



HAL
open science

Mise en place et étude de modèles de progression de la NASH jusqu'au développement du CHC : effet du régime hyperlipidique sur l'environnement hépatique

Mélanie Simoes Eugenio

► To cite this version:

Mélanie Simoes Eugenio. Mise en place et étude de modèles de progression de la NASH jusqu'au développement du CHC : effet du régime hyperlipidique sur l'environnement hépatique. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B072 . tel-03510301

HAL Id: tel-03510301

<https://theses.hal.science/tel-03510301>

Submitted on 4 Jan 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par

Mélanie SIMOES EUGENIO

**Mise en place et étude de modèles de progression de la NASH
jusqu'au développement du CHC :
effet du régime hyperlipidique sur l'environnement hépatique**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 19/12/2019

Unité de recherche : UMR-U1085 INSERM – Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail

Rapporteurs avant soutenance :

Ingrid Marcq CR, Université de Picardie Jules Verne
Béatrice Bailly-Maître CR, Université Nice Sophia-Antipolis

Composition du Jury :

Président :	Marie-Dominique Galibert	PU-PH, Université de Rennes 1
Examineurs :	Marie-Dominique Galibert	
	Sandrine Ruchaud	CR, Sorbonne Université
	Alicia Torriglia	DR, Université Paris Descartes
	Bernard Fromenty	DR, Université de Rennes 1
Dir. de thèse :	Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel	DR, Université de Rennes 1
Co-dir. de thèse :	Jacques Le Seyec	CR, Université de Rennes 1

Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais remercier chacun des membres de mon jury de thèse. Merci à vous d'avoir accepté de juger mon travail et pour le temps que vous y consacrerez.

Je remercie Michel de m'avoir accueillie à l'IRSET et dans son équipe. Merci pour ton soutien, tes idées et toutes nos réunions scientifiques à débattre « souris » notamment.

Merci Marie-Thérèse de m'avoir choisie (avec l'aide de Jacques) pour cette thèse. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Merci pour ton encadrement durant ces trois années de thèse, merci de m'avoir aidée quand j'en avais le besoin, soutenue également, et de m'avoir laissée le choix et la possibilité de tester mes hypothèses.

Je ne pourrais pas remercier Marie-Thérèse sans remercier Jacques, mon fidèle co-directeur. Merci pour tout. Pour ton soutien indéfectible durant ces trois années, ta disponibilité, tes connaissances, tout autant scientifiques que techniques ainsi que ton aide précieuse durant les manips ! Merci également pour tous les gâteaux que tu as pu nous ramener, les discussions plus personnelles et aussi pour les super cookies aux pépites de chocolat (ou était-ce l'inverse ? Des pépites de chocolat au cookie ? ;)).

Merci à tous les collaborateurs de l'IRSET (et d'ailleurs) pour votre accueil et votre sympathie. Merci Isa pour tout ce que tu as fait quand je suis arrivée ici. Merci de m'avoir aidée à prendre mes marques dans ce nouvel environnement. Merci Domi, ma voisine de « bloc », pour tous les sauvetages *in extremis* de blots, pour tes conseils lorsque je rencontrais un problème technique, pour nos discussions autour de la radio... Merci à Valérie également pour tous tes conseils de cyto, et nos échanges ! Un grand merci à Gévorg, Roseline et Pascale pour votre sympathie et tout votre travail sur les coupes histologiques de foie de souris. Et un grand merci aux animaliers. Merci Valentine, Alice, Alexis, Aurélie ... Merci d'avoir eu un œil sur mes petits bébés, mes petites souris diabétiques et d'avoir tout fait pour que cette étude se déroule au mieux. Merci pour votre gentillesse, votre spontanéité et votre accessibilité. Je pense qu'on ne vous remercie pas suffisamment pour tout le travail que vous faites avec nos souris. Merci d'être là ! Merci également à l'équipe SPARTE de l'IGDR. Rebecca, Audrey, merci pour votre sympathie, votre gentillesse à toutes les deux, votre humour également. Ne changez-pas ! Si un jour je comprends la génétique, ce sera grâce à vous ! Merci aux doctorantes de l'IRSET, les deux Marie, Fidaa, Nessrine, Nettie, etc. Toutes dans le même bateau, toutes dans la même direction à courte ou moyenne échéances ! Je vous souhaite tout plein de courage pour la suite, pour vos thèse respectives, pour vos soutenances (et la semaine qui s'annonce particulièrement chargée en pots de thèse :p).

Un grand merci également à Corinne, Tatiana, Vincent et Thomas. Vous m'avez fait découvrir l'enseignement et j'ai vraiment apprécié d'être avec vous durant cette année d'enseignements.

Je souhaiterais remercier également les membres de l'équipe 2 de l'IRSET. Merci Nico, Laurence, la team « HLAG » pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Merci aussi Nico pour toutes les découvertes culinaires dont j'ai pu apprécier la finesse depuis 3 ans ! Merci également à d'autres membres plus discrets de cette équipe, mais tout aussi important pour votre sympathie : Jérémy, Pauline, Huma et Christelle ;) Une petite pensée pour Aurélien : ça manque parfois d'humour dans ce laboratoire, tout est plus calme sans toi :p

Merci également à Perrine, pour ta gentillesse, les bêtises de ton gros toutou, et évidemment pour tout ce que tu as fait pour la lignée HT29 TRIM21-KO !

Merci Sarah pour ton aide inestimable, notamment sur la cytométrie. Merci d'avoir pris le temps de m'apprendre les analyses (et de trouver/corriger mes erreurs), de m'avoir aidée jusque parfois tard le soir, d'avoir galéré avec moi quand le cytomètre n'était pas de bonne humeur (il faut admettre qu'à ce moment-là, j'étais plus un soutien moral pour toi qu'une solution...).

Un grand merci à Claire également. Merci de m'avoir fait découvrir l'expérimentation animale, de m'avoir appris énormément de choses dans ce domaine que j'ai découvert en arrivant ici. Merci d'être restées à mes côtés durant les soirées cytométrie, d'être venue trop tôt le matin sur les sacrifices et d'avoir réussi à te libérer de tes obligations pour mes projets... Merci pour ta bonne humeur, tes conseils, tes idées scientifiques... Merci pour tout ! Un grand merci également à Farooq pour son aide durant les expérimentations de souris et d'avoir pris le temps de m'expliquer tous les fonctionnements...

Merci aux filles du bureau, Ghania, Annaïg et Christelle. Merci pour votre bonne humeur, votre humeur moins bonne aussi, les railleries, les fous-rires, et les discussions en tout genre. Parfois scientifiques, souvent anodines. De véritables bols d'air quand vous écrivez une thèse. Ghania, j'espère sincèrement que tu t'en sortiras avec les souris TRIM21 qui choisissent d'être diabétiques une semaine sur deux ! Bon courage pour ta thèse, et ne lâche rien ;) Il y a toujours une solution à un problème, paraît-il, il suffit simplement de la trouver ! Pas facile, j'avoue ! Annaïg, je te souhaite le meilleur pour la suite, autant au labo que plus personnellement ;) Et j'espère que les MLKL finiront par te donner quelque chose à te mettre sous la dent ... Parce que pour l'instant, avec Jacques, vous êtes deux affamés sans réponses ;)

Christelle, merci à toi également. Merci pour les multiples repas, tard, moins tard, prévus, imprévus... Les promenades le week-end, les samedis (ou dimanches) à la mer... Et puis les soirées cytométrie, les dimanches matin animaleries... Le bon et le moins bon. Tu es une personne extra, gentille et honnête. Garde la tête haute, reste ouverte aux autres et bon courage pour la suite de ta thèse ! Sache en tout cas que ma maison est ouverte quand tu veux (Et je suis toujours partante pour un DoMac ! ;))

Un grand merci également à Ingrid et Greg'. Vous étiez les premiers à me faire découvrir le monde de la recherche, ceux qui m'ont appris toutes les bases et qui m'ont donné envie de poursuivre cette route. Sans vous, je ne serai pas là aujourd'hui, je vous remercie infiniment de m'avoir montrée cette voie...

Je souhaiterais également remercier mes proches et mes amis. Merci Ambre et Lucie pour votre présence quotidienne et votre soutien. Merci Pierre également d'être là. Même si on ne se parle pas très souvent, à chaque fois, c'est toujours avec le même plaisir ! Je ne suis pas toujours agréable à vivre, je le reconnais, mais je mesure la chance que j'ai de vous avoir à mes côtés ! Merci !

