrophages en réponse au LPS.

L'OPN endogène conférerait une résistance partielle à la mort cellulaire induite par la déprivation en oxygène et le TNF α dans les hépatocytes, en augmentant Bcl-2 et l'ATP. Cette diminution de la mort hépatocytaire diminuerait l'activation des macrophages. De plus, dans les macrophages activés (M1), l'OPN régule la production de cytokines inflammatoires et de NO via iNOS. La mort hépatocytaire induite par l'inflammation serait alors moindre. Les effets de l'OPN à plus long terme doivent être étudiés.

- L'OPN : une protéine complexe

L'OPN est une protéine impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Dans le foie, l'OPN est augmentée au cours de lésions induites par l'obésité, l'alcoolisme chronique et l'ischémie-reperfusion. Cependant, elle va jouer des rôles différents.

Cette capacité de l'OPN à entraîner des réponses différentes dans un même organe a été rapportée dans un modèle d'allergie des voies aériennes. Lors de l'allergie, des agents environnementaux entraînent une réponse inflammatoire de type Th2 excessive. Cette étude démontre que l'OPN aurait des effets opposés lors de la première exposition à l'agent allergène (rôle pro-inflammatoire) et des expositions suivantes (rôle anti-inflammatoire) (Xanthou, Alissafi et al. 2007). Dans un modèle murin de lupus systémique, l'OPN semble favoriser la réponse pathologique dans les phases précoces de la maladie, alors qu'elle aurait un rôle protecteur lors de la phase tardive (Weber and Cantor 2001).

Très récemment, le rôle protecteur de l'OPN lors de l'hépatite alcoolique a été décrit. Le modèle murin utilisé développait des lésions d'hépatite alcoolique chronique (régime riche en cholestérol et acides gras saturés associé à l'administration intragastrique d'éthanol au long cours). Pour obtenir des lésions d'hépatite alcoolique aiguë, un gavage d'éthanol hebdomadaire était réalisé (« alcohol binge »). L'invalidation de l'OPN ne prévenait pas les lésions d'hépatite alcoolique aiguë. Certaines souris OPN^{-/-} (3/7 souris) développaient des lésions d'hépatite alcoolique aiguë même en l'absence de gavage aigu. Dans ce modèle, l'OPN protégerait de la survenue d'hépatite alcoolique aiguë. Cette étude récente propose un nouveau modèle d'hépatite alcoolique aiguë, et a été réalisée sur un petit nombre de souris. Les résultats obtenus sont hétérogènes et restent à confirmer (Lazaro, Wu et al. 2014). Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, l'OPN pourrait prévenir l'inflammation hépatique en se liant au LPS. Au cours de l'alcoolisme chronique, il y a une perte de l'intégrité de la muqueuse intestinale, permettant une translocation de LPS favorisant l'inflammation hépatique. L'OPN aurait la capacité de se lier au LPS, tant au niveau de la muqueuse intestinale que dans le foie, prévenant ainsi les lésions hépatiques (Ge, Lu et al. 2013; Ge, Leung et al. 2014).

L'étude de Lazaro *et coll.* souligne la complexité à étudier les effets d'une protéine à partir de modèles murins. Cette difficulté est accentuée lorsque la protéine étudiée a plusieurs formes. Dans le cas de l'OPN, le gène *spp1* est soumis à une traduction alternative, à un épissage alternatif, et la protéine OPN est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles.

La traduction alternative entraîne la production de la forme sécrétée (OPNs) ou intracellulaire (OPNi) de l'OPN. Ces deux formes ont des rôles différents. L'OPNs est impliquée

dans la prolifération, la survie, la migration, l'activation et la sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules de l'immunité. L'OPNi est impliquée dans la motilité cellulaire (via son interaction avec le complexe CD44-ERM et l'actine), et dans la division cellulaire (via son interaction avec la protéine Plk-1 impliqué dans le cycle mitotique). L'OPNi est également une protéine adaptatrice impliquée dans la réponse immune, dont les effets précis restent à définir (Inoue and Shinohara 2011). Les formes sécrétée et intracellulaire de l'OPN sont obtenues à partir d'un même ARN messenger. Dans les modèles murins utilisés, il est intéressant de noter que l'utilisation d'anticorps anti-OPN inhibera les fonctions de l'OPN sécrétée, et non de l'OPN intra-cellulaire. L'utilisation de modèles invalidés pour l'OPN inhibera les effets de l'OPN sécrétée et intra-cellulaire. De même chez l'homme, la quantification de la protéine OPN ou du gène de l'OPN, pourra, selon les organes ou cellules étudiées correspondre à une ou deux formes de l'OPN.

L'épissage alternatif entraîne la génération de plusieurs isoformes de l'OPN, dont le rôle pourrait varier selon le type cellulaire et les conditions physiologiques ou pathologiques. De plus, la protéine OPN est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelle. C'est dans la pathologie cancéreuse que le rôle des isoformes de l'OPN a été le plus étudié. Selon le type de cancer, une isoforme sera plus exprimée, et son rôle sera différent (Gimba and Tilli 2013). Dans le carcinome hépatocellulaire, une étude rapporte que le tissu tumoral exprime les isoformes OPNa et OPNb, alors que le tissu sain exprime l'isoforme OPNc. Les effets de l'OPN sont différents selon le type de lignées cellulaires étudiées et l'isoforme. Sur les hépatocytes non carcinomateux, l'OPNa et l'OPNb induirait la migration des cellules et l'OPNc n'aurait pas d'effet, alors qu'elle diminuerait la migration de cellules hépatocytaires carcinomateuses (Chae, Jun et al. 2009). Une autre étude révèle que l'expression de l'OPNc chez les patients serait corrélée à l'invasion cellulaire et à la dissémination métastatique (Takafuji, Forgues et al. 2007). La régulation de cet épissage alternatif n'est pas encore connue.

Enfin les nombreuses modifications post-traductionnelles de l'OPN pourrait aussi moduler ses fonctions. Par exemple, il a été rapporté que le syndecan-4, un glycosaminoglycane héparine-like se lie sur un domaine de liaison à l'héparine de l'OPN et empêche son clivage par la thrombine, et l'exposition du domaine de liaison aux intégrines. Dans un modèle d'hépatite fulminante, induit chez la souris par un traitement à la concavaline A,

l'invalidation du syndecan-4 aggrave les lésions hépatiques. En bloquant le clivage par la thrombine et le domaine de liaison aux intégrines, le syndecan-4 protège des lésions hépatiques (Kon, Ikesue et al. 2008).

Il serait intéressant de déterminer quel est la forme (intra-cellulaire ou sécrétée), l'isoforme (a,b ou c) principalement produit et quelles sont les modifications post-traductionnelles survenant lors des différentes complications hépatiques que nous avons étudiées. Ceci permettrait d'expliquer en partie les effets observés lors de l'invalidation de l'OPN dans nos différentes conditions. Il se peut également que l'OPN protège de l'apoptose hépatocytaire, par les mécanismes que nous avons évoqués, mais que ces effets soient insuffisant dans la souffrance survenant lors de l'obésité et de l'alcoolisme, et que le rôle pro-inflammatoire de l'OPN prime sur son rôle anti-apoptotique.

CONCLUSION

Les résultats présentés dans ce document permettent de mettre en évidence et de mieux comprendre le rôle de l'OPN dans les complications hépatiques liées à l'obésité et à l'alcoolisme chronique.

La stéatose hépatique, touchant 90% des patients obèses et alcooliques est diminuée en l'absence d'OPN. Cet effet de l'OPN est probablement secondaire à l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux, favorisées par l'OPN. L'OPN pourrait aussi avoir un effet sur le stockage des acides gras intra-cytoplasmique dans les hépatocytes, en régulant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des triglycérides ou dans la formation des gouttelettes lipidiques.

L'OPN favorise l'inflammation du tissu adipeux et du foie. L'OPN favorise la migration dans le tissu adipeux des macrophages et leur polarisation en cellules sécrétant des cytokines inflammatoires. Nous montrons que l'OPN favorise également l'infiltration du tissu adipeux par des lymphocytes T Th1, pro-inflammatoires et diminue la présence de lymphocytes Treg. Ce profil pro-inflammatoire favorise l'insulino-résistance. Il reste à déterminer si cette polarisation induite par l'OPN sur les LT est due à un effet direct ou via les cellules dendritiques.

Dans le foie, nous avons montré que l'OPN induit une polarisation pro-inflammatoire des lymphocytes T, lors de la stéatohépatite. En favorisant l'inflammation hépatique, l'OPN faciliterait le développement de la fibrose hépatique. Elle aurait également un rôle pro-fibrosant direct, en agissant sur les cellules stellaires hépatiques. L'inflammation du tissu adipeux chez les patients alcooliques ainsi que l'endotoxémie due à la perméabilité de la barrière intestinale seraient également impliquées. Les rôles de l'OPN sur ces facteurs (rôle délétère dans le tissu adipeux, rôle protecteur dans la muqueuse intestinale) restent à préciser. Nous rapportons également que l'OPN plasmatique serait un nouveau marqueur de fibrose modérée chez les patients alcooliques.

L'OPN agissant à tous les stades de l'évolution des lésions hépatiques observées dans l'obésité et dans l'alcoolisme chronique, elle serait une cible thérapeutique intéressante. D'autant plus que l'OPN est négativement régulée par les agonistes des PPAR γ , utilisés dans le traitement du diabète de type II (thiazolidinediones).

Dans les lésions hépatiques précoces induites par l'ischémie-reperfusion, l'OPN aurait au contraire un rôle protecteur, en favorisant la survie hépatocytaire et en diminuant l'inflammation due aux macrophages. Des études sont nécessaires pour déterminer le rôle de l'OPN dans les phases tardives de l'ischémie-reperfusion (régénération/fibrose). Cette même protéine peut donc être délétère ou protectrice vis-à-vis du parenchyme hépatique. Il serait intéressant de déterminer le rôle prépondérant de chaque isoformes de l'OPN, et par quels mécanismes ils sont régulés. Des approches de neutralisation de l'OPN (injection d'anticorps et de forme soluble de sCD44) mais aussi de maturation de cette OPN (prévenir son clivage par la thrombine via l'injection de syndecan-4) nous permettraient aussi d'évaluer si le ciblage de l'OPN peut prévenir ou corriger les maladies chroniques du foie.

ANNEXES

1: Hepatic Expression Patterns of Inflammatory and Immune Response Genes Associated with Obesity and NASH in Morbidly Obese Patients

Adeline Bertola, Stéphanie Bonnaïfous, Rodolphe Anty, Stéphanie Patouraux, Marie-Christine Saint-Paul, Antonio Iannelli, Jean Gugenheim, Jonathan Barr, José M. Mato, Yannick Le Marchand-Brustel, Albert Tran, Philippe Gual

PLoS ONE 5(10): e13577. doi:10.1371/journal.pone.0013577

2: A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients

R. Anty, A. Iannelli, S. Patouraux, S. Bonnaïfous, V. J. Lavallard, M. Senni-Buratti, I. Ben Amor, A. Staccini-Myx, M.-C. Saint-Paul, F. Berthier, P.-M. Huet, Y. Le Marchand-Brustel, J. Gugenheim, P. Gual, A. Tran

Aliment Pharmacol Ther 2010; 32: 1315–1322

3: Serum Markers of Hepatocyte Death and Apoptosis Are Non Invasive Biomarkers of Severe Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease

Lavallard VJ, Bonnaïfous S, Patouraux S, Saint-Paul M-C, Rousseau D, Rodolphe A, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P

PLoS ONE 6(3): e17599. doi:10.1371/journal.pone.0017599

4: Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in a cohort mainly composed of morbidly obese European women with NAFLD undergoing bariatric surgery

Rodolphe Anty, Sophie Marjoux, Antonio Iannelli, Stéphanie Patouraux, Anne-Sophie Schneck, Stéphanie Bonnaïfous, Camille Gire, Anca Amzoloni, Imed Ben-Amor, Marie-Christine Saint-Paul, Eugenia Mariné-Barjoan, Alexandre Pariente, Jean Gugenheim, Philippe Gual, Albert Tran

Journal of Hepatology 2012 vol. 57 j 1090–1096

5: Effects of sleeve gastrectomy in high fat diet-induced obese mice: respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots

Anne-Sophie Schneck, Antonio Iannelli, Stéphanie Patouraux, Déborah Rousseau, Stéphanie Bonnaïfous, Beatrice Bailly-Maitre, Ophélie Le Thuc, Carole Rovere, Patricia Panaia-Ferrari, Rodolphe Anty, Albert Tran, Philippe Gual, Jean Gugenheim

Surg Endosc (2014) 28:592–602 593

6: Obesity and non-alcoholic fatty liver disease

R. Anty, S. Patouraux, A. Tran, P. Gual

Obésité DOI 10.1007/s11690-014-0414-4

Hepatic Expression Patterns of Inflammatory and Immune Response Genes Associated with Obesity and NASH in Morbidly Obese Patients

Adeline Bertola, Stéphanie Bonnafous, Rodolphe Anty, Stéphanie Patouraux, Marie-Christine Saint-Paul, Antonio Iannelli, Jean Gugenheim, Jonathan Barr, José M. Mato, Yannick Le Marchand-Brustel, Albert Tran, Philippe Gual

PLoS ONE 5(10): e13577. doi:10.1371/journal.pone.0013577

Hepatic Expression Patterns of Inflammatory and Immune Response Genes Associated with Obesity and NASH in Morbidly Obese Patients

Adeline Bertola^{1,2}, Stéphanie Bonnafous^{1,2,3}, Rodolphe Anty^{1,2,3}, Stéphanie Patouraux⁴, Marie-Christine Saint-Paul^{1,2,4}, Antonio Iannelli³, Jean Gugenheim^{1,2,3}, Jonathan Barr⁵, José M. Mato⁶, Yannick Le Marchand-Brustel^{1,2,3}, Albert Tran^{1,2,3}, Philippe Gual^{1,2,3*}

1 INSERM U895, Team 8 « Hepatic Complications of Obesity », Nice, France, **2** University of Nice-Sophia Antipolis, Faculty of Medicine, Nice, France, **3** Digestive Unit, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice, France, **4** Biological Unit, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice, France, **5** OWL Genomics, Bizkaia Technology Park, Bizkaia, Spain, **6** CIC bioGUNE, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Bizkaia Technology Park, Bizkaia, Spain

Abstract

Background: Obesity modulates inflammation and activation of immune pathways which can lead to liver complications. We aimed at identifying expression patterns of inflammatory and immune response genes specifically associated with obesity and NASH in the liver of morbidly obese patients.

Methodology/Principal Findings: Expression of 222 genes was evaluated by quantitative RT-PCR in the liver of morbidly obese patients with histologically normal liver (n=6), or with severe steatosis without (n=6) or with NASH (n=6), and in lean controls (n=5). Hepatic expression of 58 out of 222 inflammatory and immune response genes was upregulated in NASH patients. The most notable changes occurred in genes encoding chemokines and chemokine receptors involved in leukocyte recruitment, CD and cytokines involved in the T cell activation towards a Th1 phenotype, and immune semaphorins. This regulation seems to be specific for the liver since visceral adipose tissue expression and serum levels of MCP1, IP10, TNF α and IL6 were not modified. Importantly, 47 other genes were already upregulated in histologically normal liver (e.g. CRP, Toll-like receptor (TLR) pathway). Interestingly, serum palmitate, known to activate the TLR pathway, was increased with steatosis.

Conclusion/Significance: The liver of obese patients without histological abnormalities already displayed a low-grade inflammation and could be more responsive to activators of the TLR pathway. NASH was then characterized by a specific gene signature. These findings help to identify new potential actors of the pathogenesis of NAFLD.

Citation: Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul M-C, et al. (2010) Hepatic Expression Patterns of Inflammatory and Immune Response Genes Associated with Obesity and NASH in Morbidly Obese Patients. PLoS ONE 5(10): e13577. doi:10.1371/journal.pone.0013577

Editor: Jeffrey M. Gimble, Pennington Biomedical Research Center, United States of America

Received: July 9, 2010; **Accepted:** September 11, 2010; **Published:** October 22, 2010

Copyright: © 2010 Bertola et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France) (ANR-05-PCOD-025-02 and PNRHGE to PG), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), and charities (Société Francophone du Diabète/Association de Langue Française pour l'Etude du Diabète et des Maladies Métaboliques (SFD/ALFEDIAM) and Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/Schering-Plough to PG). This work is part of the project "Hepatic and adipose tissue and functions in the metabolic syndrome" (HEPADIP, see <http://www.hepadip.org/>), which is supported by the European Commission as an Integrated Project under the 6th Framework Programme (Contract LSHM-CT-2005-018734). AB was successively supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (France). SB was supported by ANR-05-PCOD-025-02. YLMB and PG are the recipients of an Interface Grant from CHU of Nice. Jonathan Barr belongs to the OWL Genomics Company, Bizkaia Technology Park, Spain, who did have a role in study design, data collection and analysis. Indeed, JB has determined the palmitate level in the serum samples from the patients and has analyzed the values (Figure 5). The other funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Jonathan Barr belongs to the OWL Genomics Company, Bizkaia Technology Park, Spain. This company does not alter the authors' adherence to all PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: gual@unice.fr

Introduction

The incidence of overweight and obesity is rapidly increasing in many Western countries and is associated with the development of type 2 diabetes, hypertension and Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). NAFLD is one of the most common forms of chronic liver diseases [1]. Liver biopsies of patients with NAFLD show a spectrum of pathological changes ranging from simple steatosis to steatohepatitis (Non Alcoholic Steato-Hepatitis, NASH) and steatofibrosis leading, in some cases, to cirrhosis and

hepatocellular carcinoma. Indeed, 20% of patients with biopsies-proven NASH may progress to cirrhosis [1].

NAFLD are frequently associated with visceral obesity, insulin resistance and metabolic syndrome [2] but predisposing and environmental factors could also be involved. Obesity modulates inflammation and activation of immune pathways which can affect hepatic lipid metabolism leading to hepatic injury, NASH and fibrosis. Adipose tissue and gut are potential players in the alteration of hepatic metabolism and inflammation [3]. Adipose tissue of obese patients is inflamed and the recruitment and

activation of monocytes in the adipose tissue by chemokines such as Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) and osteopontin are the principal effectors of this inflammation [4–6]. Inflammation causes adipocyte insulin resistance resulting in increased lipolysis and serum free fatty acids (FFA) flux, alteration of adipokine secretion and consequently hepatic fat accumulation and insulin resistance [7–9].

In NAFLD, adipose tissue substantially contributes to systemic TNF α , MCP1, IL6, and adiponectin which modify the hepatic inflammatory/immune system. We have shown that IL6-stimulated CRP and hepcidin expression in adipose tissue is associated with the elevated circulating levels of CRP and hypoferremia in morbidly obese patients independently of NASH [10–12]. Patients with NAFLD also seem to have an increased intestinal permeability associated with loss of integrity of epithelial tight junctions which could lead to increased levels of circulating lipopolysaccharide (LPS) [13]. Activation of cells including Kupffer cells by LPS triggers the production of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines in the liver, resulting in NAFLD [14].

Alteration in Natural Killer T (NKT) cells number and/or activity and activation of the adaptive immune system could also promote the liver alterations. NKT cells can produce both T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) associated cytokines steering the immune system into either inflammation or tolerance. An inverse correlation has been reported between the severity of steatosis and NKT cell number in mice and the reduction in the NKT cell number was associated with an increased hepatic production of Th1 cytokines [3]. In NAFLD patients, peripheral NKT cell number is decreased [15]. Activation of Kupffer cells, oxidative stress, reduction in regulatory T cells, and the altered profiles of adipokines (leptin, resistin versus adiponectin) could also lead to the disruption of the physiological tolerance of the liver to portal antigens [3]. Indeed, IgG antibodies against lipid peroxidation-derived antigens have been observed in patients with NAFLD and are associated with advanced fibrosis [16].

The inflammation and immune reactions in the progression of normal liver to steatosis, and then NASH are not well characterized. In this paper, we have focused on the differential expression of genes related to inflammation and immune response specifically associated with obesity, steatosis and NASH in liver of morbidly obese patients. To this aim, a quantitative approach was used focussing at most inflammatory pathways reported in the hepatic complications induced by obesity and chronic alcohol consumption in mice and humans.

Results

Clinical and biochemical data

Characteristics of the morbidly obese patients are given in Table 1, according to the severity of steatosis (S0: without steatosis, n = 6; S3: with severe steatosis, n = 6) and the presence of NASH (NASH, n = 6) determined on liver biopsies. All NASH patients have severe steatosis and a NAFLD activity score (NAS) ≥ 5 . All the obese patients have the same hepatic fibrosis stage (F1). A significant difference was observed in the genders of NASH obese patients and the S0 and S3 obese patients.

Genes upregulated with NASH

The goal of this study was to better characterize the inflammation and immune reaction in NAFLD patients. To this aim, we examined the expression levels of 222 selected genes related to inflammation and immune response including the CD, chemokines, semaphorins/plexins, interleukin, IFN, TNF α ,

Table 1. Characteristics of the morbidly obese patients.

	S0	S3	NASH
Sex (female/male)	5/1	5/1	1/5
Age (years)	36.2 $\pm$ 5.9	36.0 $\pm$ 3.4	43.2 $\pm$ 4.0
BMI (kg/m ²)	43.8 $\pm$ 0.6	44.3 $\pm$ 1.9	40.2 $\pm$ 1.3*
ALT (IU/L)	17.5 $\pm$ 3.9	35.1 $\pm$ 4.2*	58.0 $\pm$ 9.7*/ [§]
AST (IU/L)	20.0 $\pm$ 3.8	24.9 $\pm$ 2.2*	35.2 $\pm$ 4.4*/ [§]
GGT (IU/L)	19.5 $\pm$ 2.6	33.7 $\pm$ 7.3*	57.2 $\pm$ 15.2*
Alkaline phosphatase (IU/L)	74.7 $\pm$ 8.9	87.3 $\pm$ 10.6	75.0 $\pm$ 3.4
Albumin (g/L)	37.9 $\pm$ 1.0	42.1 $\pm$ 1.5*	43.9 $\pm$ 1.3*
Total bilirubin (μ mol/L)	8.8 $\pm$ 2.4	7.1 $\pm$ 0.5	10.4 $\pm$ 1.7 [§]
Conjugated bilirubin (μ mol/L)	1.8 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.2
Fasting insulin (mIU/L)	7.1 $\pm$ 0.9	13.7 $\pm$ 3.5	26.0 $\pm$ 6.3*
Fasting glucose (mmol/L)	4.9 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 1.3*
HOMA-IR	1.6 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 1.1*	7.9 $\pm$ 1.7*/ [§]
Triglycerides (mmol/L)	0.99 $\pm$ 0.14	1.61 $\pm$ 0.27	4.44 $\pm$ 1.44*/ [§]
Free fatty acids (mmol/L)	0.44 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.08
Total cholesterol (mmol/L)	4.74 $\pm$ 0.42	5.89 $\pm$ 0.45	6.34 $\pm$ 0.42*
HDL cholesterol (mmol/L)	1.40 $\pm$ 0.11	1.50 $\pm$ 0.14	1.14 $\pm$ 0.07
LDL cholesterol (mmol/L)	2.90 $\pm$ 0.44	3.66 $\pm$ 0.34	3.18 $\pm$ 0.27
NAFLD Activity Score (n)	0 (6)	3 (6)	5 (5) 6 (1)
Grade of steatosis (n)	0 (6)	3 (6)	3 (6)
Lobular inflammation (n)	0 (6)	0 (6)	1 (5) 2 (1)
Hepatocellular ballooning (n)	0 (6)	0 (6)	1 (6)
Fibrosis (n)	1 (6)	1 (6)	1 (6)

S0: patients with normal liver histology, S3: patients with severe steatosis, NASH: patients with severe steatosis and NASH. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and were compared by using the non parametric Kruskal-Wallis test.

*P<0.05 compared with S0 patients and.

[§]P<0.05 compared with S3 patients.

doi:10.1371/journal.pone.0013577.t001

TGF β , NF κ B and Toll-like receptor pathways (Table S1) by a quantitative RT-PCR approach. Among the 222 inflammatory and immune response genes tested, 192 were detected in liver in our experimental conditions (Table S1).

A number of comparisons were then performed to detect genes potentially involved in obesity, liver steatosis and NASH. The first analysis compared expression profiles between NASH and S3 patients. We defined as a NASH specific gene, a gene which was upregulated more than 1.4 fold in NASH patients compared to S3 patients and, evidently, to S0 patients and controls (lean patients without liver disease). 58 genes were upregulated in NASH patients and can be separated into two groups: 38 genes were specifically upregulated in NASH patients (and not in S0 and S3 patients) and 20 genes were upregulated in S0 and S3 patients and further increased in NASH patients (Table 2). Interestingly, as illustrated in Figure 1, 15 genes upregulated in NASH patients encoded chemokines and chemokine receptors involved in leukocyte recruitment including the couples CXCL8/CXCR1; CXCL1, 3/CXCR2; CCL3-5/CCR5 and the chemokines CXCL9-11 and CCL2 (MCP1). In addition, CD62E (E-Selectin) and CD44 which could be involved in leukocyte recruitment into inflammation sites were strongly upregulated in NASH patients (Figure 1). Some of the NASH specific genes encoded cytokines and molecules involved in the interaction and co-stimulation between antigen-presenting cells (APC) and T lymphocytes

Table 2. List of the 58 genes specifically upregulated in liver of NASH patients.

Gene symbol	Controls	S0	S3	NASH	Fold NASH vs S3	P NASH vs S3
CD						
CD62E/E-Selectin	1.00±0.35	4.39±1.37*	9.19±2.52*	50.28±15.99*	5.5	0.005
CD69/EA1	1.00±0.16	1.63±0.25	1.76±0.47	6.22±1.78*	3.5	0.016
CD54/ICAM1	1.00±0.16	1.76±0.24*	1.88±0.21*	6.48±1.10*	3.5	0.006
CD80/B7-1	1.00±0.06	2.79±0.70*	2.59±0.49*	8.62±2.22*	3.3	0.025
CD11b/ITGAM	1.00±0.18	1.20±0.13	1.38±0.20	4.15 ±1.30*	3.0	0.006
CD44	1.00±0.18	1.77±0.19*	2.03±0.16*	4.63±0.89*	2.3	0.006
CD18/LFA1	1.00±0.21	0.97±0.14	1.31±0.14	2.85±0.59*	2.2	0.010
CD86/B7-2	1.00±0.25	1.79±0.23	2.20±0.26	4.83±0.79*	2.2	0.008
CD28	1.00±0.15	1.33±0.12	1.69±0.21	3.57±0.67*	2.1	0.046
CD48/LFA3	1.00±0.27	1.13±0.17	1.45±0.12	2.90±0.59*	2.0	0.010
CD68	1.00±0.10	2.20±0.19*	2.25±0.20*	4.12±0.42*	1.8	0.010
Chemokines and chemokine receptors						
CXCL8/IL8	1.00±0.10	7.21±2.79*	8.12±1.76*	73.71±27.14*	9.1	0.006
CCL4/MIP1b	1.00±0.15	1.17±0.18	1.81±0.34	7.78±1.95*	4.3	0.006
CXCL11	1.00±0.23	1.25±0.16	1.72±0.19	7.19±3.08*	4.2	0.010
CCL2/MCP1	1.00±0.32	2.58±0.48*	3.08±0.32*	12.52±5.78*	4.1	0.037
CXCL1/GRO α	1.00±0.49	2.46±1.42	7.13±3.72	26.03±7.49*	3.7	0.016
CCL3/MIP1a	1.00±0.19	2.45±0.35*	3.80±1.39*	14.19±1.64*	3.7	0.011
CXCL10/IP10	1.00±0.32	0.81±0.20	1.11±0.27	3.58±0.66*	3.2	0.010
CXCR2/IL8RB	1.00±0.21	1.66±0.42	1.93±0.30	6.12±0.97*	3.2	0.006
CCR7	1.00±0.15	1.48±0.09*	2.28±0.40*	6.63±2.06*	2.9	0.045
CXCL3/GRO γ	1.00±0.36	2.91±0.76*	5.02±1.21*	13.82±3.59*	2.8	0.028
CXCL9	1.00±0.29	0.74±0.12	1.10±0.12	2.91±0.52*	2.7	0.016
CCL5/RANTES	1.00±0.21	0.88±0.12	0.92±0.10	2.48±0.89*	2.7	0.037
CXCR1/IL8RA	1.00±0.18	2.54±0.86*	2.77±0.52*	7.39±1.31*	2.7	0.010
CCR5	1.00±0.14	0.84±0.11	0.94±0.03	1.87±0.24*	2.0	0.004
CXCL16	1.00±0.11	1.19±0.18	1.55±0.17	2.38±0.39*	1.5	0.025
Semaphorins and plexins						
PLXNC1	1.00± 0.07	1.35±0.23	1.40±0.12	5.70±2.28*	4.1	0.010
SEMA4A	1.00± 0.20	1.55± 0.42	1.48±0.24	5.36±1.66*	3.6	0.016
SEMA7A	1.00±0.25	0.87±0.09	0.97±0.08	2.87±0.71*	3.0	0.010
SEMA4D	1.00±0.19	1.25±0.13	1.42±0.10	3.43±1.22*	2.4	0.037
Interleukin pathway						
IL6	1.00±0.42	4.01±0.96	3.58±1.67	21.27±6.78*	5.9	0.011
IL1B	1.00± 0.37	0.90±0.17	1.41±0.27	7.68±2.04*	5.4	0.003
IL7R	1.00±0.23	1.39±0.15	1.29±0.12	4.40±1.56*	3.4	0.028
IL1RN	1.00±0.10	1.61±0.25*	1.78±0.32*	5.15±0.77*	2.9	0.010
IL3RA	1.00±0.23	1.06±0.25	1.26±0.11	3.32±1.12*	2.6	0.016
NFL3	1.00±0.11	1.62± 0.20*	1.86±0.24*	4.90±0.80*	2.6	0.004
IL2RG	1.00±0.16	0.91±0.09	1.01±0.12	2.56±0.53*	2.5	0.016
IL18	1.00±0.33	1.08±0.14	1.16±0.12	2.44±0.54*	2.1	0.010
IL13RA2	1.00±0.18	1.02±0.14	0.89±0.18	1.86±0.32*	2.1	0.013
IL27RA	1.00±0.17	0.70±0.09	1.00±0.15	1.93±0.34*	1.9	0.028
IL1R2	1.00±0.14	1.27±0.24	1.23±0.17	2.02±0.17*	1.6	0.018
IL18BP	1.00±0.06	1.47±0.15	2.00±0.22	3.07±0.27*	1.5	0.013
JAK-STAT-SOCS pathway						
SOCS3	1.00±0.34	3.63±0.73*	3.64±0.81*	13.37±3.34*	3.7	0.028
SOCS1	1.00±0.11	2.06±0.44*	1.78±0.23*	5.10±1.44*	2.9	0.025
IFN pathway						

Table 2. Cont.

Gene symbol	Controls	S0	S3	NASH	Fold NASH vs S3	P NASH vs S3
IFNG	1.00±0.28	0.86±0.20	1.13±0.21	4.12±1.46*	3.6	0.039
IFI16	1.00±0.25	1.42±0.17	1.20±0.09	3.35±1.02*	2.4	0.008
<i>TNFα and TGFβ pathways</i>						
TNF	1.00±0.37	0.99±0.22	1.28±0.30	5.90±0.91*	4.6	0.004
LTB	1.00±0.20	0.90±0.15	1.15±0.14	3.28±1.05*	2.9	0.019
TNFRSF1B	1.00±0.12	1.54±0.10	1.44±0.17	3.40±0.85*	2.4	0.016
TRAF1	1.00±0.12	1.06±0.14	1.24±0.17	2.70±0.43*	2.2	0.019
TGFB1	1.00±0.14	1.27±0.22	1.54±0.13	2.70±0.51*	1.8	0.016
<i>NFκB pathway</i>						
REL	1.00±0.22	1.72±0.23*	2.18±0.29*	5.12±1.28*	2.4	0.014
RELB	1.00±0.24	2.53±0.49*	2.37±0.33*	5.40±0.84*	2.3	0.010
NFKB2	1.00±0.18	1.77±0.26*	1.86±0.17*	3.22±0.46*	1.7	0.037
<i>Matrix proteases and inhibitors of matrix proteases</i>						
MMP9	1.00±0.26	2.35±0.41*	3.63±0.68*	16.54±4.00*	4.6	0.011
SERPINE1/PAI1	1.00±0.35	1.95±0.83*	5.65±0.75*	25.39±4.18*	4.5	0.004
TIMP1	1.00±0.12	0.94±0.19	1.04±0.15	2.98±0.86*	2.9	0.016
PLAU	1.00±0.18	1.25±0.30	1.76±0.27	4.79±0.80*	2.7	0.006

S0: patients with normal liver histology (n=6), S3: patients with severe steatosis (n=6), NASH: patients with severe steatosis and NASH (n=6). Results are expressed relative to control subjects (mean±SEM) and were compared by using the non parametric Kruskal-Wallis test.

*P<0.05 compared with controls.

doi:10.1371/journal.pone.0013577.t002

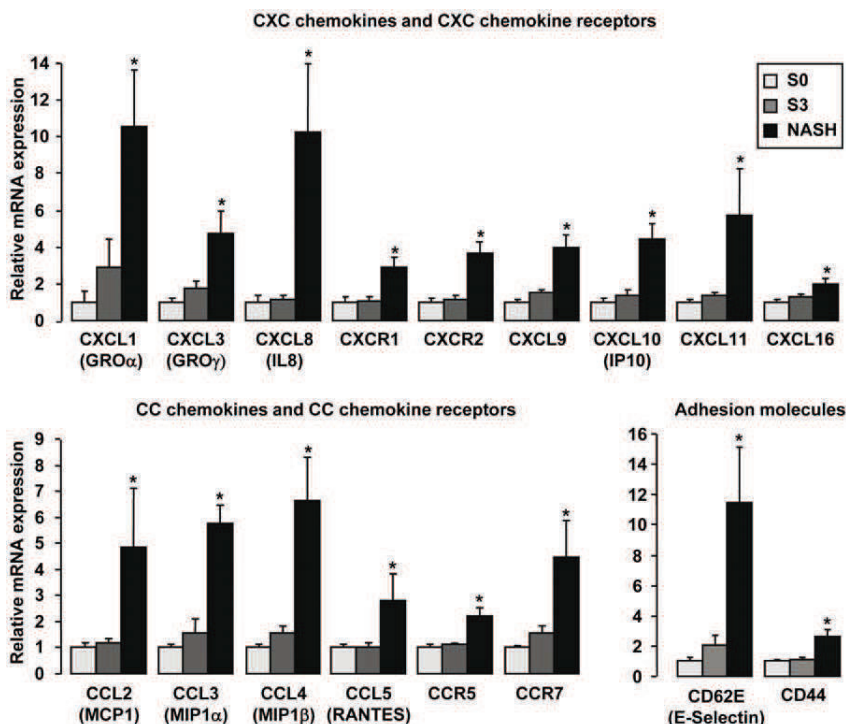


Figure 1. Upregulation of 17 genes encoding proteins involved in leukocyte recruitment in liver of NASH patients. The hepatic expression levels of genes were analyzed by real-time quantitative PCR in morbidly obese patients with normal liver histology (S0, n=6), in morbidly obese patients with severe steatosis (S3, n=6), and in morbidly obese patients with severe steatosis and NASH (NASH, n=6). The mRNA levels of genes were normalized to the mRNA levels of RPLP0. Results are expressed relative to the expression levels in S0 patients and expressed as mean±SEM. *P<0.05, compared with S0 patients.

doi:10.1371/journal.pone.0013577.g001

(Figure 2) leading to T cell activation towards a Th1 phenotype. Indeed, the gene expression levels of CD28, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) and IFN γ , in addition to CD18 (LFA1), CD54 (ICAM1), IL1 β , IL6 and TNF α were upregulated only in NASH patients. Moreover, the ratio IL10 versus IFN γ was strongly decreased in NASH patients compared to S3 patients (Figure 2A). Among the other NASH genes, the expression of genes encoding members of

the plexin/semaphorin family (PLXNC1; SEMA 4D, 7A and 4A) was also strongly increased in NASH patients (Table 2). We finally confirmed the modification of the expression levels of TNF α , IL6 and CCL2 (MCP1) in NASH patients previously reported by other groups [17–20].

