doi.org/10.3406/bavf.2025.71132

THÈSE D'UNIVERSITÉ
***
PRIX 2024

POINTS DE CONTRÔLE DES DOMMAGES À L'ADN ET PLOÏDIE HÉPATOCYTAIRE : IMPLICATIONS DANS LA PATHOGÉNIE DE LA STÉATOPATHIE MÉTABOLIQUE ET L'HÉPATOCARCINOGENÈSE.

DNA DAMAGE CHECKPOINTS AND HEPATOCYTE PLOIDY: IMPLICATIONS IN THE PATHOGENESIS OF METABOLIC-ASSOCIATED FATTY LIVER DISEASE AND LIVER CARCINOGENESIS.

Pierre CORDIER[1, 2]

Manuscrit reçu le 1er avril 2025, accepté le 22 avril 2025, révision éditoriale le 23 avril 2025.
Communication présentée le 3 avril 2025 lors de la « Séance annuelle des Lauréats » de l'Académie vétérinaire de France
Le prix de thèse d'Université de l'Académie vétérinaire de France est soutenu par la société pharmaceutique Boehringer Ingelheim

Pour accéder à la thèse : https://theses.fr/2023UNIP5094

Mots-clés : foie, stéatopathie métabolique, carcinome hépatocellulaire, réponse aux dommages à l'ADN, instabilité génomique, polyploïdie hépatique

Keywords: *liver, metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, hepatocellular carcinoma, DNA damage response, genome instability, liver polyploidy*

La stéatopathie métabolique (*Metabolic dysfunction Associated Steatotic Liver Disease*, MASLD) représente un enjeu majeur de santé publique et atteint 25-30 % de prévalence dans les pays occidentaux. Elle regroupe un éventail de lésions hépatiques d'évolution chronique et séquentielle depuis la stéatose simple (*Metabolic dysfunction-Associated Steatotic Liver*, MASL) jusqu'à sa forme avancée inflammatoire et souvent fibrosante, la stéatohépatite non alcoolique (*Metabolic dysfunction Associated SteatoHepatitis*, MASH). De manière alarmante, la MASH représente le facteur de risque de la cirrhose et du carcinome hépatocellulaire (CHC) ayant la plus forte augmentation d'incidence dans le monde, par comparaison aux autres facteurs de risque de ces deux maladies (Younossi *et al.* 2018). La pathogénie de la stéatopathie métabolique commence par une surcharge du foie en triglycérides, à l'origine d'une reprogrammation du métabolisme hépatocytaire par la saturation des sys-

1- Vétérinaire Pathologiste – Praticien Hospitalier Spécialiste (DVM, DESV-AP, PhD), LabOniris, École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Oniris VetAgroBio, site de la Chantrerie, Nantes, France.
2- Équipe Instabilité Génomique, Métabolisme, Immunité et Tumorigenèse Hépatique, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université Paris Cité, Paris, France. E-mail : pierre.cordier@oniris-nantes.fr

Cet article est publié sous licence creative commons CC-BY-NC-ND 4.0

tèmes de stockage et de catabolisme lipidiques (Anstee *et al*. 2019). Avec la chronicité, elle engendre l'émergence de métabolites toxiques qui perturbent le fonctionnement hépatocellulaire, déjà altéré par la réponse inflammatoire et fibrosante du microenvironnement hépatique. Il n'existe pour l'heure aucun traitement bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché pour la stéatopathie métabolique en France. Dans ce contexte, l'équipe « Instabilité Génomique, Métabolisme, Immunité et Tumorigenèse Hépatique » du Centre de Recherche des Cordeliers (Sorbonne Université, Inserm, Université Paris Cité) a précédemment démontré que la prolifération compensatrice des hépatocytes stéatosiques est altérée lors de la MASLD, avec une activation de la réponse aux dommages à l'ADN (*DNA Damage Respons*e, DDR) et du point de contrôle de la transition G2/M (Gentric *et al*. 2015). Face à ce stress génotoxique, l'installation de cycles d'endoréplication (alternance des phases G et S du cycle cellulaire) (Donne *et al*. 2020) conduit à une polyploïdisation (duplication du génome entier) hépatocytaire pathologique, aux conséquences encore incertaines sur la progression de la stéatopathie métabolique, notamment vers le cancer du foie.