Je me dois également de remercier Morgane, alias Nanou. Pfiou, que dire de plus ? Il y aurait probablement toute une thèse à écrire pour te remercier... Mais pour résumer : tu es l'amie dont on puisse rêver, toujours présente, que ce soit pour rire, se plaindre ou pleurer, cette amie indéfectible qui te soutient en permanence (Et qui se propose même de relire des trucs dont elle ne comprend pas le moindre mot !). Merci d'avoir été là, d'être là au quotidien dans ma vie. ET désolée. Désolée si j'ai été désagréable à certains moments, désolée de ne pas avoir été toujours présente ou présente, mais avec l'esprit ailleurs. Merci également à ta maman, Valérie, et à ton frère Timothé, de m'accueillir à chaque fois chez vous avec le sourire et la bonne humeur. Ces passages chez vous, c'est une respiration qui fait le plus grand bien. Vous êtes ma seconde famille, merci à vous !

Et quand on parle de famille, il faut forcément que je laisse un mot sur ma famille. Merci, vraiment. Les oncles, les tantes, les cousins, les cousines et mon parrain. Merci pour votre soutien, merci d'être là !

Merci également à mes frères et sœurs. Antho, Deb, Alex et Mathieu. Certaines personnes rêvent d'une famille parfaite, et unie. J'ai la chance d'avoir cette famille. Merci pour vos blagues (surtout les tiennes Alex, certaines font encore rire le labo !), votre présence, votre bonne humeur, et les discussions parfois étranges que nous avons !

Un grand merci à mes parents. Maman, papa, merci pour tout. Je sais que ça n'a pas toujours été facile pour vous. Merci de m'avoir permise d'être là aujourd'hui, à ma place, et bien dans ma peau. Merci pour votre soutien, même si pour vous, ma thèse reste un sujet flou. Des souris diabétiques et le cancer du foie ;) Merci également pour les visites surprises sur Rennes, les noëls express de 24h parce que les souris n'attendent pas. On ne se le dit pas souvent, parce que c'est supposé être sous-entendu, mais je vous aime. Il me tarde de passer un premier « véritable » Noël depuis plusieurs années à vos côtés.

Et enfin, je laisserais un dernier mot pour ma petite Swilly. Tu n'as probablement pas conscience de tout ce que tu apportes à ma vie. Ma maison serait probablement bien moins chaleureuse sans ta présence, tes airs innocents, intrépides et ton petit air aimable que tout le monde connaît. Mais rentrer chez moi, parfois tard le soir, c'était savoir que j'allais te retrouver, et laisser tout le reste à la porte jusqu'au lendemain...

La thèse est personnelle paraît-il, mais tellement de personnes participent à cette aventure. Au final, aurais-je réussi sans vous ?

« Il y a deux réponses à cette question... Comme à toutes les questions. Celle du savant et celle du poète... Laquelle souhaites-tu entendre ? »

- Pierre Bottero, Le pacte des Marchombres

LISTE DES ABBREVIATIONS

AG : Acides Gras

AIH : AutoImmune Hepatitis

ALT : Alanine aminotransférase

ANA : AntiNuclear Antibody

APAF-1 : Apoptotique Protease-Activating Factor1

APAP : Acétaminophène

AST : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

BCLC : Barcelona-Clinic Liver Cancer

CCI : Cholangiocarcinome Intra hépatique

CCL4 : Tétrachlorométhane

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

cIAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

CK-18 : Cytokératine-18

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns

DC : Dendritic Cell

DD : Death Domain

DEN : Diethylnitrosamine

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HFD : High-Fat Diet

HFHCD : High-Fat High Cholesterol Diet

HFHSD : High-Fat High Sugar Diet

HFL : High Density Lipoprotein cholesterol

HMGB1 : High-Mobility Group Box 1

HSC : Hepatic Stellate Cells

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

IGF : Insuline Growth Factor

KC : Kupffer Cell

LDL : Low-Density Lipoprotein cholesterol

LKM-1 : Liver-Kidney Microsomes-1

LPS : Lipopolysaccharides

LSEC : Liver Sinusoidal Endothelial Cells

LSECTin : Liver and lymph node Sinusoidal Endothelial Cell C-type lectin

L-SIGN : Liver/lymph node-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin

LUBAC : Linear UBiquitin Assembly Complex

MAPK/ERK : Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular signal-Regulated Kinase

MCD : Methionine and Choline Deficient

MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells

MEC : Matrice Extracellulaire

MLKL : Mixed Lineage Kinase domain Like pseudo-kinase

MMP : Métalloprotéinases

MPO : Myéloperoxydase

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NAFL : Non-Alcoholic Fatty Liver

NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Stéatohépatite Non-Alcoolique

NEMO : NF-kB Essential Modulator

NDMA : N-Nitrosodiméthylamine

NOX-1 : NADPH Oxidase 1

OPG : Ostéoprotégérine

OPN : Ostéopontine

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase

PD-1 : Programme Death 1

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

PI3K/AkT : Phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B/AkT

PRR : Pattern Recognition Receptor

RAGE : Receptor for Advanced Glycation End products

RHIM : RIP Homotypic Interaction Motif

RIPK1/3 : Receptor-Interacting Protein Kinase 1/3

ROS : Espèce réactive à l'oxygène

SCID : Déficit immunitaire combiné sévère

SMA : Smooth Muscle Antibody

SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases

STZ : Streptozotocine

TAB : TGF-Beta-Activated kinase

TACE : Chimioembolisation transartérielle

TAK1 : Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1

TAM : Tumor-Associated Macrophages

TAN : Tumor-Associated Neutrophils

TARE : Radioembolisation transartérielle

TLR : Toll-Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRADD : TNFR1-associated death domain protein

TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

VCAM : Vascular Cell Adhesion Protein

WD : Western Diet

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	2
I.1 Le foie	5
I.1.1 Anatomie et fonctions hépatiques.....	5
I.1.2 Les cellules hépatiques	7
I.1.3 Les hépatites	12
I.2 Physiologie cellulaire	17
I.2.1 Types de mort cellulaire	17
I.2.2 L'apoptose	19
I.2.3 L'autophagie	27
I.2.4 La nécrose cellulaire	28
I.2.5 La protéine RIPK1	34
I.3 Le carcinome hépatocellulaire (CHC).....	38
I.3.1 Généralités sur le CHC	39
I.3.2 Facteurs de risque du CHC	39
I.3.3 Le développement du CHC	40
I.3.4 Modifications immunitaires durant le développement du CHC.....	43
I.3.5 Traitements du CHC	48
I.4 Modèles murins d'étude du carcinome hépatocellulaire.....	50
I.4.1 Généralités	52
I.4.2 Modèles de souris génétiquement modifiés.....	52
I.4.3 Modèles de xénogreffes	53
I.4.4 Modèles d'induction par des agents chimiotoxiques.....	54
I.4.5 Modèles en lien avec des régimes alimentaires.....	56
I.4.6 Le modèle NASH-HCC.....	58
II. CONTEXTE ET OBJECTIFS	61
III. RESULTATS	64
IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	176
V. CONCLUSION	196
VI. Résumé	197
VII. Abstract	198
VIII. Références	199

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : A. Organisation du lobule hépatique. B. schéma de l'organisation histologique du lobule hépatique.	4
Schéma 2 : Représentation schématique des différents lobes hépatiques et du système sanguin environnant.....	4
Schéma 3 : Représentation des types cellulaires présents dans le tissu hépatique	6
Schéma 4 : Voie de signalisation simplifiée de l'apoptose intrinsèque	18
Schéma 5 : Voie de signalisation induisant la survie cellulaire ou la mort cellulaire par apoptose après fixation du TNF- α sur son récepteur	20
Schéma 6 : Voie de signalisation induisant l'apoptose ou la survie cellulaire après fixation de TRAIL sur son récepteur activateur	22
Schéma 7 : Processus moléculaire de l'autophagie	26
Schéma 8 : Voie de signalisation de la nécroptose.....	29
Schéma 9 : Domaines et modifications post-traductionnelles de la protéine RIPK1	35
Schéma 10 : Stades de développement du carcinome hépatocellulaire (CHC)	38
Schéma 11 : Impacts des syndromes métaboliques sur l'avancée de la maladie hépatique	41
Schéma 12 : Implication des cellules immunitaires dans la progression de la maladie hépatique	44
Schéma 13 : Stratégies d'évasion des cellules cancéreuses.....	46
Schéma 14 : Principaux modèles murins expérimentaux de carcinome hépatocellulaire.....	51
Schéma 15 : Modèle murin de NASH-HCC réalisé par Fujii et al.....	57
Schéma 16 : Domaines de la E3-ligase TRIM21	177
Schéma 17 : Ubiquitination de RIPK1 durant la nécroptose induite par le ligand TRAIL.....	179
Schéma 18 : Représentation des voies de signalisations impactées par la présence de fructose et contribuant à l'apparition du CHC.....	183
Schéma 19 : Expression de PD-L1 dans le tissu hépatique d'une souris diabétique nourrie pendant 16 semaines avec le régime HFHCD.....	187
Schéma 20 : Marqueurs de mort cellulaire dans le modèle NASH-HCC.....	189
Schéma 21 : Effet du fond génétique sur l'induction du diabète.....	193