Since inflamed adipose tissue could contribute to liver complications, we then evaluated in visceral adipose tissue (VAT) the gene

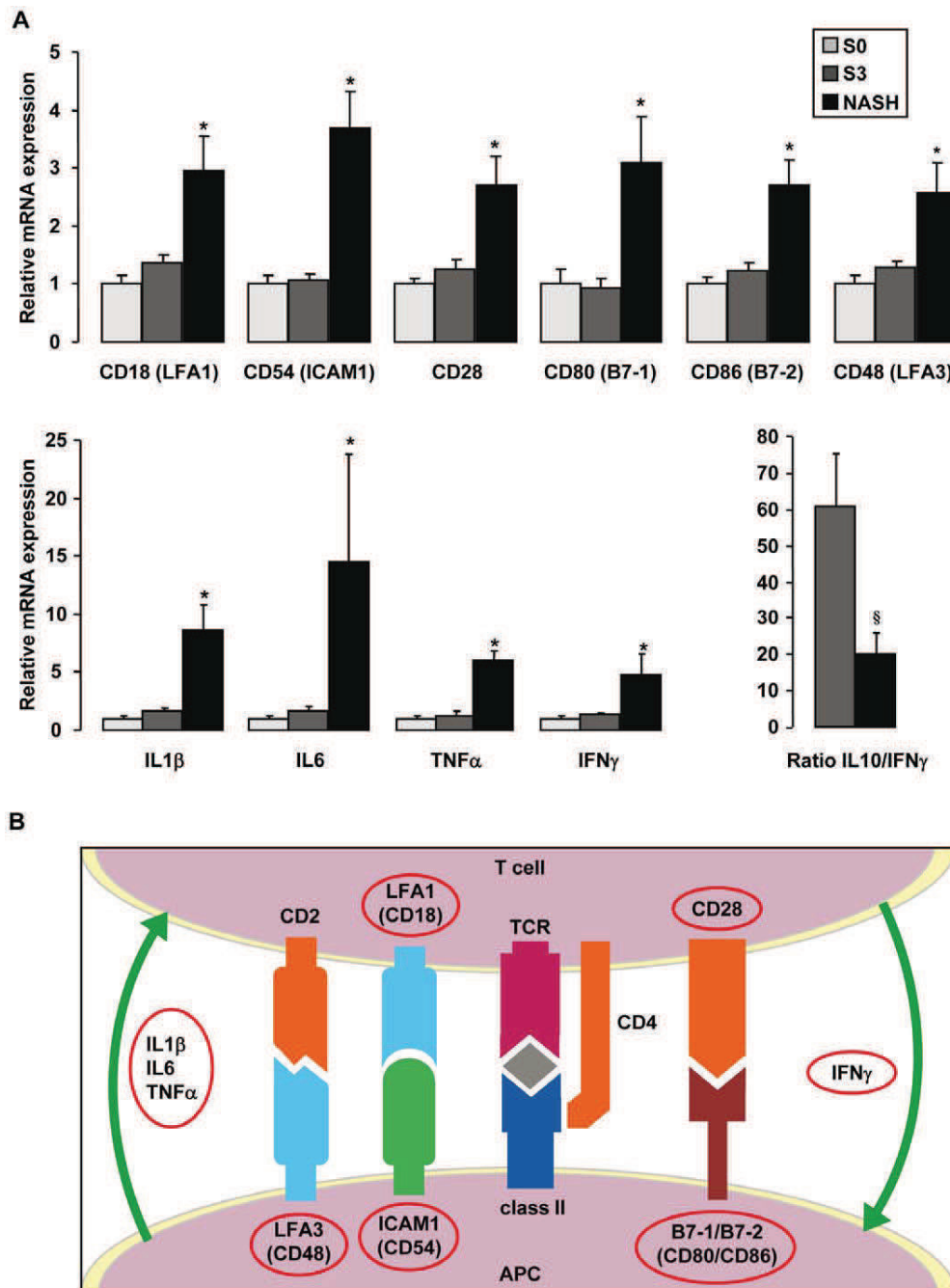


Figure 2. Specific upregulation of genes encoding Th1 cytokines and proteins involved in recognition between APC and T cells in liver of NASH patients. A. The hepatic expression levels of genes were analyzed by real-time quantitative PCR in morbidly obese patients with normal liver histology (S0, n = 6), in morbidly obese patients with severe steatosis (S3, n = 6), and in morbidly obese patients with severe steatosis and NASH (NASH, n = 6). The mRNA levels of genes were normalized to the mRNA levels of RPLP0. Results are expressed relative to the expression levels in S0 patients and expressed as mean $\pm$ SEM. *P < 0.05, compared with S0 patients; [§]P = 0.033. **B.** Scheme of recognition between APC and T cells. doi:10.1371/journal.pone.0013577.g002

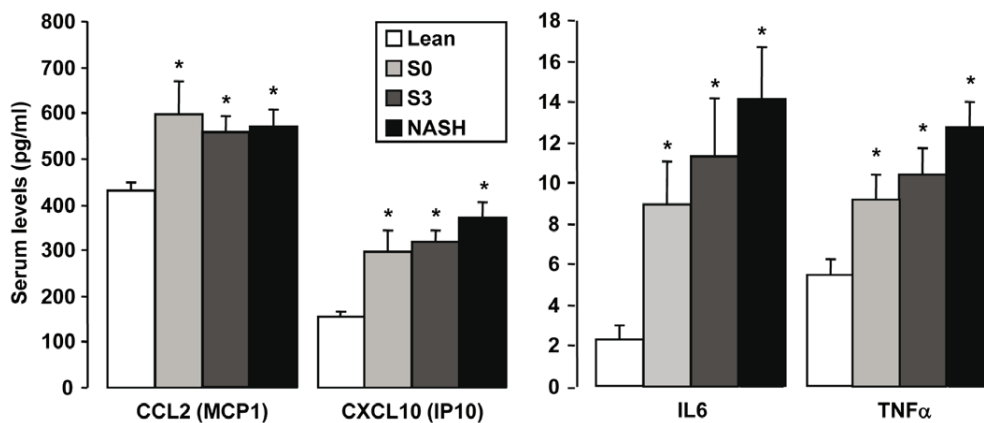


Figure 3. Elevated serum levels of CCL2, IP10, IL6 and TNFα are dependent on obesity but not on liver complications. The serum of 9 lean patients and 70 morbidly obese patients (15 S0 patients, 23 S3 patients and 23 NASH patients with severe steatosis) were used to evaluate the circulating levels of CCL2, IP10, IL6 and TNFα.
doi:10.1371/journal.pone.0013577.g003

expression levels of the NASH markers identified in the liver. VAT was chosen for these studies since adipokines secreted by VAT are directly delivered to the liver via the portal vein. Only 10 genes out of the 58 NASH specific genes had a differential expression in the VAT of NASH patients versus S3 and S0 patients (Table S2). This indicates that the majority of the NASH markers identified are liver specific. We then evaluated the circulating levels of two chemokines (MCP1, IP10) and two cytokines (IL6, TNFα) which are strongly upregulated in the liver but not in the adipose tissue of NASH patients, in a larger number of patients (10 lean, 17 S0, 24 S3 and 27 NASH patients). As shown in Figure 3, the expression level of these chemokines and cytokines was similarly increased in all obese patients compared with lean subjects with no further increase in NASH patients. This result indicates that the adipose tissue could be the main source of these circulating factors but that their local hepatic upregulation could play an important role in the evolution of the liver complications.

Genes specifically upregulated with severe steatosis

We then compared expression of genes in severe steatotic livers (S3 obese patients) with livers without any histological alterations

(S0 obese patients). Surprisingly, we identified only 3 genes which were upregulated. They encoded SEMA3C (3.6 fold increase, $P=0.001$), IL10 (3.3 fold increase, $P=0.005$) and CLDN10 (2.2 fold increase, $P=0.002$).

Genes differentially expressed in liver of S0 obese patients compared with lean controls

Differential expression between lean controls and obese patients without histological features of steatosis and inflammation (S0 obese patients) was evaluated to identify genes which could be related mostly to obesity. We have previously reported in the serum, liver and adipose tissue of morbidly obese patients that elevated CRP expression levels were independent of metabolic syndrome, type 2 diabetes and NASH [10]. We further show here that CRP gene expression in liver and subcutaneous adipose tissue was upregulated in all morbidly obese patients independently of liver complications (Figure 4). This later study was performed only in SCAT since control VAT was not available. Furthermore, we identified 46 other genes upregulated in the liver of all obese patients (Table 3) with no difference between S0, S3 and NASH patients (data not shown). Interestingly, the expression levels of

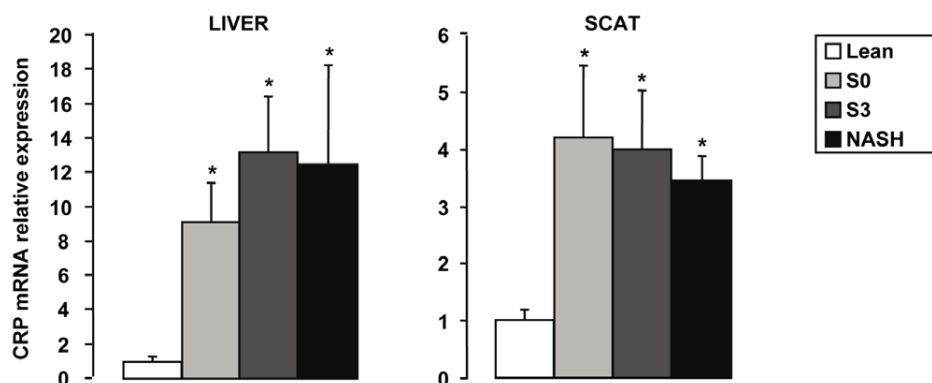


Figure 4. CRP gene expression levels in function to liver complications. The expression levels of CRP were analyzed by real-time quantitative PCR in lean subjects ($n=6$ for the liver; $n=4$ for the SCAT), in morbidly obese patients with normal liver histology (S0, $n=6$), in morbidly obese patients with severe steatosis (S3, $n=6$), and in morbidly obese patients with severe steatosis and NASH (NASH, $n=6$) in liver and subcutaneous adipose tissue. The mRNA levels of genes were normalized to the mRNA levels of RPLP0. Results are expressed relative to the expression levels in controls and expressed as mean $\pm$ SEM. * $P<0.05$, compared with controls.
doi:10.1371/journal.pone.0013577.g004

Table 3. List of the 47 genes specifically upregulated in liver of obese patients.

Gene symbol	Controls (n = 5)	Obese (n = 18)	P
Acute phase protein			
CRP	1.00±0.33	11.71±2.20	0.003
Toll-like receptors and lipopolysaccharide pathway			
TLR2	1.00±0.17	4.83±0.83	0.003
TLR6	1.00±0.21	3.09±0.32	0.002
TLR4	1.00±0.13	2.87±0.34	0.002
CD14	1.00±0.10	1.88±0.14	0.002
TRAF6	1.00±0.10	1.78±0.11	0.002
CHUK/IKK α	1.00±0.12	1.77±0.13	0.003
TRAF3	1.00±0.07	1.51±0.09	0.007
CD			
CD180	1.00±0.07	2.89±0.18	0.002
CD38	1.00±0.15	2.81±0.26	0.007
CD36	1.00±0.12	2.69±0.32	0.001
CD4	1.00±0.17	2.31±0.19	0.003
CD62P/P-Selectin	1.00±0.11	1.90±0.25	0.005
CD3E	1.00±0.10	1.87±0.17	0.011
CD40	1.00±0.14	1.78±0.10	0.002
CD47	1.00±0.07	1.56±0.09	0.001
Chemokines and chemokine receptors			
CXCR4	1.00±0.13	4.05±0.65	0.003
CXCL2	1.00±0.29	2.43±0.26	0.009
Semaphorins, plexins and neuropilins			
PLXNA2	1.00±0.12	2.55±0.24	0.001
SEMA4F	1.00±0.10	2.41±0.16	0.002
SEMA5A	1.00±0.11	2.40±0.16	0.001
NRP2	1.00±0.15	2.35±0.19	0.003
SEMA5B	1.00±0.11	1.99±0.20	0.002
SEMA6B	1.00±0.09	0.32±0.04	0.001
Interleukin pathway			
IL2RA	1.00±0.32	7.57±1.71	0.005
IL12A	1.00±0.31	2.60±0.35	0.013
IL16	1.00±0.13	2.52±0.19	0.001
IL1R1	1.00±0.13	2.20±0.16	0.001
IL22RA1	1.00±0.09	2.13±0.20	0.003
IL18R1	1.00±0.19	2.09±0.21	0.013
IL10RA	1.00±0.14	1.92±0.19	0.004
IL17R	1.00±0.07	1.88±0.17	0.002
IL4R	1.00±0.15	1.75±0.14	0.006
JAK-STAT-SOCS pathway			
STAT2	1.00±0.14	1.89±0.16	0.006
SOCS7	1.00±0.05	1.82±0.11	0.003
JAK1	1.00±0.11	1.71±0.10	0.002
TNFα and TGFβ pathways			
TRAF5	1.00±0.12	2.27±0.23	0.003
TGFBRI	1.00±0.14	1.83±0.13	0.007
TNFRSF14	1.00±0.08	1.48±0.08	0.007
IFN pathway			

Table 3. Cont.

Gene symbol	Controls (n = 5)	Obese (n = 18)	P
IFNGR1	1.00±0.09	2.86±0.33	0.001
IRF6	1.00±0.11	2.04±0.13	0.003
IRF2	1.00±0.07	2.01±0.13	0.002
IFNAR1	1.00±0.17	1.79±0.10	0.005
IFNAR2	1.00±0.04	1.76±0.08	0.001
NFkB pathway			
NFKBIA	1.00±0.09	2.90±0.36	0.001
c-Jun N-terminal kinases			
MAPK8/JNK1	1.00±0.08	2.35±0.13	0.001
Matrix proteases			
MMP14	1.00±0.14	2.09±0.17	0.002

Results are expressed relative to control subjects (mean±SEM) and were compared by using the non parametric Kruskal-Wallis test.
doi:10.1371/journal.pone.0013577.t003

gene encoding proteins involved in Toll-like receptors (TLR) and LPS signaling pathways including CD14, TLR4, TLR6, TLR2, TRAF3, TRAF6 and CHUK (IKK α) were upregulated in obese patients compared with controls (Table 3). CD14/TLR4 and TLR2/TLR6 are receptors for LPS and diacyl lipopeptides, respectively [14]. Saturated fatty acids are also known to stimulate TLR4 in macrophages [21]. We have thus evaluated the circulating levels of LPS, total free fatty acids and palmitate in the serum of some obese patients without or with hepatic histological alterations. While the endotoxemia (Figure 5) and total free fatty acids (Table 1) were not modified, the relative expression of palmitate (Figure 5) was increased in patients with severe steatosis or NASH compared to morbidly obese patients without liver alterations.

Discussion

We report here that the hepatic expression levels of several actors of the inflammatory and immune responses are modified in all morbidly obese patients even without histological features of steatosis or inflammation. Furthermore, the liver of obese patients could be more responsive to activators of the TLR pathway (endotoxin, saturated fatty acids) compared to lean subjects. The NASH status appears preferentially associated with the cell recruitment mediated by chemokines, a better recognition between APC and T cells and a Th1 response steering the immune system into inflammation.

Since a significant difference in the genders between the NASH obese patients (predominantly male) and the S0 and S3 obese patients (predominantly female) was present in our study, this should be taken into account in the interpretation of the results because a gender specific gene expression in the liver has been reported [22,23]. However, the prevalence of NAFLD is significantly different between genders and was higher in men than in premenopausal women [24]. Clinical evidence in other chronic liver diseases (i.e. chronic viral hepatitis) and evidence in experimental models suggest that estrogen may be protective against the NAFLD progression [24]. Nevertheless, a gender effect can be ruled out in our studies since the same expression pattern of hepatic genes upregulated in obesity was found in the S0, S3 and NASH obese patients when compared with lean control subjects.

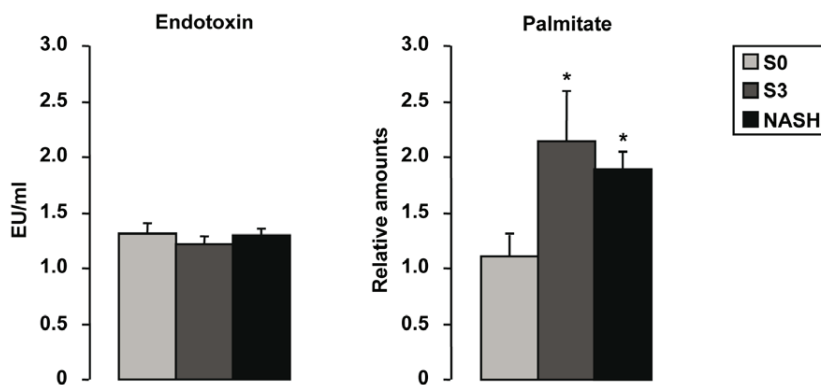


Figure 5. Elevated serum palmitate levels but not endotoxin levels were present in severely steatotic obese patients. **A.** The serum of 9 lean patients and 70 morbidly obese patients (15 S0 patients, 23 S3 patients and 23 NASH patients with severe steatosis) was used to evaluate the circulating levels of endotoxin. **B.** The abundances of palmitate as expressed relative to their values in a commercial serum sample (over 1000 individuals) were evaluated in 8 S0 patients, 9 S3 patients and 8 NASH patients. doi:10.1371/journal.pone.0013577.g005

We first identified fifty eight genes upregulated in NASH patients. $\text{TNF}\alpha$, IL6, IL1 β , CXCL8 and $\text{TGF}\beta$, which are obvious actors in the pathogenesis of progressive NAFLD, are involved in hepatocytes death/apoptosis ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$), neutrophil chemotaxis (CXCL8), activation of hepatic cells ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$), Mallory-Denk bodies ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$) and hepatic insulin resistance ($\text{TNF}\alpha$, IL6, IL1 β and SOCS3) [25]. This is in agreement with the increased hepatic expression of IL6, $\text{TNF}\alpha$ and TNF receptors which has been correlated with histological severity in obese patients [17,18].

Several studies have suggested that the homing of circulating lymphocytes to the liver may increase during inflammation and enhance hepatic inflammation [26]. A recent study has demonstrated that antibiotic treatment of *ob/ob* mice decreased hepatic infiltration of CD4 $^{+}$ T, CD8 $^{+}$ T, NKT, B and NK cells [27]. In our patients, we show here that gene expression of CXCL8 (IL8) and its receptor CXCR1; CXCL1, 3 and their receptor CXCR2; CCL3-5 and their receptor CCR5; CCL2 (MCP1); CXCL9-11; CD62E (E-Selectin) and CD44 are strongly upregulated in NASH patients. The chemokine expression thus appears to be more related to inflammation and hepatocellular ballooning than to severe steatosis. While the hepatic upregulation of these actors could be important in the progression of liver complications, the real contribution of these proteins for inflammatory cells recruitment into the liver has to be determined, since systemic levels of IL6, $\text{TNF}\alpha$, IP10 and MCP1 are dependent on obesity. The highest upregulated chemokine in liver is CXCL8 (IL8) (73 fold increases compared to the lean controls). The non parenchymal cells but also hepatocytes should contribute to its expression. Indeed, it has been recently reported that palmitate induces production of IL8 in hepatocytes [28].

Although NASH is not classically considered a Th1-polarized disease, our data suggest that an imbalance resulting from a relative excess in pro-inflammatory Th1 cytokines such as IFN γ , and a relative deficiency of anti-inflammatory cytokines such as IL10 is associated with NASH. Expression of genes encoding proteins required for the interaction and co-stimulation between APC and T cells (CD28, CD80, CD86, CD18, CD54) is also specifically upregulated in NASH patients. It has been recently shown that the serum CD54 (ICAM1) concentration is increased in patients with NASH [29]. In addition, we have previously reported the potential role of hepatic osteopontin, a Th1 cytokine, in human NAFLD [6]. Osteopontin could enhance the activation

of the Th1 immune reaction and decrease the expression of IL10 [30–32]. In mice models of NAFLD, hepatic NKT cells and the Th1 immune reaction have been recently implicated in the pathogenesis of NASH. Steatohepatitis is associated with a reduction in the number of hepatic NKT cells, a high sensitivity to the endotoxin-induced Th1 cytokine production [33], an impairment of the Kupffer cells functions [34], a reduction in the serum levels of IL10 and 15 and an increase in the IL12 levels [34–36] and excessive hepatic production of Th1 cytokines promoting inflammation [37]. Oral immunization against liver-extracted proteins was associated with a shift from a Th1 to Th2 immune reaction, leading to the amelioration of NASH and glucose intolerance in the leptin-deficient mouse model [38]. The peripheral NKT cells number is also decreased in patients with NAFLD [15] and an elevated Th1-cytokine profile dominated by the production of IFN γ is correlated with insulin resistance and NASH in obese children [39]. While additional investigations are required, all these reports and our results are in favor of a role of Th1 reaction in the pathogenesis of NASH.

We also show, for the first time, that a large number of plexin/semaphorin family members (28 members) are expressed in the human liver and that the expression of the “immune semaphorins” (SEMA4A, SEMA7A, SEMA4D, and PLXNC1) is upregulated in NASH patients. SEMA4D is crucially involved in the activation and differentiation of T cells, SEMA4A may promote Th1 differentiation and SEMA7A stimulates macrophages to produce pro-inflammatory cytokines [40,41].

In this study, we have validated the hepatic specificity of our NASH markers since the same genes were not modified in VAT. However, specific modifications of the VAT inflammation have been correlated with the evolution of liver complications. For example, increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue was associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity [42,43]. Prominent adipose specific deregulation of inflammation and immune system related genes has been also recently reported in morbidly obese patients in function to NASH, fibrosis and type 2 diabetes [44,45]. These differences could be due to the presence of type 2 diabetes and above all the stage of hepatic fibrosis. All our patients have the same hepatic fibrosis stage.

Surprisingly, we observed the presence of low-grade inflammation in the liver of morbidly obese patients without any obvious histopathological abnormalities (S0 patients) as indicated by the

upregulation of 47 genes related to inflammation and immune response. For example, the hepatic expression of CRP, a non-specific marker of inflammation, was elevated in all obese patients in accordance with the moderate elevation of CRP plasma levels in the cohort of severely obese patients [10]. The increased circulating IL6, mainly due to adipose tissue secretion, could enhance the hepatic expression of CRP. The upregulation of key molecules required for the TLR signaling pathways (CD14, TLR4) were also suggestive of a higher responsiveness to LPS or saturated fatty acids in obese patients. A series of reports are in favor of a role of LPS, mainly through TLR4 and CD14, in obesity induced NAFLD [46–52]. In fasted serum from our obese patients, the endotoxin level was similar in all groups of patients. This observation should however be taken with caution since it could be different upon meal challenge. In contrast, the relative amount of palmitate was increased in steatotic patients. It is now known that the saturated fatty acids can activate macrophages via TLR4 [21]. This hepatic inflammation could be involved in the development of liver complications since activation of Kupffer cells was a causal factor for hepatic steatosis and insulin resistance [53,54].

In summary, the liver of morbidly obese patients without histological abnormalities had a low-grade inflammation characterised by the elevated expression of inflammatory markers and could be more responsive to endotoxin and saturated fatty acids due to the elevated expression of the Toll-like receptors. The transient and repeated activation of the TLR pathway by the transient upregulation of activators of the TLR could be involved in the evolution of liver complications. Furthermore, the studies focusing on the behavior of identified chemokines, semaphorins and the actors leading to Th1 response on the liver functions are attractive approaches to acquire more insight into the pathogenesis of human NAFLD.

Materials and Methods

Study population

Patient population. 18 morbidly obese patients were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation where they underwent bariatric surgery for their morbid obesity (Nice hospital). Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with the French Guidelines. Exclusion criteria were: presence of hepatitis B or hepatitis C virus infection, excessive alcohol consumption (>20 g/d) or another cause of chronic liver diseases as previously described [6,10,11]. The characteristics of the study groups are described in Table 1. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure alanine amino transferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase, albumin, total and conjugated bilirubin. Insulin resistance was calculated by using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) index [55]. Surgical liver biopsies were obtained during surgery. Histopathological analysis was performed according to the scoring system published by Kleiner and *al.* [56]. Four histopathological features were semi-quantitatively evaluated: grade of steatosis (0, $<5\%$; 1, $5\%–30\%$; 2, $>30\%–60\%$; 3, $>60\%$), lobular inflammation (0, no inflammatory foci; 1, <2 inflammatory foci per 200x field; 2, 2–4 inflammatory foci per 200x field; 3, >4 inflammatory foci per 200x field), hepatocellular ballooning (0, none; 1, few balloon cells; 2, many cells/prominent ballooning), and fibrosis stage (from 0, none to 4, cirrhosis). Visceral adipose tissue samples were also obtained from 18 patients and frozen until analyzed. All subjects gave their informed written consent to participate in this research study according to French legislation regarding Ethic and Human Research (Huriet-Serusclet law). The “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche

Biomédicale de Nice” approved this study (07/04:2003, N° 03.017). **Control subjects:** Total RNA from 6 control livers was purchased from Stratagene (La Jolla, CA), Clontech (Mountain View, CA) and Biochain (Hayward, CA). The Stratagene and Biochain companies confirmed that histological findings were completely normal with no evidence of fatty liver disease. No clinical or biological data were available for these individuals but the absence of inflammatory process was corroborated by low CRP mRNA expression levels, as previously reported [10,11]. Control subcutaneous adipose tissue was obtained from 4 lean subjects (2 females and 2 males; age, 37 ± 11 years; BMI, 22.1 ± 0.7 kg/m²) undergoing lipectomy for cosmetic purpose.

Sera from 9 lean patients and 70 morbidly obese patients (15 S0 patients, 23 S3 patients and 23 NASH patients with severe steatosis) were used to evaluate the circulating levels of IL6, TNF α , IP10 and MCP1 (realized by the IFR150, Toulouse, France) using the Milliplex Map from Millipore and endotoxin levels (LAL QCL-1000, Lonza). The abundances of palmitate as expressed relative to their values in a commercial serum sample (Sigma Aldrich, Ref. H4522) were evaluated in 25 morbidly obese patients using liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS).

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from human tissues using the RNeasy total RNA extraction kit (Eurobio, France) for liver biopsy and RNeasy Mini Kit (Qiagen, Contraboeuf, France) for adipose tissue. The samples were treated by Turbo DNA-free (Applied Biosystems, Contraboeuf, France) following the manufacturer's protocols. The quantity and quality of the isolated RNA were determined using the Agilent 2100 Bioanalyser with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative PCR was performed using the ABI PRISM 7900/7500 Fast Real Time PCR System and FAM dyes (Applied Biosystems, Contraboeuf, France) following the manufacturer's protocols in our Genomics facilities. The TaqMan gene expression assays were purchased from Applied Biosystems (Table S1). Gene expression values were normalized to the value of the housekeeping gene *RPLP0* (Ribosomal Phosphoprotein Large P0) and calculated based on the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Statistical analysis

Statistical significance of differential gene expression between two study groups was determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test with the ΔC_t of each group. $P < 0.05$ was considered as significant. However, the genes with either less than 1.5 fold of difference between two groups or a difference due to one patient in one group were no further considered as significantly modified.

Supporting Information

Table S1 Genes included in this study

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013577.s001 (0.10 MB PDF)

Table S2 Differentially expressed genes in visceral adipose tissue of NASH patients versus S0 and S3 patients

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013577.s002 (0.08 MB PDF)

Acknowledgments

We thank Dr Marcel Deckert for his help and discussion and the Pr Alain Bernard for its Genomic Facility (INSERM UMR 576).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AB PG. Performed the experiments: AB SB SP JB. Analyzed the data: AB SB RA SP MCSP JB JMM YLMB AT PG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AB

References

- McCullough AJ (2006) Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 40 Suppl 1: S17–29.
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH (2003) Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology* 37: 1202–1219.
- Valenti L, Ludovica Fracanzani A, Fargion S (2009) The immunopathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: two triggers for one disease? *Semin Immunopathol*.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821–1830.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, et al. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796–1808.
- Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, Rousseau D, Anty R, et al. (2009) Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 58: 125–133.
- Maher JJ, Leon P, Ryan, C J (2008) Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48: 670–678.
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, et al. (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120: 1183–1192.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, et al. (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115: 1343–1351.
- Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, et al. (2006) The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 101: 1824–1833.
- Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, et al. (2006) Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131: 788–796.
- Anty R, Dahman M, Iannelli A, Gual P, Staccini-Myx A, et al. (2008) Bariatric surgery can correct iron depletion in morbidly obese women: a link with chronic inflammation. *Obes Surg* 18: 709–714.
- Tilg H, Moschen AR, Kaser A (2009) Obesity and the microbiota. *Gastroenterology* 136: 1476–1483.
- Seki E, Brenner DA (2008) Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 48: 322–335.
- Xu CF, Yu CH, Li YM, Xu L, Du J, et al. (2007) Association of the frequency of peripheral natural killer T cells with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13: 4504–4508.
- Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, et al. (2005) Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 54: 987–993.
- Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, et al. (2001) Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 34: 1158–1163.
- Wickowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, et al. (2008) Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 103: 1372–1379.
- Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, et al. (2006) Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 44: 1167–1174.
- Cayon A, Crespo J, Guerra AR, Pons-Romero F (2008) [Gene expression in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis]. *Rev Esp Enferm Dig* 100: 212–218.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276: 16683–16689.
- Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, Chaudry IH (2005) Current understanding of gender dimorphism in hepatic pathophysiology. *J Surg Res* 128: 147–156.
- Waxman DJ, Holloway MG (2009) Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol* 76: 215–228.
- Suzuki A, Abdelmalek MF (2009) Nonalcoholic fatty liver disease in women. *Womens Health (Lond Engl)* 5: 191–203.
- Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP (2006) Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 44: 197–208.
- Bruno EM (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 21: 3–16.
- Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, Dagher I, Prevot S, et al. (2008) Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 134: 1459–1469.
- Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, et al. (2007) Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 46: 823–830.
- Ito S, Yukawa T, Uetake S, Yamauchi M (2007) Serum intercellular adhesion molecule-1 in patients with nonalcoholic steatohepatitis: comparison with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 31: S83–87.
- Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, et al. (2004) Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21: 539–550.
- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, et al. (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287: 860–864.
- Mimura S, Mochida S, Inao M, Matsui A, Nagoshi S, et al. (2004) Massive liver necrosis after provocation of imbalance between Th1 and Th2 immune reactions in osteopontin transgenic mice. *J Gastroenterol* 39: 867–872.
- Guebre-Xabier M, Yang S, Lin HZ, Schwenk R, Krzych U, et al. (2000) Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology* 31: 633–640.
- Li Z, Lin H, Yang S, Diehl AM (2002) Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* 123: 1304–1310.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, et al. (1998) Leptin regulates proinflammatory immune responses. *Faseb J* 12: 57–65.
- Tilg H, Diehl AM (2000) Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 343: 1467–1476.
- Li Z, Soloski MJ, Diehl AM (2005) Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42: 880–885.
- Elinav E, Pappo O, Sklair-Levy M, Margalit M, Shibolet O, et al. (2006) Amelioration of non-alcoholic steatohepatitis and glucose intolerance in ob/ob mice by oral immune regulation towards liver-extracted proteins is associated with elevated intrahepatic NKT lymphocytes and serum IL-10 levels. *J Pathol* 208: 74–81.
- Pacifico L, Di Renzo L, Anania C, Osborn JE, Ippoliti F, et al. (2006) Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. *Eur J Endocrinol* 154: 691–697.
- Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H (2008) Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol* 9: 17–23.
- Mizui M, Kumanogoh A, Kikutani H (2009) Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. *J Clin Immunol* 29: 1–11.
- Cancello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, et al. (2006) Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55: 1554–1561.
- Tordjman J, Poitou C, Hugol D, Bouillot JL, Basdevant A, et al. (2009) Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status. *J Hepatol* 51: 354–362.
- Baranova A, Schlauch K, Elariny H, Jarrar M, Bennett C, et al. (2007) Gene expression patterns in hepatic tissue and visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Obes Surg* 17: 1111–1118.
- Estep JM, Baranova A, Hossain N, Elariny H, Ankrah K, et al. (2009) Expression of cytokine signaling genes in morbidly obese patients with non-alcoholic steatohepatitis and hepatic fibrosis. *Obes Surg* 19: 617–624.
- Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, et al. (2007) C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50: 1267–1276.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761–1772.
- Szabo G, Velayudham A, Romics L, Jr., Mandrekar P (2005) Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 140S–145S.
- Rivera CA, Adegbuyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, et al. (2007) Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 47: 571–579.
- Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM (1997) Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2557–2562.
- Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, et al. (2003) Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37: 343–350.
- Solga SF, Diehl AM (2003) Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol* 38: 681–687.
- Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD, et al. (2009) Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.

54. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, et al. (2010) Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59: 347–357.
55. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR (2004) Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27: 1487–1495.
56. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, et al. (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41: 1313–1321.

A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients

R. Anty, A. Iannelli, S. Patouraux, S. Bonnafe, V. J. Lavallard, M. Senni-Buratti, I. Ben Amor, A. Staccini-Myx, M.-C. Saint-Paul, F. Berthier, P.-M. Huet, Y. Le Marchand-Brustel, J. Gugenheim, P. Gual, A. Tran

Aliment Pharmacol Ther 2010; 32: 1315–1322

A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients

R. Anty^{*,†,‡}, A. Iannelli^{*,†,‡}, S. Patouraux^{*,†,§}, S. Bonnafous^{*,†,‡}, V. J. Lavallard^{*,†,‡}, M. Senni-Buratti[†], I. Ben Amor[†], A. Staccini-Myx[†], M.-C. Saint-Paul^{*,§}, F. Berthier[†], P.-M. Huet[†], Y. Le Marchand-Brustel^{*,†,‡}, J. Gugenheim^{*,†,‡}, P. Gual^{*,†,‡} & A. Tran^{*,†,‡}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U895, Team 8, "Hepatic Complications in Obesity", Nice, F-06204, Cedex 3, France.

[†]Digestive Center, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice, F-06202, Cedex 3, France.

[‡]Faculty of Medicine, University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, F-06107, Cedex 2, France.

[§]Biological Center, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice, F-06107, Cedex 2, France.

[†]Medical Information Department, Centre Hospitalier Princesse Grace, MC 98012, Monaco.

Correspondence to:

Dr R. Anty, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Pôle Référence Hépatite C, Hôpital de l'Archet 2, 151, Route Saint-Antoine de Ginestière, BP 3079, F, 06202 Nice, Cedex 3, France.
E-mail: anty.r@chu-nice.fr

Publication data

Submitted 8 August 2010
First decision 23 August 2010
Resubmitted 28 August 2010
Accepted 20 September 2010
EV Pub Online 7 October 2010

SUMMARY

Background

Non-invasive approaches are useful to differentiate simple steatosis from non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in obese and morbidly obese patients.

Aim

To develop a new scoring system to diagnose definitive NASH.

Methods

Preoperative clinical and biological data including serum caspase 3-generated cytokeratin-18 fragments (CK18) and surgical liver biopsies were obtained from 464 morbidly obese patients who had undergone bariatric surgery. The cohort was divided into two groups: training group ($n = 310$) and validation group ($n = 154$). Definitive NASH was defined according to Kleiner's classification with a Non-alcoholic fatty liver disease Activity Score (NAS) ≥ 5 .

Results

Alanine aminotransferase (ALT), CK18 fragments and the presence of metabolic syndrome were independent predictors for discriminating patients with NAS ≥ 5 in the training group. These three parameters were used to carry out a scoring system for the prediction of NAS ≥ 5 . Whereas serum CK18 fragment alone had an area under the receiver operating characteristic (AUROC) curve = 0.74, AUROC curves of the scoring system were 0.88 and 0.83 in the training group and the validation group, respectively.

Conclusion

A simple and non-invasive composite model (the *Nice Model*) including metabolic syndrome, ALT and CK18 fragments is able to predict accurately a non-alcoholic fatty liver disease activity score ≥ 5 in morbidly obese subjects.

Aliment Pharmacol Ther 2010; **32**: 1315–1322

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a spectrum of pathological liver abnormalities ranging from pure steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and finally to severe fibrosis and cirrhosis.¹ Classically, pure steatosis has a relatively good prognosis, whereas steatohepatitis is associated with progression of liver fibrosis.^{2, 3} Thus, differentiation of these two states is important. NAFLD is common in the context of morbid obesity and NASH can be present in 20–40% of these patients.^{4, 5}

The mechanisms of NAFLD development are complex and poorly understood. Chronic low-grade chronic inflammation, adipokines dysregulation and insulin resistance in the liver and visceral adipose tissue are the major contributing factors.^{6, 7} NAFLD has been considered the hepatic manifestation of so-called 'metabolic syndrome' (MS), a syndrome highly related to morbid obesity with its well-defined components: increased waist circumference, high blood pressure (BP), high blood triglycerides, low blood high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and high blood glucose level.^{5, 8–10} Hepatocyte apoptosis may also play an important role in the liver injury and disease progression in NAFLD.¹¹

Liver biopsy is still considered the gold standard to assess hepatic pathology in most chronic liver diseases, including NAFLD, but it is an invasive technique. Moreover, liver biopsy is associated with sampling and inter-observer variability, which might explain the differences in prevalence of NASH in morbidly obese patients reported in previous studies.^{4, 12, 13} In addition, the large number of patients with morbid obesity exposed to NAFLD renders systematic liver biopsy in all patients difficult. The availability of a non-invasive test would allow systematic diagnosis in this particularly predisposed subpopulation and would enable repeated assessment during the follow-up in a more feasible way than liver biopsy. Unfortunately, medical imaging techniques (ultrasound, computerized tomography and magnetic resonance imaging) fail to differentiate pure steatosis from NASH.¹⁴ Moreover, echography in severely or morbidly obese patients is frequently of poor quality.

Several non-invasive scoring models using routine clinico-biological parameters have been proposed for the diagnosis of NASH, but most of them have not been thoroughly validated.^{15–19} Recently, apoptotic caspase-3 generated cytokeratin 18 (CK18) fragments in the blood were reported to predict histological NASH in cohorts of obese patients or in patients with insulin resistance.^{20–23} The aim of this study was to develop a scoring system to diagnose definitive NASH using clinical and biological

data related to the MS and liver injury including caspase-3 generated CK18 fragment, in a large cohort of European morbidly obese patients.

PATIENTS AND METHODS

Study population

Four-hundred and sixty-four consecutive morbidly obese patients, referred for bariatric surgery, were included between January 2003 and April 2009. A division of the initial cohort into two groups was carried out in order to be able to have a training patient cohort and a validation patient cohort. The patients were arbitrarily divided into two groups: (i) a training patient cohort consisting of 310 patients (43 men, 267 women, mean age 40.0 ± 10.7 years) enrolled from January 2003 to April 2007; and (ii) a validation patient cohort consisting of 154 patients enrolled from May 2007 to April 2009.

The study protocol was performed according to French legislation on Ethic and Human Research and was approved by the local Ethics Committee (Huriet-Serusclet law, DGS 2003/0395). Written informed consent was obtained from all patients. All patients met the 1991 NIH Consensus Conference guidelines for gastrointestinal surgery for obesity.²⁴ All patients were negative for hepatitis B and C viral markers, autoantibodies indicative of autoimmune hepatitis and had negligible alcohol consumption (<20 g/day). Alcohol abuse was also excluded by interviewing the patients' relatives. Patients with a history of inflammatory disease (including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel disease), current infections, recent history of cancer (<5 years) and severe pulmonary or cardiac disease were not enrolled in the study. All patients underwent a Roux-en-Y divided gastric bypass, and a surgical liver biopsy was obtained during surgery.

Preoperative assessment

Preoperative assessment included history and physical examination; BP determination; anthropometric investigations (weight, height, waist circumference); psychiatric and nutritional evaluation; blood samples were also obtained before surgery after overnight fasting for the determination of plasma levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ glutamyl transferase (γ GT), glucose, insulin, C-peptide, glycosylated haemoglobin, triglycerides, HDL cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, ferritin. ALT and AST levels were determined using the Roche assay with pyridoxal phosphate on a Hitachi Modular (Hitachi Europe

Ltd, Maidenhead, UK) according to the International Federation of Clinical Chemistry and the Société Française de Biologie Clinique recommendations. Glycosylated haemoglobin was obtained using the Dual kit A1c Bio-Rad on a Variant II Bio-Rad (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA). Blood levels of apoptotic caspase-3 generated CK18 fragment levels were measured using ELISA kit M30-Apoptosense (Peviva, Bromma, Sweden) according to the manufacturer's instructions. All patients also had a chest X ray, electrocardiogram, abdominal ultrasound and upper gastrointestinal endoscopy.

Insulin resistance was assessed by homoeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). HOMA-IR is the product of fasting plasma insulin concentration (mIU/L) and glucose concentration (mmol/L) divided by 22.5.²⁵

Metabolic syndrome was diagnosed according to the International Diabetes Federation (IDF) as follows: central obesity defined by a increased waist circumference (≥ 80 cm in women and ≥ 94 cm in men) and any two of the following criteria: (i) triglycerides ≥ 1.7 mmol/L or treatment for hypertriglyceridemia; (ii) HDL-cholesterol < 1.29 mmol/L in women and < 1.03 mmol/L in men; (iii) systolic BP ≥ 130 mmHg or diastolic BP ≥ 85 mmHg or treatment for hypertension and (iv) fasting plasma glucose ≥ 5.6 mmol/L or previously diagnosed type-2 diabetes.⁸ All the morbidly obese patients of this study had a rise in the waist circumference. Type-2 diabetes was defined by two measurements of elevated fasting plasma glucose ≥ 7 mmol/L.

Pathological liver assessment

Hepatic wedges were obtained during bariatric surgery. Surgical liver biopsies were reviewed by two liver pathologists (MC-SP and SP) without knowledge of the clinical or biological characteristics of the patients. Routine haematoxylin-eosin-safran and sirius red staining were performed on all biopsies. All biopsies were graded according to the NAFLD Activity Score (NAS). This score classifies patients as simple steatosis (NAS ≤ 2), borderline group ($3 \leq \text{NAS} \leq 4$) or definitive NASH (NAS ≥ 5).²⁶ Patients were analysed as with or without NAS ≥ 5 . Liver bridging fibrosis was assessed by sirius red staining and was classified into five stages as follows: absent, mild, moderate (incomplete septa), severe (with complete septa) and cirrhosis.