STÉATOPATHIE MÉTABOLIQUE ET SIGNALISATION DES LÉSIONS DE L'ADN

De manière à caractériser fonctionnellement les lésions de l'ADN et la réponse cellulaire face à ces lésions au cours de la stéatopathie métabolique, notre laboratoire a développé des modèles murins diététiques de stéatopathie métabolique par l'utilisation de régimes hypercaloriques (modèles *HFHS : High-Fat High-Sucrose* et CD HFD : *Choline-Deficient High-Fat Diet* ; 6 mois de régime). Ces modèles ont conduit à des résultats innovants : la division d'hépatocytes stéatosiques primaires dérivés de ces deux modèles est altérée, avec une diminution de la vitesse des fourches de réplication et une accumulation de lésions à l'ADN (Donne *et al*. 2022). Ce stress de réplication provoque l'activation d'une voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante du point de contrôle intra-S. De façon remarquable, la reprogrammation métabolique, par la dérégulation du pool de nucléotides intracellulaires associée, est à l'origine des altérations de la réplication des hépatocytes (Donne *et al*. 2022). L'expression hépatique d'un corpus de gènes de la DDR a ensuite été évaluée dans une cohorte constituée de 10 patients contrôles (obèses non atteints de MASLD), 51 patients atteints de MASL et 54 patients atteints de MASH avec fibrose avancée de stade F3[1] (données RNA-seq en accès libre et publiées par Govaere *et al*. 2020). Parmi l'ensemble des acteurs et branches de la DDR inclus dans ce corpus initial, l'analyse de l'expression différentielle entre ces trois conditions a révélé une orientation transcriptionnelle de la DDR vers le contrôle de la réplication de l'ADN. En particulier, cette signature de réponse au stress de réplication était présente dès la MASL et se maintenait dans la MASH de stade F3 (signature « pan MASLD »). Au contraire, les gènes de la DDR spécifiquement dérégulés dans la MASH de stade F3 se rapportaient collectivement à la reconnaissance et la réparation des cassures double-brin de l'ADN, notamment via l'axe ATM-p53.

Ces travaux chez l'Homme et l'animal de laboratoire suggèrent qu'une hausse significative de la génotoxicité accompagne la progression de la stéatopathie métabolique, avec activation des points de contrôle des dommages à l'ADN. Ces observations ont donc conduit à explorer le rôle de la signalisation ATM-dépendante dans un modèle murin diététique de MASLD. Pour cela, une approche de mutagenèse hépato-spécifique par technologie CRISPR-Cas9 vectorisée au sein d'un virus adéno associé (AAV8) a été employée pour induire la délétion de la kinase ATM dans les hépatocytes (ATMΔhep). Après 6 mois de régime CD-HFD, les foies mutants présentaient une aggravation d'au moins trois paramètres de la stéatopathie métabolique par rapport aux foies contrôles : une légère hausse de la stéatose hépatique, une accentuation de la souffrance hépatocellulaire et une augmentation de la fibrose hépatique. Par ailleurs, une analyse lipidomique menée sur foie total a indiqué une accumulation de lipides toxiques dans les foies ATMΔhep, suggérant leur participation quant à l'aggravation des paramètres histologiques de la MASLD observée dans ce groupe. Une augmentation importante de la concentration en diglycérides et en acides gras saturés, espèces lipotoxiques par excellence, a notamment été relevée. L'analyse du métabolome hépatique a révélé une reprogrammation métabolique majeure chez les souris ATMΔhep. Par rapport aux foies contrôles, les métabolites différentiellement enrichis appartenaient principalement au métabolisme central du glucose, aux voies de biosynthèse des bases nucléotides puriques et pyrimidiques et au transfert des acides gras vers la mitochondrie (acylcarnitine). De manière frappante, l'examen concomitant du transcriptome par approche RNA-seq a révélé une suractivation mitochondriale, avec un enrichissement pour de nombreuses catégories fonctionnelles de gènes en lien avec la phosphorylation oxydative et la respiration dans les foies ATMΔhep.