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau regroupant les principales caractéristiques des virus des hépatites virales.....	13
Tableau 2 : Tableau regroupant les diverses études de la nécroptose dans les maladies hépatiques (partie 1/2).	31
Tableau 2 : Tableau regroupant les diverses études de la nécroptose dans les maladies hépatiques (partie 2/2).	33

INTRODUCTION

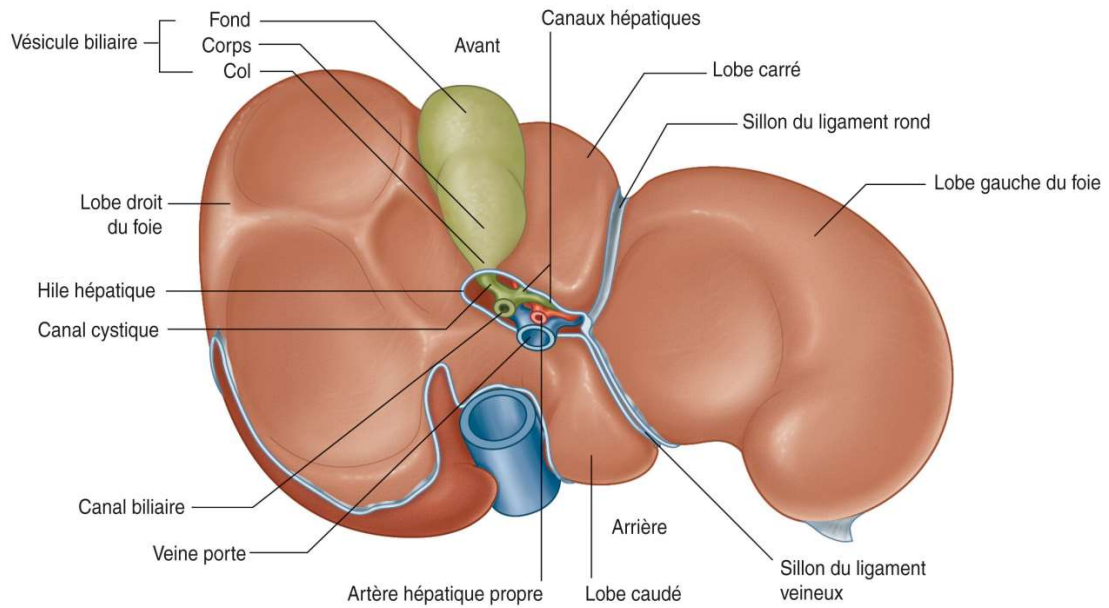


Schéma 1 : Représentation schématique des différents lobes hépatiques et du système sanguin environnant. Face viscérale
 (Source : Les fondamentaux de la pathologie digestive, © CDU-HGE/Editions Elsevier-Masson, 2014).

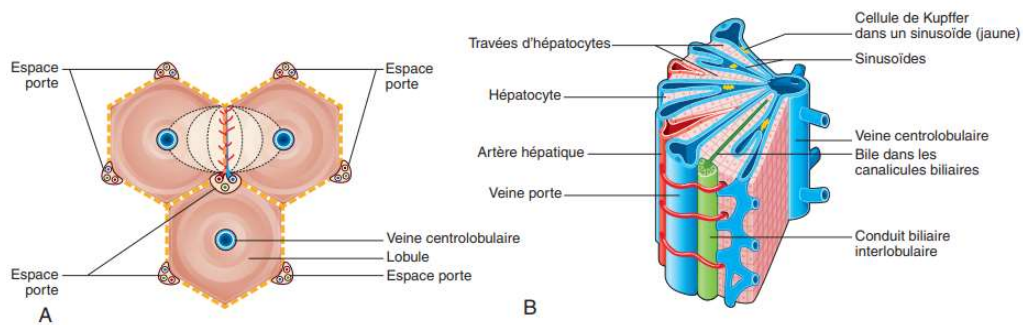


Schéma 2 : A. Organisation du lobule hépatique. B. schéma de l'organisation histologique du lobule hépatique.
 (Source : Les fondamentaux de la pathologie digestive, © CDU-HGE/Editions Elsevier-Masson, 2014).

I. Introduction

I.1 Le foie

I.1.1 Anatomie et fonctions hépatiques

a) Anatomie hépatique

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain et représente 2% de sa masse totale. Situé sous le diaphragme, dans la cavité abdominale, il fait partie du système digestif. Il est directement connecté à l'estomac, aux intestins, à la rate ainsi qu'au pancréas.

Cet organe est divisé en 4 lobes : les lobes gauche et droit, et situés entre les deux, les lobes carré et caudé. Chaque lobe peut être sous-divisé en 8 segments. Les lobes carré et caudé sont séparés par un sillon nommé le hile du foie. Ce sillon permet le passage de l'artère hépatique, de la veine porte ainsi que le passage des canaux biliaires majeurs (Schéma 1).

Le foie est l'un des organes les plus vascularisés du corps humain et contient plus de 10% du volume sanguin total. Il est alimenté par deux pédicules vasculaires : un pédicule inférieur afférent, également appelé pédicule hépatique et un pédicule supérieur efférent.

Le pédicule hépatique est particulier par sa double vascularisation, d'une part par l'artère hépatique (qui se divise ensuite en artères hépatiques droite et gauche) et d'autre part par la veine porte. Les artères hépatiques apportent du sang oxygéné, nécessaire au bon fonctionnement de l'organe tandis que la veine porte apporte du sang appauvri en oxygène mais riches en nutriments et toxines provenant du tube digestif, de la rate ainsi que du pancréas. La veine porte assure également la vascularisation des voies biliaires. Le pédicule supérieur efférent veineux est composé de trois veines hépatiques principales : la veine gauche, la veine droite et la veine moyenne, toutes trois reliées à la veine cave inférieure (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

Le parenchyme hépatique est organisé en lobules hépatiques, chaque lobule étant composé d'une veine centrolobulaire, d'hépatocytes organisés en travées séparées par des sinusoides. Ces sinusoides sont bordées de cellules endothéliales et contiennent notamment les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie). Entre les cellules endothéliales et les hépatocytes se trouve l'espace de Disse qui contient les cellules étoilées du foie (Schéma 2).

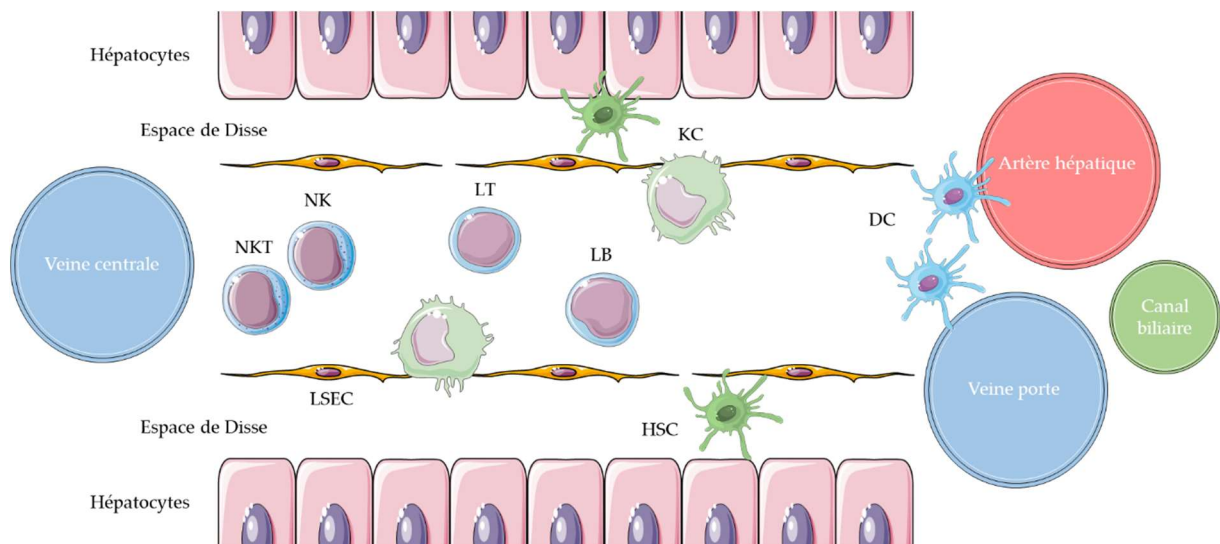


Schéma 3 : Représentation des types cellulaires présents dans le tissu hépatique (Réalisé à partir de Racanelli et al., 2006).