Statistical analysis

Statistical analysis was first performed on the training patient cohort ($n = 310$) in three steps: (i) univariate analysis of clinical and biochemical parameters was carried out for patients with NAS < 5 and NAS ≥ 5 . The most relevant

parameters for classifying the patients were noted. Continuous data are described as means $\pm$ standard deviation (SD). Comparisons were made using the Chi-squared test or Fischer's exact tests for nominal data and by two-sample t -tests for continuous data; (ii) multivariate analyses were performed using binary logistic regression with estimation of odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI). The most statistically significant (with $P < 0.05$) and clinically relevant variables in the univariate step were included in a multivariate model, and only variables with $P < 0.05$ were retained for the final model; (iii) the final model was determined by logistic regression to predict NAS ≥ 5 and was based on three parameters: CK18 fragment levels, ALT and MS. The diagnostic performance of this model was determined by constructing a receiver-operating characteristic (ROC) curve and by calculating the area under ROC (AUROC) curve for predicting patients with NAS ≥ 5 . From this curve, the best cut-off value was established for the model score; this value maximized the sum of the sensitivity and specificity to identify patient status. The diagnostic accuracy of the logarithmic transformation of the *Nice Model* [$\text{Prob}(Y < \text{group}) = 1/(1 + \text{Exp}(-\text{Nice Model}))$] was then determined. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and likelihood ratio were determined for each cutoff value of the *Nice Model*.

Statistical analysis was then carried out on the validation patient cohort ($n = 154$). The main parameters of both cohorts were compared using Chi-squared test or Fischer's exact tests for nominal data, and by two-sample t -tests for continuous data. The final model obtained in the training patient cohort was applied to the validation patient cohort. The diagnostic performance of the model was determined by constructing an ROC curve and calculating the AUROC curve for prediction of patients with NAS ≥ 5 . All statistical analyses were performed using NCSS 2007 software (NCSS, Kaysville, Utah, USA).

RESULTS

Pathological findings and univariate analysis

The distribution of NAS scores among the 310 patients in the training patient cohort is shown in the Table 1. Using Kleiner's classification, 39 patients were found to have NAS ≥ 5 . Fibrosis reported using bridging fibrosis grade was absent in 13 patients, mild perivenular and/or periportal fibrosis in 281, septal fibrosis in 15 patients and severe fibrosis in one patient.

Using the univariate analysis (Table 2), patients with NAS ≥ 5 were found to have higher waist circumference,

Table 1 | Distribution of parameters according to NAS score in the training morbidly obese patient cohort (*n* = 310)

NAS	<i>n</i>	Age (years)	Gender (M/F)	BMI (kg/m ²)	CK18 fragment levels (IU/L)	ALT (IU/L)	IDF MS (absent/present)
0	20	30.5 ± 9.2	0/20	43.7 ± 2.6	216.3 ± 114.6	21.0 ± 8.5	16/4
1	105	40.2 ± 11.0	8/97	44.7 ± 4.7	231.3 ± 114.6	23.7 ± 10.9	59/46
2	72	40.5 ± 10.0	10/62	44.4 ± 5.4	225.4 ± 138.3	31.8 ± 25.5	35/37
3	59	40.8 ± 11.0	11/48	44.6 ± 4.8	253.4 ± 158.9	43.3 ± 21.1	25/34
4	15	42.4 ± 8.7	5/10	45.5 ± 5.0	254.2 ± 130.6	38.6 ± 20.6	7/8
5	36	41.0 ± 10.3	9/27	45.3 ± 6.4	393.5 ± 250.4	63.0 ± 47.8	7/29
6	3	50.6 ± 4.7	0/3	41.9 ± 2.3	935.2 ± 198.2	118.7 ± 28.3	0/3
7	0	-	-	-	-	-	-
8	0	-	-	-	-	-	-

Results are expressed as means ± SD, or as absolute numbers.

Metabolic syndrome (MS) was defined according to the definition of the International Diabetes Federation (IDF); NAS, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score; M, male; F, female; BMI, body mass index; ALT, alanine amino-transferase.

ALT, γ GT, triglyceride levels, blood glucose levels, C peptide, glycosylated haemoglobin, HOMA-IR, ferritin and CK18 fragment levels compared with patients with NAS

<5. HDL-cholesterol was lower in the more severe patients. Rates of type 2 diabetes mellitus and MS were also higher in patients with NAS $\geq$ 5 (Table 2). Neither

	Liver disease according to NAFLD Activity Score (NAS)		
	NAS <5 (<i>n</i> = 271)	NAS $\geq$ 5 (<i>n</i> = 39)	<i>P</i> -value
Age (years)	39.8 ± 10.8	41.7 ± 10.2	NS
Gender (M/F)	34/237	9/30	NS
BMI (kg/m ²)	44.6 ± 4.8	45.0 ± 6.2	NS
Waist circumference (cm)	119.7 ± 13.1	126.9 ± 15.6	0.002
ALT (IU/L)	30.7 ± 20.1	67.4 ± 48.8	<0.0000001
γ GT (IU/L)	38.8 ± 34.2	73.6 ± 54.4	<0.0000001
HDL cholesterol (mmol/L)	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.3	0.008
Triglyceride (mmol/L)	1.65 ± 1.16	2.6 ± 2.1	0.00002
Blood glucose level (mmol/L)	5.9 ± 2.2	7.6 ± 3.3	0.00006
C-peptide (pmol/L)	1047.5 ± 405.2	1402.9 ± 442.8	0.000006
Glycosylated haemoglobin (%)	5.9 ± 1.1	6.8 ± 1.6	0.000009
HOMAIR	5.5 ± 5.9	9.2 ± 6.6	0.0007
Ferritin (μ mol/L)	74.3 ± 77.5	142.8 ± 165.6	0.00003
CK18 fragment levels (IU/L)	234.9 ± 132.0	445.9 ± 292.5	<0.0000001
Type 2 diabetes (%)	19.6	43.6	0.03
IDF MS (%)	47.6	82.1	0.003

Patients were classified as without or with a NAFLD Activity Score (NAS) <5 or $\geq$ 5. Quantitative results are expressed as means ± SD.

Metabolic syndrome (MS) was defined according to the definition of the International Diabetes Federation (IDF); M, male; F, female; NS, not significant; BMI, body mass index; ALT, alanine amino-transferase; γ GT, gamma glutamyl transpeptidase; HDL, high density lipoprotein; HOMA-IR, homoeostasis model assessment of insulin resistance.

Table 2 | Univariate analysis of the training patient cohort (*n* = 310) according to the severity of liver disease

age nor body mass index (BMI) was associated with NAS ≥ 5 .

Multivariate analysis

Multivariate analysis included a model combining ALT, γ GT, HOMA-IR, CK18 fragment levels, gender and MS in the training patient cohort. ALT [OR = 1.04 (95% CI: 1.01–1.07), $P = 0.002$], MS [OR = 7.3, (95% CI: 1.8–29.4), $P = 0.005$] and CK18 fragments [OR = 1.003, (95% CI: 1.0006–1.005), $P = 0.044$] were the only independent variables when NAS ≥ 5 was the judgment criterion (Table 3).

CK18 fragments, ALT and IDF MS for the prediction of NAS ≥ 5

Receiver operating characteristic curves for CK18 fragments, ALT and MS were assessed for the prediction of liver disease (NAS ≥ 5) in the training patient cohort. The AUROC curves were 0.74, 0.78 and 0.74 for the CK18 fragment levels, ALT and MS respectively for the prediction of NAS ≥ 5 .

Model to predict NAS ≥ 5 in morbidly obese patients

A new model combining these three values was constructed by logistic regression in the training patient cohort, the 'Nice Model'. The equation of this model was: $-5.654 + 3.780E-02 \times \text{ALT (IU/L)} + 2.215E-03 \times \text{CK18}$

fragment levels (IU/L) $+ 1.825 \times (\text{presence of MS} = 1)$. The AUROC curve for the prediction of NAS ≥ 5 was 0.88 (Figure 1). The diagnostic accuracy of the logarithmic transformation of the Nice Model [$\text{Prob}(Y < \text{group}) = 1/(1 + \text{Exp}(-\text{Nice Model}))$] is shown in Table 4. The best cutoff value was 0.14. This value was associated with a sensitivity of 0.84, a specificity of 0.86, a positive predictive value of 0.44 and negative predictive value of 0.98. The prevalence of NAS ≥ 5 was 0.12.

The distribution of values from the Nice Model according to liver histology in the training patient cohort is shown in Figure 2. Box plots were constructed either separating patients into simple steatosis (NAS ≤ 2), borderline group ($3 \leq \text{NAS} \leq 4$) or definitive NASH (Figure 2a) or between NAS ≥ 5 and NAS < 5 (Figure 2b). Nice Model values were significantly higher in patients with NAS ≥ 5 compared with borderline ($P < 0.00001$) and with simple steatosis groups ($P < 0.00001$). Nice Model values in the borderline group were also significantly higher than in the simple steatosis group ($P < 0.00001$). In the same way, patients with NAS ≥ 5 had significantly higher Nice Model values compared with patients with NAS < 5 ($P < 0.0001$).

Evaluation of the Nice Model in the validation cohort of morbidly obese patients

The training patient cohort and validation patient cohort were similar in terms of age, gender, BMI, ALT, CK18 fragment levels, prevalence of MS, as shown in Table 5. The number of patients with NAS ≥ 5 was also similar in

Table 3 | Multivariate analysis of the training patient cohort ($n = 310$) according to the severity of liver disease

	Liver disease according to NAFLD Activity Score (NAS)		
	NAS ≥ 5 ($n = 39$) vs. NAS < 5 ($n = 271$)		
	P-value	OR	95% CI
ALT	0.002	1.04	1.01–1.07
γ GT	0.6	0.99	0.98–1.01
HOMA-IR	0.6	0.98	0.92–1.05
CK18 fragment levels	0.044	1.003	1.00006–1.005
Gender	0.7	0.82	0.21–3.19
IDF MS	0.005	7.3	1.8–29.4

Patients were classified as without or with a NAFLD Activity Score (NAS) < 5 or ≥ 5 .

Metabolic syndrome (MS) was defined according to the definition of the International Diabetes Federation (IDF); ALT, alanine amino-transferase; γ GT, gamma glutamyl transpeptidase; HOMA-IR, homoeostasis model assessment of insulin resistance.

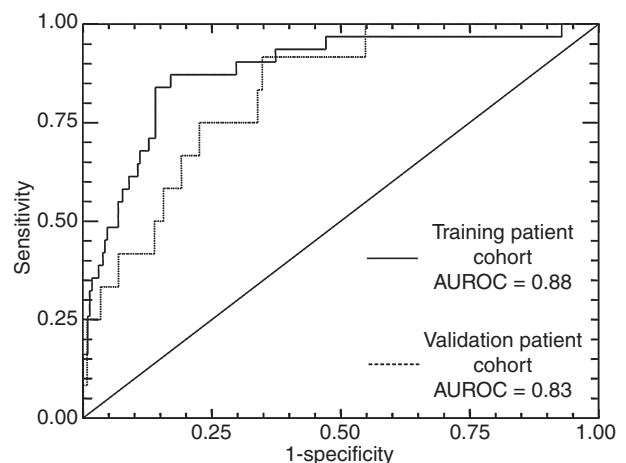


Figure 1 | Nice Model receiver-operating characteristic (ROC) curves for the diagnosis of definitive NASH (NAS ≥ 5) in morbidly obese patients. Nice Model ROC curves are shown for the training patient cohort ($n = 310$) and validation patient cohort ($n = 154$).

Cutoff value	Sensitivity	Specificity	Likelihood ratio	Positive predictive value (prevalence 0.12)	Negative predictive value
0.10	0.87	0.80	4.3	0.36	0.98
0.12	0.87	0.81	4.6	0.38	0.98
0.13	0.84	0.84	5.2	0.41	0.98
0.14	0.84	0.86	5.9	0.44	0.98
0.17	0.68	0.89	6.0	0.44	0.95
0.20	0.58	0.92	6.9	0.47	0.94
0.29	0.48	0.95	10.4	0.57	0.93
0.51	0.35	0.97	14.0	0.65	0.92
0.68	0.23	0.99	26.6	0.78	0.91
0.83	0.16	0.99	38.1	0.9	0.91

Table 4 | Diagnostic accuracy of the *Nice Model* to predict NAS ≥ 5 in the training cohort of morbidly obese patients ($n = 310$)

the two cohorts (12.6% vs. 9%, $P = \text{NS}$). AUROC curves for the prediction of NAS ≥ 5 was 0.83 (Figure 1).

DISCUSSION

We propose a new composite scoring system (*Nice Model*) based on ALT, CK18 fragment levels and the presence of MS to diagnose NAS ≥ 5 in morbidly obese patients. Indeed, the ALT, CK18 fragment levels or presence of MS separately were moderately predictive of NAS ≥ 5 . The association of these three items in the *Nice Model* displayed an AUROC for NAS ≥ 5 of 0.88 and 0.83 in the training cohort ($n = 310$) and the validation ($n = 154$) cohort of morbidly obese patients respectively.

Assessment of CK18 fragment levels has recently been proposed as a marker for NASH in patients exposed to NAFLD. The value of this marker was suggested by a pilot study and was confirmed in a large multicentre study in obese patients.^{20, 27} The disadvantage of the assessment of CK18 fragment levels is that it is not performed routinely in daily practice, but it has the advantage that it is a commercial ELISA kit. The CK18 fragment levels have also been studied in morbidly obese patients. In a cohort of 99 morbidly obese patients, CK18 fragment levels were found to be associated with NASH. CK18 fragment levels AUROC curve was 0.88.²¹ This value was higher than the one found in our training patient group (AUROC curve value only of 0.74) to predict NAS ≥ 5 . Difference in the diagnostic accuracy could be due to the influence of fibrosis on the CK18 fragments levels. As reported by the previous authors, CK18 fragments levels were significantly higher in subjects with moderate-to-severe fibrosis vs. those with no or mild fibrosis.²¹

To improve the prediction of definitive NASH, we attempted to develop a new scoring system combining vari-

ables significantly associated with NAS ≥ 5 in univariate and multivariate analyses. These variables were CK18 fragment levels, ALT and the presence of MS. ALT level has previously been related to inflammatory liver damage during NASH in morbidly obese patients and to an elevated risk of appearance of MS, diabetes and cardiovascular events.^{17, 28} However, ALT alone would not be sufficient for predicting NASH because it has been reported of normal levels of transaminases in patients with proven steatohepatitis and/or significant or severe fibrosis due to NASH.^{29–31}

Presence of MS in our model is not surprising because it is strongly associated with liver complications. However, in our cohort, MS alone is poorly predictive of definitive NASH.

Our scoring system offers the original association of CK18 fragment levels, ALT and MS to diagnose definitive NASH. Several non-invasive tests have been proposed for the diagnosis of NASH. Among the different models proposed,^{16, 19, 22, 33, 34} we evaluated only those with items available in our cohort.^{15, 17, 18} Respective AUROC of these models applied in the entire cohort ($n = 464$) is summarized in Table 6.

One of the weaknesses of this study is that our model is developed among morbidly obese patients. The clinical utility of this model will be fully acquired only when a validation on overweight and simple obese patients is carried out. Another point is the relatively small number of patients with NAS ≥ 5 which could limit the statistical power of analyses.

Pure steatosis had classically a relatively good prognosis, whereas steatohepatitis was associated with liver fibrosis. However, it was recently suggested that patients with low NAS could develop NASH and fibrosis progression.³² Even if patients with definitive NASH could have

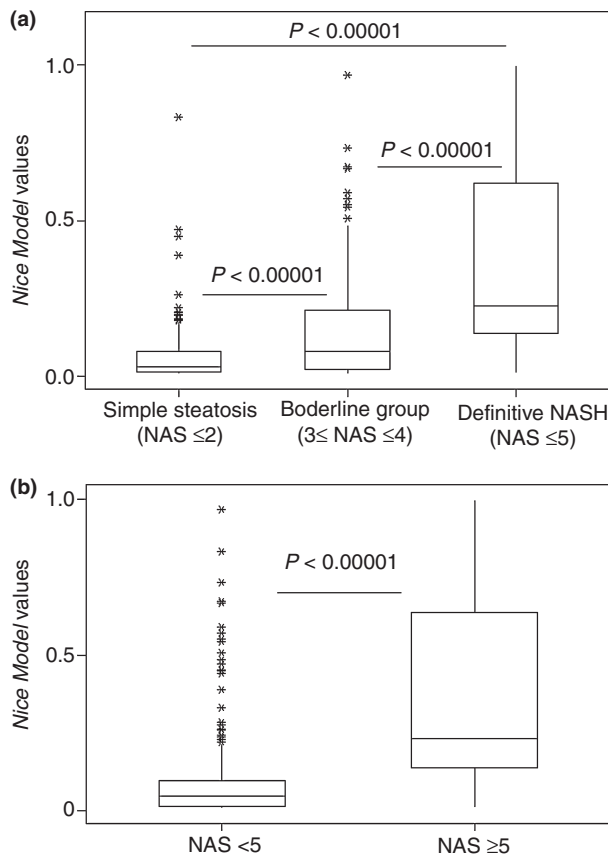


Figure 2 | Distribution of values for the *Nice Model* (based on ALT, CK18 fragment levels and the presence of IDF metabolic syndrome) according to the severity of liver histology in the training cohort ($n = 310$). (a) Distribution according to NAS values: simple steatosis ($\text{NAS} \leq 2$), borderline Group ($3 \leq \text{NAS} \leq 4$) and definitive NASH ($\text{NAS} \geq 5$). (b) Distribution according to NAS values: $\text{NAS} \geq 5$ or $\text{NAS} < 5$.

a more severe prognosis, clinicians should keep in mind that all patients with NAFLD should undergo periodic assessment and treatment.

In conclusion, a new composite model, the *Nice Model*, for the diagnosis of definitive NASH in morbidly obese patients based on ALT and CK18 fragment levels and on the presence of MS is proposed. The diagnostic accuracy of this model was better than using CK18 fragment levels, ALT and the presence of MS alone. Possibility of the *Nice Model* to be an alternative to liver biopsy in the follow-up of obese patients and in the evaluation of treatments aimed at preventing the progression of liver disease in these high risks patients should be assessed. The identification of non-invasive scoring system independent of the severity of obesity and the ethnicity constitutes an important challenge for the diagnosis of NASH.

Table 5 | Comparative analysis between the training ($n = 310$) and the validation ($n = 154$) cohorts of morbidly obese patients

	Training patient cohort ($n = 310$)	Validation patient cohort ($n = 154$)	P
Age (years)	40.0 ± 10.7	39.3 ± 10.8	NS
Gender (M/F)	43/267	19/135	NS
BMI (kg/m^2)	44.6 ± 5.0	44.4 ± 5.7	NS
ALT (IU/L)	35.3 ± 28.1	34.4 ± 26.3	NS
CK18 fragment levels (IU/L)	259.2 ± 172.0	242.5 ± 178.0	NS
IDF MS	52% (161/310)	52% (80/154)	NS

Metabolic syndrome (MS) was defined according to the definition of the International Diabetes Federation (IDF); NS, not significant; M, male; F, female; BMI, body mass index; ALT, alanine amino-transferase.

Table 6 | AUROC curves of published scoring systems applied in the entire cohort ($n = 464$) to diagnose $\text{NAS} \geq 5$

Scoring system	AUROC curve in the original study	AUROC curve in the entire cohort ($n = 464$)
Dixon <i>et al.</i> (HAIR) ¹⁷	0.9	0.77
Gholam <i>et al.</i> ¹⁸	0.82	0.79
Palekar <i>et al.</i> ¹⁵	0.76	0.44

Among published scoring models, only those with items available in the cohort were studied.

AUROC, area under receiver-operating characteristic.

The most important aspect of this article is that a non-invasive scoring system including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 fragments was able to predict definitive NASH in morbidly obese subjects accurately.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr E Floch and Newmed Publishing Services for editing the draft, and Dr M Dahman, Mrs A Fafin and Dr E Mariné-Barjoan for their assistance. *Declaration of personal interests:* None. *Declaration of funding interests:* This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (CHU of Nice), and charities (AFEF/Schering-Plough and AFEF/ROCHE to PG and AT). This work is part of the project 'Hepatic and adipose tissue and functions in the metabolic syndrome'

(HEPADIP, see <http://www.hepadip.org/>), which is supported by the European Commission as an Integrated Project under the 6th Framework Programme (Contract LSHM-CT-2005-018734). VJL was successively supported

by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (CHU of Nice) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (France). YLMB and PG are the recipients of an Interface Grant from CHU of Nice.

REFERENCES

- Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; **134**: 1682–98.
- Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, *et al.* Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006; **44**: 865–73.
- Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, *et al.* The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; **129**: 113–21.
- Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006; **45**: 600–6.
- Huang HL, Lin WY, Lee LT, Wang HH, Lee WJ, Huang KC. Metabolic syndrome is related to nonalcoholic steatohepatitis in severely obese subjects. *Obes Surg* 2007; **17**: 1457–63.
- Maher JJ, Leon P, Ryan JC. Beyond insulin resistance: innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008; **48**: 670–8.
- Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; **24**: 320–7.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome – a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; **23**: 469–80.
- Lee WJ, Huang MT, Wang W, Lin CM, Chen TC, Lai IR. Effects of obesity surgery on the metabolic syndrome. *Arch Surg* 2004; **139**: 1088–92.
- Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; **444**: 881–7.
- Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, *et al.* Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; **125**: 437–43.
- Ratzliff V, Charlotte F, Heurtier A, *et al.* Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005; **128**: 1898–906.
- Merriman RB, Ferrell LD, Patti MG, *et al.* Correlation of paired liver biopsies in morbidly obese patients with suspected nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; **44**: 874–80.
- Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, *et al.* The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; **123**: 745–50.
- Palekar NA, Naus R, Larson SP, Ward J, Harrison SA. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006; **26**: 151–6.
- Campos GM, Bambha K, Vittinghoff E, *et al.* A clinical scoring system for predicting nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Hepatology* 2008; **47**: 1916–23.
- Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Non-alcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; **121**: 91–100.
- Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, Charney DA, Kotler DP. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 399–408.
- Poynard T, Ratzliff V, Charlotte F, *et al.* Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non-alcoholic steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006; **6**: 34.
- Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009; **50**: 1072–8.
- Diab DL, Yeran L, Schauer P, *et al.* Cytokeratin 18 fragment levels as a non-invasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; **6**: 1249–54.
- Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, *et al.* A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 2008; **18**: 1430–7.
- Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 – the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; **30**: 1103–9.
- NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med* 1991; **115**: 956–61.
- Wallace T, Matthews D. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 2002; **19**: 527–34.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; **41**: 1313–21.
- Wieckowska A, Zein NN, Yeran LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. *In vivo* assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; **44**: 27–33.
- Goessling W, Massaro JM, Vasan RS, D'Agostino RB Sr, Ellison RC, Fox CS. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology* 2008; **135**: 1935–44.
- Mofrad P, Contos MJ, Haque M, *et al.* Clinical and histologic spectrum of non-alcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003; **37**: 1286–92.
- Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, Abrams GA. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology* 2005; **42**: 650–6.
- Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, *et al.* Risk of severe liver disease in non-alcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008; **48**: 792–8.
- Wong VW, Wong GL, Choi PC, *et al.* Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 2010; **59**: 969–74.
- Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Komorowski R, *et al.* A noninvasive clinical scoring model predicts risk of nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2010; **20**: 685–91.
- Munteanu M, Ratzliff V, Morra R, Mesous D, Imbert-Bismut F, Poynard T. Noninvasive biomarkers for the screening of fibrosis, steatosis and steatohepatitis in patients with metabolic risk factors: FibroTest-FibroMax experience. *J Gastrointest Liver Dis* 2008; **17**: 187–91.

Serum Markers of Hepatocyte Death and Apoptosis Are Non Invasive Biomarkers of Severe Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease

Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, Saint-Paul M-C, Rousseau D, Rodolphe A, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P

PLoS ONE 6(3): e17599. doi:10.1371/journal.pone.0017599

Serum Markers of Hepatocyte Death and Apoptosis Are Non Invasive Biomarkers of Severe Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease

Vanessa Jeannette Lavallard^{1,2,3*}, Stéphanie Bonnafeous^{1,3*}, Stéphanie Patouraux^{1,2,4}, Marie-Christine Saint-Paul^{1,2,4}, Déborah Rousseau^{1,2}, Rodolphe Anty^{1,2,3}, Yannick Le Marchand-Brustel^{1,2,3}, Albert Tran^{1,2,3}, Philippe Gual^{1,2,3*}

1 Team 8, «Hepatic complications of obesity», INSERM, U895, Nice, France, **2** Faculty of Medicine, University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, France, **3** Digestive Center, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice, France, **4** Biological Center, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice, France

Abstract

Background: Quantification of hepatocyte death is useful to evaluate the progression of alcoholic liver diseases. Our aims were to quantify and correlate the circulating levels of Cytokeratin 18 (CK18) and its caspases-generated fragment to disease severity in heavy alcoholics.

Methodology/Principal Findings: CK18 and CK18-fragment were evaluated in the serum of 143 heavy alcoholics. Serum levels of markers of hepatocyte death (CK18), apoptosis (CK18 fragment) and necrosis (CK18-CK18 fragment) increased in patients with severe fibrosis compared to patients with mild fibrosis. These markers strongly correlated with Mallory-Denk bodies, hepatocyte ballooning, fibrosis and with hepatic TNF α and TGF β assessed in the liver of 24 patients. Elevated levels of serum hepatocyte death and apoptotic markers were independent risk factors in predicting severe fibrosis in a model combining alkaline phosphatase, bilirubin, prothrombin index, hyaluronate, hepatocyte death and apoptotic markers. The level of markers of hepatocyte death and apoptosis had an area under the receiving operator curve that predicted severe fibrosis of 0.84 and 0.76, respectively.

Conclusion/Significance: Death of hepatocytes can be easily evaluated with serum markers and correlated with severe fibrosis in heavy alcohol drinkers. These biomarkers could be useful to rapidly evaluate liver injuries and the efficacy of therapies.

Citation: Lavallard VJ, Bonnafeous S, Patouraux S, Saint-Paul M-C, Rousseau D, et al. (2011) Serum Markers of Hepatocyte Death and Apoptosis Are Non Invasive Biomarkers of Severe Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease. PLoS ONE 6(3): e17599. doi:10.1371/journal.pone.0017599

Editor: Ben Ko, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong

Received: November 19, 2010; **Accepted:** January 30, 2011; **Published:** March 18, 2011

Copyright: © 2011 Lavallard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/Schering-Plough to PG). VJL was successively supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (France). SP was supported by the Fondation Recherche Médicale. YLMB and PG are the recipients of an Interface Grant from the Centre Hospitalier Universitaire of Nice. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gual@unice.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Excessive alcohol consumption is the third leading preventable cause of death in the United States [1]. Regular alcohol use can result in hepatic steatosis, which eventually progresses to steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis. Up to 40% of patients with severe acute alcoholic hepatitis die within six months [1]. A large body of evidence suggests that apoptosis of hepatocytes may be a key mechanism of alcohol-induced liver injury [2,3]. It has been largely reported that apoptosis of hepatocytes is a significant histological feature of human Alcoholic Liver Diseases (ALD). The magnitude of apoptosis evaluated by the Tunel assay, caspase activation and the apoptotic index correlated with the severity of ALD, the degree of inflammation and stage of fibrosis [2]. Hepatocyte apoptosis is more pronounced in patients with high

bilirubin and AST levels [2]. Death receptors (i.e. TNF α /TNF α Receptor, Fas-L/Fas), oxidative and endoplasmic reticulum stress, glutathione depletion could play an important role in alcohol induced apoptosis of hepatocytes [2,3]. Elevated circulating levels of soluble Fas, Fas ligand and TNF α have been reported [4,5], together with upregulation of the receptors in patients with ALD [6,7,8]. When the activation of mitochondrial-dependent apoptosis was more severe and involved most of the mitochondria, ATP was depleted and could result in a switch from apoptosis to necrosis [9]. Cytokeratin 18 (CK18) is the major intermediate filament protein in the liver and one of the most prominent substrates of caspases during apoptosis of hepatocytes [10]. Caspases-generated CK18 fragments are released from the tissue and are resistant to proteolysis [11,12]. CK18 is cleaved by caspases at two sites (Asp238 and Asp396) and the M30 antibody

recognizes the neo-epitope mapped to positions 387 to 396, which is only revealed after caspase cleavage. The M30-based ELISA thus determines the circulating levels of a specific caspases-generated CK18 fragment and is proposed as a surrogate biomarker of cell apoptosis [11]. The M65-based ELISA determines the circulating levels of both the caspases-generated fragment and intact CK18. The soluble full-length CK18 is released from cells undergoing necrosis [11,12]. These markers have been evaluated in patients with different chronic liver diseases including alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases [13]. The CK18 fragment level appears to be a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis [14,15,16,17] and changes in the level correlate with changes in the NAFLD activity score [18]. In contrast, few studies have been performed on patients with ALD. The level of CK18 or of the CK18 fragment was frequently increased in small groups of alcoholics and may act as a marker of hepatitis [19,20,21]. The serum levels of total CK18 in heavy drinkers ($n=15$) were higher than those of healthy controls ($n=10$), and even tended to be higher than those of patients with biopsy-proven malignancy of epithelial origin ($n=22$) including adenocarcinoma of a variety of origins, small lung carcinoma, hypernephroma and epidermoid esophageal carcinoma [22]. The same group showed that serum levels of total CK18 correlated with the apoptotic score in 53 patients (31 with alcoholic hepatitis and 22 with fatty liver) [19]. More recently, it has been reported that serum levels of CK-18 fragment in patients with alcoholic hepatitis ($n=50$) were higher than those of healthy controls ($n=50$) and heavy drinkers ($n=50$), and even tended to be higher than those of patients with malignancy ($n=50$) [21].

In this study, we focused on the death of hepatocytes by apoptosis and/or necrosis as evaluated by circulating serum biomarkers in a cohort of 143 patients with ALD and investigated correlation with disease severity. The prediction of severe fibrosis based on these markers was also evaluated.

Materials and Methods

Study population

From October 1997 to June 1998, 143 consecutive heavy alcohol drinkers (105 men, 38 women, mean age: 48 ± 9 years) admitted to our Liver unit for detoxification and/or in patient rehabilitation were entered into this study. All patients had consumed over 80 g ethanol per day for more than 5 years. All patients were negative for circulating hepatitis B surface antigen, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus. No patient had osteoarthritis or rheumatoid arthritis. Fasting blood samples were used to measure alanine amino transferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyl transferase (γ GT). A needle liver biopsy was performed on all patients by the transperitoneal approach. Biopsies were processed routinely and stained with hematoxylin-eosin-safran and Sirius Red. The length of the liver biopsy was over 15 mm. Histopathological features were semi-quantitatively evaluated: grade of steatosis (0, $<5\%$; 1, $5\%–30\%$; 2, $>30\%–60\%$; 3, $>60\%$); hepatocellular ballooning (0, none; 1, few balloon cells; 2, many cells/prominent ballooning); megamitochondria (0, none to rare; 1, many); Mallory's hyaline (0, none to rare; 1, many) and fibrosis stage (From 0, none, to 4, cirrhosis). The grading of hepatic activity was done according to the Activity score of Orrego et al. [23]. The characteristics of whole cohort from which a representative group of 24 alcoholic patients was selected for the hepatic gene expression analysis are described in Table 1. Sera and liver tissues were stored at -80°C until use. These patients were included later in the "Fibroscore program". All subjects gave their informed written consent to

Table 1. Characteristics of Serum and Gene groups.

	Serum group	Gene group
N (female/male)	143 (38/105)	24(4/20)
Age (years)	48.0(42.0, 53.0)	48.0(46.0, 53.0)
Alcohol (g/day)	120.0(90.0, 182.5)	142.0(90.0, 170.0)
AST (IU/L)	66.0(41.0, 120.0)	52.0(32.0, 119.0)
ALT (IU/L)	41.0(25.0, 78.0)	39.0(23.0, 57.5)
AST/ALT	1.7(1.1, 2.5)	1.7(1.2, 2.6)
γGT (IU/L)	181.0(98.0, 394.0)	137.0(83.0, 514.0)
Steatosis (%)		
<5%	7.6	4.2
5–30%	59.0	66.7
>30–60%	25.7	12.5
>60%	11.4	16.7
Inflammation (%)	22.9	16.7
Mallory-Denk body (%)	35.2	16.7
Ballooning (%)	32.4	45.8
Fibrosis (%)		
0	11.2	8.3
1	37.8	41.7
2	10.5	16.7
3	36.4	8.3
4	4.2	25.0

Data are expressed as Median (25th, 75th percentile) or %. AST: aspartate amino-transferase; ALT: alanine amino-transferase; γ GT: Gamma Glutamyl Transpeptidase.

doi:10.1371/journal.pone.0017599.t001

participate in this research study according to French legislation regarding Ethic and Human Research (Huriet-Serusclet law, the "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice" approved this study, N°03.613).

Circulating levels of total and fragmented CK18

Intact CK18 is released by necrotic cells. CK18 is also cleaved by caspases during apoptosis, generating soluble protein fragments. The M65[®] ELISA assay, which detects all forms of CK18, measures cell death due to both apoptosis and necrosis (CK18 intact and fragment), while the M30 Apoptosense[®] ELISA assay specifically measures apoptosis (the caspases-generated CK18 fragment, CK18-Asp396). The quantification of necrosis results from the difference between total CK18 values (M65) and the values of the caspases-generated fragment (M30). The caspases-generated CK18 fragment (M30 antigen) and CK18 (M65 antigen) were evaluated in the serum of 143 patients with M30 Apoptosense[®] ELISA and M65[®] ELISA kits (PEVIVA), respectively, as described by the manufacturer's instructions. All samples were analyzed in duplicate, in random order and blinded to the clinical/pathological data. For both the M30 Apoptosense[®] ELISA and M65[®] ELISA, within assay (WA % CV) variation was $<10\%$ and between assay (BA % CV) variation was $<10\%$ for samples >100 U/L. The minimum detectable concentration of M30 and M65 were 25 U/L and 11 U/L, respectively. Cytokeratins are released into the circulation as protein complexes. These complexes are remarkably stable during sample collection and long-term storage. Furthermore, plasma/serum samples can be exposed to repetitive freeze-thaw cycles without loss of activity [24].

Real-time quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from human tissues using a RNeasy Mini Kit (Qiagen, Contraboeuf, France). The samples were treated with Turbo DNA-free™ (Applied Biosystems, Contraboeuf, France) following the manufacturer's protocols. The quantity and quality of the isolated RNA were determined using the Agilent 2100 Bioanalyser with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Total RNA (0.5 µg) was reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative PCR was performed using the ABI PRISM 7500 Fast Real Time PCR System and FAM™ dyes (Applied Biosystems, Contraboeuf, France) following the manufacturer's protocols in our Genomics facilities. The TaqMan® gene expression assays were purchased from Applied Biosystems: Fas-L, Hs00181225_m1; TNFα, Hs00174128_m1; TGFβ, Hs00171257_m1; and RPLP0; Hs99999902_m1. Gene expression values were normalized to the value of the housekeeping gene *RPLP0* (Ribosomal Phosphoprotein Large P0) and calculated based on the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), as previously described [25,26]

Statistical analysis

Statistical significance of the differential circulating levels of the liver markers of total hepatocyte death, apoptosis and necrosis in patients with hepatic inflammation (A1) and severe fibrosis (F3/F4) compared to patients with no inflammation (A0) and to moderate fibrosis (F0/1/2), respectively, was determined using the non-parametric Mann-Whitney test. $P < 0.05$ was considered as significant. Correlations were analyzed using the Spearman's rank correlation test. Comparisons were done using the Chi2 test or Fischer's exact tests for nominal data and by two-sample t tests for continuous data. Multivariate analyses were performed using binary logistic regression with estimation of odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95%CI). Diagnostic performance was determined by constructing a "receiver-operating characteristic" (ROC) curve and calculating the area under the ROC (AUROC) curve for prediction of patients with advanced fibrosis ($F \geq 3$) for serum cell death markers. From these curves, the best cut-off values were established for the serum cell death markers, which were the values that maximized the sum of the sensitivity and specificity to identify patient status. Statistical analyses were made using NCSS 2007 software.

Results

Elevated serum levels of total cell death, apoptotic and necrotic biomarkers correlated with hepatic inflammation, Mallory-Denk bodies, hepatocyte ballooning and fibrosis

The goal of this study was to better characterize the hepatic apoptosis and necrosis induced by chronic alcohol consumption.

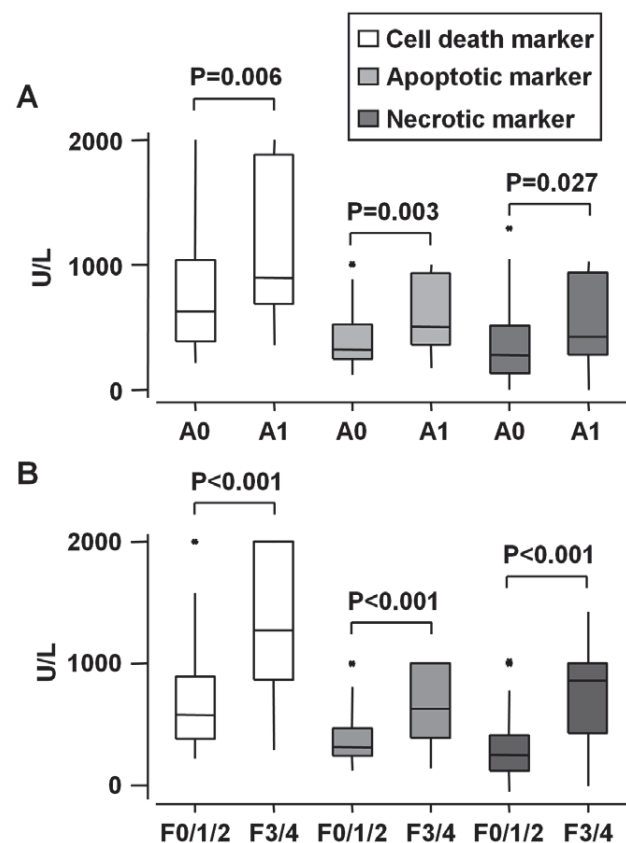


Figure 1. Elevated serum levels of total, apoptotic and necrotic cell death markers in patients with hepatic inflammation and advanced fibrosis. The serum of 143 alcoholic patients were used to evaluate the circulating levels of total CK18 (M65® ELISA) and the caspases-generated CK18 fragment (M30 Apoptosense® ELISA). Results were expressed as median (25th, 75th percentile) in function to: (A) hepatic inflammation (A1) and (B) advanced fibrosis (F3/4). doi:10.1371/journal.pone.0017599.g001

To quantify liver cell death by apoptosis and/or necrosis in alcoholic patients, we evaluated the circulating levels of biomarkers of cell death (soluble intact CK18 or the caspases-generated CK18 fragment) in 143 alcoholic patients without or with hepatic inflammation and with different grades of fibrosis (Table 1). As shown in Figure 1, the circulating levels of the liver markers of total hepatocyte death, apoptosis and necrosis were increased in patients with hepatic inflammation (A1) and severe fibrosis (F3/F4) compared to patients with no inflammation (A0) and to moderate fibrosis (F0/1/2), respectively. Further, the three biomarkers

Table 2. Correlation between circulating levels of total, apoptotic and necrotic cell death markers and hepatic inflammation, Mallory-Denk bodies, ballooning and fibrosis in 143 alcoholic patients.