Le phénotype de reprogrammation métabolique des hépatocytes ATMΔhep a été approfondi par culture primaire. Dans un premier temps, l'analyse des isotopologues[2] du glucose uniformément marqué [U 13C6] – D glucose a corroboré la dérégulation du métabolisme central du glucose dans les hépatocytes primaires ATMΔhep par rapport aux hépatocytes contrôles : glycolyse, métabolisme du pyruvate et cycle de Krebs étaient les principales voies métaboliques altérées. Pour cette dernière voie en particulier, une augmentation marquée de la fraction isotopologue de plusieurs métabolites intermédiaires a été observée, parmi lesquels le citrate, l'α-cétoglutarate, le malate et, dans une moindre mesure, le succinate. Ces données suggèrent une accélération du flux métabolique au sein du cycle de Krebs et/ou une dérivation du flux glucidique principalement vers celui-ci, aux dépens

1- Le stade de chronicité de la MASH est évalué au moyen d'un score histologique allant de F0 à F4, qui mesure l'extension de la fibrose hépatique : F0 et F1 indiquent l'absence de fibrose ou une fibrose légère ; F2 et F3 indiquent une fibrose modérée ou avancée ; F4 indique une cirrhose.
2- Ensemble des espèces chimiques de structure atomique identique et ne différant les unes des autres que par la présence d'un ou plusieurs isotopes.

Cet article est publié sous licence creative commons CC-BY-NC-ND 4.0

d'autres voies métaboliques, comme la voie des pentoses phosphates. Ensuite, nous identifions la mitochondrie comme étant un organite clé dans la pathogénie des dérégulations métaboliques induites par la délétion d'ATM, mais sans altération de la masse (dosage de l'ADN mitochondrial) et de la quantité (microscopie électronique) mitochondriales. L'analyse simultanée de la respiration mitochondriale (approche technologique *SeaHorse*) a démontré une consommation accrue d'oxygène à l'état basal et à l'état maximal avec une fuite augmentée de protons, une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et un épuisement du glutathion réduit intracellulaire. Finalement, la diminution marquée de la charge hépatocellulaire en adénylate, reflet de l'état énergétique de la cellule, indique un découplage mitochondrial lors de la perte d'ATM.

Pris dans leur ensemble, ces travaux apportent un éclairage nouveau sur le lien bidirectionnel entre perte de l'homéostasie métabolique et atteinte à l'intégrité du génome hépatocytaire dans la stéatopathie métabolique.

HYPERPLOÏDISATION HÉPATOCYTAIRE ET HÉPATOCARCINOGENÈSE

L'implication des phénomènes d'hyperploïdisation hépatocytaire lors de l'hépatocarcinogenèse a été étudiée dans une cohorte de 111 patients avec un diagnostic de carcinome hépatocellulaire (CHC), pour lesquels les données pathologiques, mutationnelles (génomiques) et transcriptomiques étaient disponibles (collaborations Pr Julien Calderaro [Hôpital Henri Mondor, Créteil] et Pr Jessica Zucman-Rossi [Centre de Recherche des Cordeliers, Paris]). Une nouvelle approche de pathologie digitale à haut débit à partir de coupes histologiques entières a été développée pour déterminer le profil de ploïdie nucléaire des tumeurs et reconstituer spatialement la cartographie des contingents hyperploïdes. Nous apportons ici un faisceau d'arguments qui étaye le rôle pro-tumoral de l'hyperploïdisation hépatocytaire lorsqu'elle survient au sein des CHC. En effet, les CHC hyperploïdes analysés étaient généralement de plus haut grade (plus faible degré de différenciation tumorale) et présentaient plus fréquemment une mutation du gène *TP53* par rapport aux CHC diploïdes. La comparaison transcriptomique, par RNA-seq, des CHC hyperploïdes par rapport aux CHC diploïdes a révélé une signature pronostique défavorable pour ce premier groupe et leur appartenance à la classe « prolifération » des CHC. En outre, le programme d'expression génique des CHC hyperploïdes montrait un enrichissement positif pour des catégories fonctionnelles de gènes se rapportant aux propriétés des cellules souches.