DC : Dendritic Cell ; HSC : Hepatic Stellate Cell ; KC : Kupffer Cell ; LB : Lymphocyte B ; LSEC : Liver Sinusoidal Endothelial Cell ; LT : Lymphocyte T ; NK : Natural Killer cell ; NKT : Natural Killer T cell

b) Fonctions hépatiques

Le foie assure de nombreuses fonctions essentielles à l'organisme. Il joue un rôle dans :

- Le métabolisme des graisses : le foie réalise l'oxydation des triglycérides permettant la production d'énergie et permet la synthèse de lipoprotéines plasmatiques. Il effectue également la synthèse du cholestérol et des phospholipides ;
- Le métabolisme des hydrates de carbone : le foie convertit les hydrates de carbone et les protéines en acides gras et en triglycérides. Il régule aussi la glycémie par les processus de glycogénèse, de glycogénolyse et néoglucogénèse ;
- Le métabolisme protéique : il synthétise de nombreuses protéines plasmatiques, comme par exemple l'albumine ou les facteurs de coagulation ainsi que les acides aminés non essentiels.

Le foie assure la détoxification de l'organisme vis-à-vis de toxines, de médicaments et également de l'alcool. Il peut également participer au stockage du glycogène, du fer ou des vitamines. Enfin, le foie est considéré comme l'un des seuls organes à être pourvu des fonctions de glandes exocrines mais également endocrines. En effet, il permet la sécrétion de la bile vers les intestins, et assure la production de certains facteurs de croissance comme l'IGF (Insuline Growth Factor) ce qui lui donne la fonction de glande exocrine. Il permet également la filtration du sang depuis le système digestif vers la circulation sanguine, ce qui lui procure la fonction de glande endocrine.

I.1.2 Les cellules hépatiques

Le foie est composé de deux types cellulaires majeurs : les cellules parenchymateuses, qui représentent 80% du volume hépatique et les cellules non parenchymateuses. Les cellules parenchymateuses sont composées majoritairement d'hépatocytes, qui assurent la majorité des fonctions hépatiques, et de cholangiocytes. Les cellules non parenchymateuses sont composées de diverses populations cellulaires incluant les cellules sinusoïdales endothéliales, les cellules étoilées hépatiques, les cellules de Kupffer et les lymphocytes intra-hépatiques (Kmieć, 2001) (Schéma 3).

a) Les cellules sinusoïdales endothéliales

Les cellules sinusoïdales endothéliales (Liver Sinusoidal Endothelial Cells, [LSEC]) bordent le compartiment sinusoïdal et séparent les leucocytes situés dans la lumière sinusoïdale des hépatocytes.

Elles permettent l'adhésion des cellules immunitaires résidentes au sein du tissu hépatique comme les cellules de Kupffer. Elles possèdent des capacités d'endocytoses de glycoprotéines, de composants de la matrice extracellulaire (comme le collagène ou la fibronectine), de complexes immuns et peut ainsi permettre le passage de molécules non diffusives de la lumière sinusoïdale vers les hépatocytes.

Les LSEC sont des régulateurs clés de la réponse immunitaire hépatique en raison de leur emplacement stratégique dans les sinusoides mais également de leurs possibilités d'interactions avec les lymphocytes et les autres populations immunitaires résidentes. Ces cellules possèdent notamment de nombreux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor, [PRR]), principalement les récepteurs de types Toll (Toll-Like Receptor, [TLR]) qui les rendent particulièrement sensibles et réactives lors d'agressions hépatiques. De plus, elles ont la capacité de réguler l'activité des lymphocytes T. En effet, les LSEC possèdent des récepteurs L-SIGN (Liver/lymph node-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin) et LSECtin (Liver and lymph node Sinusoidal Endothelial Cell C-type lectin) qui reconnaissent le marqueur CD44 exprimés par les LT activés. La liaison du CD44 aux récepteurs exprimés par les LSEC engendre l'inactivation des LT et leur mort. De plus, les LSEC sont également des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) qui peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T-CD8⁺ et activer ces derniers (Knolle and Wohlleber, 2016).

b) Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer (Kupffer Cell, [KC]), communément considérées comme les macrophages résidents du foie, représentent 20% des cellules non parenchymateuses hépatiques. Elles jouent un rôle dans l'élimination des toxines, des cellules mortes ou encore la dégradation des complexes immuns résiduels.

Les KC ont la particularité de pouvoir exprimer simultanément des marqueurs de macrophages de type M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire) selon l'environnement cytokinique. Elles expriment de nombreux PRR leurs permettant de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes et aux dommages cellulaires (Pathogen-Associated Molecular Patterns, [PAMPs] et Damage-Associated Molecular Patterns, [DAMPs]). Une fois activées, les KC relarguent diverses cytokines pro-inflammatoires (IL-6, [Interleukine-6] ; le TNF- α , [Tumor Necrosis Factor- α] ; l'IL-1 β ; ICAM-1, [InterCellular Adhesion Molecule-1] ; VCAM-1, [Vascular Cell Adhesion Protein], etc.).

De plus, elles peuvent, en cas de stimulation, jouer sur la réponse immunitaire en sécrétant de l'IL-10, une cytokine connue pour ses effets inhibiteurs sur les lymphocytes T et activateurs sur les lymphocytes T régulateurs (Tacke and Zimmermann, 2014). Elles peuvent également sécréter d'autres cytokines, telles que l'IL-1 β , l'IL-12 et l'IL-17 et permettre la régulation de la différenciation des Natural Killer (NK) en favorisant leur action cytotoxique. En cas de lésions hépatiques, les KC interagissent avec les cellules étoilées hépatiques afin de recruter des monocytes, indispensables à la régénération du tissu hépatique (Ma et al., 2017).

c) Les cellules dendritiques

Les Cellules Dendritiques (Dendritic Cell, [DC]), peu nombreuses dans le tissu hépatique, sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus spécialisées. Les DC sont généralement retrouvées dans les régions portales et parfois dans le parenchyme hépatique. Elles possèdent la capacité de capturer les antigènes rencontrés afin de les présenter aux lymphocytes dans les tissus lymphoïdes. Ces cellules sont subdivisées en deux sous-populations : les DC classiques (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les cDC expriment fortement le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et fonctionnent comme des CPA hautement efficaces. Au contraire, les pDC expriment plus faiblement les MHC-II et sont plutôt sécréteurs d'IFN après une infection virale (Lau and Thomson, 2003).

Les cellules dendritiques résistent aux effets immunosuppresseurs de l'IL-10 et peuvent sécréter de l'IL-12 afin de renforcer l'immunité innée. Une fois activées par les cellules dendritiques, les lymphocytes T naïfs deviennent des cellules effectrices cytotoxiques matures de type Th1 ou Th2 (Doherty and O'Farrelly, 2001).

d) Les cellules étoilées hépatiques

Les cellules étoilées hépatiques (Hepatic Stellate Cells, [HSC]) sont des cellules mésenchymateuses, spécifiques du foie, situées dans l'espace de Disse, entre les cellules sinusoidales endothéliales et les cellules épithéliales hépatiques.

Ces cellules jouent un rôle important dans la régénération hépatique et la fibrogenèse. En effet, en cas de lésions hépatiques, les hépatocytes mourants ou les cellules immunitaires présentes à proximité des lésions hépatiques vont activer les cellules étoilées hépatiques et induire leur différenciation en cellules myofibroblastiques. Cette différenciation va conduire à la production de matrice extracellulaire afin de préserver le tissu de dommages supplémentaires.

Elles peuvent également amplifier la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , CCL-2, CCL-21) et jouer un rôle dans l'immunorégulation hépatique en induisant l'infiltration de leucocytes dans le tissu hépatique. Les cellules étoilées expriment également les récepteurs TLRs et sont des cellules présentatrices d'antigènes. Elles peuvent ainsi stimuler la prolifération lymphocytaire ou induire leur apoptose.

Au sein du tissu hépatique, les cellules étoilées jouent un rôle dans le stockage et le transport des rétinoïdes, dérivés de la vitamine A. Entre 50 à 80% des rétinoïdes totaux présents dans le corps humain sont stockés dans le tissu hépatique, parmi lesquels, 80 à 90% sont conservés dans les cellules étoilées. La composition des rétinoïdes peut varier selon l'alimentation et être enrichie en triglycérides, phospholipides, cholestérol ou encore acides gras libres (Friedman, 2008).

e) *Les lymphocytes intra-hépatiques*

Chez l'homme, plus de 65% des lymphocytes hépatiques sont représentés par les cellules NK, les NKT et les cellules T non conventionnelle ($\gamma\delta$). Ces cellules peuvent être activées, proliférer dans des conditions pathologiques et sont les effecteurs majeurs de la surveillance immunitaire hépatique.