Marker of	Inflammation		Mallory-Denk bodies		Ballooning		Fibrosis	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P	r_s	P
Cell death (CK18 total)	0.284	0.003	0.493	<0.001	0.352	<0.001	0.617	<0.001
Apoptosis (CK18 fragment)	0.297	0.002	0.496	<0.001	0.330	0.001	0.472	<0.001
Necrosis (CK18 total-fragment)	0.238	0.012	0.426	<0.001	0.316	0.001	0.594	<0.001

Spearman's rank correlation test.
doi:10.1371/journal.pone.0017599.t002

Table 3. Correlation between hepatic TGF β , TNF α and Fas-L gene expression and circulating levels of total, apoptotic and necrotic cell death markers in 24 alcoholic patients.

	Fibrosis		Cell death marker (CK18 total)		Apoptotic marker (CK18 fragment)		Necrotic marker (CK18 total-fragment)	
	r_s	P	r_s	P	r_s	P	r_s	P
TGF β	0.792	<0.001	0.589	0.005	0.547	0.010	0.631	0.002
TNF α	0.489	0.034	0.519	0.019	0.504	0.033	0.529	0.016
Fas-L	0.577	0.008	0.359	0.120	0.347	0.134	0.283	0.226

The correlation between the expression levels of TGF β , TNF α and Fas-L mRNA (Δ Ct) and circulating levels of biomarkers was analyzed using the Spearman's rank correlation test.

doi:10.1371/journal.pone.0017599.t003

positively correlated with hepatic inflammation, Mallory-Denk bodies, ballooning and fibrosis (Table 2).

Elevated total cell death, apoptotic and necrotic markers correlate with hepatic expression of TNF α and TGF β

In patients with ALD, liver apoptotic cell death and fibrosis were reported to be associated with upregulation of TNF α , Fas-L and TGF β , respectively [4,5,6,7,8,27]. So we evaluated the expression of their mRNA level in the liver of 24 alcoholic patients. As expected, the gene expression of TNF α , Fas-L and TGF β was increased in patients with severe fibrosis (F3/F4) compared with patients with no or mild fibrosis (F0/F1) (TNF α , 1.74 ± 0.27 vs 1 ± 0.16 , $P = 0.039$; Fas-L, 1.55 ± 0.13 vs 1 ± 0.11 , $P = 0.007$; TGF β , 2.33 ± 0.17 vs 1 ± 0.16 , $P = 0.0001$) and correlated with the grade of fibrosis (Table 3). Furthermore, the serum markers of total, apoptotic and necrotic cell death correlated with hepatic expression of TNF α and TGF β (Table 3).

The serum total cell death and apoptotic markers were independent risk factors in predicting severe liver fibrosis in patients with alcoholic liver diseases

Since the circulating level of total cell death and apoptotic markers was higher in patients with severe fibrosis (F3) compared with patients with moderate fibrosis (F2) (data not shown), we investigated the pertinence of the levels of serum total cell death and apoptotic markers in predicting severe fibrosis. Using the univariate analysis (Table 4), patients with advanced fibrosis ($F \geq 3$) were older with higher levels of total cell death, apoptotic and necrotic markers, alkaline phosphatase, bilirubin and hyaluronate levels and lower levels of platelets, albumin and of the prothrombin index compared to patients with no to moderate fibrosis ($F < 3$) (Table 4). In contrast, the gender, the AST, ALT and γ GT levels were not associated with $F \geq 3$. In a multivariate analysis including total cell death and apoptotic markers, alkaline phosphatase, bilirubin, prothrombin index and hyaluronate levels, the only independent variables, when the judgment criterion was $F \geq 3$, were prothrombin index, hyaluronate, total and apoptotic cell death markers (Table 5).

The three biomarkers of cell death accurately predicted severe fibrosis in alcoholic patients

We then wanted to determine if these serum biomarkers could predict severe fibrosis ($F \geq 3$) in our cohort of 143 patients. As shown in Figure 2, the area under the ROC curve (AUC) for discriminating severe fibrosis with the total cell death, apoptotic or necrotic markers was 0.84 (CI95% 0.76, 0.90), 0.76 (CI95% 0.66, 0.83) and 0.84 (CI95% 0.75, 0.89), respectively. The comparison

of the AUC indicated that the total cell death marker is significantly different from the apoptotic marker (total cell death marker AUROC versus apoptotic marker AUROC: $P = 0.0006$; total cell death marker AUROC versus necrotic marker AUROC: $P = 0.73$; apoptotic marker AUROC versus necrotic marker AUROC: $P = 0.0505$).

Several cut-off values were calculated for the levels of the three markers for the prediction of $F \geq 3$ in our cohort (Table 6). For example, the cut-off point at 790 U/L of the cell death marker predicted $F \geq 3$ with a sensitivity of 84%, a specificity of 71%, a Positive and Negative Predictive Value of 67.1% and 87.1%, respectively. The cell death markers predicted severe fibrosis with good specificity and sensitivity indicating that hepatic cell death could be an important actor or characteristic of liver fibrosis induced by chronic alcohol consumption.

Discussion

We report here that severe fibrosis associated with chronic alcoholic liver disease correlated with substantial liver cell death

Table 4. Univariate analysis of the 143 alcoholic patients according to the severity of liver disease.

Data	F<3 (n=85)	F $\geq$ 3 (n=58)	P
Age (years)	45.8 $\pm$ 7.8	51.2 $\pm$ 8.8	<0.000001
Gender (female/male)	19/66	19/39	0.166613
Platelets (10^9 /L)	204.0 $\pm$ 77.6	132.6 $\pm$ 76.2	<0.000001
AST (IU/L)	90.4 $\pm$ 103.5	106.6 $\pm$ 81.6	0.453246
ALT (IU/L)	79.6 $\pm$ 175.3	41.4 $\pm$ 31.8	0.102965
γ GT (IU/L)	302.2 $\pm$ 359.1	368.6 $\pm$ 391.1	0.296977
Alkaline phosphatase (IU/L)	88.8 $\pm$ 39.4	163.6 $\pm$ 89.8	<0.000001
Bilirubin (μ mol/L)	10.3 $\pm$ 6.2	77.6 $\pm$ 93.9	<0.000001
Albumin (g/L)	47.5 $\pm$ 4.5	31.6 $\pm$ 8.6	<0.000001
Prothrombin index (%)	97.3 $\pm$ 5.6	60.1 $\pm$ 20.3	<0.000001
Total cell death marker (U/L)	669.6 $\pm$ 397.2	1392.2 $\pm$ 566.4	<0.000001
Apoptotic marker (U/L)	381.6 $\pm$ 208.3	658.4 $\pm$ 305.2	<0.000001
Necrotic marker (U/L)	294.7 $\pm$ 237.6	733.8 $\pm$ 335.6	<0.000001
Hyaluronate (μ g/L)	43.5 $\pm$ 31.3	486.1 $\pm$ 305.6	<0.000001

Patients were classified as Fibrosis (F) <3 or $\geq$ 3. Quantitative results are expressed as means $\pm$ standard deviations. AST: aspartate amino-transferase; ALT: alanine amino-transferase; γ GT: Gamma Glutamyl Transpeptidase.

doi:10.1371/journal.pone.0017599.t004

Table 5. Multivariate analysis for the prediction of the severity of liver disease.

Data	F $\geq$ 3 versus F<3		
	P	OR	95%CI
Alkaline phosphatase	0.1566	0.901	0.9556–1.0072
Bilirubin	0.3540	0.902	0.7273–1.1207
Prothrombin index	0.0142	0.675	0.4940–0.9245
Cell death marker	0.0497	0.991	0.9833–0.9999
Apoptotic marker	0.0211	1.032	1.0047–1.0607
Hyaluronate	0.0073	1.068	1.0181–1.1221

Patients were classified according to Fibrosis (F) <3 or $\geq$ 3. Multivariate analysis was performed using logistic regression.

doi:10.1371/journal.pone.0017599.t005

due to both apoptosis and necrosis, as evaluated by circulating levels of cell death markers. These serum markers also correlated with hepatic features of hepatocyte injury including ballooning and the presence of Mallory-Denk bodies and hepatic expression of TNF α and TGF β . Finally, we show that the total, apoptotic and necrotic cell death markers accurately predict severe fibrosis in a large cohort of alcoholic patients.

Markers of total, apoptotic and necrotic cell death correlated with fibrosis and hepatic expression of TNF α and TGF β in our patients. In agreement with our results, it has been shown that apoptosis of hepatocytes was significantly increased in patients with alcoholic hepatitis, and correlated with disease severity and hepatic fibrosis [27]. It has been proposed that alcohol alters the population of gut bacteria and inhibits intestinal motility, resulting in overgrowth of a Gram-negative flora. Lipopolysaccharide is elevated in portal blood and activates Kupffer cells leading to the production of ROS and, consequently, TNF α . TNF α then stimulates mitochondrial oxidant production in hepatocytes, which are sensitized to apoptosis [28]. Hepatic apoptosis produces chemokines and inflammation, which in turn may activate hepatic stellate cells. Moreover, the phagocytosis of hepatocyte apoptotic bodies by hepatic stellate cells and Kupffer cells enhances the expression of pro-fibrogenic genes, such as TGF β , that may initiate hepatic fibrosis [27]. Although the degradation of cytokeratin during apoptosis is not completely understood, it has been suggested that it could facilitate the formation of apoptotic bodies and amplify the apoptotic signal [29]. We also showed that necrosis of hepatocytes was enhanced in severe fibrosis and could amplify these processes by massive release of cytokines.

Previous studies have shown that the serum levels of total CK18 (evaluated by a M3-based ELISA, the M3 antibody recognises soluble fragments of CK18) in heavy drinkers (n = 15) were higher than those of healthy controls (n = 10), and even tended to be higher than those of patients with biopsy-proven malignancy of epithelial origin (n = 22) including adenocarcinoma of a variety of origins, small lung carcinoma, hypernephroma and epidermoid esophageal carcinoma [22]. The same group showed that serum levels of total CK18 correlated with the apoptotic score in 53 patients (31 with alcoholic hepatitis and 22 with fatty liver) [19]. While these studies were done on a small group of patients, the circulating level of total CK18 was increased in alcoholics. We now reported that circulating levels of these cell death markers correlated better with fibrosis than with the hepatic activity in a large cohort of alcoholic patients (n = 143).

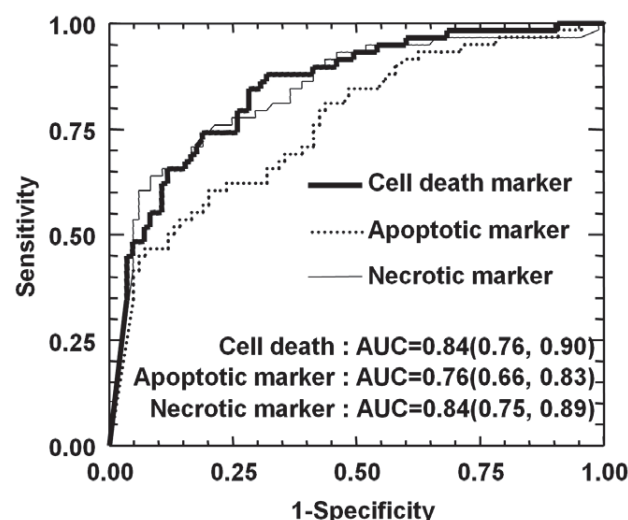


Figure 2. Levels of total, apoptotic and necrotic cells death markers for diagnosis of advanced fibrosis (F $\geq$ 3) in 143 alcoholic patients. The area under the ROC curves are shown for the performance of the total (CK18 total), apoptotic (CK18 fragment) and necrotic (CK18 total-fragment) cell death markers for predicting advanced fibrosis (F $\geq$ 3).

doi:10.1371/journal.pone.0017599.g002

We have shown for the first time that the serum cell death and apoptotic markers were independent factors that predict severe fibrosis in a large cohort of patients with ALD. Liver biopsy remains the gold standard for assessment of liver fibrosis. However, problems with liver biopsy include sampling error and inter-observer variability. Fibroscan and the currently available sero-algorithm tests (Fibrotest $^{\circ}$, Fibrometer $^{\circ}$) or the direct biomarker (Hyaluronate) can differentiate between mild and severe disease [30,31,32]. In the case of borderline results two or more methods can be combined. However, identification of novel markers is needed to improve sero-algorithm tests leading to quantification of fibrosis and to monitor the dynamic nature of fibrosis.

Cell death biomarkers have already been inserted into a composite model for prediction of liver injury or patient survival in other liver diseases. In acute liver failure, the cytokeratin 18-based modification of the model for the End-Stage Liver Disease (MELD) score improves prediction of spontaneous survival after acute liver injury [33]. We have recently shown that the association of serum CK18 fragments with ALT and the presence of a metabolic syndrome in a composite model predicted hepatic inflammation in morbidly obese patients [34]. These markers could also be useful in rapidly providing information concerning the treatment response. For example, the apoptotic cell death (CK18 fragment) marker has been recently used to evaluate the effect of some treatments in patients with chronic hepatitis C infection [35,36].

In summary, circulating levels of total and the caspases-generated fragment of cytokeratin 18 predict with good accuracy severe fibrosis in heavy alcohol drinkers. These markers also correlated with hepatocyte ballooning, the presence of Mallory-Denk bodies and hepatic TNF α and TGF β expression. Furthermore, studies focusing on the behavior of these markers for the follow up of patients with severe alcoholic liver disease should be of great interest, particularly in response to corticosteroid.

Table 6. Total, apoptotic and necrotic cell death marker levels for prediction of severe fibrosis ($F \geq 3$) ($n = 143$).

Cut-off Value Marker of	Sensitivity	Specificity	Likelihood Ratio	PPV (Prev. 0.41)	NPV (Prev. 0.41)
Cell death (CK18 total)					
790	0.844	0.717	2.992	0.671	0.871
844	0.793	0.741	3.064	0.676	0.840
952	0.741	0.811	3.938	0.728	0.821
Apoptosis (CK18 fragment)					
346	0.810	0.564	1.861	0.559	0.813
415	0.706	0.611	1.820	0.554	0.753
500	0.603	0.800	3.017	0.673	0.747
Necrosis (CK18 total-fragment)					
380	0.810	0.670	2.459	0.626	0.838
430	0.758	0.788	3.582	0.709	0.827
511	0.706	0.835	4.291	0.745	0.806

PPV: Positive Predictive value, NPV: Negative Predictive value; Prev: Prevalence.
doi:10.1371/journal.pone.0017599.t006

Acknowledgments

We thank Dr M C Brahimi-Horn for editorial correction.

References

- Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR (2009) Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 360: 2758–2769.
- Feldstein AE, Gores GJ (2005) Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* 10: 3093–3099.
- Malhi H, Gores GJ (2008) Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134: 1641–1654.
- Taieb J, Mathurin P, Poynard T, Gougerot-Pocidal MA, Chollet-Martin S (1998) Raised plasma soluble Fas and Fas-ligand in alcoholic liver disease. *Lancet* 351: 1930–1931.
- Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI (1991) Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13: 267–276.
- Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart IJ, et al. (2001) Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 34: 248–253.
- Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, et al. (2004) Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 99: 1708–1717.
- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, et al. (1995) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 182: 1223–1230.
- Jaeschke H, Lemasters JJ (2003) Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125: 1246–1257.
- Linder S, Havelka AM, Ueno T, Shoshan MC (2004) Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker. *Cancer Lett* 214: 1–9.
- Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, Nap M, Mauermann J, et al. (2004) Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res* 64: 1751–1756.
- Luft T, Conzelmann M, Benner A, Rieger M, Hess M, et al. (2007) Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood* 110: 4535–4542.
- Yilmaz Y (2009) Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 - the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 30: 1103–1109.
- Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, et al. (2006) In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 44: 27–33.
- Younossi ZM, Jarrar M, Nugent C, Randhawa M, Afendy M, et al. (2008) A novel diagnostic biomarker panel for obesity-related nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Obes Surg* 18: 1430–1437.
- Diab DL, Yerian L, Schauer P, Kashyap SR, Lopez R, et al. (2008) Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6: 1249–1254.
- Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, et al. (2009) Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 50: 1072–1078.
- Wong VW, Wong GL, Choi PC, Chan AW, Li MK, et al. (2010) Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut* 59: 969–974.
- Gonzalez-Quintela A, Abdulkader I, Campos J, Fernandez-Hernandez L, Lojo S (2009) Serum levels of keratin-18 fragments [tissue polypeptide-specific antigen (TPS)] are correlated with hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. *Dig Dis Sci* 54: 648–653.
- Gonzalez-Quintela A, Garcia J, Campos J, Perez LF, Alende MR, et al. (2006) Serum cytokeratins in alcoholic liver disease: contrasting levels of cytokeratin-18 and cytokeratin-19. *Alcohol* 38: 45–49.
- Li X, Zhang Y, Wu K, Fan D (2010) Serum cytokeratin-18 fragment level: a noninvasive biomarker for not only nonalcoholic steatohepatitis, but also alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 51: 1865–1866.
- Gonzalez-Quintela A, Mallo N, Mella C, Campos J, Perez LF, et al. (2006) Serum levels of cytokeratin-18 (tissue polypeptide-specific antigen) in liver diseases. *Liver Int* 26: 1217–1224.
- Orrego H, Blake JE, Blendis LM, Medline A (1987) Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 92: 208–214.
- Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, Xu R, Cai F, et al. (2007) Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 13: 3198–3206.
- Bekri S, Gual P, Anty R, Luciani N, Dahman M, et al. (2006) Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131: 788–796.
- Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, Rousseau D, Anty R, et al. (2009) Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 58: 125–133.
- Purohit V, Brenner DA (2006) Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology* 43: 872–878.
- Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209–218.

29. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138: 1379–1394.
30. Manning DS, Afdhal NH (2008) Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 134: 1670–1681.
31. Naveau S, Gaude G, Asnacios A, Agostini H, Abella A, et al. (2009) Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 49: 97–105.
32. Nguyen-Khac E, Chatelain D, Tramier B, Decrombecque C, Robert B, et al. (2008) Assessment of asymptomatic liver fibrosis in alcoholic patients using fibroscan: prospective comparison with seven non-invasive laboratory tests. *Aliment Pharmacol Ther* 28: 1188–1198.
33. Bechmann LP, Jochum C, Kocabayoglu P, Sowa JP, Kassalik M, et al. (2010) Cytokeratin 18-based modification of the MELD score improves prediction of spontaneous survival after acute liver injury. *J Hepatol* 53: 639–647.
34. Anty R, Iannelli A, Patouraux S, Bonnafous S, Lavallard VJ, et al. (2010) A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 32: 1315–1322.
35. Feldstein A, Kleiner D, Kravetz D, Buck M (2009) Severe hepatocellular injury with apoptosis induced by a hepatitis C polymerase inhibitor. *J Clin Gastroenterol* 43: 374–381.
36. Volkman X, Cornberg M, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, et al. (2006) Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 43: 1311–1316.

Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in
a cohort mainly composed of morbidly obese European women with
NAFLD undergoing bariatric surgery

Rodolphe Anty, Sophie Marjoux, Antonio Iannelli, Stéphanie Patouraux, Anne-Sophie Schneck, Stéphanie Bonnafous, Camille Gire, Anca Amzoloni, Imed Ben-Amor, Marie-Christine Saint-Paul, Eugenia Mariné-Barjoan, Alexandre Pariente, Jean Gugenheim, Philippe Gual, Albert Tran

Journal of Hepatology 2012 vol. 57 j 1090–1096

Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in a cohort mainly composed of morbidly obese European women with NAFLD undergoing bariatric surgery

Rodolphe Anty^{1,2,3,*}, Sophie Marjoux⁴, Antonio Iannelli^{1,2,3}, Stéphanie Patouraux^{1,3,5}, Anne-Sophie Schneck^{1,2,3}, Stéphanie Bonnafous^{1,2,3}, Camille Gire², Anca Amzolini⁶, Imed Ben-Amor², Marie-Christine Saint-Paul^{1,5}, Eugenia Mariné-Barjoan⁷, Alexandre Pariente⁸, Jean Gugenheim^{1,2,3}, Philippe Gual^{1,2,3}, Albert Tran^{1,2,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1065, Team 8, "Hepatic Complications in Obesity", Nice, F-06204 Cedex 3, France; ²Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Digestive Center, Nice, F-06202 Cedex 3, France; ³University of Nice-Sophia-Antipolis, Faculty of Medicine, Nice, F-06107 Cedex 2, France; ⁴Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Digestive Center, Lyon, France; ⁵Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Biological Center, Nice, F-06107 Cedex 2, France; ⁶University of Medicine and Pharmacy of Craiova, Faculty of Medicine, Romania; ⁷Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Department of Public Health, Nice, F-06202 Cedex 2, France; ⁸Centre Hospitalier of Pau, Digestive Center, Pau, France

Background & Aims: The aim of this study was to determine the influence of coffee and other caffeinated drinks on liver fibrosis of severely obese European patients.

Methods: A specific questionnaire exploring various types of coffee (regular filtrated coffee and espresso), caffeinated drinks, and chocolate was filled in by 195 severely obese patients. All patients had liver biopsies that were analyzed according to the NASH Clinical Research Network Scoring System. Univariate and multivariate analyses of significant fibrosis were performed.

Results: Caffeine came mainly from coffee-containing beverages (77.5%). Regular coffee and espresso were consumed in 30.8% and 50.2% of the patients, respectively. Regular coffee, espresso, and total caffeine consumption was similar between patients with and without NASH. While consumption of espresso, caffeinated soft drinks, and chocolate was similar among patients, with respect to the level of fibrosis, regular coffee consumption was lower in patients with significant fibrosis ($F \geq 2$). According to logistic regression analysis, consumption of regular coffee was an independent protective factor for fibrosis (OR: 0.752 [0.578–0.980], $p = 0.035$) in a model including level of AST (OR: 1.04

[1.004–1.076], $p = 0.029$), presence of NASH (OR: 2.41 [1.007–5.782], $p = 0.048$), presence of the metabolic syndrome (NS), and level of HOMA-IR (NS). Espresso, but not regular coffee consumption was higher in patients with lower HDL cholesterol level, higher triglyceride level, and the metabolic syndrome.

Conclusions: Consumption of regular coffee but not espresso is an independent protective factor for liver fibrosis in severely obese European patients.

© 2012 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most frequent chronic liver diseases in the world. NAFLD is associated with different types of liver damage ranging from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and finally to cirrhosis. The pathophysiology of NASH is now better understood. Genetic and environmental factors are implicated in the development of steatosis and NASH [1]. NASH is more often associated with overweight and obesity. However, thin patients with a normal waist circumference can also have NASH [2]. In contrast, morbidly obese patients have NASH in 15–20% of the cases [3]. The reasons for such heterogeneity of NASH manifestations are not well understood. Association of liver co-morbidity such as hepatitis B or C, HIV infection or toxic exposure, such as alcohol intake, tobacco and cannabis smoking is known to cause higher liver damage. Among the environmental factors, coffee consumption has been suggested to induce protective effects on the liver [4,5]. The level of liver enzymes and the degree of fibrosis and cirrhosis were lower in hepatitis C or alcoholic liver disease in patients who drank coffee. Cirrhosis was less frequent in heavy alcoholic drinkers who drank coffee compared to those who did not. Moreover, in cirrhotic patients hepatocellular carcinoma

Keywords: Fatty liver; Regular coffee; Espresso; Metabolic syndrome; Severely obese patients.

Received 11 May 2012; received in revised form 28 June 2012; accepted 9 July 2012; available online 20 July 2012

* Corresponding author. Address: Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Pôle Référence Hépatite C, Hôpital de l'Archet 2, 151, Route Saint-Antoine de Ginestière, BP 3079, Nice, F-06202 Cedex 3, France. Tel.: +33 4 92 03 59 43.

E-mail address: rodolphe.anty@laposte.net (R. Anty).

Abbreviations: NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steato-hepatitis; BMI, body mass index; ALT, alanine amino-transferase; AST, aspartate amino-transferase; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HOMA1-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; I-DF, International Diabetes Federation; NAS, NAFLD activity score; TGF, tumor growth factor; CTGF, connective tissue growth factor; UGT, UDP glucuronosyltransferases.



was less frequent in patients with a high consumption of coffee, regardless of the cause of liver damage [6]. Such protective effects could be due to caffeine, but also to other molecules such as cafestol, kahweol, chlorogenic acids, and phenols. Coffee is a complex beverage containing more than a hundred compounds. The composition of coffee is influenced by several factors such as the type of coffee bean and the type of preparation. For example, cafestol and kahweol are not present in “filtrated” coffee (regular coffee). Espresso, which is made using high-pressure hot water through a column of coffee in a percolator, has a different composition. Since the composition differs according to the preparation, the physiological effects might also be different. The impact of coffee and caffeine consumption on patients with NAFLD and NASH is not well known. A recent study has suggested that the level of liver enzymes, suspected to be due to NAFLD, is higher in patients with a low coffee consumption [7]. A large American study has found that liver fibrosis is lower in patients with high coffee consumption. Surprisingly, typical lesions of NASH are not influenced by coffee consumption [8].

The influence of coffee and caffeine consumption on liver lesions has yet to be studied in severely obese patients. The aim of this study was to compare the consumption of several kinds of coffee-containing beverages and other sources of caffeine such as tea, chocolate, and cola drinks on the liver histology of severely obese European patients.

Patients and methods

Study population

One hundred and ninety-five consecutive severely and morbidly obese patients, referred for bariatric surgery, were included between December 2009 and July 2011.

The study protocol was performed according to the French legislation regarding Ethics and Human Research and was approved by the local Ethics Committee (Huriet-Serusclet law, DGS 2003/0395). Written informed consent was obtained from all patients. All patients met the 1991 NIH Consensus Conference guidelines for gastrointestinal surgery for obesity [9]. All patients were negative for hepatitis B and C viral markers, autoantibodies indicative of autoimmune hepatitis, and had negligible alcohol consumption (<20 g/day in women and <30 g/day in men). Alcohol abuse was also excluded by interviewing the patients' relatives. Patients with a history of inflammatory disease (including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and inflammatory bowel disease), current infections, recent history of cancer (<5 years), and severe pulmonary or cardiac disease were not enrolled in the study. All patients underwent bariatric surgery and a surgical liver biopsy was obtained during the operation.

Preoperative assessment

Preoperative assessment was done 2 or 3 weeks before surgery and included: history and physical examination, blood pressure determination, anthropometric investigations (weight, height, waist circumference), psychiatric and nutritional evaluation, blood samples, obtained after overnight fasting for determination of plasma levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose, insulin, C-peptide, glycosylated hemoglobin, triglycerides, HDL cholesterol, and low density lipoprotein (LDL) cholesterol. ALT and AST levels were determined using the Roche® assay with pyridoxal phosphate on a Hitachi Modular® according to the International Federation of Clinical Chemistry and the Société Française de Biologie Clinique recommendations. In our center, the upper limit of normal ALT (N) was 11 IU/L for women and 41 IU/L for men. Glycosylated hemoglobin was determined with the Dual kit A1c Biorad® on a Variant 2 Biorad® (Biorad, USA). All patients also had chest X-ray, electrocardiogram, abdominal ultrasound and upper gastrointestinal endoscopy.

Insulin resistance was assessed by homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). HOMA-IR is the product of fasting plasma insulin concentration (mIU/L) and glucose concentration (mmol/L) divided by 22.5 [10].

The metabolic syndrome was diagnosed according to the International Diabetes Federation (IDF) as follows: central obesity defined by an increased waist circumference (≥ 80 cm in women and ≥ 94 cm in men) and any two of the following criteria: (i) triglycerides ≥ 1.7 mmol/L or treatment for hypertriglyceridemia; (ii) HDL-cholesterol <1.29 mmol/L in women and <1.03 mmol/L in men; (iii) systolic blood pressure (BP) ≥ 130 mmHg or diastolic BP ≥ 85 mmHg or treatment for hypertension; and (iv) fasting plasma glucose ≥ 5.6 mmol/L or previously diagnosed type 2 diabetes [11]. All the morbidly obese patients of this study had an increased waist circumference. Type 2 diabetes was defined by two elevated measurements for fasting plasma glucose ≥ 7 mmol/L.

Assessment of coffee and caffeine consumption

Questionnaires were performed by SM. Accurate questions were asked to patients within 2 months of bariatric surgery. Patients were questioned on their consumption of coffee and other foods and drinks containing caffeine during the period preceding surgery. Patients were asked about their typical consumption before receiving any recommendations for food intake to prepare for bariatric surgery. The daily consumption of coffee and caffeinated foods and drinks during a typical week was asked. The volume of consumed coffee and drinks was noted. Automatic conversion between the consumed volume of coffee and caffeinated drinks was done using a homemade specific converter. The amount of caffeine contained in each type of coffee and caffeinated drink is presented in Supplementary Table 1. In detail, coffee-containing beverages were espresso, double espresso, filtrated coffee (regular coffee), coffee made with an Italian coffee machine, and decaffeinated coffee. Other investigated beverages were green tea, black tea, black and milk chocolate, cola-based soft drinks, tea-based soft drinks, and energetic soft drinks. Alcohol, tobacco, and cannabis consumption was also evaluated.

Assessment of liver pathology

Hepatic wedges were obtained during bariatric surgery by specialized liver surgeons (IA and JG). Hepatic wedges were at least 10 mm long. Surgical liver biopsies were reviewed by one liver pathologist (MC-SP) without knowledge of the clinical or biological characteristics of the patients. Routine haematoxylin-eosin-safran and Sirius Red staining was performed on all the biopsies. Modified Brunt criteria for diagnosis of NASH were used [12]. All biopsies were graded according to the NAFLD activity score (NAS). This score classifies patients as simple steatosis (NAS ≤ 2), borderline (3 $\leq$ NAS ≤ 4) or definitive NASH (NAS ≥ 5) [13]. In the present study, liver bridging fibrosis was assessed by Sirius Red staining and was classified into seven stages according to the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores in Study Set as follows: F0: no fibrosis, F1a: mild zone 3 sinusoidal fibrosis, F1b: moderated zone 3 sinusoidal fibrosis, F1c: peri-portal sinusoidal fibrosis, F2: zone 3 sinusoidal fibrosis and peri-portal sinusoidal fibrosis, F3: bridging fibrosis, and F4: cirrhosis [13].

Statistical analysis

All tests were two-sided and an alpha <0.05 was considered to be statistically significant. Analyses were performed with NCSS 2007 software (Kaysville, Utah, USA). Results are presented as means and standard deviations or as absolute numbers and percentages, as shown in the Tables. Patients were analyzed according to presence of NASH, degree of NAS, and severity of fibrosis. Two groups were defined according to the level of fibrosis. The first group (n = 68) was composed of patients having a significant fibrosis stage equal or superior to F2. The other group (n = 127) was composed of patients with a fibrosis stage of F0 or F1. Univariate analyses were performed using Student's *t*-test or Chi² as appropriate. First multivariate analysis (model 1) was performed to determine the independent parameters associated with significant fibrosis (F ≥ 2).

Association between coffee intake and significant fibrosis was determined by logistic regression, significant fibrosis (F ≥ 2) being the dependent variable. A first logistic regression model (model 1) was made. Variables that were significantly (*p* <0.05) different between the 2 groups of patients according to the severity of fibrosis (F ≥ 2 and F <2) in univariate analysis, were included in this first model. When variables were linked together (such as AST and ALT or NAS and NASH) only one of them was chosen according to the clinical relevance. Caffeine from regular coffee, given as g/week, has been added to the model as a quantitative variable. This is a quantitative value reflecting the consumption of regular coffee (the volume of consumed regular coffee was the one given in the questionnaire). Automatic conversion between consumed volume of regular coffee and caffeine intake was done using a homemade specific converter (see the

Research Article

Table 1. Clinical and biological characteristics of the study population.

Variable	
Gender (F/M)	161/34
Age (yr)	39.4 ± 12.3
BMI (kg/m ²)	42.2 ± 4.7
Waist circumference (cm)	119.9 ± 12.6
ALT (IU/L)	32.3 ± 21.4
AST (IU/L)	27.8 ± 10.9
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.4
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.2 ± 0.9
Triglyceride (mmol/L)	1.5 ± 0.8
Blood glucose (mmol/L)	5.1 ± 1.3
C-peptide (pmol/L)	882.3 ± 375.9
HOMA1-IR	6.0 ± 6.0
Glycosylated hemoglobin (%)	5.8 ± 0.8
Tobacco use (packages per yr)	5.3 ± 12.2
Cannabis (joints per yr)	0.18 ± 1.5
Type 2 diabetes n (%)	36 (18.5)
IDF metabolic syndrome n (%)	91 (46.6)

F, female; M, male; BMI, body mass index; ALT, alanine amino-transferase; AST, aspartate amino-transferase; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HOMA1-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IDF: International Diabetes Federation.

Section "Assessment of coffee and caffeine consumption"). A second multivariate analysis (model 2) was performed using the parameters of model 1 plus the forced variable caffeine from espresso drinking given as g/week.

Correlations between stages of fibrosis and caffeine intake, and between caffeine from espresso drinking and number of parameters of metabolic syndrome, triglycerides, and HDL-cholesterol were estimated with the Pearson correlation coefficient.

Results

Characteristics of patients

The clinical, biological, and histological characteristics of patients are presented in Tables 1 and 2. The cohort consisted of 161 women and 34 men. Mean age was 39.4 ± 12.3 years and mean body mass index (BMI) was 42.2 ± 4.7 kg/m². Type 2 diabetes and metabolic syndrome were present in 18.5% and 46.6% of the patients, respectively. NASH was present in 19.5% of the patients without any difference between men and women (23.5% vs. 18.6%, *p* = n.s.). Significant fibrosis (≥2) was observed in 34.9% of the patients without any difference in gender (26.5% vs. 36.6%, *p* = n.s.). C peptide (1001.1 ± 518.6 vs. 856.0 ± 333.0 pmol/L, *p* = 0.04) and HOMA-IR (10.7 ± 17.3 vs. 5.7 ± 5.5, *p* = 0.002) were significantly higher in men than in women. HDL cholesterol was significantly lower in men than in women (1.1 ± 0.3 vs. 1.4 ± 0.4 mmol/L, *p* = 0.008). Body mass index, glycosylated hemoglobin, triglyceride, LDL cholesterol, and proportion of patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome were similar between men and women.

Consumption of cannabis was infrequent in our cohort (4.1%). Tobacco consumption occurred in 35.4% of the patients with 14.9 ± 16.6 packages of tobacco per year.

While coffee consumption was present in 72.8% of the patients, differences in the types of consumed coffee existed: 19.5% drank only regular coffee, 39% only espresso, 11.3% both

Table 2. Histological characteristics of the study population.

	Pathological parameters	
	in the whole population (n = 195) n (%)	in patients with NASH (n = 38) n (%)
Grade of steatosis		
0	14 (7)	0
1	75 (38.5)	5 (13.2)
2	68 (34.9)	14 (36.8)
3	38 (19.4)	19 (50)
Grade of ballooning		
0	119 (61.0)	0
1	75 (38.5)	37 (97.4)
2	1 (0.5)	1 (2.6)
Grade of inflammation		
0	153 (78.5)	0
1	40 (20.5)	36 (94.7)
2	2 (1)	2 (5.3)
NAFLD activity score		
0	14 (7.2)	0
1	64 (32.8)	0
2	36 (18.5)	0
3	37 (19)	4 (10.5)
4	24 (12.3)	14 (36.8)
5	19 (9.7)	19 (50)
6	1 (0.5)	1 (2.6)
≥3	81 (41.5)	38 (100)
≥4	44 (22.6)	34 (89.5)
≥5	20 (10.3)	20 (52.6)
NASH	38 (19.5)	-
Stage of fibrosis		
F0	31 (15.9)	3 (7.9)
F1a	62 (31.8)	10 (26.3)
F1b	14 (7.2)	2 (5.3)
F1c	20 (10.3)	2 (5.3)
F2	61 (31.3)	15 (39.5)
F3	6 (3.1)	5 (13.2)
F4	1 (0.5)	1 (2.6)

NAS, NAFLD activity score; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

Stage of steatosis, ballooning, inflammation, and fibrosis was assessed using the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores in Study Set.

regular coffee and espresso, and 9.2% decaffeinated coffee. 90.8% of the patients used to consume caffeinated soft drinks, which represent only 10.6% of the total intake of caffeine. Consumption of caffeine was mainly attributed to the consumption of regular and espresso coffee. Tea and chocolate represented 11.7% of the total caffeine intake. Consumption of regular coffee, decaffeinated coffee, caffeinated soft drinks, tea, and chocolate was similar for men and women. In contrast, espresso was consumed more by men than women (67.6% vs. 46.6%, *p* = 0.03).

Total caffeine and the amount of caffeine from regular coffee were similar between patients with and without metabolic syndrome, type 2 diabetes, or the individual parameters of the metabolic syndrome (low HDL cholesterol, high triglycerides, high blood glucose level, and high blood pressure). In contrast, consumption of caffeine from espresso drinking was significantly associated with metabolic abnormalities. Caffeine from espresso drinking was significantly higher in patients with the metabolic syndrome (1.4 ± 2.0 vs. 0.7 ± 1.4 g/week, $p = 0.005$), and with specific features of the metabolic syndrome such as low HDL cholesterol (1.3 ± 2.0 vs. 0.8 ± 1.4 g/week, $p = 0.03$), and high triglycerides (1.4 ± 2.3 vs. 0.8 ± 1.4 g/week, $p = 0.02$). The prevalence of high blood glucose and high blood pressure was similar in both groups. In espresso coffee drinkers, the amount of caffeine from espresso consumption positively correlated with the number of parameters of the metabolic syndrome and with the triglyceride level, and inversely correlated with HDL-cholesterol (Supplementary Table 2).

Association between NASH and coffee consumption and total caffeine intake

No association was found between the presence of NASH or NAS in coffee drinkers vs. non-drinkers. Similarly, the amount of total consumed caffeine was comparable in patients with or without NASH. No difference was found when caffeine intake was analyzed according to the sources of caffeine (regular coffee, espresso coffee, soft drinks, tea, and chocolate) in patients with or without NASH. Total caffeine and caffeine coming from coffee were also divided into 4 categories (0, <100 mg/day, 100–200 mg/day, more than 300 mg/day): no difference was found between patients with and without NASH and according to NAS. Similarly, the same proportion of patients with NASH was observed in both regular coffee drinkers and espresso coffee drinkers (18.3% and 17.3%, respectively).

Association between the severity of fibrosis and coffee and caffeine consumption

The stage of fibrosis in the whole population and in patients with NASH is presented in Table 2. As expected, hepatic fibrosis positively correlated with NAS ($r = 0.3$, $p < 0.0001$) and with the number of features of the metabolic syndrome ($r = 0.22$, $p = 0.002$).

A comparison of the patients divided into 2 groups according to the severity of fibrosis (F0–F1 and F2–F4) was made (Table 3). Patients with the highest level of fibrosis had a significantly lower consumption of caffeine coming from regular coffee. No significant difference was found concerning the amount of total caffeine, caffeine coming from espresso, soft drinks, tea, and chocolate. Patients in the F2–F4 group had significantly higher levels of AST, ALT, HOMA-IR, prevalence of the metabolic syndrome, NASH, and level of NAS.