La reconstruction spatiale des contingents hyperploïdes, permise par notre approche de pathologie digitale, a révélé la présence d'une troisième catégorie de CHC. Celle-ci était caractérisée par un fort niveau d'hétérogénéité intra-tumorale et la présence de foyers hyperploïdes survenant au sein d'un fond tumoral diploïde. Une analyse 3'mRNA-seq de ces foyers, après macro-dissection sur blocs de paraffine, a montré d'une part une certaine similarité transcriptionnelle avec les CHC entièrement hyperploïdes et d'autre part une signature d'instabilité génomique. En effet, plusieurs catégories fonctionnelles de gènes positivement et significativement enrichies au sein des clones hyperploïdes se rapportaient à l'activation d'une DDR orientée vers la réponse aux dommages à l'ADN générés par la réplication (point de contrôle G2/M, recombinaison homologue et synthèse translésionnelle). Finalement, la technologie de transcriptomique spatiale Visium (10X Genomics, Lewis *et al.* 2021) a permis d'établir un lignage entre hépatocytes diploïdes et hyperploïdes au sein des CHC hétérogènes. L'analyse spatiale de la variation du nombre de copies (*Copy-Number Variation*, CNV) a révélé une évolution clonale des foyers hyperploïdes à partir de précurseurs diploïdes ayant subi un évènement de duplication du génome.

Ces travaux étayent l'hypothèse de l'existence d'une relation encore ambiguë entre état non diploïde et cancer du foie chez l'Homme. Ils indiquent que l'hyperploïdisation caractérise une classe de CHC agressifs et participe à l'hétérogénéité et à la progression tumorale.

CONFLITS D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts lié à ce travail.

COMITÉ D'ÉTHIQUE

L'auteur déclare que l'utilisation de l'animal de laboratoire et de matériels biologiques humains à des fins de recherche a fait l'objet d'une autorisation par les instances réglementaires compétentes.

RÉFÉRENCES

• Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019; 16(7): 411-28. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7.

• Donne R, Saroul-Aïnama M, Cordier P, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020; 17(7): 391-405. https://doi.org/10.1038/s41575-020-0284-x.

Cet article est publié sous licence creative commons CC-BY-NC-ND 4.0

• Donne R, Saroul-Ainama M, Cordier P, Hammoutene A, Kabore C, Stadler M *et al*. Replication stress triggered by nucleotide pool imbalance drives DNA damage and cGAS-STING pathway activation in NAFLD. Dev Cell. 2022 25; 57(14): 1728-41.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.06.003.
• Gentric G, Maillet V, Paradis V, Couton D, L'Hermitte A, Panasyuk G *et al*. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2015; 125(3): 981-92. https://doi.org/10.1172/JCI73957.
• Govaere O, Cockell S, Tiniakos D, Queen R, Younes R, Vacca M *et al*. Transcriptomic profiling across the nonalcoholic fatty liver disease spectrum reveals gene signatures for steatohepatitis and fibrosis. Sci Transl Med. 2020;12(572):eaba 4448. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aba4448.
• Lewis SM, Asselin-Labat ML, Nguyen Q, Berthelet J, Tan X, Wimmer VC *et al*. Spatial omics and multiplexed imaging to explore cancer biology. Nat Methods. 2021; 18(9): 997-1012. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01203-6.
• Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M *et al*. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018; 15(1): 11-20. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109.

Cet article est publié sous licence creative commons CC-BY-NC-ND 4.0