Le tissu hépatique est un tissu enrichi en cellules NK, qui constituent la population lymphocytaire majoritaire. Ces cellules, naturellement activées dans le foie, jouent un rôle majeur dans les réponses anti-tumorales : la sécrétion de ligands de mort cellulaire tels que les ligands FasL et TRAIL (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand) par les cellules NK pourra induire la mort des cellules tumorales par cytolysse. Elles peuvent également promouvoir l'inflammation hépatique *via* l'induction de chimiokines, comme CXCL-9 qui permet le recrutement de lymphocytes T dans le tissu hépatique (Gao et al., 2012; Subleski et al., 2006).

Les cellules NKT sont une population lymphocytaire particulière qui exprime à la fois les marqueurs des cellules NK mais aussi un répertoire restreint du récepteur T ($\alpha\beta$ TCR). Deux types de NKT peuvent être différenciés selon leur reconnaissance et le réarrangement du récepteur TCR. Les NKT de type I ou NKT invariants (iNKT) reconnaissent spécifiquement l' α -galactosylceramide présenté par le CD1d. Les NKT de type II, reconnaissent, quant à eux, d'autres lipides présentés par le CD1d, comme le 3-sulfated galactosylceramide par exemple. (Slauenwhite and Johnston, 2015).

Une fois activées, les cellules NKT sécrètent de fortes quantités de cytokines de type Th1 (TNF- α et IFN- γ), Th2 (IL-4 et IL-13) et Th17 (IL-17 et IL-23). Elles ont également la capacité d'induire, comme les cellules NK, la mort des hépatocytes infectés ou tumoraux par la sécrétion de ligands de mort cellulaire ou le système perforine/granzyme (Swain, 2008).

Les lymphocytes $\gamma\delta$ T (cellules T non conventionnelles) représentent 15 à 25% des cellules T intra-hépatiques. Elles reconnaissent un large panel d'antigènes, peuvent se différencier en LT CD4⁺ ou LT CD8⁺ et infiltrer le tissu hépatique en cas d'inflammation. Les LT CD8⁺ sont des lymphocytes cytotoxiques qui jouent un rôle majeur dans l'élimination de cellules infectées mais reconnaissent également les cellules tumorales. Ces cellules agissent en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IFN- γ et le TNF- α et libèrent des molécules cytolytiques telles que les granzymes et les perforines. Elles peuvent également induire l'apoptose des cellules cibles *via* l'activation du récepteur de mort cellulaire Fas (Roth and Pircher, 2004).

Les lymphocytes B, dernière sous-population lymphocytaire présente dans le tissu hépatique, représentent 5% des lymphocytes intra-hépatiques. Peu d'études ont été réalisées sur cette population lymphocytaire. Une étude publiée en 2017 a mis en évidence qu'en présence de TGF- β (cytokine immunosuppressive), les lymphocytes B exprimant l'IgM (lymphocytes B immatures) sont convertis en lymphocytes B exprimant l'IgA (lymphocytes B activés). Ces lymphocytes B-IgA⁺ possède une activité immunosuppressive et peuvent, par exemple, inhiber l'activation des lymphocytes cytotoxiques CD8⁺. Ces lymphocytes B-IgA⁺ ont été retrouvés chez des patients atteints de Stéatohépatite Non-Alcoolique (NASH) et reproduits sur des modèles murins de développement de NASH et de carcinomes hépatocellulaire (CHC) (Shalapour et al., 2017).

a) Les granulocytes

Les granulocytes sont des cellules possédant des noyaux polylobés. Trois classes de granulocytes peuvent être distinguées : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Seules les deux premières classes sont retrouvées dans le tissu hépatique.

Les neutrophiles, leucocytes polynucléaires, représentent la population prédominante dans la circulation sanguine. Ils sont indispensables au contrôle des infections bactériennes et fongiques. Ils possèdent la particularité de pouvoir migrer dans le tissu hépatique durant l'inflammation.

En effet, au niveau du site inflammatoire, les neutrophiles vont jouer un rôle de phagocytose des déchets et des hépatocytes morts, relarguer de l'ADN extracellulaire et sécréter diverses enzymes protéolytiques (élastase ou cathepsine), protéines bactéricides (défensines) ou métalloprotéinases (MMP-3, MMP-9). Cependant, leur action génère la production d'espèce réactive à l'oxygène (ROS), qui peuvent aggraver les lésions hépatiques préexistantes (Ley et al., 2007).

Les éosinophiles, quant à eux, peuvent être attirés en cas de lésions hépatiques et produire des cytokines qui vont permettre l'activation du système immunitaire à proximité du site inflammatoire. Cependant, à l'heure actuelle, leur rôle dans le tissu hépatique reste peu détaillé dans la littérature (Pham et al., 2001).

L'ensemble de ces populations immunitaires jouent un rôle important dans l'homéostasie du tissu hépatique. Elles constituent également la première ligne de défense face aux agressions que peut subir le tissu hépatique. Récemment, un atlas des populations cellulaires présentes au sein du tissu hépatique humain a été réalisé. Cet atlas a révélé l'hétérogénéité du tissu hépatique, ainsi que la présence de sous-populations cellulaires non étudiées à ce jour. Par exemple, cette étude a démontré que la population EPCAM⁺TROP^{int} semblait être impliquée dans la régénération hépatique, l'apparition de maladies hépatiques et la formation de tumeurs (Aizarani et al., 2019).

I.1.3 Les hépatites

Les hépatites désignent une inflammation aigüe ou chronique du foie qui engendre des lésions hépatiques légères ou aggravées. Trois formes majeures d'hépatites sont reconnues : une forme aigüe ou fulminante, une forme chronique et l'insuffisance hépatique aigüe qui apparaît généralement sur une maladie hépatique chronique. Cette maladie peut évoluer vers la guérison ou vers une hépatite chronique qui peut à son tour progresser vers une fibrose hépatique, une cirrhose et enfin un cancer du foie.

Les hépatites peuvent être causées par diverses étiologies, les étiologies virales étant les plus fréquentes. Viennent ensuite les étiologies toxiques puis métaboliques. Enfin, dans de plus rares cas, elles peuvent se développer à partir de maladies auto-immunes ou de maladies génétiques.

Virus	Classification	Mode de contamination	Epidémiologie	Hépatite induite	Références
VHA	Famille : <i>picornaviridae</i> Genre : <i>hepatovirus</i>	Ingestion d'eau ou d'aliments contaminés	1 million de personnes par an	Hépatite fulminante	(Jefferies et al., 2018; Linder and Malani, 2017)
VHB	Famille : <i>hepadnaviridae</i> Genre : <i>orthohepadnavirus</i>	Parentéral (Buccal ou sexuel) Fluides biologiques	780 000 décès par an	Hépatite chronique	(Jefferies et al., 2018; Trépo et al., 2014)
VHC	Famille : <i>flaviviridae</i> Genre : <i>hepacivirus</i>	Parentéral	71 millions de personnes atteintes, 400 000 décès par an	Hépatite aigüe asymptomatique puis hépatite chronique	(Jefferies et al., 2018; Westbrook and Dusheiko, 2014)
VHD	Famille : <i>hepadnaviridae</i> Genre : <i>deltavirus</i>	Virus satellite, co-infection avec le VHB	18 millions de personnes infectées	Co-infection : Risque accrue de développer une hépatite fulminante/hépatite chronique sévère	(Jefferies et al., 2018; Rizzetto, 2015)
VHE	Famille : <i>hepeviridae</i> Genre : <i>hepevirus</i>	Ingestion d'eau ou d'aliments contaminés	20 millions de personnes infectées, 400 000 décès par an	Hépatite fulminante qui peut devenir chronique	(Jefferies et al., 2018; Kamar et al., 2014)

Tableau 1 : Tableau regroupant les principales caractéristiques des virus des hépatites virales.

VHA/B/C/D/E : Virus de l'Hépatite A/B/C/D/E.

a) Hépatites virales

Les hépatites virales se développent après l'infection par certains virus de l'hépatite. Cinq virus sont aujourd'hui décrits : Virus de l'Hépatite A (VHA), VHB, VHC, VHD et VHE. Les hépatites virales sont responsables de plus d'1,4 millions de décès par an dont 90% sont attribuables aux virus des hépatites B et C (Jefferies et al., 2018) (Tableau 1).

b) Hépatites toxiques

Les hépatites toxiques regroupent les hépatites induites par la surconsommation d'alcool, ainsi que les intoxications médicamenteuses et alimentaires.