A multivariate analysis using logistic regression was performed in order to find independent parameters associated with the higher level of fibrosis in patients. Caffeine intake from regular coffee, which reflected consumption of regular coffee, was a significant and independent factor associated with significant fibrosis in a model including AST, HOMA-IR, presence of the metabolic syndrome, and presence of NASH. Consumption of regular coffee was protective against liver fibrosis as the OR was below 1. In contrast, the level of AST and the presence of NASH were pos-

itively and independently associated with the presence of significant fibrosis (Table 4). A second logistic regression analysis (model 2) was made by adding the forced variable caffeine intake from espresso consumption (Supplementary Table 3). The results were similar to those of model 1. Caffeine intake from regular coffee was the only protective factor while the level of AST and the presence of NASH were associated with a higher level of fibrosis. Caffeine intake from espresso consumption was not independently associated with the level of fibrosis.

Finally, in regular coffee drinkers, the amount of caffeine from regular coffee inversely correlated with the severity of fibrosis ($r = -0.26$, $p = 0.041$, Supplementary Table 2).

Discussion

In this study, consumption of regular coffee but not espresso was associated with a lower level of fibrosis and was independently protective against fibrosis in a cohort of severely obese patients undergoing bariatric surgery. Total consumption of coffee, regular coffee, and espresso was not associated with NASH. By contrast, consumption of espresso was positively associated with the presence of the metabolic syndrome. This study suggests that specific components from regular coffee, possibly not only caffeine, decrease the risk of liver fibrosis in severely obese patients. These beneficial effects were not observed with espresso.

Coffee is one of the most popular beverages in the Western world. The impact of coffee on health has been studied for twenty years [14]. For example, potential positive effects were reported on the central nervous system, particularly for Parkinson's disease and depression [14]. A beneficial effect on the liver has been suggested more recently. First, epidemiological studies have reported a lower level of liver enzymes (GGT, ALT) in association with coffee drinking [5]. In addition, less fibrosis and cirrhosis have been observed in patients with alcoholic liver disease among those who drank coffee [5]. The protective action of coffee against liver fibrosis or inflammation has also been reported in patients with hepatitis C [15,16]. An anti-proliferative effect has also been suspected since the occurrence of hepatocellular carcinoma was less frequent in cirrhotic patients who drank coffee. This has been observed in alcoholism, in post hepatitis C and other liver diseases [6,17,18]. In patients with hepatitis C, coffee consumption has also been associated with an increase of sustained virological response after antiviral therapy [19]. Only two cohort studies have been reported on the influence of coffee on the evolution and severity of NAFLD [7,8]. Binerdinc *et al.* reported that coffee consumption was associated with a decrease in the levels of liver enzymes in patients with suspicion of NAFLD [7]. More recently, Molloy *et al.* have reported that coffee consumption is associated with less fibrosis in overweight and obese American patients [8], the effect on NASH being less clear. In a large cohort of European morbidly obese patients, we found that regular coffee consumption was associated with less fibrosis. We were surprised to observe that not all kinds of coffee were equivalent in terms of a protective effect against fibrosis; regular filtered coffee but not espresso consumption appearing to be protective.

Coffee is a very complex mixture of approximately one hundred compounds. The three main compounds are caffeine, diterpenes, such as cafestol and kahweol, and chlorogenic acids. Caffeine modifies the TGF β signaling pathway through an

Research Article

Table 3. Characteristics of the patients according to the stage of fibrosis.

Variable	Fibrosis <F2 (n = 127)	Fibrosis ≥F2 (n = 68)	p value
Gender (F/M)	102/25	59/9	n.s.
Age (yr)	39.3 ± 12.4	39.6 ± 12.2	n.s.
BMI (kg/m ²)	42.3 ± 5.0	42.2 ± 4.0	n.s.
Waist circumference (cm)	119.7 ± 12.1	120.2 ± 13.5	n.s.
ALT (IU/L)	29.7 ± 19.2	37 ± 24.4	0.03
AST (IU/L)	26.0 ± 7.7	31.3 ± 14.4	0.001
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.4	n.s.
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.2 ± 1.0	3.2 ± 0.8	n.s.
Triglyceride (mmol/L)	1.45 ± 0.8	1.54 ± 0.8	n.s.
Blood glucose (mmol/L)	5.0 ± 1.1	5.3 ± 1.5	n.s.
C-peptide (pmol/L)	868.7 ± 367.8	907.9 ± 392.5	n.s.
HOMA1-IR	5.3 ± 4.1	7.3 ± 8.5	0.04
Glycosylated hemoglobin (%)	5.8 ± 0.7	5.8 ± 0.8	n.s.
Type 2 diabetes n (%)	21 (16.5)	15 (22.1)	n.s.
Metabolic syndrome n (%)	53 (41.7)	40 (58.8)	0.02
Total caffeine (g/wk)	2.55 ± 2.52	1.98 ± 2.04	n.s.
Number of espresso/wk	10.0 ± 16.5	11.4 ± 19.3	n.s.
Quantity of espresso consumed (ml/wk)	578.3 ± 986.5	682.1 ± 1157.8	n.s.
Caffeine from espresso (g/wk)	0.96 ± 1.64	1.14 ± 1.93	n.s.
Quantity of regular coffee consumed (ml/wk)	1441.7 ± 2889.9	575.4 ± 1254.5	0.02
Caffeine from regular coffee (g/wk)	1.00 ± 2.02	0.40 ± 0.88	0.02
Caffeine from tea and chocolate (g/wk)	0.29 ± 0.41	0.25 ± 0.32	n.s.
Total caffeine soda (g/wk)	0.29 ± 0.45	0.18 ± 0.26	n.s.
Tobacco use (packages per yr)	4.9 ± 11.1	6.0 ± 14.0	n.s.
Cannabis (joints per yr)	0.2 ± 1.8	0.09 ± 0.7	n.s.
NAFLD activity score (NAS)			
≥3 n (%)	45 (35.4)	36 (52.9)	0.02
≥4 n (%)	20 (15.7)	24 (35.3)	0.002
≥5 n (%)	7 (5.5)	13 (19.1)	0.003
NASH n (%)	17 (13.4)	21 (30.9)	0.003

F, female; M, male; BMI, body mass index; ALT, alanine amino-transferase; AST, aspartate amino-transferase; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HOMA1-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IDF, International Diabetes Federation; NAS, NAFLD activity score; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; n.s., not significant.

Stage of fibrosis was assessed using the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores in Study Set.

increase in the level of SMAD, which could decrease the transcription of CTGF, one of the major stimulator of liver fibrosis [20]. However, the antioxidant cytoprotective effects of coffee could be indirectly induced by UDP glucuronosyltransferases (UGT1A) and might be independent of caffeine content, cafestol, and kahweol [22].

The type of preparation of coffee influenced the composition of the final beverage. Filtrated (regular) coffee did not contain cafestol or kahweol, and since espresso is prepared using high pressure boiling water through a column of coffee (barista method), it could modify several of its compounds. The espresso content in caffeine and 5-O-caffeoylquinic acid, the main chlorogenic acid, and their ratio varied largely in 20 commercial espressos tested in Scotland; the infusion/filtration used for regular coffee better preserved chlorogenic acids than the barista method used for espresso [21].

Table 4. Multivariate analysis assessing factors associated with significant fibrosis (≥F2) in morbidly obese patients.

	OR	95% CI	p value
AST	1.039	1.004-1.076	0.029
Caffeine from regular coffee*	0.752	0.578-0.980	0.034
HOMA-IR	0.993	0.955-1.032	0.706
NASH	2.413	1.007-5.782	0.048
IDF metabolic syndrome	1.253	0.622-2.527	0.528

*Caffeine from regular coffee intake (g/week) reflects consumption of regular coffee.

Stage of fibrosis was assessed using the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores in Study Set.

Filtrated coffee is one of the most commonly used in the US, whereas espresso is the most consumed coffee in Europe. In

our study, around 50% of our patients took at least one espresso a week whereas around 30% took at least one cup of regular coffee a week. One could hypothesize that the difference between regular coffee and espresso in our study could be due to the fact that potentially benefic compound(s) are present in regular coffee but not in espresso. Another possibility could be that the beneficial effect of some compounds present in regular coffee is antagonized in other preparations, including espresso. Indeed, a positive correlation was found between espresso consumption and the metabolic syndrome and some of its constitutive parameters, such as low HDL and high triglyceride levels. Of note, consumption of regular coffee was not associated with the presence of metabolic parameters. Espresso consumption could be associated with an abnormal metabolic profile, which could favor the occurrence of fibrosis during severe obesity. One hypothesis could be that sucrose added by espresso consumers could be potentially deleterious. Sucrose is composed of one molecule of glucose and one molecule of fructose. The use of fructose has been associated with the severity of fibrosis in American patients with NASH [23,24]. This could be due to the specific hepatic metabolism of fructose favoring ATP depletion, lipotoxicity, insulin resistance, and TNF expression [25]. Fructose consumption has also been associated with increased gut permeability and endotoxemia [25]. Severe NASH lesions have been obtained in mice receiving high-fructose corn syrup [26]. Sucrose seems also to favor features of obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and fatty liver in mouse or rat models [27,28]. Unfortunately, we did not record the amount of sugar used with coffee by our patients. However, one must keep in mind that the concentration of sugar in an espresso (120 g/L) is similar to that of a typical cola soft drink (106 g/L). Sugar used in soft drinks is mainly based on high-fructose corn syrup. The increasing use in beverages of high-fructose corn syrup has been suggested to be a factor responsible for the increase of obesity in adults and teenagers observed in developed countries for the last thirty years [29].

In conclusion, we found that consumption of regular filtrated coffee but not espresso was independently associated with a lower level of fibrosis in morbidly obese European patients. The finding that some compounds in coffee can protect from liver fibrosis is of potential pharmacological interest. As sugar could decrease the beneficial effect of coffee, coffee consumption, particularly regular coffee, could be encouraged but without sugar addition!

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Financial support

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (CHU de Nice), and charities (AFEF/Schering-Plough and AFEF/ROCHE to PG and AT). PG is a recipient of an Interface Grant from the Centre Hospitalier Universitaire de Nice.

Acknowledgments

We thank Mme Annie Fafin for her daily, precious work and unfailing help. We thank Dr Moncef Dahman and Dr Frederic Berthier for their help and Yannick Le Marchand-Brustel for her advice concerning the discussion. We thank Dr M C Brahimi-Horn for editorial correction.

In memory of Jean Gabriel Bernard-Cuisinier.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.07.014>.

References

- [1] Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010;53:372–384.
- [2] Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Vanni E, Grieco A, Miele L, et al. Risk of non alcoholic steatohepatitis and fibrosis in patients with non alcoholic fatty liver disease and low visceral adiposity. *J Hepatol* 2010;54:1244–1249.
- [3] Zimmermann E, Anty R, Tordjman J, Verrijken A, Gual P, Tran A, et al. C-reactive protein levels in relation to various features of non-alcoholic fatty liver disease among obese patients. *J Hepatol* 2011;55:660–665.
- [4] Masterton GS, Hayes PC. Coffee and the liver: a potential treatment for liver disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22:1277–1283.
- [5] Cadden JS, Partovi N, Yoshida EM. Review article: possible beneficial effects of coffee on liver disease and function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26:1–8.
- [6] Gelatti U, Covolo L, Franceschini M, Pirali F, Tagger A, Ribero ML, et al. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *J Hepatol* 2005;42:528–534.
- [7] Bircerdinc A, Stepanova M, Pawloski L, Younossi ZM. Caffeine is protective in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:76–82.
- [8] Molloy JW, Calcagno CJ, Williams CD, Jones FJ, Torres DM, Harrison SA. Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2011;10:24731.
- [9] NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med* 1991;115:956–961.
- [10] Wallace T, Matthews D. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 2002;19:527–534.
- [11] Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome – a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469–480.
- [12] Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467–2474.
- [13] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
- [14] Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;46:101–123.
- [15] Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010;51:201–209.
- [16] Costentin CE, Roudot-Thoraval F, Zafrani ES, Medkour F, Pawlowsky JM, Mallat A, et al. Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011;54:1123–1129.
- [17] Tanaka K, Hara M, Sakamoto T, Higaki Y, Mizuta T, Eguchi Y, et al. Inverse association between coffee drinking and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Japan. *Cancer Sci* 2007;98:214–218.
- [18] Montella M, Polesel J, La Vecchia C, Dal Maso L, Crispo A, Crovatto M, et al. Coffee and tea consumption and risk of hepatocellular carcinoma in Italy. *Int J Cancer* 2007;120:1555–1559.
- [19] Freedman ND, Curto TM, Lindsay KL, Wright EC, Sinha R, Everhart JE. Coffee consumption is associated with response to peginterferon and ribavirin

Research Article

- therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011;140:1961–1969.
- [20] Gressner OA. Less Smad2 is good for you! A scientific update on coffee's liver benefits. *Hepatology* 2009;50:970–978.
- [21] Crozier TW, Stalmach A, Lean ME, Crozier A. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. *Food Funct* 2012;3:30–33.
- [22] Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP. Coffee induces expression of glucuronosyltransferases by the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach. *Gastroenterology* 2010;139:1699–1710.
- [23] Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008;48:993–999.
- [24] Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51:1961–1971.
- [25] Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:251–264.
- [26] Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G987–G995.
- [27] Ma T, Liaset B, Hao Q, Petersen RK, Fjaere E, Ngo HT, et al. Sucrose counteracts the anti-inflammatory effect of fish oil in adipose tissue and increases obesity development in mice. *PLoS One* 2011;6:e21647.
- [28] Roncal-Jimenez CA, Lanasa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, et al. Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism* 2011;60:1259–1270.
- [29] Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E685–E694.

Effects of sleeve gastrectomy in high fat diet-induced obese mice:
respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue
inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots

Anne-Sophie Schneck, Antonio Iannelli, Stéphanie Patouraux, Déborah Rousseau, Stéphanie Bonnafous, Beatrice Bailly-Maitre, Ophélia Le Thuc, Carole Rovere, Patricia Panaia-Ferrari, Rodolphe Anty , Albert Tran, Philippe Gual, Jean Gugenheim

Surg Endosc (2014) 28:592–602 593

Effects of sleeve gastrectomy in high fat diet-induced obese mice: respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots

Anne-Sophie Schneck · Antonio Iannelli · Stéphanie Patouraux · Déborah Rousseau ·
Stéphanie Bonnafous · Beatrice Bailly-Maitre · Ophélie Le Thuc ·
Carole Rovere · Patricia Panaia-Ferrari · Rodolphe Anty · Albert Tran ·
Philippe Gual · Jean Gugenheim

Received: 10 June 2013 / Accepted: 30 August 2013 / Published online: 3 October 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract

Background Sleeve gastrectomy (SG) has become a popular bariatric procedure. The mechanisms responsible for weight loss and improvement of metabolic disturbances have still not been completely elucidated. We investigated the effect of SG on body weight, adipose tissue depots, glucose tolerance, and liver steatosis independent of reduced caloric intake in high-fat-diet-induced obese mice. **Methods** C57BI/6 J mice fed a high fat diet (45 %) for 33 weeks were divided into three groups: sleeve gastrectomy (SG, 13 mice), sham-operated ad libitum fed (SALF, 13 mice) and sham-operated pair fed (PFS, 13 mice). The animals were humanely killed 23 days after surgery. **Results** In SG mice, food intake was reduced transiently, but weight loss was significant and persistent compared to

controls (SG vs. PFS, $P < 0.05$; PFS vs. SALF, $P < 0.05$). SG mice showed improved glucose tolerance and lower levels of liver steatosis compared with controls (area under the curve, SG vs. PFS, $P < 0.01$; PFS vs. SALF, $P < 0.05$) (liver steatosis, SG vs. PFS, $P < 0.05$; PFS vs. SALF, $P < 0.01$). This was associated with a decrease in the ratios of the weight of pancreas, epididymal and inguinal adipose tissues to body weight, and an increase in the ratio of brown adipose tissue weight to body weight. Epididymal adipose tissue was also infiltrated by fewer activated T cells and by more anti-inflammatory regulatory T cells. Serum levels of fasting acyl ghrelin were still significantly decreased 3 weeks after surgery in SG mice compared to PFS mice ($P < 0.05$).

Conclusions Reduced white adipose tissue inflammation, modification of adipose tissue development (brown vs. white adipose tissue), and ectopic fat are potential

Anne-Sophie Schneck and Antonio Iannelli have contributed equally to this article.

A.-S. Schneck (✉) · A. Iannelli · R. Anty · A. Tran · P. Gual ·
J. Gugenheim
Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet,
Pôle Digestif, Nice, France
e-mail: escargot2@yahoo.com

A. Iannelli
e-mail: antonio_iannelli@hotmail.com

A.-S. Schneck · A. Iannelli · S. Patouraux · D. Rousseau ·
S. Bonnafous · B. Bailly-Maitre · O. Le Thuc · C. Rovere ·
R. Anty · A. Tran · P. Gual · J. Gugenheim
Faculté de Médecine, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice,
France

A.-S. Schneck · A. Iannelli · S. Patouraux · D. Rousseau ·
S. Bonnafous · B. Bailly-Maitre · R. Anty · A. Tran · P. Gual ·
J. Gugenheim
Equipe 8 « Complications hépatiques de l'obésité », INSERM,
U1065, Nice, France

S. Patouraux · P. Panaia-Ferrari
Département de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de
Nice, Hôpital de l'Archet, Nice, France

O. Le Thuc · C. Rovere
Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097,
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS),
Valbonne, France

mechanisms that may account for the reduced caloric intake independent effects of SG.

Keywords Bariatric surgery · Glucose tolerance · Morbid obesity · Sleeve gastrectomy · Weight loss

Sleeve gastrectomy (SG), first reported as the restrictive part of the biliopancreatic diversion with duodenal switch [1], rapidly gained wide consensus in the bariatric surgical community because of its straightforward surgical technique. It preserves the pylorus and lacks intestinal bypass, which makes the upper digestive tract accessible to endoscopic exploration [2]. Furthermore, the weight loss obtained with SG has been shown to be comparable to that reported for Roux-en-Y gastric bypass, not only in the short term but also beyond 5 years [3]. This has made SG a legitimate stand-alone bariatric procedure [3].

SG consists of vertical gastrectomy over an intraluminal calibration bougie that reduces by about 80 % the capacity of the stomach and results in a dramatic reduction in food intake. However, it has been shown that SG is associated with a decrease in the circulating levels of fasting ghrelin, the orexigenic hormone mainly secreted by the gastric fundus mucosa [4], and postprandial intestinal peptides such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY), which influence appetite and food intake [5]. The reported short-term results for SG and Roux-en-Y gastric bypass suggest a comparable effect on type 2 diabetes [6, 7]. Furthermore, although the metabolic effects of SG can be at least partly explained by a reduction in the fat mass occurring after surgery, other mechanisms may be responsible for improvement in glucose tolerance, such as a decrease in the low-grade systemic inflammatory state linked to obesity [8]. Taken together, these results indicate that the mechanisms leading to the loss of weight and metabolic changes that follow SG cannot be explained solely by the reduced caloric intake induced by a reduction in the gastric capacity.

We tested the hypothesis that reduced caloric intake alone is not sufficient to account for the effects of SG on body weight, glucose tolerance, and liver steatosis in high fat diet (HFD)-induced obese mice. We also investigated the role of inflammation of adipose tissue on metabolic disturbances linked to obesity.

Materials and methods

Animals and study design

Two-month-old male C57BL/6 J mice (Janvier) acclimated to our animal facilities under a 12/12-h light/dark cycle at a

temperature of 21 ± 2 °C were fed ad libitum a HFD (45 kcal % fat, 35 kcal % carbohydrate, 20 kcal % protein) (D12451; Research Diets) and a fructose sweetened beverage (3 %) for 32 weeks. At 40 weeks of age, mice underwent the surgical procedures as described below. All experiments were performed according to the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals under a license issued by the local ethical committee. Mice were assigned to one of three groups. Group 1 ($n = 13$) consisted of sham-operated, ad libitum-fed mice (SALF). In this group, mice had a laparotomy only with ad libitum access to food and water after surgery. Group 2 ($n = 13$) consisted of mice that had the SG. These mice also had ad libitum access to food and water after surgery. The group 3 mice ($n = 13$) were sham-operated pair-fed (PFS) mice. These mice had a laparotomy only with access to the same amount of food as their counterparts in group 2. Before surgery, mice were deprived of food for 8 h. Mice were fed the same HFD after surgery for the duration of the study.

Operative technique

Anesthesia was induced and maintained throughout the procedure with intraperitoneal injection of ketamine (150 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg). Preoperatively, 20 mg/kg ceftriaxone (Sandoz) was administered, and 6 mg/ml paracetamol (Macopharma) was added to the drinking water after surgery. Mice were placed on a heating pad to avoid hypothermia, and the abdomen was disinfected before a 2-cm midline laparotomy was performed. The model for SG in mice has been previously validated in other studies [9, 10]. Our model is a modified version of what has previously been reported. The mouse stomach contains two well-defined areas, a nonglandular forestomach and a glandular stomach that is connected to the duodenum. Ghrelin is produced in the distal glandular stomach. The forestomach was resected first, and the glandular stomach was then closed with a 6-0 polypropylene (Prolene; Ethicon Inc.) running suture. To complete the SG to the glandular stomach, a metallic clip (Premium Surgiclip II; Covidien Surgical) was placed on the glandular stomach parallel to the lesser curvature (midway between the lesser and greater curvature), and a vertical gastrectomy was performed along the clip that was used to guide a 6-0 polypropylene running suture. The abdominal wall was closed with Monocryl 4-0 (Ethicon Inc.) (continuous suturing). The skin was closed with Monocryl 3-0 (Ethicon Inc.) (intracutaneous continuous suturing). In the sham-treated groups (SALF and PFS), the stomach was mobilized, and the time of surgery was then extended for the same duration required to perform the SG to mimic surgery-related stress and trauma. After surgery, animals

were housed individually and subcutaneous fluids (1 ml of NaCl 0.9 %; Laboratoire Aguettant) were administered for the first postoperative day. Animals were given free access to a fructose-sweetened beverage 6 h after surgery and a HFD the day after surgery. Two days after surgery, the animals were housed five per cage.

Food intake and body weight measurement

Food intake was monitored every day for each cage from 1 week before surgery and then throughout the study period. PFS mice were given the same amount of food as the SG mice. SALF mice were given free access to food and water. For body weight measurement, mice were weighted individually daily at 6 a.m. from 1 week before surgery and throughout the study period. All animals were humanely killed 23 days after surgery. Each animal underwent necropsy immediately after death, and the epididymal (EAT), brown (BAT), and inguinal adipose tissues (IAT) were collected, weighed (in the case of EAT a sample was further processed as indicated below), and snap frozen at -80°C . The liver and pancreas were also collected. A sample was sent for histology, and the remaining tissue was snap frozen at -80°C .

Histopathological assessment of steatosis

Liver samples were fixed in 4 % neutral-buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin for pathological evaluation after hematoxylin and eosin staining. Results are expressed as percentages and represent the mean number of hepatocytes with macrovesicular steatosis. Histological examination was performed in a blinded fashion by the same pathologist.

Intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT)

Mice were fasted for 8 h with free access to water. Conscious mice received an intraperitoneal injection of a glucose solution (1 g/kg body weight; 250 mg/ml) and blood glucose levels were determined before (baseline) and every 30 min for 180 min using a glucometer optium (Xceed; Abbott).

Serum transaminases, fasting ghrelin

Serum fasting ghrelin concentrations were assessed using a rat/mouse ghrelin (active) ELISA (Millipore Corporation) according to the manufacturer's protocol. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) serum concentrations were measured with an Olympus AU5400 (Olympus France) automatic analyzer.

Preparation of the stromal vascular fraction of adipose tissue

White epididymal adipose tissue pads were removed and the stromal vascular fraction was immediately purified as previously described [11]. Briefly, adipose tissue pads were cut into small pieces and rinsed in a buffer containing 120 mM NaCl, 4 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 750 μM CaCl_2 , 10 mM NaHCO_3 and 30 mM HEPES pH 7.4. Explants were incubated at 37°C for 30 min in 15 ml of the above buffer supplemented with 1 % BSA, 280 mM glucose and 15 mg of type 1 collagenase (Worthington Biochemical Corporation). Adipocytes were then collected by filtration and floatation. The stromal vascular fraction was collected by centrifugation for 5 min at 750 g.

Antibodies and flow cytometric analysis

Hamster antibodies against mouse CD3 (clone 145-2C11) and rat antibodies against mouse CD44 (clone IM7) and FoxP3 (clone FJK-16s) were purchased from Becton–Dickinson or eBioscience. For intracellular staining, the FoxP3 staining buffer set (eBioscience) was used according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry was performed on a FACS-Canto and analyzed using FACS-Diva version 6.0 software (BD-Bioscience).

RNA isolation and quantitative real-time PCR

Hypothalami were dissected and stored at -80°C . Total mRNA was isolated according the Chowynski method using a Fast Prep apparatus (Q-Biogene). Two micrograms of total RNA were denatured at 65°C for 10 min and incubated for 1 h at 42°C in presence of 2.5 mM dNTP, 100 U Superscript II (Invitrogen) using 0.5 μg oligo(dT) primer in a total volume of 20 μl , followed by inactivation for 15 min at 70°C . A negative control lacking RT was also performed in each assay (NRT). Real time PCR was performed from reverse transcribed cDNA samples for relative amounts of mRNA levels for the genes of interest. Quantitative real time PCR was performed in a Light Cycler 480 apparatus (Roche Diagnostics) using qPCRTMMastermix Plus for SYBR Green I reagent (Eurogentec) as described by the manufacturer. Primers were designed using Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). mPOMC-F: AGTGCCAGGACCTCACCA; mPOMC-R: CAGCGAGAGGTCTGAGTTTG; mNPY-F: CCGCTCTGCGACACTACAT; mNPY-R: TGTCTCAGGGCTGGATCTCT; mAgRP-F: CCCAGAGTTCCCA GGTCTAAGTCT; mAgRP-R: CACCTCCGCCAAAGCT TCT. mGAPDH-F: GAACATCATCCCTGCATCC; mGAPDH-R: CCAGTGAGCTTCCCGTTCA. Five microliters of the RT or NRT mixture was added to $1\times$ Sybr Green

PCR buffer containing 5 mM MgCl_2 , dNTPs including dUTP, uracil-*N* glycosylase, SYBR Green I, and Hot Goldstar DNA polymerase in a total volume of 25 μl . PCR cycling was performed at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min for a total of 40 cycles. Real-time PCR was performed to amplify mouse POMC, NPY, AgRP, and GAPDH mRNA. For each assay, the PCR was performed in duplicate to determine the relative quantities of target genes and GAPDH amplicons.

Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test was used for the comparison of more than two study groups. If the Kruskal–Wallis test was significant, then a Mann–Whitney *U* test was used for comparison between groups for statistical significance. All values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by NCSS 2007 software. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Body weight, food intake, ghrelin serum level, and expression of melanocortin system neuropeptides

Five animals died immediately after surgery within 6 h. The death was attributed to anesthesia because no anomaly was found at necropsy.

No differences between the three groups of mice with respect to body weight (SALF 48.4 ± 2.5 g vs. SG 46.7 ± 2.3 g vs. PFS 48.4 ± 4.9 g, $P = 0.335$) and daily food intake (SALF 2.2 ± 0.12 g vs. SG 2.6 ± 0.1 g vs. PFS 2.4 ± 0.15 g, $P = 0.15$) were observed before surgery. SG mice showed a significant weight loss compared to SALF mice, as expected (SG 36.9 ± 3.9 g vs. SALF 48.1 ± 4.2 g, $P < 0.05$), but also compared to PFS mice (SG 36.9 ± 3.9 g vs. PFS 41.3 ± 4.9 g, $P < 0.05$) (Fig. 1A, B). On average, SG mice consumed spontaneously significantly less chow per day for the first 2 weeks than SALF mice and reached the control mice on the third week (Fig. 1C, D). In agreement with this, both the gene expression of the neuropeptide Y (NPY) and Agouti-related peptide (AgRP) in the hypothalamus arcuate nucleus, which increase feeding and decrease energy expenditure, were not different in SG mice compared to control mice ($P = 0.799$ and $P = 0.799$, respectively). Likewise, the gene expression of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene, which decreases appetite and increases energy expenditure, was not different among the three groups (Fig. 1E) at the end of the experiment ($P = 0.551$).

However, the serum levels of fasting acyl ghrelin were still significantly decreased 3 weeks after surgery in SG mice compared to PFS mice (SG 101.5 ± 13.7 pg/ml vs. PFS 298.1 ± 68.8 pg/ml, $P < 0.042$). Taken together, these data indicate that the loss of weight that follows SG cannot be explained exclusively by the reduced caloric intake of SG.

Glucose tolerance

We then evaluated the impact of SG on glucose tolerance. Although the three groups of mice were intolerant to glucose before surgery (Fig. 2A), SG mice and PFS mice showed significantly better glucose tolerance on day 15 compared with the baseline glucose time course as shown by the IGTT, with lower 60-, 90-, and 120-min peak levels (Fig. 2A, B) ($P < 0.05$) and a lower mean area under the curve (AUC) (SG 5925 ± 1083.7 mg/dl [min] vs. PFS 11903.1 ± 818.8 mg/dl [min] vs. SALF 13140 ± 1668.3 mg/dl [min]; SG vs. PFS, $P < 0.01$; SG vs. SALF, $P < 0.01$) (Fig. 2C). As expected, glucose tolerance did not improve in SALF mice (mean AUC, $P = 0.895$). SG mice showed a significantly lower mean AUC after IGTT ($P < 0.01$) and lower 60-, 90-, and 120-min peak levels ($P < 0.05$) compared to PFS mice (Fig. 2A–C), indicating that food restriction was not sufficient to account for the improvement in glucose tolerance observed in SG mice.

Weight of the pancreas and body fat

Fat accumulation in the pancreas and expansion of adipose tissue, inflammation play an important role in alterations to glucose homeostasis. Interestingly, the mean pancreas/body weight ratio was significantly lower in SG mice compared to control groups (SG 0.27 ± 0.06 vs. PFS 0.44 ± 0.03 , $P = 0.0482$; SG 0.27 ± 0.06 % vs. SALF 0.44 ± 0.02 %, $P = 0.055$) (Fig. 3A). Further, SG mice showed significantly lower EAT and IAT/body weight ratios compared with SALF ($P = 0.0004$ and $P = 0.0001$, respectively), and PFS mice ($P = 0.001$ and $P = 0.003$, respectively). In contrast, the BAT/body weight ratio was increased in SG mice (1.3 %) compared to PFS (1 %) and SALF mice (0.9 %). Although this difference was not statistically significant for SG versus PFS mice ($P = 0.39$), the SG mice had a significantly higher BAT/body weight ratio compared SALF mice ($P = 0.049$) (Fig. 3B). As adipose tissue inflammation, mainly as a result of T cell infiltration, has been shown to play a pivotal role in mechanisms leading to insulin resistance and liver steatosis [12–14], we investigated the number of T cells responsible for the regulation of the inflammatory response in EAT. Although the CD3^+ T cells were equally represented in the EAT of the three groups of mice, the number of activated T

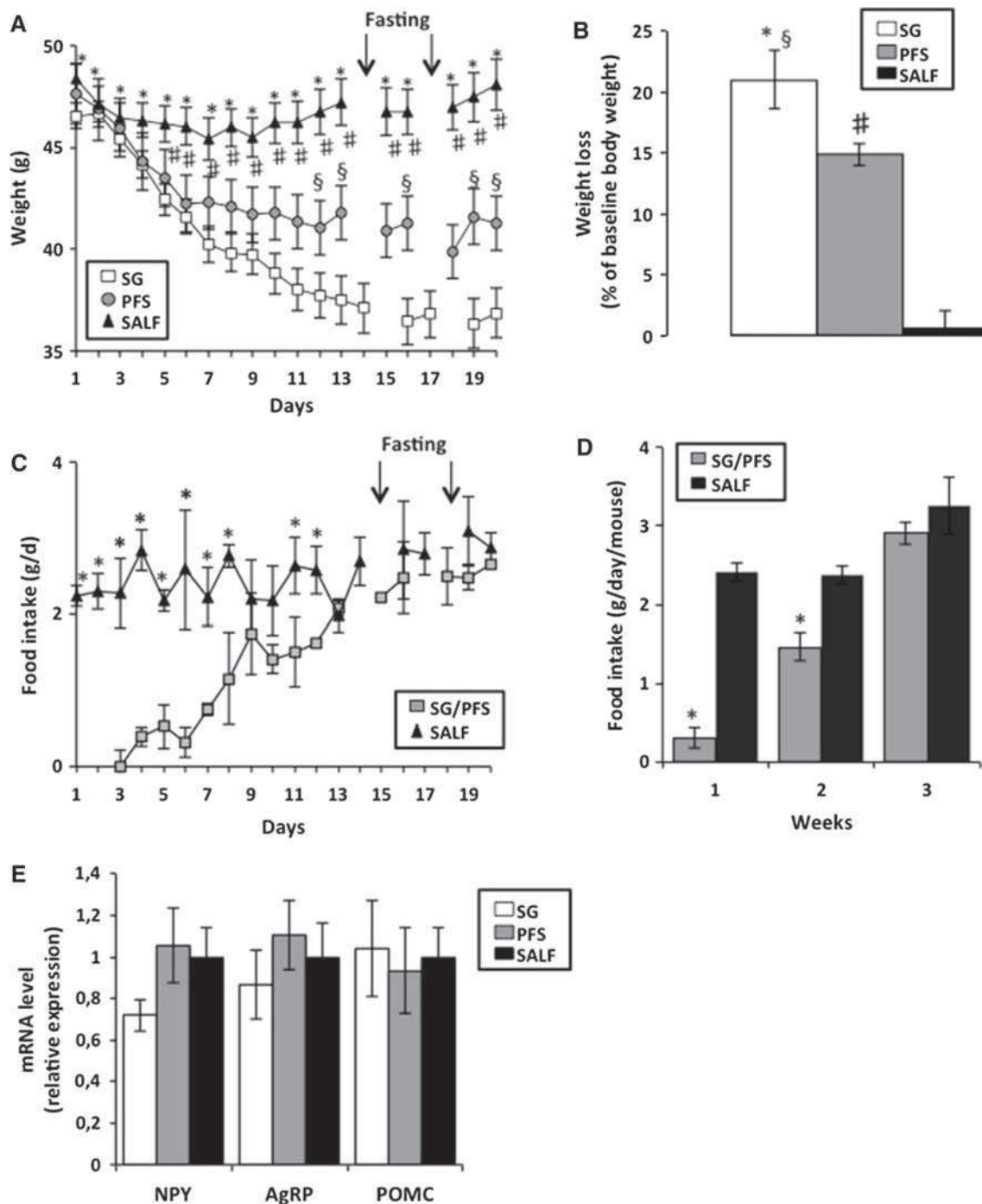


Fig. 1 Effect of sleeve gastrectomy on body weight, food intake, and the expression of melanocortin system neuropeptides. Evolution of the body weight **A**, weight loss (percentage of body weight ratio at baseline) **B**, daily food intake (mean weight (g)/mouse) **C**, and average food intake (mean weight (g)/mouse/week) **D** were evaluated in SG (10 animals), PFS (13 animals) and SALF (11 animals) mice. **E** Expression of neuropeptide Y (NPY), Agouti-related peptide (AgRP) and pro-opiomelanocortin (POMC), in the hypothalamus

cells, as evaluated by the CD44/FOXP3 ratio, was decreased, and the number of anti-inflammatory regulatory T (Treg) cells, as evaluated by the intracytoplasmic

arcuate nucleus in SG (10 mice), PFS (13 mice) and SALF mice (11 mice) at 23 days after the surgery. The gene expression of the peptide was normalized to the mRNA levels of GAPDH. Results are expressed relative to the expression level of the SALF group and expressed as mean $\pm$ SEM. PFS pair-fed sham-operated, SALF sham-operated ad libitum fed, SG sleeve gastrectomy. Mann–Whitney U test $*P < 0.05$ between SG and SALF mice, $^{\#}P < 0.05$ between PFS and SALF mice, $^{\$}P < 0.05$ between SG and PFS

expression of FOXP3, was increased in the EAT of SG mice compared to PFS and SALF mice (Fig. 3C). These data indicate that SG mice not only had less EAT

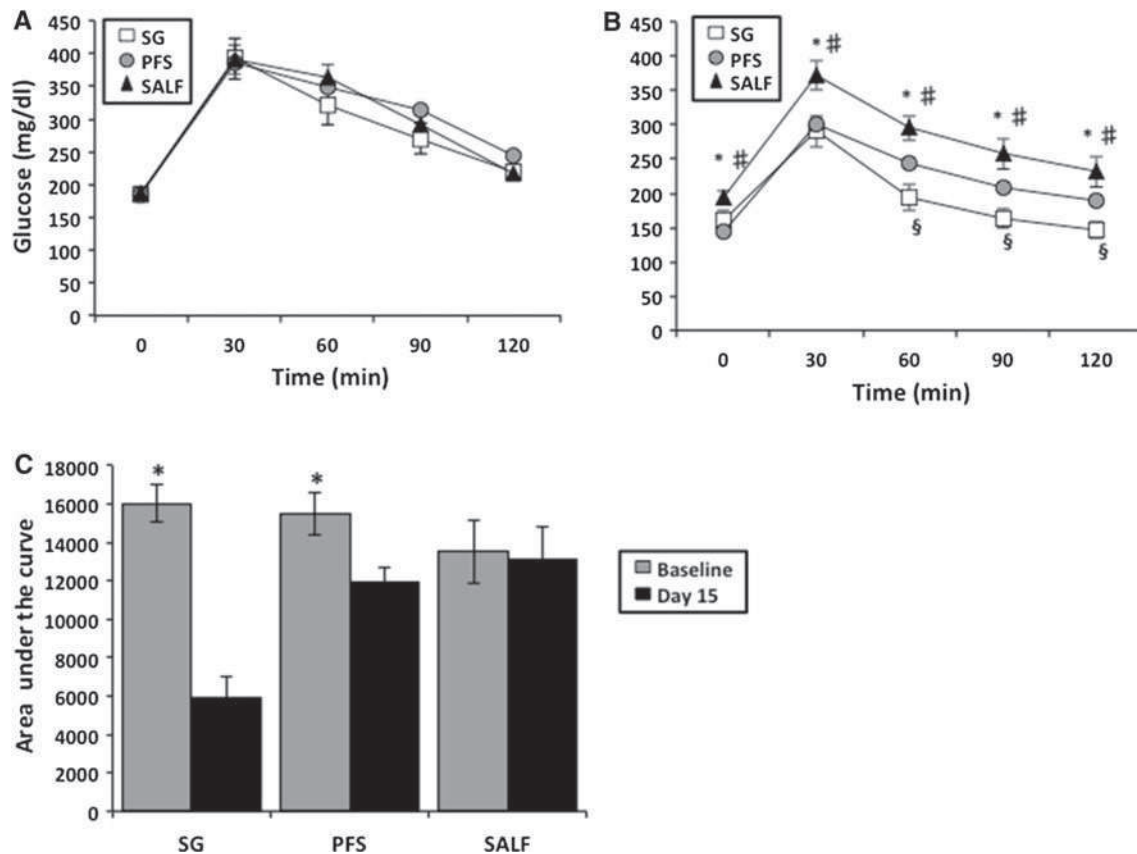


Fig. 2 Effects of sleeve gastrectomy on glucose tolerance. Intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT) at baseline **A** and on day 15 after surgery **B**. Mean area under the curve (AUC) of the glucose tolerance test **C** in SG (10 animals), PFS (13 animals), and SALF (11 animals)

mice. *PFS* pair-fed sham-operated, *SALF* sham-operated ad libitum fed, *SG* sleeve gastrectomy. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Mann–Whitney *U* test * $P < 0.05$ between SG and SALF mice. # $P < 0.05$ between PFS and SALF mice. § $P < 0.05$ between SG and PFS

quantitatively, but also that the T-cell balance was in favor of a decreased inflammatory response.