La physiopathologie des hépatites alcooliques est multifactorielle. La surconsommation d'alcool provoque une augmentation de la métabolisation de l'éthanol par le tissu hépatique. Cette métabolisation excessive va aboutir à la génération de ROS et provoquer une inflammation hépatique. De plus, la perméabilisation intestinale induite par la surconsommation d'alcool engendre une augmentation de la présence d'endotoxines dans le tissu hépatique et contribue à l'activation du système immunitaire et à l'amplification de l'inflammation hépatique mais va également augmenter le stockage hépatocytaire de lipides. La répétition de la consommation abusive d'alcool va aboutir à une stéatose alcoolique qui peut évoluer en cirrhose hépatique et progresser vers le développement d'un cancer du foie (Chayanupatkul and Liangpunsakul, 2014).

Les intoxications médicamenteuses sont généralement des intoxications provoquées par l'ingestion de fortes doses de médicaments nocifs pour le foie. L'acétaminophène (ou paracétamol) est l'analgésique le plus vendu en France et le premier principe actif responsable d'intoxication aigüe, suivi du bromazépam et du citalopram (Mégarbane, 2017). A des doses trop importantes, la métabolisation de l'acétaminophène au niveau hépatique conduit à la production d'un métabolite actif, le N-acétyl-p-benzoquinone (NAPQI) qui va engendrer une déplétion en glutathion. Cette déplétion va causer un état de stress oxydatif et une hépatolyse, qui va aboutir à une hépatite aigüe qui peut parfois évoluer en hépatite chronique (Ichai and Samuel, 2011).

Les hépatites induites par intoxications alimentaires, les intoxications par anatoxines ou aflatoxines, sont les plus rares et provoquent généralement des hépatites fulminantes.

Par exemple, l'intoxication par l'Aflatoxin B1 (AFB1), mycotoxine produite par les champignons de la famille *Aspergillus*, peut être retrouvée si la consommation de maïs ou de cacahuètes ayant été conservés dans un milieu humide et chaud est avérée. L'AFB1 est métabolisée dans le tissu hépatique en un intermédiaire actif qui peut se lier et causer des dommages à l'ADN. L'AFB1 peut induire des mutations dans les cellules hépatiques, comme par exemple sur le gène suppresseur de tumeurs p53, et favoriser le développement d'un CHC (El-Serag, 2012).

c) Hépatites métaboliques

Les hépatites métaboliques regroupent les hépatites provoquées par une alimentation riche en lipides et glucides qui induisent une stéatose hépatique. La stéatose hépatique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, [NAFLD]) regroupe la stéatose hépatique non alcoolique (Non Alcoholic Fatty Liver, [NAFL]) ainsi que sa forme plus sévère, la stéatohépatite (Non Alcoholic Steato-Hepatitis, [NASH]). Ces hépatites chroniques peuvent conduire au développement d'une cirrhose hépatique et au cancer du foie. Elles seront abordées avec plus de détails par la suite.

d) Autres hépatites

Cette catégorie regroupe les hépatites les plus rares comme les hépatites auto-immunes et les hépatites liées à des maladies génétiques :

- Les hépatites auto-immunes (AutoImmune Hepatitis, [AIH]) : ces hépatites sont caractérisées par la présence d'une activation exagérée du système immunitaire. Cette activation peut se produire lorsque les réponses lymphocytaires effectrices sont abondantes et inappropriées ou en l'absence d'une régulation efficace. L'activation du système immunitaire entraîne l'apparition de lésions hépatiques et d'une hépatite chronique. Il existe 2 types d'AIH, caractérisées par la présence d'anticorps définis. L'AIH de type I est caractérisée par la présence d'anticorps antinucléaires (AntiNuclear Antibody, [ANA]) et/ou d'anticorps anti-muscle lisse (Smooth Muscle Antibody, [SMA]). L'AIH de type II est, quant à elle, retrouvée principalement chez les enfants et est définie par la présence d'anticorps contre les microsomes hépatiques du rein de type 1 (LKM-1) ou d'anticorps anti-cytosol de type 1 du foie (Gerven et al., 2016) ;

- La maladie de Wilson est une maladie génétique qui se caractérise par la mutation du gène ATP7B (ATPase Copper Transporting Beta-7). La dysfonction de la protéine ATP7B induit une accumulation du cuivre dans le tissu hépatique. Cette accumulation induit un stress oxydatif, la formation de radicaux libres et la mort des hépatocytes. Elle induit généralement une insuffisance hépatique aigüe ou une hépatite chronique et est généralement associée à des désordres neurologiques (Shribman et al., 2019) ;
- L'hémochromatose caractérise de nombreuses maladies génétiques liées à une surcharge en fer hépatique. La plus fréquente est l'hémochromatose liée à la mutation du gène HFE. La mutation de ce gène induit une augmentation de l'absorption du fer dans le tissu hépatique et l'activation de la fibrose hépatique. L'hémochromatose provoque une cirrhose hépatique qui peut évoluer vers un carcinome hépatocellulaire (Brissot et al., 2017).

I.2 Physiologie cellulaire

I.2.1 Types de mort cellulaire

La mort cellulaire est un processus biologique courant dans tout organisme vivant. Elle participe notamment à de nombreux processus physiologiques et permet de garantir l'homéostasie cellulaire et tissulaire. La mort cellulaire représente également une stratégie de défense de l'organisme en éliminant sélectivement les cellules infectées, endommagées ou mutées qui pourraient compromettre l'homéostasie générale du tissu. Néanmoins, les processus de mort cellulaires peuvent également contribuer au développement de désordres pathologiques.

De nombreux types de morts cellulaires sont décrits à ce jour dans la littérature. Trois types de morts cellulaires majeurs peuvent être distingués :

- L'apoptose est caractérisée par l'activation de voies de signalisation nécessitant la présence de caspases initiatrices et exécutrices. Elle aboutit à la condensation de la chromatine ajoutée à une fragmentation de l'ADN et à la formation de corps apoptotiques ;
- L'autophagie est définie par la séquestration au sein d'autophagosomes d'une partie du cytoplasme et d'organites cellulaires dans le but de permettre à la cellule de survivre en cas de dérégulation métabolique (par exemple un faible niveau en ATP (Adénosine Triphosphate), une privation de nutriments et d'acides aminés, etc.) ou pour éliminer des organites endommagés. Un excès d'autophagie, lié à la perte de contrôle de ce processus cellulaire conduit à l'activation de l'apoptose de la cellule ;
- La nécrose cellulaire est caractérisée par une rupture de la membrane plasmique et une perte des structures cellulaires sans condensation de la chromatine. Ces caractéristiques morphologiques sont retrouvées dans la nécrose (mort « accidentelle ») et la nécroptose (mort cellulaire « programmée »).

D'autres types de mort cellulaire sont également décrits comme l'anoïkis, la cornification, l'entose, la catastrophe mitotique, la NETose, la parthanatos ou encore la pyroptose (Green and Llambi, 2015).

Manque de facteurs de croissance
Stress cellulaire

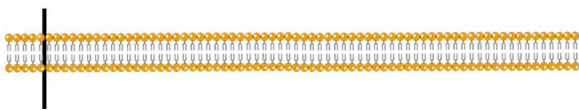
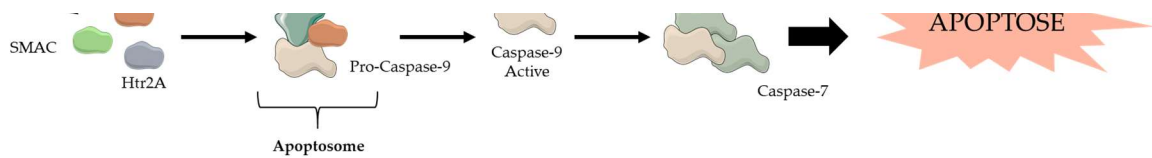


Schéma 4 : Voie de signalisation simplifiée de l'apoptose intrinsèque (à partir d'Estaquier et al., 2012).

APAF-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 ; Bak : Bcl-2 homologous Antagonist Killer ; Bax : Bcl-2-Associated X ; Cyt-c : Cytochrome c ; Htr2A : 5-hydroxytryptamine receptor 2A ; SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase.



I.2.2 L'apoptose

L'apoptose est le type de mort cellulaire le plus décrit dans la littérature. Cette mort cellulaire peut être induite par deux voies d'activation différentes : une voie d'activation intrinsèque mitochondriale, voie majeure d'apoptose chez les vertébrés, et une voie d'activation extrinsèque, qui nécessite la fixation d'un ligand de mort cellulaire sur son récepteur pour être induite. Ces deux voies peuvent également se croiser : la voie extrinsèque peut permettre l'activation de la voie intrinsèque par l'intermédiaire de la caspase-8 et le clivage de Bid (Green and Llambi, 2015).

La voie intrinsèque de l'apoptose peut être engagée suite à des dommages à l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique ou encore un milieu défavorable à la survie de la cellule. Elle nécessite l'action de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 (Bax et Bak par exemple) qui vont induire une perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage de facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c (Cyt-c), SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) et HtrA2 dans le cytosol. Suite au relargage de ces protéines, un complexe multi-protéique va être formé : l'apoptosome. L'apoptosome se compose de Cyt-c, de la procaspase-9 ainsi que de la protéine APAF-1 (Apoptotique Protease-Activating Factor 1). Dans ce complexe, la caspase-9 va être activée et induire l'activation des caspases exécutrices, les caspase-3 et caspase-7. Ces caspases exécutrices vont cliver des composants cellulaires indispensables aux processus physiologiques comme l'ADN. Leurs activités enzymatiques va également engendrer la réorganisation du cytosquelette, la formation de corps apoptotiques et induire la mort de la cellule (Estaquier et al., 2012) La voie intrinsèque de l'apoptose est décrite dans le schéma 4.

La voie extrinsèque de l'apoptose est induite par des récepteurs de mort cellulaire possédant un domaine de mort (Death Domain, [DD]) et appartenant à la superfamille du TNF-R (Tumor Necrosis Factor-Receptor). Cette superfamille inclue les récepteurs TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Recepteur), TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor) et Fas (Apo-1 ou CD95).

a) *L'apoptose induite par le TNF- α*

Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor) est un ligand qui appartient aux ligands de la superfamille du TNF. Cette famille compte 19 membres dont le TNF- α , TRAIL et FasL, ligands les plus décrits dans la littérature. Cette cytokine joue un rôle clef au cours des inflammations chroniques ou aiguës.

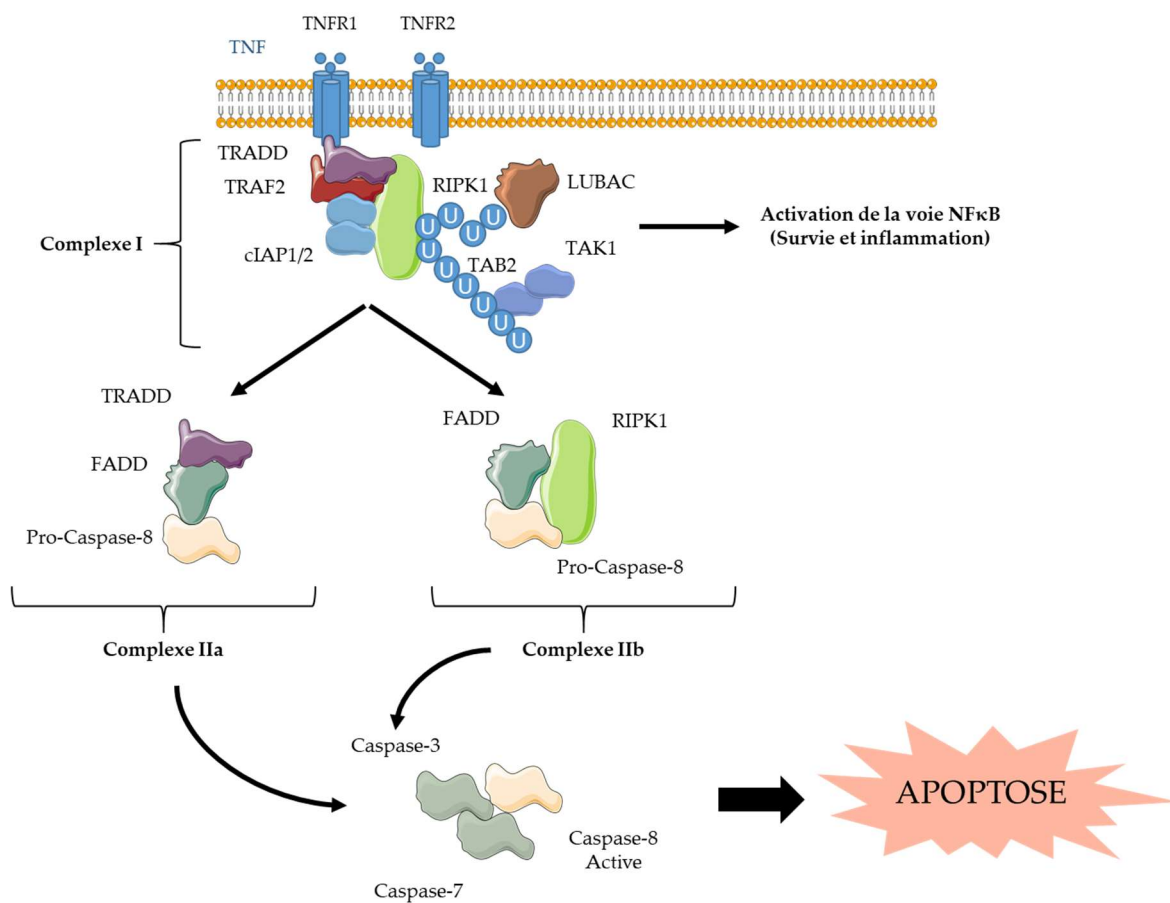


Schéma 5 : Voie de signalisation induisant la survie cellulaire ou la mort cellulaire par apoptose après fixation du TNF- α sur son récepteur (Réalisé à partir de Dondeliger et al., 2016).

cIAP1/2 : Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1/2 ; FADD : Fas-Associated protein with Death Domain ; NFκB : Nuclear Factor-kappa B ; LUBAC : Linear UBiquitination Assembly Complex ; RIPK1 : Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1 ; TAB2 : TGF-beta Activated kinase 1 (MAP3K7) Binding protein 2 ; TAK1 : Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1 ; TRADD : TNFR1-Associated Death Domain.

En se fixant sur son récepteur, le TNFR1, le TNF- α induit différents types de réponses cellulaires en fonction du type cellulaire et de l'environnement : la survie et la prolifération, l'inflammation ou encore la mort cellulaire par apoptose ou nécroptose (Ting and Bertrand, 2016).

De manière générale, la fixation du TNF- α sur son récepteur spécifique, le TNFR1 n'induit pas la mort de la cellule, mais conduit à la formation d'un complexe membranaire, le complexe I. Ce complexe est composé des protéines TRADD (TNFR1-Associated Death Domain), RIPK1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1) et TRAF2. La protéine TRAF2 interagit avec les E3 ubiquitine ligases cIAP1 et cIAP2 (Inhibitor of Apoptosis Protein) qui vont ubiquitinyler RIPK1. Les chaînes d'ubiquitines générées vont permettre le recrutement du complexe LUBAC (Linear UBiquitin Assembly Complex). Ce complexe permet l'ajout d'une chaîne linéaire d'ubiquitines sur RIPK1 et va permettre de recruter les protéines nécessaires à l'activation de la voie de signalisation du NF κ B (Nuclear Factor-kappa B) et la survie des cellules (Dondelinger et al., 2016; Sedger and McDermott, 2014).

En cas d'inhibition de la voie de signalisation du NF κ B, le complexe cytosolique IIa va être formé. Ce complexe se compose des protéines TRADD, FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et de la caspase-8. L'activation de la caspase-8 au sein de ce complexe va permettre d'induire une apoptose RIPK1-indépendante. En cas d'absence des E3 ubiquitine ligases (cIAP1/2 ou LUBAC), le complexe cytosolique IIb, composé des protéines RIPK1, FADD et de la caspase-8 va se former. La formation et l'activité de ce second complexe dépend de l'activité kinase de la protéine RIPK1. L'activation de la caspase-8 dans le complexe IIb va initier une apoptose RIPK1-dépendante (Belizário et al., 2015; Feoktistova and Leverkus, 2015) (Schéma 5).

b) L'apoptose induite par le ligand TRAIL

Le ligand TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) est une glycoprotéine membranaire de type II. Ce ligand peut se fixer à plusieurs récepteurs membranaires ou à son récepteur soluble. Il peut induire la survie ou la mort cellulaire par apoptose ou nécroptose en se fixant sur les récepteurs TRAIL-R1 (ou DR4, TNFSF10A) et TRAIL-R2 (ou DR5, KILLER, TNFSF10B). DR4 et DR5 sont tous les deux exprimés chez l'homme alors que seul DR5 est présent chez la souris (Wu et al., 1999).