Liver steatosis and serum transaminases

Because fat tissue plays an important role in the genesis of insulin resistance and liver complications, we then evaluated the effect of SG on liver complications. As an indicator of liver damage, the variation in the transaminases level versus baseline values were first evaluated. The ALT and AST levels, as percentage of baseline values, decreased more significantly in SG mice compared to SALF mice ($P = 0.002$ and $P = 0.0015$, respectively) and PFS mice ($P = 0.046$ and $P = 0.019$, respectively) (Fig. 4A, B). Further, SG mice showed significantly less steatosis compared with SALF ($6.7 \% \pm 1.7$ vs. $30.9 \% \pm 5.2$, $P = 0.001$) and PFS mice ($6.7 \% \pm 1.68$ vs. $16.6 \% \pm 3.9$, $P = 0.04$) (Fig. 4C–F). Although reduced caloric intake was already associated with less liver disease (PFS mice), SG was related to normalization

of the transaminases levels and a strong improvement in hepatic steatosis.

Discussion

We demonstrated that the additional loss of weight, the improvement in glucose tolerance, and the decrease in liver steatosis observed after SG in HFD-induced obese mouse cannot be explained exclusively by reduced caloric intake.

We found a loss of weight in the SG mice that remained significant throughout the duration of the study even though the mice were kept on a HFD after surgery. Interestingly, SG mice showed a significant lower food intake for the first 2 weeks after surgery, which became comparable to SALF on the third week, indicating that SG mice spontaneously increased their daily intake of food. Although this might be explained by the spontaneous dilation of the stomach, as observed sometime in humans, we did not find any significant dilation of the gastric tube at the time of the animal's death (data not shown).

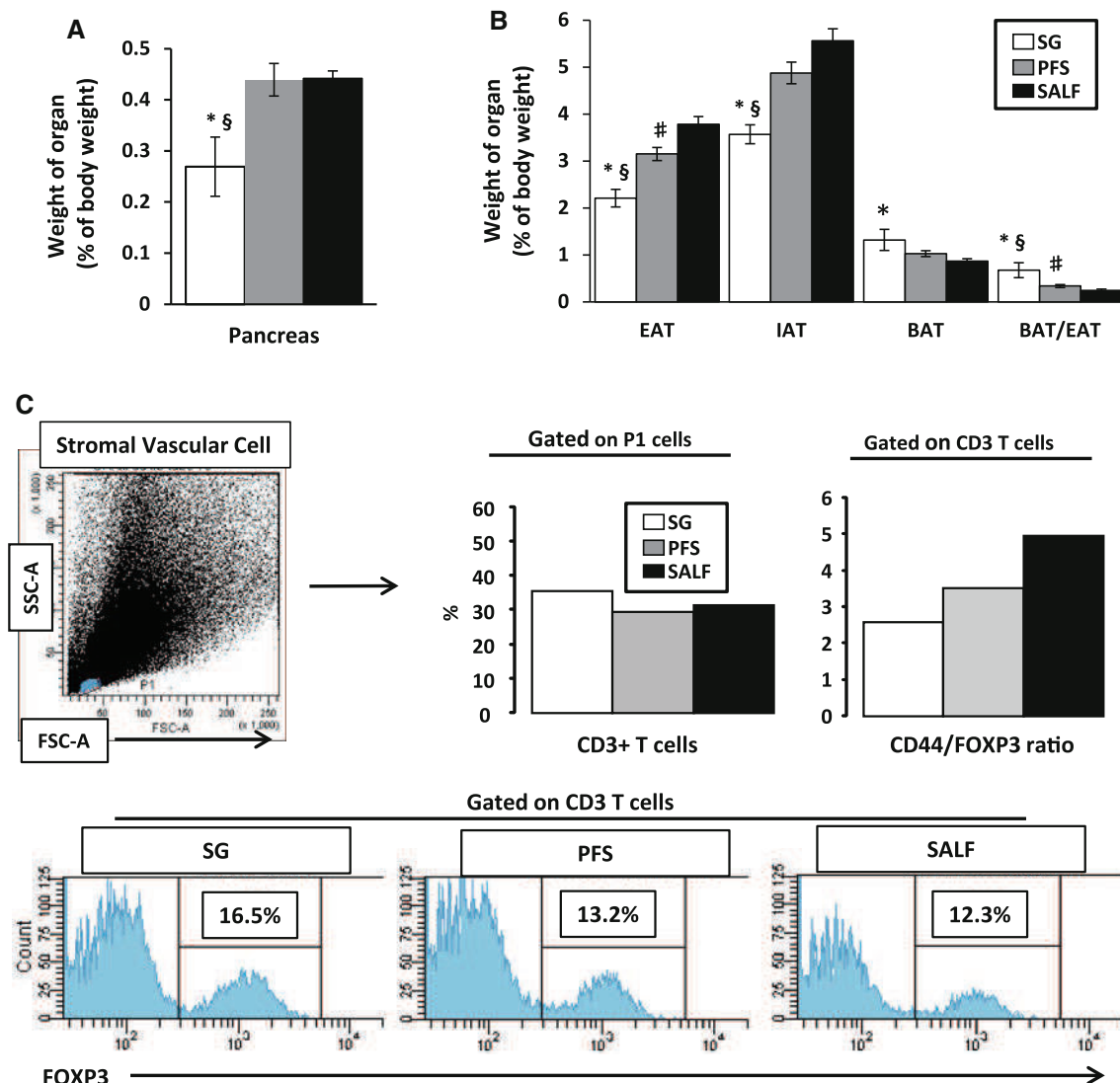


Fig. 3 Effects of sleeve gastrectomy on body fat composition and characterization of CD3⁺ T cells in epididymal adipose tissue. Ratio of the weight of the pancreas to body weight **A**. Ratio of the weight of the epididymal adipose tissue (EAT), inguinal adipose tissue (IAT), and brown adipose tissue (BAT) to the body weight **B**. Weights were evaluated at the time of death of SG (10 animals), PFS (13 animals), and SALF (11 animals) mice. **C** Characterization of the CD3⁺ T cells in adipose tissue from SG, PFS, and SALF mice. Epididymal fat pads were isolated, and the stromal vascular fraction (SVF) was stained for

CD3, CD44, or FOXP3. Cells were gated on the nongranular and small-size populations (P1) and then on the CD3⁺ population. (*Top*) For the FOXP3 marker, cells were stained with an anti-FOXP3 antibody. (*Bottom*) SSC-A side-scatter area, SVF stromal vascular fraction. PFS pair-fed sham-operated, SALF sham-operated ad libitum fed, SG sleeve gastrectomy. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Mann–Whitney *U* test. **P* < 0.05 between SG and SALF mice. #*P* < 0.05 between PFS and SALF mice. §*P* < 0.05 between SG and PFS

Nevertheless, the initial decrease in dietary intake could be explained by the restrictive effects of postoperative edema and tissue inflammation at the gastric suture line in the SG group, which usually decreases within a few days of surgery. Stefater et al. also found temporary anorexia in the obese rat after SG followed by a progressive increase in food intake, which reached sham-treated ad libitum-fed controls by day 16 while weight loss was persistent. The authors reported that SG rats adapt their meal pattern, eating smaller but more frequent meals [15]. In HFD-fed

obese mice, Yin et al. found a significant loss of weight after SG, which was maintained at 8 weeks in spite of the persistence of the HFD after surgery. Unfortunately, the food intake and the sham-treated pair-fed group were not evaluated [9]. Indeed, our data indicate that reduced caloric intake accounted for a loss of weight of 15 % of the baseline body weight (PFS), while the SG mice showed an additional loss of 6 % of body weight, which could not be explained by the reduced intake of food. Further, the regulation of the food intake by the central nervous system

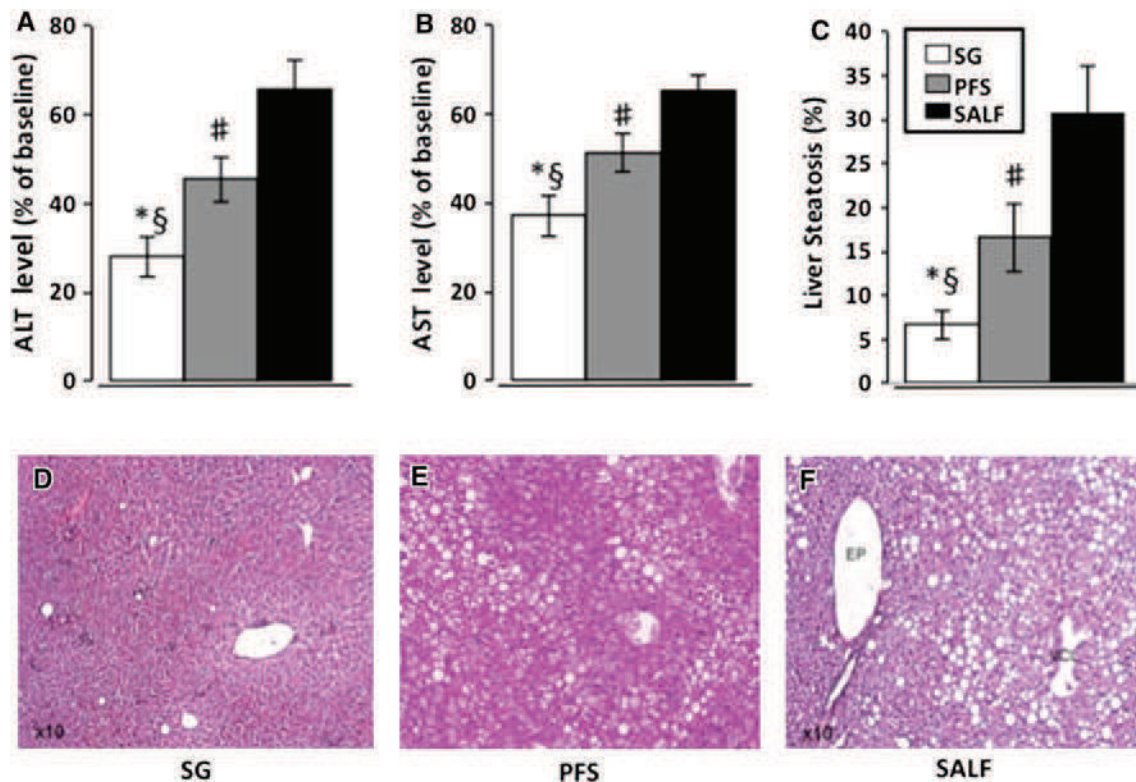


Fig. 4 Effect of sleeve gastrectomy on the serum transaminases level and on hepatic steatosis. Serum levels (percentage of baseline) of alanine aminotransferase (ALT) **A**, aspartate aminotransferase (AST) **B** (day 20 after surgery), and liver steatosis **C** (day 23 after surgery) were evaluated in SG (10 animals), PFS (13 animals), and SALF (11 animals) mice. Typical pictures of hematoxylin and eosin-stained

liver sections from SG **D**, PFS **E**, and SALF **F** mice are shown. PFS pair-fed sham-operated, SALF sham-operated ad libitum fed, SG sleeve gastrectomy. A–C Data are shown as mean $\pm$ SEM. Mann–Whitney *U* test. **P* < 0.05 between SG and SALF mice. #*P* < 0.05 between PFS and SALF mice. §*P* < 0.05 between SG and PFS

was not modified 3 weeks after surgery. Some neurons in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) coexpress NPY and AgRP, which stimulate food intake and weight gain, while another population of neurons express pro-opiomelanocortin (POMC), which promotes weight loss [16]. Evaluation of the gene expression of NPY, AgRP and POMC in our mice displayed no significant difference between SG and control mice (PFS and SALF). This nonsignificant difference in levels may not have influenced food intake, but the trend was for lower levels of NPY and AgRP in the SG group, which may have an effect on energy expenditure [17, 18]. Although we measured ARC peptide expression on postoperative day 23, when the food intake was similar between SG and control mice, Stefater et al. found the same results in obese rats undergoing SG, not only on postoperative day 122, but also immediately after surgery (days 9 and 35), when animals were still experiencing a transient anorexic state [15]. Thus, these results could indicate that ARC peptides are not responsible for the maintenance of weight loss after SG.

Interestingly, Bueter et al. [19] provided evidence that gastric bypass was associated with increased energy

expenditure in obese rats. As gastric bypass increases postprandial plasma levels of PYY and GLP1 [20], the authors speculated that this might be responsible for the increased energy expenditure through interference with central neuroendocrine signaling in the hypothalamic arcuate nucleus [19]. Because the difference in body weight in our study remained significant in spite of comparable food intake, we investigated the development of BAT as a potential mechanism responsible for the persistence of weight loss. Although white adipose tissue is the main storage site of excess energy, primarily in the form of triglycerides, BAT can disperse energy as heat [21]. Interestingly, we found that SG mice had a significant decrease in white adipose tissue, including IAT and EAT, but that the BAT/body weight ratio tended to increase, although this difference was not statistically significant between SG versus PFS mice. However, the BAT/EAT ratio progressively increased with PFS and then SG compared to SALF mice (SALF: 0.246 ± 0.025 vs. SPF: 0.339 ± 0.033 vs. SG: 0.676 ± 0.157 ; SG vs. PFS, *P* = 0.025; SG vs. SALF, *P* = 0.0018; PFS vs. SALF, *P* = 0.025). These data suggest that a modification in the specific fat depot (brown vs.

white adipose tissue) may participate in the persistence of weight loss in SG mice in spite of the increased food intake.

Visceral white adipose tissue is responsible for the low-grade inflammatory state of obese subjects through the secretion of soluble mediators of inflammation [22]. There is also evidence that soluble mediators of inflammation are implicated in mechanisms leading to insulin resistance by interfering with the disruption of insulin signaling through serine phosphorylation of the insulin receptor substrate [23–25]. Furthermore, it has been shown that T cells play a pivotal role in regulating the inflammatory response in the adipose tissue [12–14, 26]. We thus investigated the number of T cells in the EAT, which is the equivalent of human visceral adipose tissue in rodents. Although the absolute number of CD3⁺ T cells was not different for SG and control mice, the former had an increased number of FOXP3⁺ T cells, which are implicated in anti-inflammatory signals blocking adipose tissue inflammation, and a decreased number of pro-inflammatory activated T cells, as evaluated by the CD44/FOXP3 ratio. SG thus was associated with a T-cell balance in EAT that was indicative of a decrease in the inflammatory response. This observation was in accordance with our previous reports on the decrease in adipose tissue and systemic inflammation associated with gastric bypass in patients [11, 27–29]. Thus, the reduced amount of EAT coupled with a reduced inflammatory response, and the potential concomitant reduction in the levels of circulating cytokines observed in SG mice are consistent with a casual role in SG-induced improvement of glucose tolerance.

Insulin resistance is the common denominator of the metabolic disturbances associated with obesity, which include the accumulation of triglycerides in the liver that leads to hepatic steatosis. Indeed, the improvement in glucose tolerance we observed in SG mice compared to control mice was associated with a decrease in liver steatosis in SG mice, which was superior to that observed in the control groups (PFS mice). As expected, the decrease in liver steatosis was associated with a significant decrease in the level of serum transaminases.

We also investigated the role of ghrelin, the potent orexigenic hormone secreted primarily by the gastric mucosa, which has been considered as a main actor responsible for the effects of SG, not only on the balance in energy expenditure but also on the metabolic disturbances linked to obesity [30]. In our study, SG mice showed reduced circulation levels of acyl ghrelin, the active form of ghrelin, compared with control mice. Chambers et al. [31] recently demonstrated in ghrelin-deficient mice that the effect of SG on weight loss, food intake, and glucose tolerance was independent of ghrelin signaling. However, developmental compensations in ghrelin-deficient mice may lead to underestimate the role of ghrelin reduction to

the effects of SG. Indeed, Longo et al. [30] showed that chronic pharmacological blockade of the ghrelin receptor was associated with a striking improvement in hepatic insulin sensitivity, insulin secretion, decreased hepatic steatosis, and better liver function. The reduced circulating levels of ghrelin we found in SG mice may thus influence the mechanisms responsible for the dramatic reduction in liver steatosis that we observed in SG mice compared with control mice.

There is evidence in the literature of the inhibitory effect of fatty acids on insulin secretion in vitro and in vivo [32–34] and the association between pancreatic fat content and type two diabetes [35], with a sharp increase in both the total pancreatic fat and islet triacylglycerol content before the onset of spontaneous diabetes in rodents [36, 37]. Furthermore, Pinnick et al. [38] demonstrated that mice fed a HFD for 15 weeks had a higher triacylglycerol content compared to control mice fed a normal diet. As mice in the present study were fed a HFD for 32 weeks before surgery, we investigated the effect of SG on the pancreas/body weight ratio and found that SG mice showed a ratio significantly lower in spite of a greater weight loss compared with both control groups. We speculate that a possible decrease in pancreatic fat after SG may contribute to the strong improvement in glucose tolerance observed in SG mice that could not be explained exclusively by the reduced caloric intake in our study.

We acknowledge that there are some limitations of the present study. We did not investigate the energy expenditure (body temperature, basal metabolic rate), locomotor activity, gut function (lipid absorption, gut permeability, endotoxemia), and gut hormones (GLP-1, PYY, CCK), which have important metabolic effects after SG and might account for the difference in weight loss between SG and PFS mice.

Others have previously demonstrated the effect of SG and reduced caloric intake on glucose, lipid metabolism, and blood pressure in rat model [39, 40]. We have also evaluated the effect of the SG in a HFD mice model. Indeed, mice were fed the same HFD before but also after surgery, leading to the evaluation the role of SG even without modification of the diet. We report a modification in the specific fat depot (brown vs. white adipose tissue) in response to SG that may participate in the persistence of weight loss in SG mice in spite of the increased food intake. Further, the beneficial effect of SG correlated with less activated T cells and by more anti-inflammatory regulatory T cells in epididymal adipose tissue. Altogether, these responses mediated by SG prevent the ectopic fat accumulation in both liver and pancreas even in HFD. This effect cannot be explained exclusively by reduced caloric intake. In our study, SG proved more effective than simple reduced caloric intake in reducing body weight, in restoring

glucose tolerance, and in decreasing liver steatosis in HFD-induced obese mice. Modification of adipose tissue development (brown vs. white adipose tissue) and ectopic fat (pancreatic steatosis) could also be involved. Thus, SG is not a purely restrictive procedure but has several metabolic effects such as decreased ghrelin levels and increased insulin, PYY, and GLP-1 levels, unlike other purely restrictive procedures as such gastric banding and vertical banded gastroplasty [7].

Acknowledgments This work was supported by grants from INSERM (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/Schering-Plough to PG, EFSD/Lilly European Diabetes Research Programme to PG and la Fondation pour la Recherche Médicale to Jean-Louis Nahon). We thank Dr. Jean-Louis Nahon for scientific discussions, Dr. M. C. Brahimi-Horn for editorial work, and the members of the INSERM U1065 animal facility.

Disclosures Stéphanie Patoureaux was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale. Philippe Gual is a recipient of an Interface Grant from the Centre Hospitalier Universitaire of Nice. Anne-Sophie Schneck, Antonio Iannelli, Déborah Rousseau, Stéphanie Bonnafous, Beatrice Bailly-Maitre, Ophélie Le Thuc, Carole Rovere, Patricia Panaia-Ferrari, Rodolphe Anty, Albert Tran, and Jean Gugenheim have no conflicts of interest or financial ties to disclose.

References

- Ren CJ, Patterson E, Gagner M (2000) Early results of laparoscopic biliopancreatic diversion with duodenal switch: a case series of 40 consecutive patients. *Obes Surg* 10:514–523
- Iannelli A, Dainese R, Piche T, Facchiano E, Gugenheim J (2008) Laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity. *World J Gastroenterol* 14:821–827
- Braghetto I, Csendes A, Lanzarini E, Papapietro K, Carcamo C, Molina JC (2012) Is laparoscopic sleeve gastrectomy an acceptable primary bariatric procedure in obese patients? Early and 5-year postoperative results. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 22:479–486
- Basso N, Capoccia D, Rizzello M, Abbatini F, Mariani P, Maglio C, Coccia F, Borghonovo G, De Luca ML, Asprino R, Alessandri G, Casella G, Leonetti F (2011) First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis. *Surg Endosc* 25:3540–3550
- Peterli R, Wölnerhanssen B, Peters T, Devaux N, Kern B, Christoffel-Courtin C, Drewe J, von Flüe M, Beglinger C (2009) Improvement in glucose metabolism after bariatric surgery: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective randomized trial. *Ann Surg* 250:234–241
- Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, Thomas S, Abood B, Nissen SE, Bhatt DL (2012) Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med* 366:1567–1576
- Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M, Kern B, von Flüe M, Beglinger C (2012) Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. *Obes Surg* 22:740–748
- Iannelli A, Anty R, Schneck AS, Tran A, Gugenheim J (2011) Inflammation, insulin resistance, lipid disturbances, anthropometrics, and metabolic syndrome in morbidly obese patients: a case control study comparing laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy. *Surgery* 149:364–370
- Yin DP, Gao Q, Ma LL, Yan W, Williams PE, McGuinness OP, Wasserman DH, Abumrad NN (2011) Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. *Ann Surg* 254:73–82
- Schlager A, Khalaileh A, Mintz Y, Abu Gazala M, Globerman A, Ilani N, Rivkind AI, Salpeter S, Dor Y, Zamir G (2011) A mouse model for sleeve gastrectomy: applications for diabetes research. *Microsurgery* 31:66–71
- Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, Rousseau D, Anty R, Wakkach A, Dahman M, Tordjman J, Clément K, McQuaid SE, Frayn KN, Huet PM, Gugenheim J, Lotersztajn S, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P (2009) Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 58:125–133
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Oh-sugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki Nagai R (2009) CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15:914–920
- Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tzui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielinski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15:921–929
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15:930–939
- Stefater MA, Pérez-Tilve D, Chambers AP, Wilson-Perez HE, Sandoval DA, Berger J, Toure M, Tschöp M, Woods SC, Seeley RJ (2010) Sleeve gastrectomy induces loss of weight and fat mass in obese rats, but does not affect leptin sensitivity. *Gastroenterology* 138:2426–2436
- Spiegelman BM, Flier JS (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531–543
- Schwartz MW, Porte D Jr (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307:375–379
- Zengin A, Nguyen AD, Wong IP, Zhang L, Enriquez RF, Eisman JA, Herzog H, Baldock PA, Sainsbury A (2013) Neuropeptide Y mediates the short-term hypometabolic effect of estrogen deficiency in mice. *Int J Obes (Lond)* 37:390–398
- Bueter M, Löwenstein C, Olbers T, Wang M, Cluny NL, Bloom SR, Sharkey KA, Lutz TA, Le Roux CW (2010) Gastric bypass increases energy expenditure in rats. *Gastroenterology* 138:1845–1853
- Borg CM, Le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR, Patel AG, Aylwin SJ (2006) Progressive rise in gut hormone levels after Roux-en-Y gastric bypass suggests gut adaptation and explains altered satiety. *Br J Surg* 93:210–215
- Enerbäck S (2010) Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond)* 34(Suppl 1):S43–S46
- Hajer GR, Van Haeften TW, Visseren FLJ (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29:2959–2971
- Iannelli A, Schneck AS, Gugenheim J (2011) Comment on: serial changes in inflammatory biomarkers after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis* 7:625–627
- Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and

- tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278:45777–45784
25. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333–336
 26. Tran A, Gual P (2013) Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 37:17–29
 27. Dalmás E, Rouault C, Abdenmour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, Nahon JL, Bouillot JL, Guerre-Millo M, Clément K, Poitou C (2011) Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr* 94:450–458
 28. Anty R, Dahman M, Iannelli A, Gual P, Staccini-Myx A, Amor IB, Luciani N, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Srar SK, Unwin R, Gugenheim J, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Bekri S (2008) Bariatric surgery can correct iron depletion in morbidly obese women: a link with chronic inflammation. *Obes Surg* 18:709–714
 29. Iannelli A, Anty R, Piche T, Dahman M, Gual P, Tran A, Gugenheim J (2009) Impact of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass on metabolic syndrome, inflammation, and insulin resistance in super versus morbidly obese women. *Obes Surg* 19:577–582
 30. Longo KA, Govek EK, Nolan A, McDonagh T, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Morgan K, Hixon J, Zhou C, Kelder B, Kopchick JJ, Saunders JO, Navia MA, Curtis R, DiStefano PS, Geddes BJ (2011) Pharmacologic inhibition of ghrelin receptor signaling is insulin sparing and promotes insulin sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 339:115–124
 31. Chambers AP, Kirchner H, Wilson-Perez HE, Willency JA, Hale JE, Gaylinn BD, Thorne MO, Pfluger PT, Gutierrez JA, Tschöp MH, Sandoval DA, Seeley RJ (2013) The effects of vertical sleeve gastrectomy in rodents are ghrelin independent. *Gastroenterology* 144:50–52
 32. Igoillo-Estève M, Marselli L, Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, Grieco FA, Dotta F, Weir GC, Marchetti P, Ezirik DL, Cnop M (2010) Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 53:1395–1405
 33. Cnop M (2008) Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 36:348–352
 34. Noshmeh H, D'Amico E, Farilla L, Hui H, Wawrowsky KA, Mlynarski W, Doria A, Abumrad NA, Perfetti R (2005) Fatty acid translocase (FAT/CD36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic beta-cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. *Diabetes* 54:472–481
 35. Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, van Waesberghe JH, Schindhelm RK, Mari A, Heine RJ, Diamant M (2007) Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:2916–2921
 36. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH (1994) Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10878–10882
 37. Lee Y, Lingvay I, Szczepaniak LS, Ravazzola M, Orci L, Unger RH (2010) Pancreatic steatosis: harbinger of type 2 diabetes in obese rodents. *Int J Obes (Lond)* 34:396–400
 38. Pinnick KE, Collins SC, Londos C, Gauquier D, Clark A, Fielding BA (2008) Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity (Silver Spring)* 16:522–530
 39. Rodríguez A, Becerril S, Valentí V, Moncada R, Mendez-Gimenez M, Ramirez B, Lancha A, Marin M, Burrell MA, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Frühbeck G (2012) Short-term effects of sleeve gastrectomy and caloric restriction on blood pressure in diet-induced obese rats. *Obes Surg* 22:1481–1490
 40. Cummings BP, Bettaieb A, Graham JL, Stanhope KL, Kowala M, Hai FG, Chouinard ML, Havel PJ (2012) Vertical sleeve gastrectomy improves glucose and lipid metabolism and delays diabetes onset in UCD-T2DM rats. *Endocrinology* 153:3620–3632

Obesity and non-alcoholic fatty liver disease

R. Anty, S. Patouraux, A. Tran, P. Gual

Obésité DOI 10.1007/s11690-014-0414-4

Obésité et maladie du foie gras non alcoolique

Obesity and non a alcoholic fatty liver disease

R. Anty · S. Patouraux · A. Tran · P. Gual

© Springer-Verlag France 2014

Résumé Les complications hépatiques de l'obésité (Non alcoholic fatty liver diseases, NAFLD) sont la première cause de maladie hépatique en France. Les NAFLD vont de la stéatose à la stéatohépatite (Non-Alcoholic SteatoHepatitis, NASH), la fibrose, la cirrhose et parfois le carcinome hépatocellulaire. Les NAFLD sont fréquemment associées à l'obésité viscérale, l'insulino-résistance et le syndrome métabolique. Cependant, les mécanismes physiopathologiques responsables de la progression d'une stéatose isolée « bénigne/non évolutive » à une NASH sont mal connus. Des interactions entre le tissu adipeux et le foie, l'intestin et le foie et entre l'intestin et le tissu adipeux sont impliquées dans la genèse des NAFLD. Cette revue développera des données récemment identifiées pour le diagnostic et la compréhension du développement des NAFLD au cours de l'obésité et, plus particulièrement, les marqueurs non invasifs de NASH, les mécanismes intra-hépatiques (régulation de l'inflammation hépatique, dépôts de fer intra-hépatiques, mort hépatocytaire) et les facteurs extra-hépatiques impliqués (tissu adipeux et intestin).

Mots clés Obésité · Foie gras · Stéatose · NASH · Kératine 18 · Mort hépatocytaire · Tissu adipeux · Intestin · Inflammation

Abstract The hepatic complications of obesity (Non Alcoholic fatty liver disease, NAFLD) are the first cause of liver

diseases in France. NAFLD range from steatosis to steatohepatitis (Non-Alcoholic SteatoHepatitis, NASH), fibrosis, cirrhosis and finally hepatocellular carcinoma. NAFLD are frequently associated with visceral obesity, insulin resistance and metabolic syndrome. However, the pathophysiological mechanisms responsible for the progression from a "safety" state to NASH are still unclear. Cross talks between adipose tissue and liver, gut and liver and between gut and adipose tissue have been involved in the NAFLD appearance. This review will provide insight into the current diagnosis and understanding of development of NAFLD including non-invasive markers of NASH, intra-hepatic mechanisms (regulation of the hepatic inflammation, hepatocellular iron deposition, hepatocyte death) and extra-hepatic factors (from adipose tissue and gut) in obese patients.

Keywords Obesity · Fatty liver · NASH · Keratin 18 · Hepatocyte death · Adipose tissue · Intestinal tract · Inflammation

Abréviations

NASH, Non-alcoholic steatohepatitis ; NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease ; LPS, Lipopolysaccharide ; ALAT, Alanine amino-transférase ; ASAT, Aspartate-amino-transférase ; TNF, Tumor necrosis factor, IL, Interleukine

R. Anty · S. Patouraux · A. Tran · P. Gual (✉)
INSERM, U1065, Équipe 8 « Complications hépatiques de l'obésité », 151, route Saint Antoine de Ginestière,
BP 2 3194, 06204 Nice cedex 3 France
e-mail : gual@unice.fr

Université de Nice-Sophia Antipolis, Faculté de Médecine,
Nice, France

R. Anty · A. Tran
Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet,
Département Digestif, Nice, France

S. Patouraux
Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital Pasteur,
Pôle Biologique, Nice, France

Introduction

Le foie reçoit 80% de son apport sanguin de la veine porte qui draine l'intestin grêle et le colon. Ce sang portal est riche en endotoxines, xénobiotiques et antigènes alimentaires. Les hépatocytes représentent 70% des cellules hépatiques et sont chargés de fonctions métaboliques et de détoxifications vitales pour l'organisme. Les autres cellules du parenchyme hépatique sont les cellules non parenchymateuses incluant les cellules endothéliales, les cellules stellaires, les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie) et les lymphocytes.

Des données suggèrent que le foie jouerait un rôle important dans la réponse immunitaire de l'organisme. Au cours de l'obésité, l'activation du système immunitaire dans le foie, par des facteurs intra- ou extra-hépatiques, joue un rôle clef dans les complications hépatiques de l'obésité appelées maladies du foie gras non alcoolique (Non Alcoholic fatty liver disease, NAFLD). Les sites extra-hépatiques comportent l'intestin et le tissu adipeux. La modification du microbiote et de la perméabilité intestinale, ainsi que l'inflammation du tissu adipeux favorisent la progression des NAFLD.

L'incidence du surpoids et de l'obésité augmente rapidement dans les pays occidentaux. Cette pandémie n'est pas associée seulement au développement du diabète de type 2, de l'hypertension artérielle et des maladies cardio-vasculaires mais aussi aux NAFLD. Dans la population générale, la prévalence estimée des NAFLD va de 5,4 à 24% [1]. Le spectre des anomalies hépatiques va de la stéatose pure (accumulation de triglycérides) à la stéatohépatite (Non alcoholic steatohepatitis, NASH), la stéatofibrose et parfois la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire qui survient principalement au cours de la cirrhose (80% des cas) mais également chez certains patients ayant une NASH sans cirrhose [2].

La présence d'une NASH conditionne l'histoire naturelle de la maladie, le pronostic hépatique et le pronostic vital à long terme. Elle nécessite une prise en charge globale active. Actuellement, le diagnostic de NASH nécessite la réalisation d'une biopsie hépatique. Seule la biopsie hépatique permet de caractériser les lésions typiques de NASH qui associent stéatose hépatique, souffrance des hépatocytes (ballonisation hépatocytaire) et infiltration par des cellules polynucléaires neutrophiles. Le diagnostic anatomopathologique est parfois délicat. Plusieurs classifications ont été proposées pour aider au diagnostic ou au suivi évolutif des patients [3,4]. La biopsie hépatique reste un geste invasif associé à une morbidité non négligeable.

Les NAFLD sont difficiles à traiter. Différentes recommandations ont été publiées, cependant, outre les mesures hygiéno-diététiques, aucune étude n'a démontré l'intérêt de molécules avec un bon rapport bénéfice-risque à long terme [5].

Les mécanismes moléculaires responsables de l'apparition et de l'aggravation des NAFLD sont toujours mal connus. La première hypothèse proposée en 1998 est celle de la théorie des 2 coups [6]. Dans ce modèle, la résistance périphérique à l'insuline représentait le « premier coup » qui entraînait l'apparition de la stéatose hépatique. Cette stéatose serait favorisée par l'afflux d'acides gras venant du tissu adipeux et par une augmentation de la lipogenèse hépatique *de novo*. Les hépatocytes avec une stéatose seraient plus vulnérables à un « deuxième coup » induit par les cytokines (telles que le Tumor necrosis factor- α , TNF- α) et le stress oxydatif qui favoriseraient le développement de la NASH et de la fibrose.

Cependant, l'aggravation des lésions n'est pas systématique et le passage entre stéatose et stéatohépatite n'est pas irréversible. Certains patients semblent garder au cours du temps une stéatose hépatique non évolutive et non associée à une surmortalité hépatique, alors que d'autres patients évolueraient rapidement vers une NASH et une fibrose hépatique altérant leur pronostic [7]. De plus, la persistance, voire l'aggravation de l'insulino-résistance au cours du temps et l'identification de multiples facteurs délétères intra ou extra hépatiques (induction du CYP2E1, endotoxémie, dysbiose intestinale, rôle toxique du fer, stress du réticulum endoplasmique...) ont conduit à revoir le modèle sous la forme d'une théorie des « coups multiples » [8].

Parmi les facteurs extra-hépatiques identifiés, l'accumulation et/ou la (dé)régulation des macrophages, des cellules T et dendritiques dans le tissu adipeux sont des sources importantes d'inflammation qui expliquent un lien causal entre le développement d'une insulino-résistance et de complications hépatiques. Des échanges entre le foie et le tissu adipeux ont ainsi été impliqués dans le développement de la NASH. En plus de l'axe foie-tissu adipeux, un axe foie-tube digestif jouerait aussi un rôle important dans le développement des NAFLD. Cette revue va se focaliser sur les travaux ayant permis d'identifier des nouveaux marqueurs diagnostiques de la NASH et des mécanismes intra- et extra-hépatiques suspectés.

Marqueurs non invasifs de la NASH

Le diagnostic de NASH nécessite une biopsie hépatique qui peut être dangereuse et n'est pas répétable aisément. Ainsi, des marqueurs non invasifs de NASH sont grandement nécessaires. Les marqueurs peuvent être sériques (évaluation d'un ou de plusieurs paramètres évaluant la stéatose et/ou la NASH et/ou la fibrose) ou physiques (élastométrie hépatique ou Controlled attenuation Parameter[®] évaluant respectivement la fibrose et la stéatose hépatique). Aucun marqueur de la présence d'une NASH n'est validé actuellement. Certains tests sériques « gratuits » ou commercialisés évaluant la fibrose hépatique au cours des NAFLD (NALFD Fibrosis Score, Fibromètre, Steatotest[®]...) peuvent être utilisés. Une revue récente présente les principaux marqueurs en cours d'évaluation [9]. Dans cette revue, nous nous intéresserons particulièrement à la C-reactive protein et aux marqueurs de mort cellulaires.

La « C-reactive protein » (CRP)

La CRP est un marqueur non spécifique de l'inflammation couramment utilisé en pratique clinique. Alors que la concentration de CRP est très basse chez les gens en bonne santé, une élévation modérée de la CRP a été associée avec

l'obésité, le syndrome métabolique et l'insulino-résistance. En effet, un état inflammatoire chronique de bas grade apparaît comme un nouveau facteur de risque de développement d'un diabète de type 2 et d'une NAFLD. L'augmentation de la CRP circulante serait, par elle-même, un marqueur de NAFLD ou de NASH chez les patients en surpoids ou obèses [10]. Cependant des données contradictoires ont été rapportées [11]. Dans notre cohorte de 159 patients obèses morbides, la CRP n'était pas associée à la présence d'une NASH. Cela serait en partie lié à une production de CRP non seulement par le foie mais aussi par le tissu adipeux où l'ARNm et la protéine CRP ont été détectés [12]. La production et la sécrétion importante d'interleukine (IL)6 par le tissu adipeux pourraient contribuer à l'augmentation de la CRP hépatique au cours de l'obésité mais indépendamment de l'inflammation du foie. Dans ce sens, il a été récemment mis en évidence que la CRP serait un marqueur de stéatose mais pas de NASH dans une étude ayant porté sur 627 patients obèses (80% de patientes) issues de 3 cohortes franco-belges [13].

Marqueurs de mort hépatocyttaire

La cytokératine/kératine 18 (K18) est un filament intermédiaire majeur dans le foie et l'un des substrats des caspases (notamment des caspase 3 et 6) durant l'apoptose des hépatocytes. La K18 et ses fragments clivés sont libérés par les tissus et sont mesurables dans le sang. Le filament entier de la K18 est libéré par les cellules en cours de nécrose. Le fragment clivé de la K18 est un marqueur de NASH chez les patients en surpoids, obèses de grade 1 ou 2 ou obèses morbides [9]. Cependant les études initiales portaient sur de faibles effectifs ou sur des cohortes sélectionnées avec une forte prévalence de patients avec une NASH. Les études ultérieures de validation ont suggéré des résultats moins efficaces de ce marqueur. La performance diagnostique du marqueur de mort totale (filament entier de la K18) était meilleure que celle du marqueur d'apoptose pour diagnostiquer la NASH [14]. L'intérêt de ces marqueurs pourrait être potentialisé par le développement et la validation de scores diagnostiques intégrant différents paramètres clinico-biologiques à un marqueur de mort cellulaire [9]. L'un de ces scores, le Nice-Model associant le fragment K18 à l'ALAT et à la présence d'un syndrome métabolique offrait une meilleure performance diagnostique que le seul fragment clivé de K18 pour déterminer la présence d'une NASH (définie par un NAFLD Activity Score $\geq$ 5)[15]. Les niveaux sériques du fragment K18 ou le filament entier K18 sont également associés à la présence de la fibrose hépatique [14]. Ces marqueurs de mort cellulaires augmentent également en fonction de la sévérité de l'inflammation ou de la fibrose au cours d'autres maladies chroniques du foie dont les maladies alcooliques [16].

Mécanismes intra-hépatiques

Des altérations du nombre et/ou de l'activité des cellules Natural Killer (NKT), une activation des cellules de Kupffer, le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique, une réduction de la régulation des cellules T, un profil altéré des adipokines (leptine, résistine versus adiponectine) et une augmentation de l'endotoxémie mèneraient à une rupture de la tolérance hépatique physiologique aux antigènes du flux portal [17]. En effet, des anticorps anti peroxydation lipidique ont été observés chez des patients NAFLD et sont associés à une fibrose avancée.

Modification de la polarisation des macrophages résidents du foie

Les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer, jouent le rôle de sentinelle et peuvent avoir différentes caractéristiques dont une polarisation anti-inflammatoire (M2) ou pro-inflammatoire (M1). Une limitation de la polarisation des macrophages M1 diminue les atteintes hépatiques induites par l'alcool. De plus, les cellules de Kupffer M2 préviennent à des stades précoces le développement des NAFLD et ALD (alcoholic liver disease). Chez les patients alcooliques et obèses, une diminution des M2 corrèle avec les atteintes hépatiques et une diminution de l'apoptose des M1. Par des approches cellulaires, l'IL10 sécrétée par les macrophages M2 induit l'apoptose des macrophages M1 par un mécanisme dépendant de l'activation de l'arginase. Chez la souris traitée à l'alcool, la neutralisation de l'IL10 prévient l'apoptose des macrophages M1. Ce déséquilibre et ce dialogue entre les macrophages M2 versus les macrophages M1 pourrait donc jouer un rôle important dans les étapes précoces du développement des complications hépatiques associées à l'alcool et l'obésité [18].

Régulation des cellules NKT

Une altération du nombre et/ou de l'activité des cellules NKT et l'activation de l'immunité adaptative favoriseraient les modifications hépatiques. Les cellules NKT produiraient des cytokines de type T helper-1 (Th1) et -2 (Th2) qui orienteraient le système immunitaire vers une inflammation ou une tolérance. Dans un travail récent, un modèle de souris NASH avec fibrose avait un enrichissement du foie en cellules NKT. Les souris déficientes en cellules NKT (souris déficientes en CD1d) étaient protégées de la fibrose. Les cellules mononucléaires intra-hépatiques étaient enrichies en cellules NKT chez des patients avec une cirrhose NASH [19].

Altération du profil des chimiokines et des cytokines

Dans une cohorte de patients obèses morbides, nous avons identifié 58 gènes liés à l'inflammation ou à la réponse immune qui étaient surexprimés chez des patients NASH (NAFLD Activity Score ≥ 5) [20]. Le TNF- α , IL6, IL1- β , CXCL8, et le transforming growth factor (TGF)- β , qui participent à la pathogénie de la progression des NAFLD, sont impliqués dans la mort hépatocytaire/apoptose (TNF- α), dans le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles (CXCL8/IL8), dans l'activation des cellules stellaires hépatiques (TGF- β), la présence de corps de Mallory-Denk (TNF- α , TGF- β) et dans l'insulino-résistance (TNF- α , IL6, IL1- β et suppressor of cytokine signaling (SOCS)3). Cela est en accord avec l'augmentation de l'expression hépatique de l'IL6, du TNF- α et des récepteurs au TNF- α qui corrélerent avec la sévérité des lésions histologiques chez les patients obèses [21]. Plusieurs études suggèrent que le « homing » de lymphocytes circulants dans le foie pourrait augmenter durant l'inflammation et favoriserait l'inflammation hépatique. Ainsi, un traitement antibiotique de souris ob/ob diminuerait l'infiltration hépatique en cellules T4 (CD4⁺), T8 (CD8⁺), NKT, B et NKT [22]. Bien que la NASH ne soit pas classiquement considérée comme une maladie polarisée Th1, Bertola et al. ont suggéré qu'un déséquilibre résultant d'un excès relatif de cytokines pro-inflammatoires Th1 tels que IFN- γ et une relative insuffisance en cytokines anti-inflammatoires telle que l'IL10 seraient associés à la NASH. L'expression de gènes codant pour des protéines nécessaires à l'interaction entre des cellules présentatrices de l'antigène et des cellules T (CD28, CD80, CD86, CD18, CD54) était également augmentée chez les patients NASH [20]. De plus, l'ostéopontine, une cytokine pro-Th1/Th17 serait impliquée dans l'évolution des NAFLD, la fibrogenèse mais également dans d'autres hépatopathies chroniques [19,23-25] (Figs. 1, 2).

Voies TLR et NLR

Les patients avec une NAFLD semblent avoir une perméabilité intestinale augmentée associée à une perte de l'intégrité des *tight-junctions* intestinales ce qui augmenterait les niveaux de lipopolysaccharide (LPS). L'activation de cellules, dont les cellules de Kupffer, par le LPS déclenche la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de cytokines pro-inflammatoires dans le foie favorisant l'apparition d'une NAFLD [26]. La surexpression de molécules clefs (CD14, toll-like receptor (TLR)4) impliquées dans la voie de signalisation TLR a été rapportée au cours des NAFLD [27].

En plus des TLRs, les membres de la famille des Nucléotide-binding domain, Leucine rich repeat containing family (NLR family) sont importants à la fois pour l'immunité innée et adaptative. Plusieurs molécules de la famille NLR dont la NLR Pyrin domain-containing-3 (NLRP3), avec la protéine

adaptatrice ASC (apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain ; aussi appelée PYCARD) et la pro-caspase-1 forment une plateforme moléculaire appelée inflammasome qui transmet l'activation catalytique de la caspase 1. La caspase 1 activée va entraîner la maturation et la libération de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL18 [28].

Les activateurs de l'inflammasome incluent des pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) et des damage-associated molecular patterns (DAMPs). La plupart des DAMPs déclenchent la production de ROS qui sont connus pour activer l'inflammasome NLRP3 [29]. Chez la souris, les inflammasomes NLRP6 et NLRP3 et la protéine effectrice IL-18 régulent négativement la progression de la stéatose vers la NASH ainsi que de multiples aspects du syndrome métabolique via la modulation du microbiote intestinal. Différents modèles de souris ayant des déficits de l'inflammasome (lignées de souris invalidées respectivement pour la caspase 1, ASC, NLRP3, IL18) ont des changements du microbiote intestinal et présentent une exacerbation de la stéatose et de l'inflammation du fait de l'afflux d'agonistes des TLR4 et TLR9 dans la circulation portale. Cela mène à une augmentation de l'expression hépatique du TNF- α et à la progression de la NASH. De plus, le partage des cages entre les souris ayant des déficits de l'inflammasome et les souris sauvages résulte dans la transmission de la stéatose et de l'obésité, via une modification du microbiote des souris sauvages. Ainsi, la perturbation des interactions entre le microbiote intestinal et l'hôte, favorisé par un « sensing » défaillant des inflammasomes NLRP3 et NLRP6, favoriserait la progression des anomalies associées au syndrome métabolique. Cela souligne le rôle central du microbiote intestinal dans la pathogénie de maladies auto-inflammatoires et « métaboliques » qui semblaient jusque-là non liées [30].

Les acides gras saturés seraient un élément délétère endogène sous la forme d'un premier coup qui augmenterait la production de l'inflammasome au cours de la NASH. Un second coup médié par le LPS fragiliserait alors les hépatocytes qui libéreraient de l'IL1- β . De plus, les hépatocytes exposés aux acides gras libres envoient des signaux de danger qui déclenchent l'activation de l'inflammasome dans les cellules immunitaires. Ainsi les hépatocytes jouent un rôle clé, en orchestrant les réponses tissulaires aux signaux de danger dans la NASH [31,32].

Dépôts de fer intracellulaires

Le rôle du fer dans les lésions hépatiques, la fibrogenèse et le développement des cancers, est maintenant bien accepté. Comme catalyseur de la réaction de Fenton, un excès de fer libre dans le foie contribuerait à une activité Redox et à la formation de radicaux libres qui favorisent la peroxydation lipidique et qui ont une toxicité directe sur les hépatocytes [33]. Ces hépatocytes en souffrance activeraient les cellules

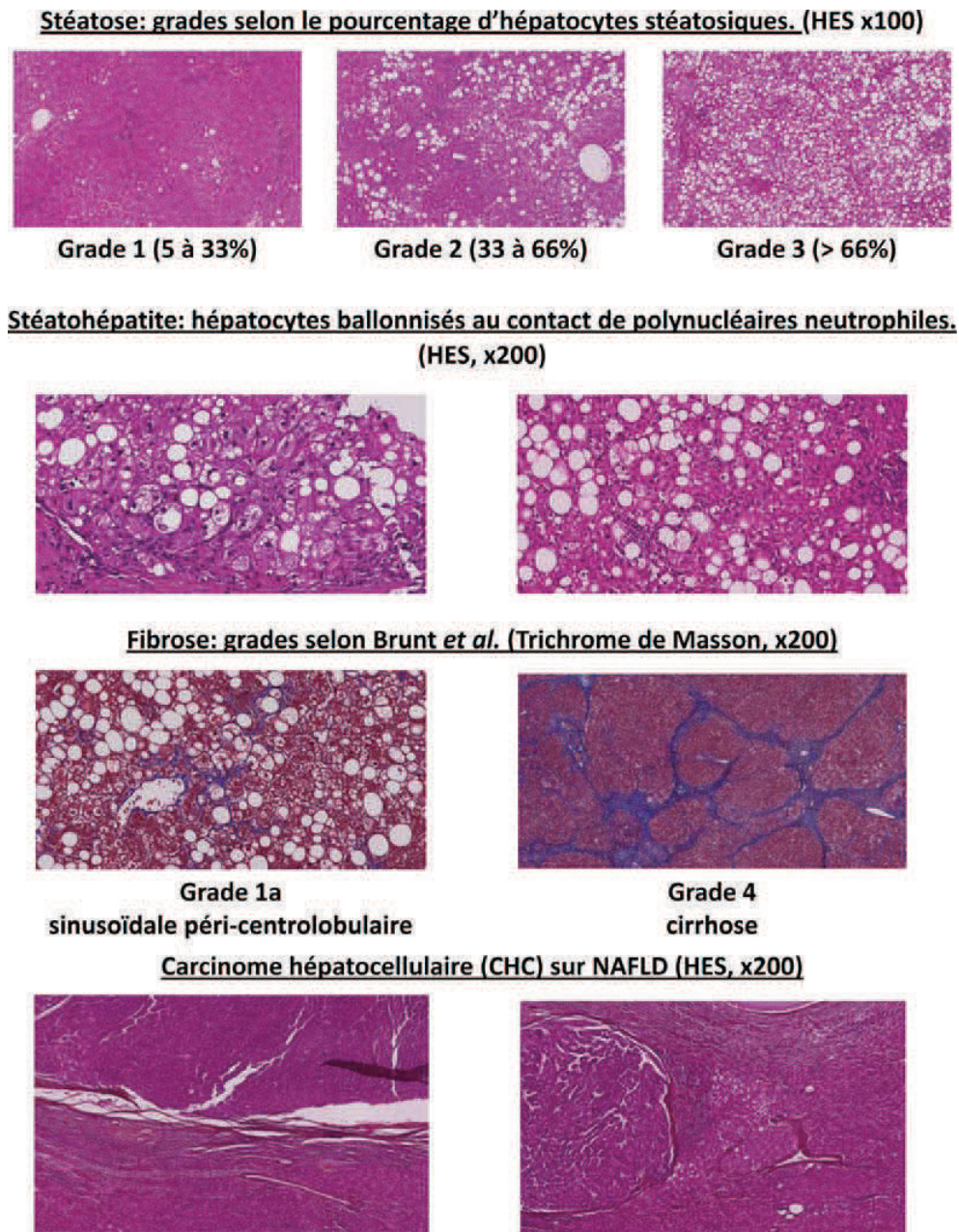


Fig. 1 Aspects histologiques des NAFLD

de Kupffer et d'autres macrophages hépatiques, menant à la libération de cytokines, au recrutement de cellules inflammatoires et à l'inflammation. Finalement, l'augmentation du fer intra-hépatique a été montré comme activant les cellules stellaires hépatiques qui jouent un rôle clef dans la fibrogenèse hépatique [34]. Cependant, des études contradictoires ont été publiées dans les NAFLD [34b]. Si la surcharge en fer hépatique semble jouer un rôle important dans l'évolution des NAFLD, l'inflammation associée à l'obésité retarderait la survenue de cette surcharge. Nous avons ainsi mis en évidence que l'hepcidine, l'hormone régulatrice du métabolisme du fer, était produite par le tissu adipeux en plus de son site de pro-

duction hépatique connu [35,36]. L'hepcidine est importante pour l'homéostasie du fer, elle inhibe l'absorption intestinale et le « relargage » du fer intra-macrophagique amenant à une carence en fer absolue ou/et relative (par séquestration). L'expression génique de l'hepcidine corrèle avec les marqueurs de l'inflammation IL 6 et CRP dans le tissu adipeux humain. L'expression génique de l'hepcidine dans le tissu adipeux semble sous la dépendance de stimulations inflammatoires mais aussi de l'hémojuvénine et de la voie de signalisation des « bone morphogenetic protein » mais n'est pas influencée par le fer [35,36]. Ces observations expliqueraient la carence en fer observée au cours de l'inflammation liée à

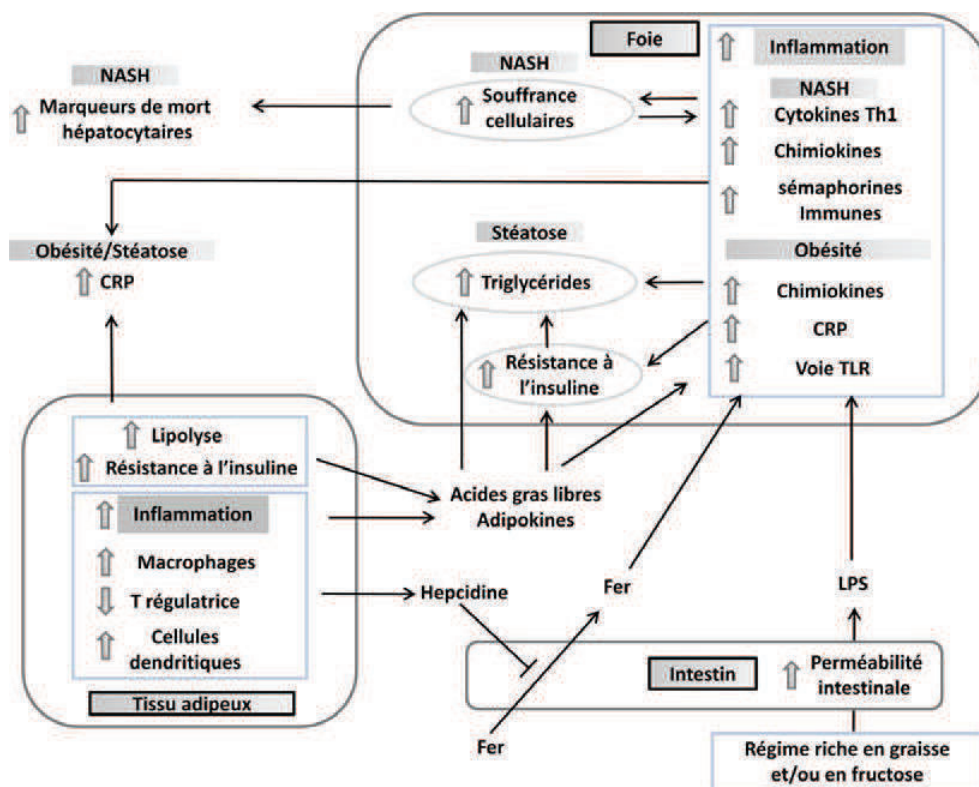


Fig. 2 Complications hépatiques chez les patients obèses. Des modifications dans l'inflammation hépatique et la réponse immunitaire jouent un rôle important dans le développement des complications hépatiques associées à l'obésité. Des facteurs intra et extra hépatiques sont impliqués. Au cours de l'obésité, une augmentation de l'inflammation du tissu adipeux (diminution des Treg, accumulation des macrophages M1 et de cellules dendritiques) amène à une résistance à l'insuline et à une lipolyse excessive. Le relargage d'acides gras libres et de cytokines/chimiokines modifierait l'inflammation du foie. L'inflammation du tissu adipeux, qui est associée à une élévation des taux de CRP, augmente aussi la production d'hépcidine. Celle-ci retarderait les dépôts de fer en inhibant l'absorption intestinale de fer. Une alimentation riche en graisse et en fructose modifierait la perméabilité intestinale et favoriserait l'endotoxémie (LPS). Les acides gras libres, les adipokines et le LPS sont impliqués dans la modification de la voie de signalisation de l'insuline et de l'inflammation. L'augmentation de l'inflammation hépatique en présence d'une stéatose augmente la mort cellulaire (par apoptose ou par nécrose) ce qui conduit à l'augmentation des niveaux circulants des marqueurs de mort cellulaire hépatique. L'augmentation de cytokines pro-inflammatoires Th1 et de chimiokines dont l'ostéopontine favoriserait la NASH

l'obésité. Ainsi l'obésité, en particulier l'obésité morbide s'ajoute à la liste des pathologies chroniques caractérisées par une hyposidérémie et une tendance à l'anémie inflammatoire. La perte de poids après chirurgie bariatrique s'accompagne d'une diminution des taux sériques d'hépcidine, de l'inflammation et d'une remontée de la sidérémie [37,38].

Mort hépatocytaire

L'apoptose hépatocytaire est importante dans la progression de la sévérité des complications hépatiques. Les hépatocytes apoptotiques sont phagocytés par les cellules de Kupffer favorisant leur activation. L'activation des cellules stellaires par la phagocytose des corps apoptotiques ou par le TGF- β produit par les cellules de Kupffer activées favorise la fibrose hépatique [39]. L'apoptose hépatocytaire définie par l'activation des caspases apoptotiques est un marqueur

de la NASH (cf chapitre marqueurs de NASH). La surexpression des récepteurs de mort cellulaire (Fas et TNF- α receptor) et du TNF- α a été rapportée au cours de la NASH. Le Fas soluble, les acides gras libres, le stress du réticulum endoplasmique, les cytokines et les adipokines pourraient également être impliqués [39]. Parmi les pistes thérapeutiques pour réduire ces mécanismes, l'acide ursodésoxycholique, la vitamine E et les inhibiteurs sélectifs de caspases sont en cours d'évaluation [5].

Régulations extra-hépatiques

Régulation de l'inflammation et de la fonction du tissu adipeux

L'obésité est caractérisée par une augmentation de la masse du tissu adipeux. Le tissu adipeux joue un rôle important dans

la genèse de l'insulino-résistance et des complications hépatiques. Dans des situations d'apports énergétiques excessifs, les adipocytes sont poussés aux limites de leur capacité de stockage et de régulation du métabolisme lipidique. Les cellules du système immunitaire régulent ce processus, en particulier les macrophages du tissu adipeux [40,41]. Chez les souris minces, les macrophages résidents ont une faible activité inflammatoire et expriment des cytokines Th2 (phénotype M2) [42]. Au cours de l'obésité, des macrophages sont recrutés vers le tissu adipeux et expriment des cytokines Th1 (phénotype M1). Ces cytokines pro-inflammatoires altèrent la voie de signalisation de l'insuline dans les adipocytes menant à une augmentation de la lipolyse et au relargage d'acides gras libres dans la circulation sanguine. Ces derniers avec la sécrétion d'adipokines favorisent l'insulino-résistance hépatique et musculaire et le développement du diabète de type 2 et des NAFLD. Les adipokines sécrétées par le tissu adipeux viscéral agissent aussi directement sur le foie via la veine porte et réguleraient l'inflammation hépatique, l'homéostasie glucidique, lipidique et la fibrose. L'abondance des macrophages dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané profond, mais pas le superficiel est significativement augmentée chez les patients ayant une NASH et/ou des lésions hépatiques fibro-inflammatoires [43]. Dans des modèles de souris obèses, l'inhibition de l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux induit par la délétion ou l'inhibition des chimiokines telles que l'ostéopontine ou le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1/CCL2) ou par l'ablation d'une sous population spécifique de macrophages, diminue l'inflammation, la résistance à l'insuline et la stéatose hépatique [44,45]. Chez les patients obèses morbides, l'élévation de l'expression de l'ostéopontine dans le tissu adipeux sous-cutané est associée à l'infiltration en macrophages et ces 2 éléments diminuent après la réalisation d'une chirurgie bariatrique [23].

Les cellules T altéreraient la balance entre les stimuli Th2 (anti-inflammatoire) et Th1 (pro-inflammatoire) dans le tissu adipeux [46-48]. Le ratio des cellules CD8⁺ (cellules T effectrices) sur CD4⁺ (cellules T régulatrices, cellules T Th1, cellules T Th2) des lymphocytes du tissu adipeux est augmenté avant l'infiltration macrophagique. La diminution des cellules T régulatrices (T Reg) dans le tissu adipeux des souris obèses diminuerait les signaux anti-inflammatoires qui inhibent l'inflammation du tissu adipeux.

L'identification des antigènes et des cellules présentatrices des antigènes dans le tissu est la prochaine étape essentielle pour comprendre l'inflammation du tissu adipeux et les complications associées. La déplétion en cellules CD11c qui est le marqueur des cellules dendritiques murines améliore l'insulino-résistance dans des modèles murins [49]. Nous avons mis en évidence un enrichissement en cellules dendritiques du tissu adipeux de souris obèses et de patients insulino-résistants [50]. Ces cellules seraient fonctionnelles et seraient d'importants régulateurs de l'inflammation du

tissu adipeux en favorisant un « switch » vers une réponse Th1/Th17 au cours de l'insulino-résistance qui accompagne l'obésité. Par contre, les antigènes présents dans le tissu adipeux n'ont pas été encore identifiés et une endotoxémie et/ou les produits des adipocytes morts en seraient des sources potentielles.

L'excès d'apport calorique induit également une accumulation progressive et soutenue de cellules B dans le tissu adipeux qui contribue à l'insulino-résistance [51]. Une meilleure connaissance des mécanismes de l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité identifierait de nouvelles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'insulino-résistance et des NAFLD.

Régulation de la fonction digestive

Une alimentation riche en graisse ou en fructose augmente la perméabilité intestinale, l'endotoxémie, la production hépatique de TNF- α et l'aggravation de la fibrose hépatique au cours des NAFLD [52]. Les changements du microbiote intestinal et des jonctions serrées augmentent le LPS arrivant au niveau du foie. Le LPS a de multiples effets dont la stimulation des TLR4. La perte de la fonction TLR4 conduit au blocage ou à l'atténuation des anomalies métaboliques dans ces modèles (alimentation riche en graisse ou en fructose).

Le microbiote intestinal contribue aux anomalies métaboliques et à la dysfonction du système immunitaire intestinal et pourrait promouvoir le développement du syndrome métabolique. Les souris déficientes en TLR5, un des composants du système immunitaire intestinal, présentent une hyperphagie ainsi que des anomalies constitutives du syndrome métabolique. Ces changements sont corrélés à la modification de la composition du microbiote intestinal. La transplantation du microbiote intestinal de souris déficientes en TLR5 à des souris sauvages entraîne, chez ces dernières, l'apparition des anomalies métaboliques constatées chez les souris déficientes en TLR5 [53]. De nouvelles stratégies pour prévenir ou traiter les NAFLD pourraient être développées à partir de la manipulation de l'axe microbiote intestinal-système immunitaire à travers des médicaments, des aliments ou des probiotiques [54,55].

Conclusion

Les NAFLD sont fréquentes et potentiellement associées à des lésions hépatiques sévères. L'un des enjeux est de pouvoir diagnostiquer de façon non invasive la présence d'une NASH et/ou d'une fibrose hépatique significative. Parmi les marqueurs sériques non invasifs, les marqueurs de mort cellulaire associés à d'autres paramètres clinico-biologiques sont prometteurs. Un autre enjeu majeur est l'obtention de traitements médicamenteux de la NASH lorsque les mesures

hygiéno-diététiques sont insuffisantes. La meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'inflammation hépatique, la mort hépatocytaire, la dysrégulation du tissu adipeux et de l'intestin permettrait de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Supports financiers :

Ce travail a été supporté par l'INSERM (France), l'Université de Nice, Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), et par des associations (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/LFB à PG ; Société Francophone du Diabète/BMS à PG ; European Foundation for the study of Diabetes/Lilly European Diabetes Research Programme à PG). Ce travail a aussi bénéficié d'une aide de l'Etat gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du programme LABEX SIGNALIFE « Investissements d'Avenir » portant la référence : ANR-11-LABX-0028-01.

Conflit d'intérêt : Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt

Références

- Clark JM (2006) The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 40:S5–10
- Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, et al (2009) Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* 49:851–9
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313–21
- Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al (2012) Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 56:1751–9
- Nascimbeni F, Pais R, Bellentani S, et al (2013) From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. *J Hepatol* 59:859–71
- Day CP, James OF (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842–5
- Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, et al (2006) Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 44:865–73
- Tilg H, Moschen AR (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52:1836–46
- Machado MV, Cortez-Pinto H (2013) Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol* 58:1007–19
- Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, et al (2007) High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 42:573–82
- Hui JM, Farrell GC, Kench JG, George J (2004) High sensitivity C-reactive protein values do not reliably predict the severity of histological changes in NAFLD. *Hepatology* 39:1458–9
- Anty R, Bekri S, Luciani N, et al (2006) The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 101:1824–33
- Zimmermann E, Anty R, Tordjman J, et al (2011) C-reactive protein levels in relation to various features of non-alcoholic fatty liver disease among obese patients. *J Hepatol* 55: 660–5
- Joka D, Wahl K, Moeller S, et al (2012) Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 55:455–64
- Anty R, Iannelli A, Patouraux S, et al (2010) A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 32: 1315–22.
- Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, et al (2011) Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 6:e17599
- Valenti L, Fracanzani AL, Fargion S (2009) The immunopathogenesis of alcoholic and non alcoholic steatohepatitis: two triggers for one disease? *Semin Immunopathol* 138:359–69
- Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, et al (2013) M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: A protective mechanism against alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* doi: 10.1002/hep.26607
- Syn WK, Oo YH, Pereira TA, et al (2010) Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51:1998–2007
- Bertola A, Bonnafous S, Anty R, et al (2010) Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 5: e13577
- Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, et al (2008) Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 103:1372–9
- Bigorgne AE, Bouchet-Delbos L, Naveau S, et al (2008) Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice. *Gastroenterology* 134:1459–69
- Bertola A, Deveau V, Bonnafous S, et al (2009) Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 58:125–33
- Patouraux S, Bonnafous S, Voican CS, et al (2012) The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 7: e35612
- Syn WK, Agboola KM, Swiderska M, et al (2012) NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 61:1323–29
- Seki E, Brenner DA (2008) Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 48:322–35
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761–72
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140: 821–32
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221–5
- Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, et al (2012) Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482:179–85
- Csak T, Ganz M, Pespisa J, et al (2011) Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* 54:133–44

32. Szabo G, Csak T (2012) Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol* 57:642–54
33. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, et al (1998) Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 114:311–8
34. Xiong S, She H, Sung CK, Tsukamoto H (2003) Iron-dependent activation of NF-kappaB in Kupffer cells: a priming mechanism for alcoholic liver disease. *Alcohol* 30:107–13
35. b. Valenti L, Fracanzani AL, Bugianesi E, et al (2010) HFE genotype, parenchymal iron accumulation, and liver fibrosis in patients with non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 138:905–12
36. Bekri S, Gual P, Anty R, et al (2006) Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 131:788–96
37. Luciani N, Brasse-Lagnel C, Poli M, et al (2011) Hemojuvelin: a new link between obesity and iron homeostasis. *Obesity* 19:1545–51
38. Anty R, Dahman M, Iannelli A, et al (2008) Bariatric Surgery Can Correct Iron Depletion in Morbidly Obese Women: A Link with Chronic Inflammation. *Obes Surg* 18: 709–14
39. Tussing-Humphreys LM, Nemeth E, Fantuzzi G, et al (2010) Elevated systemic hepcidin and iron depletion in obese premenopausal females. *Obesity* 18:1449–56
40. Malhi H, Gores GJ (2008) Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 134:1641–54
41. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821–30
42. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796–808
43. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–84
44. Cancellor R, Henegar C, Viguerie N, et al (2005) Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277–86
45. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116:115–24
46. Kiefer FW, Neschen S, Pfau B, et al (2011) Osteopontin deficiency protects against obesity-induced hepatic steatosis and attenuates glucose production in mice. *Diabetologia* 54:2132–42
47. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15:930–9
48. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al (2009) CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15:914–20
49. Winer S, Chan Y, Paltser G, et al (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15:921–9
50. Patsouris D, Li PP, Thapar D, et al (2008) Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell metabolism* 8:301–9
51. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, et al (2012) Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 61:2238–47
52. Winer DA, Winer S, Shen L, et al (2011) B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17:610–7
53. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, et al (2010) Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51:1961–71
54. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, et al (2010) Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328:228–231.
55. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, et al (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500:585–8
56. Burcelin R, Serino M, Chabo C, et al (2013) Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. *Diabetes, obesity & metabolism* 15 Suppl 3:61–70

REFERENCES

- Adachi, M. and D. A. Brenner (2005). "Clinical syndromes of alcoholic liver disease." Dig Dis **23**(3-4): 255-263.
- Affo, S., M. Dominguez, et al. (2013). "Transcriptome analysis identifies TNF superfamily receptors as potential therapeutic targets in alcoholic hepatitis." Gut **62**(3): 452-460.
- Agnihotri, R., H. C. Crawford, et al. (2001). "Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin)." J Biol Chem **276**(30): 28261-28267.
- Ahmad, R., A. Al-Mass, et al. (2013). "Interaction of osteopontin with IL-18 in obese individuals: implications for insulin resistance." PLoS One **8**(5): e63944.
- Albano, E. and M. Vidali (2010). "Immune mechanisms in alcoholic liver disease." Genes Nutr **5**(2): 141-147.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, et al. (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." Circulation **120**(16): 1640-1645.
- Alchi, B., S. Nishi, et al. (2005). "Osteopontin expression in acute renal allograft rejection." Kidney Int **67**(3): 886-896.
- Alkhouri, N., C. Carter-Kent, et al. (2011). "Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **5**(2): 201-212.
- Allen, D. G. and X. H. Xiao (2003). "Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion." Cardiovasc Res **57**(4): 934-941.
- Altamirano, J., R. Miquel, et al. (2014). "A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis." Gastroenterology **146**(5): 1231-1239 e1231-1236.
- Angulo, P. (2002). "Nonalcoholic fatty liver disease." N Engl J Med **346**(16): 1221-1231.
- Anty, R., S. Bekri, et al. (2006). "The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH." Am J Gastroenterol **101**(8): 1824-1833.
- Aouadi, M., M. Tencerova, et al. (2013). "Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(20): 8278-8283.
- Apte, U. M., A. Banerjee, et al. (2005). "Role of osteopontin in hepatic neutrophil infiltration during alcoholic steatohepatitis." Toxicol Appl Pharmacol **207**(1): 25-38.
- Arthur, M. J., J. P. Iredale, et al. (1999). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: role in liver fibrosis and alcoholic liver disease." Alcohol Clin Exp Res **23**(5): 940-943.
- Ashkar, S., G. F. Weber, et al. (2000). "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity." Science **287**(5454): 860-864.
- Atkins, K., J. E. Berry, et al. (1998). "Coordinate expression of OPN and associated receptors during monocyte/macrophage differentiation of HL-60 cells." J Cell Physiol **175**(2): 229-237.
- Baffy, G., E. M. Brunt, et al. (2012). "Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace." J Hepatol **56**(6): 1384-1391.
- Bailey, S. M. and C. C. Cunningham (1998). "Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes." Hepatology **28**(5): 1318-1326.
- Banerjee, A., U. M. Apte, et al. (2006). "Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease." J Pathol **208**(4): 473-485.

- Banerjee, A., R. C. Burghardt, et al. (2006). "The temporal expression of osteopontin (SPP-1) in the rodent model of alcoholic steatohepatitis: a potential biomarker." Toxicol Pathol **34**(4): 373-384.
- Banerjee, A., J. H. Lee, et al. (2008). "Interaction of osteopontin with neutrophil alpha(4)beta(1) and alpha(9)beta(1) integrins in a rodent model of alcoholic liver disease." Toxicol Appl Pharmacol **233**(2): 238-246.
- Banerjee, A., R. Rose, et al. (2009). "The influence of estrogen on hepatobiliary osteopontin (SPP1) expression in a female rodent model of alcoholic steatohepatitis." Toxicol Pathol **37**(4): 492-501.
- Bayless, K. J. and G. E. Davis (2001). "Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin." J Biol Chem **276**(16): 13483-13489.
- Bayless, K. J., G. A. Meininger, et al. (1998). "Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin." J Cell Sci **111** (Pt 9): 1165-1174.
- Becker, U., A. Deis, et al. (1996). "Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study." Hepatology **23**(5): 1025-1029.
- Bedogni, G., L. Miglioli, et al. (2005). "Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study." Hepatology **42**(1): 44-52.
- Bedossa, P., C. Poitou, et al. (2012). "Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients." Hepatology **56**(5): 1751-1759.
- Bekri, S., P. Gual, et al. (2006). "Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH." Gastroenterology **131**(3): 788-796.
- Bell, C. G., D. Meyre, et al. (2005). "Association of melanin-concentrating hormone receptor 1 5' polymorphism with early-onset extreme obesity." Diabetes **54**(10): 3049-3055.
- Bertola, A., T. Ciucci, et al. (2012). "Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients." Diabetes **61**(9): 2238-2247.
- Bertola, A., V. Deveau, et al. (2009). "Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity." Diabetes **58**(1): 125-133.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.
- Bigorgne, A. E., L. Bouchet-Delbos, et al. (2008). "Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice." Gastroenterology **134**(5): 1459-1469.
- Bouhrel, M. A., B. Derudas, et al. (2007). "PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties." Cell Metab **6**(2): 137-143.
- Bourlier, V., A. Zakaroff-Girard, et al. (2008). "Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages." Circulation **117**(6): 806-815.
- Brancatelli, G., M. P. Federle, et al. (2002). "Hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: CT, clinical, and pathologic findings in 39 U.S. residents." Radiology **222**(1): 89-94.
- Briggs, T. A. (2013). "Osteopontin - a biomarker for organ damage in paediatric lupus?" Arthritis Res Ther **15**(2): 110.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (2008). "Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox." Cell Metab **7**(2): 95-96.
- Bruemmer, D., A. R. Collins, et al. (2003). "Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice." J Clin Invest **112**(9): 1318-1331.
- Brunt, E. M., C. G. Janney, et al. (1999). "Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions." Am J Gastroenterol **94**(9): 2467-2474.
- Bugianesi, E. (2007). "Non-alcoholic steatohepatitis and cancer." Clin Liver Dis **11**(1): 191-207, x-xi.

- Cadranel, J. F., P. Rufat, et al. (2000). "Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEFL)." *Hepatology* **32**(3): 477-481.
- Cales, P., F. Oberti, et al. (2005). "A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis." *Hepatology* **42**(6): 1373-1381.
- Cani, P. D., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**(7): 1761-1772.
- Cao, D. X., Z. J. Li, et al. (2012). "Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers." *World J Gastroenterol* **18**(30): 3923-3930.
- Cao, Z., J. Dai, et al. (2008). "A novel functional motif of osteopontin for human lymphocyte migration and survival." *Mol Immunol* **45**(14): 3683-3692.
- Capeau, J. (2003). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." *Med Sci (Paris)* **19**(8-9): 834-839.
- Chae, S., H. O. Jun, et al. (2009). "Osteopontin splice variants differentially modulate the migratory activity of hepatocellular carcinoma cell lines." *Int J Oncol* **35**(6): 1409-1416.
- Chakir, H., H. Wang, et al. (2003). "T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3." *J Immunol Methods* **278**(1-2): 157-169.
- Chapman, J., P. D. Miles, et al. (2010). "Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice." *PLoS One* **5**(11): e13959.
- Chen, A., S. Mumick, et al. (2005). "Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity." *Obes Res* **13**(8): 1311-1320.
- Chidlow, G., J. P. Wood, et al. (2008). "Expression of osteopontin in the rat retina: effects of excitotoxic and ischemic injuries." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(2): 762-771.
- Chrostek, L. and A. Panasiuk (2014). "Liver fibrosis markers in alcoholic liver disease." *World J Gastroenterol* **20**(25): 8018-8023.
- Churchill, T. A., K. M. Cheetham, et al. (1994). "Glycolysis and energy metabolism in rat liver during warm and cold ischemia: evidence of an activation of the regulatory enzyme phosphofructokinase." *Cryobiology* **31**(5): 441-452.
- Cinti, S., G. Mitchell, et al. (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." *J Lipid Res* **46**(11): 2347-2355.
- Cizza, G. and K. I. Rother (2012). "Beyond fast food and slow motion: weighty contributors to the obesity epidemic." *J Endocrinol Invest* **35**(2): 236-242.
- Clarke, S. F., E. F. Murphy, et al. (2012). "The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights." *Gut Microbes* **3**(3): 186-202.
- Coates, P. S., J. D. Fernstrom, et al. (2004). "Gastric bypass surgery for morbid obesity leads to an increase in bone turnover and a decrease in bone mass." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(3): 1061-1065.
- Cotillard, A., S. P. Kennedy, et al. (2013). "Dietary intervention impact on gut microbial gene richness." *Nature* **500**(7464): 585-588.
- Crompton, M. (2000). "Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death." *J Physiol* **529 Pt 1**: 11-21.
- Crowson, C. S., E. L. Matteson, et al. (2013). "Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis." *Arthritis Care Res (Hoboken)* **65**(1): 71-77.
- Csak, T., M. Ganz, et al. (2011). "Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells." *Hepatology* **54**(1): 133-144.
- da Silva, A. P., R. P. Ellen, et al. (2009). "Osteopontin attenuation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." *Lab Invest* **89**(10): 1169-1181.
- de Groot, H. and U. Rauhen (2007). "Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review." *Transplant Proc* **39**(2): 481-484.

- De Minicis, S., E. Seki, et al. (2007). "Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo." *Gastroenterology* **132**(5): 1937-1946.
- Denhardt, D. T., D. Mistretta, et al. (2003). "Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter." *Clin Exp Metastasis* **20**(1): 77-84.
- Denhardt, D. T. and M. Noda (1998). "Osteopontin expression and function: role in bone remodeling." *J Cell Biochem Suppl* **30-31**: 92-102.
- Dentin, R., J. Girard, et al. (2005). "Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver." *Biochimie* **87**(1): 81-86.
- Dobrowsky, R. T., C. Kamibayashi, et al. (1993). "Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A." *J Biol Chem* **268**(21): 15523-15530.
- Emanuelli, B., P. Peraldi, et al. (2000). "SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling." *J Biol Chem* **275**(21): 15985-15991.
- Everett, L., A. Galli, et al. (2000). "The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease." *Liver* **20**(3): 191-199.
- Fabbrini, E., M. Cella, et al. (2013). "Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals." *Gastroenterology* **145**(2): 366-374 e361-363.
- Fan, K., J. Dai, et al. (2008). "Treatment of collagen-induced arthritis with an anti-osteopontin monoclonal antibody through promotion of apoptosis of both murine and human activated T cells." *Arthritis Rheum* **58**(7): 2041-2052.
- Farfan Labonne, B. E., M. Gutierrez, et al. (2009). "Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage." *Cell Biol Toxicol* **25**(6): 599-609.
- Fei, N. and L. Zhao (2013). "An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice." *ISME J* **7**(4): 880-884.
- Feldstein, A. E., N. W. Werneburg, et al. (2004). "Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway." *Hepatology* **40**(1): 185-194.
- Fet, V., M. E. Dickinson, et al. (1989). "Localization of the mouse gene for secreted phosphoprotein 1 (Spp-1) (2ar, osteopontin, bone sialoprotein 1, 44-kDa bone phosphoprotein, tumor-secreted phosphoprotein) to chromosome 5, closely linked to Ric (Rickettsia resistance)." *Genomics* **5**(2): 375-377.
- Feurerer, M., L. Herrero, et al. (2009). "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters." *Nat Med* **15**(8): 930-939.
- Franzen, A. and D. Heinegard (1985). "Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix." *Biochem J* **232**(3): 715-724.
- Gao, C., H. Guo, et al. (2007). "Osteopontin induces ubiquitin-dependent degradation of STAT1 in RAW264.7 murine macrophages." *J Immunol* **178**(3): 1870-1881.
- Gao, C., H. Guo, et al. (2004). "S-nitrosylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B regulates osteopontin transcription in endotoxin-stimulated murine macrophages." *J Biol Chem* **279**(12): 11236-11243.
- Gao, C., Z. Mi, et al. (2007). "Osteopontin regulates ubiquitin-dependent degradation of Stat1 in murine mammary epithelial tumor cells." *Neoplasia* **9**(9): 699-706.
- Gao, Z., D. Hwang, et al. (2002). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex." *J Biol Chem* **277**(50): 48115-48121.
- Ge, X., T. M. Leung, et al. (2014). "Osteopontin binding to lipopolysaccharide lowers tumor necrosis factor-alpha and prevents early alcohol-induced liver injury in mice." *Hepatology* **59**(4): 1600-1616.
- Ge, X., Y. Lu, et al. (2013). "Milk osteopontin, a nutritional approach to prevent alcohol-induced liver injury." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **304**(10): G929-939.
- Giachelli, C. M., D. Lombardi, et al. (1998). "Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo." *Am J Pathol* **152**(2): 353-358.

- Giachelli, C. M. and S. Steitz (2000). "Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization." *Matrix Biol* **19**(7): 615-622.
- Gimba, E. R. and T. M. Tilli (2013). "Human osteopontin splicing isoforms: known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways." *Cancer Lett* **331**(1): 11-17.
- Gomez-Ambrosi, J., V. Catalan, et al. (2007). "Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(9): 3719-3727.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* **5**(12): 953-964.
- Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, et al. (2005). "Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation." *Biochimie* **87**(1): 99-109.
- Guerin, S., A. Laplanche, et al. (2013). "Alcohol-attributable mortality in France." *Eur J Public Health* **23**(4): 588-593.
- Guo, H., C. Q. Cai, et al. (2001). "Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages." *J Immunol* **166**(2): 1079-1086.
- Guo, H., P. Y. Wai, et al. (2008). "Osteopontin mediates Stat1 degradation to inhibit iNOS transcription in a cecal ligation and puncture model of sepsis." *Surgery* **144**(2): 182-188.
- Gutcher, I. and B. Becher (2007). "APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation." *J Clin Invest* **117**(5): 1119-1127.
- Hamada, T., S. Duarte, et al. (2009). "Inducible nitric oxide synthase deficiency impairs matrix metalloproteinase-9 activity and disrupts leukocyte migration in hepatic ischemia/reperfusion injury." *Am J Pathol* **174**(6): 2265-2277.
- Heilmann, K., U. Hoffmann, et al. (2009). "Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation." *J Cell Mol Med* **13**(6): 1162-1174.
- Henao-Mejia, J., E. Elinav, et al. (2012). "Inflammasomes: far beyond inflammation." *Nat Immunol* **13**(4): 321-324.
- Herring, G. M. and P. W. Kent (1963). "Some Studies on Mucosubstances of Bovine Cortical Bone." *Biochem J* **89**: 405-414.
- Hijiya, N., M. Setoguchi, et al. (1994). "Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter." *Biochem J* **303** (Pt 1): 255-262.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* **420**(6913): 333-336.
- Huang, W., A. Metlakunta, et al. (2010). "Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance." *Diabetes* **59**(2): 347-357.
- Hur, E. M., S. Youssef, et al. (2007). "Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells." *Nat Immunol* **8**(1): 74-83.
- Hwang, S. M., C. A. Lopez, et al. (1994). "Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial cells." *J Biol Chem* **269**(1): 711-715.
- Iizuka, K., R. K. Bruick, et al. (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(19): 7281-7286.
- Ikeda, T., K. Yanaga, et al. (1992). "Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats." *Hepatology* **16**(2): 454-461.
- Imbert-Bismut, F., V. Ratziu, et al. (2001). "Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study." *Lancet* **357**(9262): 1069-1075.
- Inoue, M. and M. L. Shinohara (2011). "Intracellular osteopontin (iOPN) and immunity." *Immunol Res* **49**(1-3): 160-172.
- Inouye, K. E., H. Shi, et al. (2007). "Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue." *Diabetes* **56**(9): 2242-2250.
- Iqbal, J., S. McRae, et al. (2013). "Mechanism of hepatitis C virus (HCV)-induced osteopontin and its role in epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes." *J Biol Chem* **288**(52): 36994-37009.

- Iqbal, J., S. McRae, et al. (2014). "Role of hepatitis C virus induced osteopontin in epithelial to mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocytes." *PLoS One* **9**(1): e87464.
- Iwade, H., H. Kobayashi, et al. (2014). "Plasma osteopontin is correlated with bone resorption markers in rheumatoid arthritis patients." *Int J Rheum Dis* **17**(1): 50-56.
- Jagavelu, K., C. Routray, et al. (2010). "Endothelial cell toll-like receptor 4 regulates fibrosis-associated angiogenesis in the liver." *Hepatology* **52**(2): 590-601.
- Jeong, W. I., D. Osei-Hyiaman, et al. (2008). "Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver." *Cell Metab* **7**(3): 227-235.
- Joshi-Barve, S., S. S. Barve, et al. (2007). "Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes." *Hepatology* **46**(3): 823-830.
- Jourdan, T., L. Djaouti, et al. (2010). "CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice." *Diabetes* **59**(4): 926-934.
- Jubber, A. S. (2004). "Respiratory complications of obesity." *Int J Clin Pract* **58**(6): 573-580.
- Junaid, A., M. C. Moon, et al. (2007). "Osteopontin localizes to the nucleus of 293 cells and associates with polo-like kinase-1." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(2): C919-926.
- Kamei, N., K. Tobe, et al. (2006). "Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance." *J Biol Chem* **281**(36): 26602-26614.
- Kawamura, K., K. Iyama, et al. (2005). "Differentiation, maturation, and survival of dendritic cells by osteopontin regulation." *Clin Diagn Lab Immunol* **12**(1): 206-212.
- Kawashima, R., S. Mochida, et al. (1999). "Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas." *Biochem Biophys Res Commun* **256**(3): 527-531.
- Kiefer, F. W., S. Neschen, et al. (2011). "Osteopontin deficiency protects against obesity-induced hepatic steatosis and attenuates glucose production in mice." *Diabetologia* **54**(8): 2132-2142.
- Kiefer, F. W., M. Zeyda, et al. (2010). "Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance." *Diabetes* **59**(4): 935-946.
- Kiefer, F. W., M. Zeyda, et al. (2008). "Osteopontin expression in human and murine obesity: extensive local up-regulation in adipose tissue but minimal systemic alterations." *Endocrinology* **149**(3): 1350-1357.
- Kim, H. J., H. J. Lee, et al. (2009). "Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(36): 15326-15331.
- Kintscher, U., M. Hartge, et al. (2008). "T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(7): 1304-1310.
- Kleiner, D. E., E. M. Brunt, et al. (2005). "Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **41**(6): 1313-1321.
- Koh, A., A. P. da Silva, et al. (2007). "Role of osteopontin in neutrophil function." *Immunology* **122**(4): 466-475.
- Koh, H. S., A. Matsui, et al. (2005). "Increased cytoprotective function in the liver of transgenic mice expressing osteopontin in hepatocytes." *Hepatology Research* **32**(1): 46-51.
- Kohan, M., R. Bader, et al. (2007). "Enhanced osteopontin expression in a murine model of allergen-induced airway remodelling." *Clin Exp Allergy* **37**(10): 1444-1454.
- Kohjima, M., M. Enjoji, et al. (2007). "Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease." *Int J Mol Med* **20**(3): 351-358.
- Kohjima, M., N. Higuchi, et al. (2008). "SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease." *Int J Mol Med* **21**(4): 507-511.
- Kon, S., M. Ikesue, et al. (2008). "Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin." *J Exp Med* **205**(1): 25-33.

- Kong, X., D. Feng, et al. (2013). "Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease." *J Gastroenterol Hepatol* **28 Suppl 1**: 56-60.
- Kong, X., D. Feng, et al. (2012). "Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice." *Hepatology* **56**(3): 1150-1159.
- Kopp, A., C. Buechler, et al. (2009). "Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes." *Obesity (Silver Spring)* **17**(4): 648-656.
- Kossmehl, P., J. Schonberger, et al. (2005). "Increase of fibronectin and osteopontin in porcine hearts following ischemia and reperfusion." *J Mol Med (Berl)* **83**(8): 626-637.
- Krause, S. W., M. Rehli, et al. (1996). "Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation." *J Leukoc Biol* **60**(4): 540-545.
- Kwon, H. J., Y. S. Won, et al. (2010). "The role of osteopontin in d-galactosamine-induced liver injury in genetically obese mice." *Toxicol Appl Pharmacol* **242**(3): 344-351.
- Lacronique, V., A. Mignon, et al. (1996). "Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice." *Nat Med* **2**(1): 80-86.
- Lancha, A., R. Moncada, et al. (2014). "Effect of sleeve gastrectomy on osteopontin circulating levels and expression in adipose tissue and liver in rats." *Obes Surg* **24**(10): 1702-1708.
- Lancha, A., R. Moncada, et al. (2014). "Comparative effects of gastric bypass and sleeve gastrectomy on plasma osteopontin concentrations in humans." *Surg Endosc* **28**(8): 2412-2420.
- Lancha, A., A. Rodriguez, et al. (2014). "Osteopontin deletion prevents the development of obesity and hepatic steatosis via impaired adipose tissue matrix remodeling and reduced inflammation and fibrosis in adipose tissue and liver in mice." *PLoS One* **9**(5): e98398.
- Lanthier, N., O. Molendi-Coste, et al. (2010). "Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**(1): G107-116.
- Lavallard, V. J., S. Bonnafe, et al. (2011). "Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease." *PLoS One* **6**(3): e17599.
- Lazaro, R., R. Wu, et al. (2014). "Osteopontin deficiency does not prevent but promotes alcoholic neutrophilic hepatitis in mice." *Hepatology*.
- Le Chatelier, E., T. Nielsen, et al. (2013). "Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers." *Nature* **500**(7464): 541-546.
- Le Roy, T., M. Llopis, et al. (2013). "Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice." *Gut* **62**(12): 1787-1794.
- Lee, S. H., G. S. Seo, et al. (2004). "Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells." *Biochem Pharmacol* **68**(12): 2367-2378.
- Lemmers, A., C. Moreno, et al. (2009). "The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease." *Hepatology* **49**(2): 646-657.
- Lenga, Y., A. Koh, et al. (2008). "Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation." *Circ Res* **102**(3): 319-327.
- Lewington, A. J., B. J. Padanilam, et al. (2000). "Expression of CD44 in kidney after acute ischemic injury in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**(1): R247-254.
- Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, et al. (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." *Nature* **444**(7122): 1022-1023.
- Li, Y., S. Xu, et al. (2011). "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice." *Cell Metab* **13**(4): 376-388.
- Liaw, L., V. Lindner, et al. (1995). "Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro." *Circ Res* **77**(4): 665-672.
- Lieber, C. S. (2004). "Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis." *Alcohol* **34**(1): 9-19.

- Lima-Cabello, E., M. V. Garcia-Mediavilla, et al. (2011). "Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C." Clin Sci (Lond) **120**(6): 239-250.
- Liu, H., H. Perlman, et al. (2001). "Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation." J Exp Med **194**(2): 113-126.
- Liu, Q., J. Zheng, et al. (2012). "Monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD) positively regulates ERK and Akt activation and TNF-alpha and NO production in macrophages." Mol Biol Rep **39**(5): 5643-5650.
- Lopez, R. P. and H. P. Hynes (2006). "Obesity, physical activity, and the urban environment: public health research needs." Environ Health **5**: 25.
- Lorena, D., I. A. Darby, et al. (2006). "Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. altered liver healing in osteopontin-deficient mice." J Hepatol **44**(2): 383-390.
- Lu, C., P. A. Kumar, et al. (2013). "Targeted deletion of growth hormone (GH) receptor in macrophage reveals novel osteopontin-mediated effects of GH on glucose homeostasis and insulin sensitivity in diet-induced obesity." J Biol Chem **288**(22): 15725-15735.
- Lucey, M. R., P. Mathurin, et al. (2009). "Alcoholic hepatitis." N Engl J Med **360**(26): 2758-2769.
- Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, et al. (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." J Clin Invest **117**(1): 175-184.
- Lumeng, C. N., J. B. DelProposto, et al. (2008). "Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes." Diabetes **57**(12): 3239-3246.
- Lund, S. A., C. M. Giachelli, et al. (2009). "The role of osteopontin in inflammatory processes." J Cell Commun Signal **3**(3-4): 311-322.
- Machado, M., P. Marques-Vidal, et al. (2006). "Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery." J Hepatol **45**(4): 600-606.
- Machado, M. V. and H. Cortez-Pinto (2011). "Osteopontin: a missing link between hedgehog signaling and fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **53**(2): 382-384.
- Malhi, H. and G. J. Gores (2008). "Cellular and molecular mechanisms of liver injury." Gastroenterology **134**(6): 1641-1654.
- Mallat, A., F. Teixeira-Clerc, et al. (2013). "Cannabinoid signaling and liver therapeutics." J Hepatol **59**(4): 891-896.
- Mallat, Z. (2011). "The B-side story in insulin resistance." Nat Med **17**(5): 539-540.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.
- Marcos, M., M. Gomez-Munuera, et al. (2009). "Tumor necrosis factor polymorphisms and alcoholic liver disease: a HuGE review and meta-analysis." Am J Epidemiol **170**(8): 948-956.
- Marra, F. and S. Lotersztajn (2013). "Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment." Curr Pharm Des **19**(29): 5250-5269.
- Marroquin, C. E., L. Downey, et al. (2004). "Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murine leukemia cells." Immunol Lett **95**(1): 109-112.
- Martin-Murphy, B. V., Q. You, et al. (2014). "Mice lacking natural killer T cells are more susceptible to metabolic alterations following high fat diet feeding." PLoS One **9**(1): e80949.
- Mazen, I., M. El-Gammal, et al. (2009). "A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient." Mol Genet Metab **97**(4): 305-308.
- Meller, R., S. L. Stevens, et al. (2005). "Neuroprotection by osteopontin in stroke." J Cereb Blood Flow Metab **25**(2): 217-225.
- Mello, T., E. Ceni, et al. (2008). "Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde." Mol Aspects Med **29**(1-2): 17-21.
- Meng, F., K. Wang, et al. (2012). "Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice." Gastroenterology **143**(3): 765-776 e761-763.

- Miller, A. M., H. Wang, et al. (2011). "Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice." *Hepatology* **54**(3): 846-856.
- Minehira, K., S. G. Young, et al. (2008). "Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice." *J Lipid Res* **49**(9): 2038-2044.
- Mochida, S., T. Yoshimoto, et al. (2004). "Transgenic mice expressing osteopontin in hepatocytes as a model of autoimmune hepatitis." *Biochem Biophys Res Commun* **317**(1): 114-120.
- Monetti, M., M. C. Levin, et al. (2007). "Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver." *Cell Metab* **6**(1): 69-78.
- Monney, L., C. A. Sabatos, et al. (2002). "Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease." *Nature* **415**(6871): 536-541.
- Morales-Ibanez, O., M. Dominguez, et al. (2013). "Human and experimental evidence supporting a role for osteopontin in alcoholic hepatitis." *Hepatology* **58**(5): 1742-1756.
- Muccioli, G. G., D. Naslain, et al. (2010). "The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis." *Mol Syst Biol* **6**: 392.
- Muhanna, N., L. Abu Tair, et al. (2011). "Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation." *Gut* **60**(1): 90-98.
- Musso, G., E. Paschetta, et al. (2013). "Interactions among bone, liver, and adipose tissue predisposing to diabetes and fatty liver." *Trends Mol Med* **19**(9): 522-535.
- Nagasaki, T., E. Ishimura, et al. (1999). "Alpha_v integrin regulates TNF- α -induced nitric oxide synthesis in rat mesangial cells--possible role of osteopontin." *Nephrol Dial Transplant* **14**(8): 1861-1866.
- Nakamachi, T., T. Nomiya, et al. (2007). "PPAR α agonists suppress osteopontin expression in macrophages and decrease plasma levels in patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **56**(6): 1662-1670.
- Naveau, S., A. M. Cassard-Doulcier, et al. (2010). "Harmful effect of adipose tissue on liver lesions in patients with alcoholic liver disease." *J Hepatol* **52**(6): 895-902.
- Naveau, S., G. Gaude, et al. (2009). "Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease." *Hepatology* **49**(1): 97-105.
- Naveau, S., V. Giraud, et al. (1997). "Excess weight risk factor for alcoholic liver disease." *Hepatology* **25**(1): 108-111.
- Naveau, S., B. Raynard, et al. (2005). "Biomarkers for the prediction of liver fibrosis in patients with chronic alcoholic liver disease." *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**(2): 167-174.
- Naveau, S., J. Thaur, et al. (2009). "Predictive factors for pure steatosis in alcoholic patients." *Alcohol Clin Exp Res* **33**(6): 1104-1110.
- Neuman, M. G. (2001). "Apoptosis in diseases of the liver." *Crit Rev Clin Lab Sci* **38**(2): 109-166.
- Nguyen, M. T., S. Favelyukis, et al. (2007). "A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways." *J Biol Chem* **282**(48): 35279-35292.
- Nishimura, S., I. Manabe, et al. (2009). "CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." *Nat Med* **15**(8): 914-920.
- Noiri, E., K. Dickman, et al. (1999). "Reduced tolerance to acute renal ischemia in mice with a targeted disruption of the osteopontin gene." *Kidney Int* **56**(1): 74-82.
- Nomiya, T., D. Perez-Tilve, et al. (2007). "Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice." *J Clin Invest* **117**(10): 2877-2888.
- Nystrom, T., P. Duner, et al. (2007). "A constitutive endogenous osteopontin production is important for macrophage function and differentiation." *Exp Cell Res* **313**(6): 1149-1160.
- Nzeako, U. C., Z. D. Goodman, et al. (1996). "Hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic livers. A clinico-histopathologic study of 804 North American patients." *Am J Clin Pathol* **105**(1): 65-75.

- O'Regan, A. W., G. L. Chupp, et al. (1999). "Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro." *J Immunol* **162**(2): 1024-1031.
- O'Regan, A. W., G. J. Nau, et al. (2000). "Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks." *Immunol Today* **21**(10): 475-478.
- O'Shea, R. S., S. Dasarathy, et al. (2010). "Alcoholic liver disease." *Am J Gastroenterol* **105**(1): 14-32; quiz 33.
- Ogawa, D., J. F. Stone, et al. (2005). "Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways." *Circ Res* **96**(7): e59-67.
- Oh, D. Y., H. Morinaga, et al. (2012). "Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice." *Diabetes* **61**(2): 346-354.
- Okada, H., K. Moriwaki, et al. (2000). "Osteopontin expressed by renal tubular epithelium mediates interstitial monocyte infiltration in rats." *Am J Physiol Renal Physiol* **278**(1): F110-121.
- Okada, H., K. Moriwaki, et al. (2000). "Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis." *Am J Kidney Dis* **36**(3): 498-506.
- Ophascharoensuk, V., C. M. Giachelli, et al. (1999). "Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis." *Kidney Int* **56**(2): 571-580.
- Orman, E. S., G. Odena, et al. (2013). "Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy." *J Gastroenterol Hepatol* **28 Suppl 1**: 77-84.
- Osei-Hyiaman, D., J. Liu, et al. (2008). "Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice." *J Clin Invest* **118**(9): 3160-3169.
- Oyama, Y., N. Akuzawa, et al. (2002). "PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells." *Circ Res* **90**(3): 348-355.
- Oyama, Y., M. Kurabayashi, et al. (2000). "Troglitazone, a PPARgamma ligand, inhibits osteopontin gene expression in human monocytes/macrophage THP-1 cells." *J Atheroscler Thromb* **7**(2): 77-82.
- Padanilam, B. J., D. R. Martin, et al. (1996). "Insulin-like growth factor I-enhanced renal expression of osteopontin after acute ischemic injury in rats." *Endocrinology* **137**(5): 2133-2140.
- Panchal, S. K. and L. Brown (2011). "Rodent models for metabolic syndrome research." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 351982.
- Paradis, V., S. Zalinski, et al. (2009). "Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis." *Hepatology* **49**(3): 851-859.
- Park, E. J., J. H. Lee, et al. (2010). "Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression." *Cell* **140**(2): 197-208.
- Patarca, R., G. J. Freeman, et al. (1989). "Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection." *J Exp Med* **170**(1): 145-161.
- Patarca, R., R. A. Saavedra, et al. (1993). "Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene." *Crit Rev Immunol* **13**(3-4): 225-246.
- Patouraux, S., S. Bonnafe, et al. (2012). "The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease." *PLoS One* **7**(4): e35612.
- Patsouris, D., P. P. Li, et al. (2008). "Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals." *Cell Metab* **8**(4): 301-309.
- Peralta, C., M. B. Jimenez-Castro, et al. (2013). "Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu." *J Hepatol* **59**(5): 1094-1106.
- Persy, V. P., A. Verhulst, et al. (2003). "Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice." *Kidney Int* **63**(2): 543-553.

- Persy, V. P., W. A. Verstrepen, et al. (1999). "Differences in osteopontin up-regulation between proximal and distal tubules after renal ischemia/reperfusion." *Kidney Int* **56**(2): 601-611.
- Philip, S., A. Bulbule, et al. (2001). "Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells." *J Biol Chem* **276**(48): 44926-44935.
- Pischon, T., U. Nothlings, et al. (2008). "Obesity and cancer." *Proc Nutr Soc* **67**(2): 128-145.
- Poirier, P., T. D. Giles, et al. (2006). "Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism." *Circulation* **113**(6): 898-918.
- Poynard, T., R. Morra, et al. (2007). "Meta-analyses of FibroTest diagnostic value in chronic liver disease." *BMC Gastroenterol* **7**: 40.
- Pritchett, J., E. Harvey, et al. (2012). "Osteopontin is a novel downstream target of SOX9 with diagnostic implications for progression of liver fibrosis in humans." *Hepatology* **56**(3): 1108-1116.
- Quaglia, M., A. Chiochetti, et al. (2014). "Osteopontin circulating levels correlate with renal involvement in systemic lupus erythematosus and are lower in ACE inhibitor-treated patients." *Clin Rheumatol* **33**(9): 1263-1271.
- Rangwala, F., C. D. Guy, et al. (2011). "Increased production of sonic hedgehog by ballooned hepatocytes." *J Pathol* **224**(3): 401-410.
- Rao, R. (2009). "Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease." *Hepatology* **50**(2): 638-644.
- Ratzl, V., S. Bellentani, et al. (2010). "A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference." *J Hepatol* **53**(2): 372-384.
- Ratzl, V., F. Charlotte, et al. (2005). "Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* **128**(7): 1898-1906.
- Rausch, M. E., S. Weisberg, et al. (2008). "Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration." *Int J Obes (Lond)* **32**(3): 451-463.
- Raynard, B., A. Balian, et al. (2002). "Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease." *Hepatology* **35**(3): 635-638.
- Renkl, A. C., J. Wussler, et al. (2005). "Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype." *Blood* **106**(3): 946-955.
- Riess, M. L., A. K. Camara, et al. (2002). "Anesthetic preconditioning attenuates mitochondrial Ca²⁺ overload during ischemia in Guinea pig intact hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid." *Anesth Analg* **95**(6): 1540-1546, table of contents.
- Rittling, S. R. and D. T. Denhardt (1999). "Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice." *Exp Nephrol* **7**(2): 103-113.
- Rocha, V. Z., E. J. Folco, et al. (2008). "Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity." *Circ Res* **103**(5): 467-476.
- Rollo, E. E., D. L. Laskin, et al. (1996). "Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages." *J Leukoc Biol* **60**(3): 397-404.
- Sahai, A., P. Malladi, et al. (2004). "Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(1): G264-273.
- Sahai, A., P. Malladi, et al. (2004). "Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(5): G1035-1043.
- Saltiel, A. R. (2012). "Insulin resistance in the defense against obesity." *Cell Metab* **15**(6): 798-804.
- Samuel, D. J., K. P. Sundararaj, et al. (2010). "Adipocyte-mononuclear cell interaction, Toll-like receptor 4 activation, and high glucose synergistically up-regulate osteopontin expression via an interleukin 6-mediated mechanism." *J Biol Chem* **285**(6): 3916-3927.

- Sancho-Bru, P., R. Bataller, et al. (2005). "Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers." *J Hepatol* **43**(2): 272-282.
- Schroeter, M., P. Zickler, et al. (2006). "Increased thalamic neurodegeneration following ischaemic cortical stroke in osteopontin-deficient mice." *Brain* **129**(Pt 6): 1426-1437.
- Schulz, G., A. C. Renkl, et al. (2008). "Regulated osteopontin expression by dendritic cells decisively affects their migratory capacity." *J Invest Dermatol* **128**(10): 2541-2544.
- Schwabe, R. F. and D. A. Brenner (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**(4): G583-589.
- Seki, E., S. De Minicis, et al. (2007). "TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis." *Nat Med* **13**(11): 1324-1332.
- Sesti, G., M. Federici, et al. (2001). "Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders." *FASEB J* **15**(12): 2099-2111.
- Seth, D., A. Duly, et al. (2014). "Osteopontin is an important mediator of alcoholic liver disease via hepatic stellate cell activation." *World J Gastroenterol* **20**(36): 13088-13104.
- Seth, D., M. D. Gorrell, et al. (2006). "Intrahepatic gene expression in human alcoholic hepatitis." *J Hepatol* **45**(2): 306-320.
- Setshedi, M., J. R. Wands, et al. (2010). "Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease." *Oxid Med Cell Longev* **3**(3): 178-185.
- Shi, Z., M. Mirza, et al. (2014). "Osteopontin-a alters glucose homeostasis in anchorage-independent breast cancer cells." *Cancer Lett* **344**(1): 47-53.
- Shi, Z., B. Wang, et al. (2014). "Energy metabolism during anchorage-independence. Induction by osteopontin-c." *PLoS One* **9**(8): e105675.
- Shimano, H., J. D. Horton, et al. (1997). "Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells." *J Clin Invest* **99**(5): 846-854.
- Shinohara, M. L., M. Jansson, et al. (2005). "T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47): 17101-17106.
- Shinohara, M. L., H. J. Kim, et al. (2008). "Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(20): 7235-7239.
- Shinohara, M. L., L. Lu, et al. (2006). "Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells." *Nat Immunol* **7**(5): 498-506.
- Shio, K., H. Kobayashi, et al. (2010). "Thrombin-cleaved osteopontin is increased in urine of patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **37**(4): 704-710.
- Smith, L. L., H. K. Cheung, et al. (1996). "Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin." *J Biol Chem* **271**(45): 28485-28491.
- Smith, U. (2002). "Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue?" *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**(7): 897-904.
- Sodek, J., B. Ganss, et al. (2000). "Osteopontin." *Crit Rev Oral Biol Med* **11**(3): 279-303.
- Sodhi, C. P., S. A. Phadke, et al. (2001). "Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose." *Diabetes* **50**(6): 1482-1490.
- Stefanovic-Racic, M., X. Yang, et al. (2012). "Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver." *Diabetes* **61**(9): 2330-2339.
- Stein, C. J. and G. A. Colditz (2004). "The epidemic of obesity." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2522-2525.
- Stephens, J. M. and P. H. Pekala (1991). "Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha." *J Biol Chem* **266**(32): 21839-21845.

- Stewart, S. H. (2002). "Racial and ethnic differences in alcohol-associated aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase elevation." *Arch Intern Med* **162**(19): 2236-2239.
- Stickel, F., S. Buch, et al. (2011). "Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians." *Hepatology* **53**(1): 86-95.
- Strowig, T., J. Henao-Mejia, et al. (2012). "Inflammasomes in health and disease." *Nature* **481**(7381): 278-286.
- Sugimoto, T., S. Yamashita, et al. (2002). "Decreased microsomal triglyceride transfer protein activity contributes to initiation of alcoholic liver steatosis in rats." *J Hepatol* **36**(2): 157-162.
- Syn, W. K., K. M. Agboola, et al. (2012). "NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease." *Gut* **61**(9): 1323-1329.
- Syn, W. K., S. S. Choi, et al. (2011). "Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* **53**(1): 106-115.
- Szalardy, L., D. Zadori, et al. (2013). "Evaluating biomarkers of neuronal degeneration and neuroinflammation in CSF of patients with multiple sclerosis-osteopontin as a potential marker of clinical severity." *J Neurol Sci* **331**(1-2): 38-42.
- Takafuji, V., M. Forgues, et al. (2007). "An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma." *Oncogene* **26**(44): 6361-6371.
- Tan, Z., X. Qian, et al. (2013). "IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation." *J Immunol* **191**(4): 1835-1844.
- Taniai, H., I. N. Hines, et al. (2004). "Susceptibility of murine periportal hepatocytes to hypoxia-reoxygenation: role for NO and Kupffer cell-derived oxidants." *Hepatology* **39**(6): 1544-1552.
- Teixeira-Clerc, F., B. Julien, et al. (2006). "CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis." *Nat Med* **12**(6): 671-676.
- Thabut, D., S. Naveau, et al. (2006). "The diagnostic value of biomarkers (AshTest) for the prediction of alcoholic steato-hepatitis in patients with chronic alcoholic liver disease." *J Hepatol* **44**(6): 1175-1185.
- Tordjman, J., C. Poitou, et al. (2009). "Association between omental adipose tissue macrophages and liver histopathology in morbid obesity: influence of glycemic status." *J Hepatol* **51**(2): 354-362.
- Trabut, J. B., A. Plat, et al. (2008). "Influence of liver biopsy on abstinence in alcohol-dependent patients." *Alcohol Alcohol* **43**(5): 559-563.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* **444**(7122): 1027-1031.
- Uede, T. (2011). "Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases." *Pathol Int* **61**(5): 265-280.
- Ueki, K., T. Kondo, et al. (2004). "Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms." *Mol Cell Biol* **24**(12): 5434-5446.
- Uesugi, T., M. Froh, et al. (2001). "Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice." *Hepatology* **34**(1): 101-108.
- Uesugi, T., M. Froh, et al. (2002). "Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice." *J Immunol* **168**(6): 2963-2969.
- Urtasun, R., A. Lopategi, et al. (2012). "Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin alpha(V)beta(3) engagement and PI3K/pAkt/NFkappaB signaling." *Hepatology* **55**(2): 594-608.
- van der Weerd, K., W. A. Dik, et al. (2012). "Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype." *Diabetes* **61**(2): 401-408.
- Vinas, J. L., A. Sola, et al. (2010). "Inhibitory action of Wnt target gene osteopontin on mitochondrial cytochrome c release determines renal ischemic resistance." *Am J Physiol Renal Physiol* **299**(1): F234-242.

- Vinciguerra, M., F. Carrozzino, et al. (2009). "Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN." J Hepatol **50**(6): 1132-1141.
- Viollet, B., B. Guigas, et al. (2009). "AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives." Acta Physiol (Oxf) **196**(1): 81-98.
- Virkamaki, A., K. Ueki, et al. (1999). "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest **103**(7): 931-943.
- Volpe, E., N. Servant, et al. (2008). "A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses." Nat Immunol **9**(6): 650-657.
- Vrieze, A., E. Van Nood, et al. (2012). "Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome." Gastroenterology **143**(4): 913-916 e917.
- Wallace, T. M., J. C. Levy, et al. (2004). "Use and abuse of HOMA modeling." Diabetes Care **27**(6): 1487-1495.
- Wan, H. G., H. Xu, et al. (2014). "Comparison osteopontin vs AFP for the diagnosis of HCC: A meta-analysis." Clin Res Hepatol Gastroenterol.
- Wan, J., M. Benkdane, et al. (2014). "M2 kupffer cells promote hepatocyte senescence: an IL-6-dependent protective mechanism against alcoholic liver disease." Am J Pathol **184**(6): 1763-1772.
- Wan, J., M. Benkdane, et al. (2014). "M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **59**(1): 130-142.
- Wang, J., Q. Tang, et al. (2013). "Osteopontin level correlates with acute cellular renal allograft rejection." J Surg Res **182**(1): 161-165.
- Wang, J. H., R. G. Batey, et al. (2006). "Role of ethanol in the regulation of hepatic stellate cell function." World J Gastroenterol **12**(43): 6926-6932.
- Wang, K. X. and D. T. Denhardt (2008). "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses." Cytokine Growth Factor Rev **19**(5-6): 333-345.
- Wang, X., A. Lopategi, et al. (2014). "Osteopontin induces ductular reaction contributing to liver fibrosis." Gut.
- Weber, G. F., S. Ashkar, et al. (1996). "Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1)." Science **271**(5248): 509-512.
- Weber, G. F. and H. Cantor (2001). "Differential roles of osteopontin/Eta-1 in early and late lpr disease." Clin Exp Immunol **126**(3): 578-583.
- Weisberg, S. P., D. Hunter, et al. (2006). "CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding." J Clin Invest **116**(1): 115-124.
- Weiss, J. M., A. C. Renkl, et al. (2001). "Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes." J Exp Med **194**(9): 1219-1229.
- Wen, S. R., G. J. Liu, et al. (2012). "Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." J Neuroimmunol **244**(1-2): 94-96.
- Wendel, A. A., L. O. Li, et al. (2010). "Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 deficiency in ob/ob mice diminishes hepatic steatosis but does not protect against insulin resistance or obesity." Diabetes **59**(6): 1321-1329.
- White, M. F. (2002). "IRS proteins and the common path to diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(3): E413-422.
- Winer, D. A., S. Winer, et al. (2011). "B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies." Nat Med **17**(5): 610-617.
- Winer, S., Y. Chan, et al. (2009). "Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy." Nat Med **15**(8): 921-929.

- Wu, H., S. Ghosh, et al. (2007). "T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity." *Circulation* **115**(8): 1029-1038.
- Wu, H., X. D. Perrard, et al. (2010). "CD11c expression in adipose tissue and blood and its role in diet-induced obesity." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(2): 186-192.
- Wu, L., V. V. Parekh, et al. (2012). "Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(19): E1143-1152.
- Xanthou, G., T. Alissafi, et al. (2007). "Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets." *Nat Med* **13**(5): 570-578.
- Xie, Y., S. Nishi, et al. (2001). "Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process." *Kidney Int* **59**(3): 959-974.
- Xie, Y., M. Sakatsume, et al. (2001). "Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney." *Kidney Int* **60**(5): 1645-1657.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* **112**(12): 1821-1830.
- Yahagi, N., H. Shimano, et al. (2002). "Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice." *J Biol Chem* **277**(22): 19353-19357.
- Yamabe, K., S. Shimizu, et al. (1998). "Prevention of hypoxic liver cell necrosis by in vivo human bcl-2 gene transfection." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1): 217-223.
- Yamaguchi, K., L. Yang, et al. (2007). "Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* **45**(6): 1366-1374.
- Yamashita, T., M. Honda, et al. (2009). "Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma." *J Hepatol* **50**(1): 100-110.
- Yeh, M. M. and E. M. Brunt (2014). "Pathological Features of Fatty Liver Disease." *Gastroenterology*.
- Yin, M., M. D. Wheeler, et al. (1999). "Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice." *Gastroenterology* **117**(4): 942-952.
- Yokosaki, Y., N. Matsuura, et al. (1999). "The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin." *J Biol Chem* **274**(51): 36328-36334.
- You, M., M. Fischer, et al. (2002). "Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)." *J Biol Chem* **277**(32): 29342-29347.
- Young, M. F., J. M. Kerr, et al. (1990). "cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN)." *Genomics* **7**(4): 491-502.
- Zeisberg, M., C. Yang, et al. (2007). "Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition." *J Biol Chem* **282**(32): 23337-23347.
- Zeyda, M., D. Farmer, et al. (2007). "Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production." *Int J Obes (Lond)* **31**(9): 1420-1428.
- Zeyda, M., K. Gollinger, et al. (2011). "Osteopontin is an activator of human adipose tissue macrophages and directly affects adipocyte function." *Endocrinology* **152**(6): 2219-2227.
- Zhang, H., J. K. DiBaise, et al. (2009). "Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7): 2365-2370.
- Zhang, R., X. Pan, et al. (2011). "Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines." *PLoS One* **6**(8): e23831.
- Zhang, Z. X., K. Shek, et al. (2010). "Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury." *J Immunol* **185**(2): 967-973.
- Zhao, J., L. Dong, et al. (2008). "Down-regulation of osteopontin suppresses growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via induction of apoptosis." *Gastroenterology* **135**(3): 956-968.

- Zhao, L., T. Li, et al. (2008). "Elevated plasma osteopontin level is predictive of cirrhosis in patients with hepatitis B infection." Int J Clin Pract **62**(7): 1056-1062.
- Zhao, W., L. Wang, et al. (2010). "Differential expression of intracellular and secreted osteopontin isoforms by murine macrophages in response to toll-like receptor agonists." J Biol Chem **285**(27): 20452-20461.
- Zhao, W., L. Wang, et al. (2011). "NF-kappaB- and AP-1-mediated DNA looping regulates osteopontin transcription in endotoxin-stimulated murine macrophages." J Immunol **186**(5): 3173-3179.
- Zhou, R., A. S. Yazdi, et al. (2011). "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation." Nature **469**(7329): 221-225.
- Zhu, B., K. Suzuki, et al. (2004). "Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin." J Cell Physiol **198**(1): 155-167.
- Zhu, L., Y. Wu, et al. (2011). "IL-17R activation of human periodontal ligament fibroblasts induces IL-23 p19 production: Differential involvement of NF-kappaB versus JNK/AP-1 pathways." Mol Immunol **48**(4): 647-656.
- Zhu, W., L. Guo, et al. (2014). "Combination of osteopontin with peritumoral infiltrating macrophages is associated with poor prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma after curative resection." Ann Surg Oncol **21**(4): 1304-1313.
- Zohar, R., N. Suzuki, et al. (2000). "Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration." J Cell Physiol **184**(1): 118-130.
- Zuniga, L. A., W. J. Shen, et al. (2010). "IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity." J Immunol **185**(11): 6947-6959.