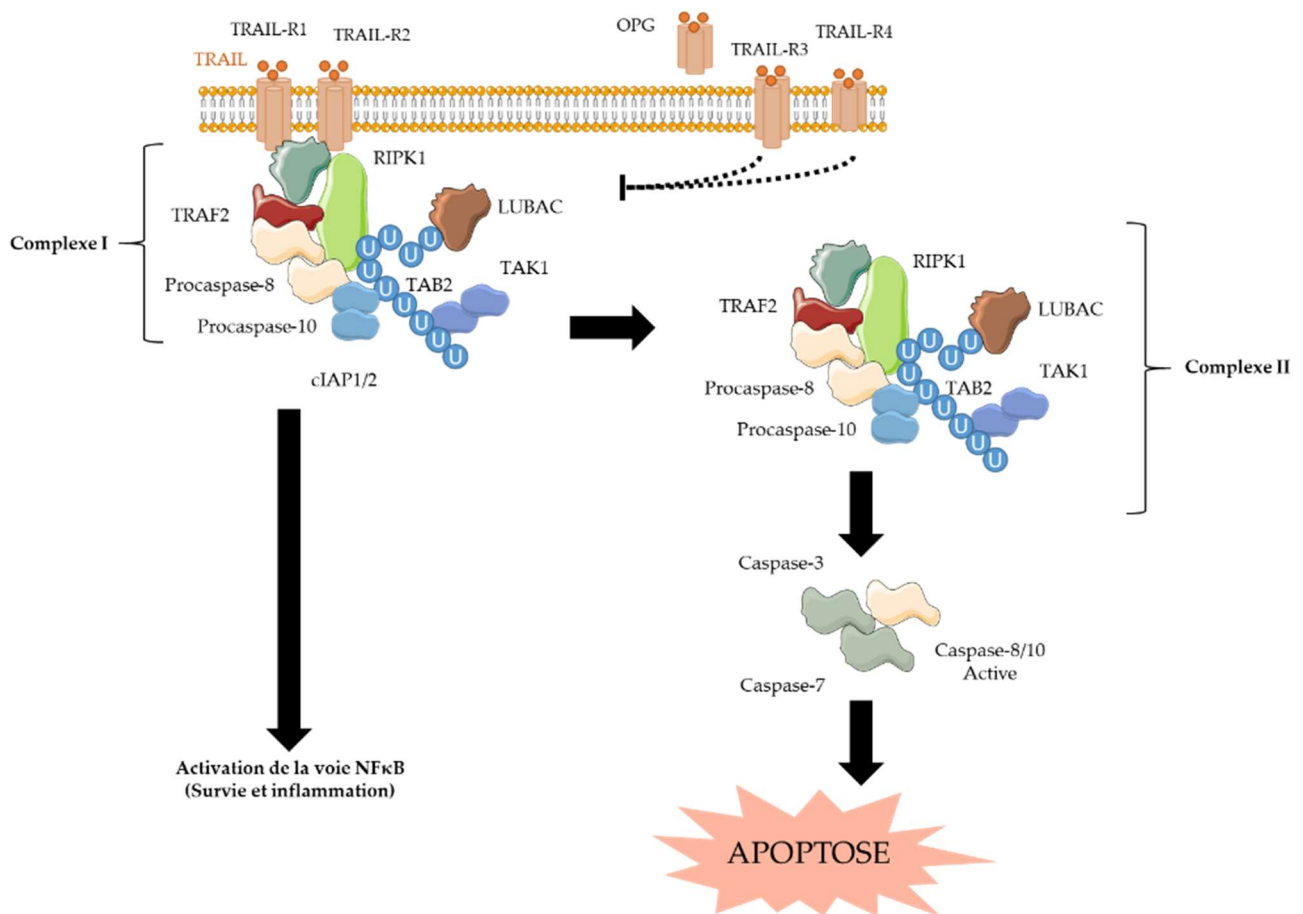


Schéma 6 : Voie de signalisation induisant l'apoptose ou la survie cellulaire après fixation de TRAIL sur son récepteur activateur (Réalisé à partir de Lafont et al., 2018).

cIAP1/2 : Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1/2 ; FADD : Fas-Associated protein with Death Domain ; NFκB : Nuclear Factor-kappa B ; LUBAC : Linear UBiquitination Assembly Complex ; OPG : Ostéoprotégérine ; RIPK1 : Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1 ; TAB2 : TGF-beta Activated kinase 1 (MAP3K7) Binding protein 2 ; TAK1 : Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1 ; TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2 ; TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand.

TRAIL peut également se fixer sur trois autres récepteurs, qui jouent le rôle de leurre et n'induisent pas un signal de mort cellulaire : TRAIL-R3 (ou DcR1, TRID, TNFSF10C) qui est un récepteur membranaire dont le domaine de mort est absent, TRAIL-R4 (ou DcR2, TNFRSF10D) qui possède un domaine de mort tronqué et non fonctionnel et le récepteur soluble OPG (ostéoprotégérine) (Daniels et al., 2005).

L'interaction de TRAIL avec ses récepteurs agonistes induit la fixation de la protéine FADD sur la partie intracellulaire du récepteur DR4 ou DR5 *via* le domaine de mort. La fixation de FADD va conduire au recrutement de RIPK1, des procaspases-8 et -10, de cFLIP et également de LUBAC et la formation d'un premier complexe, le complexe I (Lafont et al., 2017). La poursuite de la signalisation vers la survie cellulaire ou la mort cellulaire par apoptose ou nécroptose dépend de l'expression, de la présence et de la fonctionnalité de nombreuses protéines. Plus particulièrement, de nombreuses E3-ubiquitine ligases peuvent interagir avec les protéines de ce complexe et favoriser la survie ou la mort de la cellule.

La présence de la E3-ubiquitine ligase Cullin-3 induit l'ubiquitinylation de la caspase-8. Cette ubiquitination peut ensuite être reconnue par p62, une ubiquitine-binding protéine induisant l'oligomérisation de la caspase-8, son activation et l'apoptose de la cellule (*via* l'activation des caspases effectrices, caspase-3, caspase-6 et caspase-7) (Jin et al., 2009). TRAF2 peut également ubiquitinyler la caspase-8 et induire sa dégradation par le protéasome, empêchant ainsi la réalisation de l'apoptose (Gonzalvez et al., 2012). De la même façon, le recrutement de la protéine LUBAC limite l'activation de la caspase-8 au sein du complexe I, en favorisant le recrutement de la protéine A20. Il est suggéré que la protéine A20 puisse limiter l'induction de l'apoptose en ubiquitinylant RIPK1, ce qui diminuerait l'activation de la caspase-8 dans ce complexe (Bellail et al., 2012).

RIPK1, lorsqu'elle a auparavant été ubiquitinylée par cIAP1/2, peut également être ubiquitinylée par LUBAC (Lafont et al., 2017). La chaîne d'ubiquitines ajoutée par LUBAC induit le recrutement d'autres protéines, l'activation de la voie de signalisation du NFκB et favorise la survie cellulaire. La signalisation de TRAIL peut promouvoir la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme CCL-2, IL-8, CXCL-1 ou CXCL-5 et de facteurs anti-apoptotiques tels que cFLIP (Lafont et al., 2018).

L'impossibilité d'induire un signal de survie induit la formation d'un second complexe, le complexe II au niveau cytosolique. Ce complexe est formé de FADD, TRAF2, RIPK1, LUBAC, NEMO (NF- κ B Essential Modulator) et de la procaspase-8. L'oligomérisation et l'activation de la caspase-8 conduit à l'apoptose de la cellule (Schéma 6).

a) L'apoptose induite par le ligand FasL

L'induction de l'apoptose après la fixation du ligand FasL (CD95L) sur son récepteur Fas (CD95) conduit à la formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex).

Ce complexe est composé du couple ligand/récepteur, de FADD, de la procaspase-8 et de la procaspase-10. La dimérisation des procaspases permet leur activation, leur clivage et leur libération dans le cytoplasme. Elles vont pouvoir activer les caspases effectrices (caspase-3 et caspase-7) et induire la mort de la cellule (O' Reilly et al., 2016).

b) L'apoptose dans les maladies hépatiques

Au sein du tissu hépatique, l'apoptose permet de contrôler l'homéostasie hépatique et contribue à l'équilibre entre perte et remplacement des cellules hépatiques : 0.05% des hépatocytes sont renouvelés en permanence par apoptose. Un déséquilibre entre perte et remplacement induit une pathologie hépatique.

La mort cellulaire par apoptose permet notamment l'élimination des virus lors d'une infection. Elle est induite par les cellules immunitaires (principalement les KC ou les NK) lorsqu'une cellule infectée est détectée (Fischer et al., 2007). L'apoptose joue également un rôle dans les hépatites chroniques. En effet, le relargage de DAMPs par les hépatocytes morts par apoptose induit l'activation d'autres cellules hépatiques, telles que les cellules étoilées ou les KC. Ces cellules peuvent induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui amplifient les dommages hépatiques mais également sécréter des médiateurs fibrogéniques (TGF- β ou PDGF par exemple) qui vont permettre d'induire la fibrogenèse au sein du tissu (Ganz and Szabo, 2013).

L'apoptose est également mis en cause dans le développement de cancers hépatiques. En effet, la mort cellulaire induit la prolifération d'hépatocytes sains et peut permettre l'apparition de mutations pro-tumorales. De plus, la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose permet leur survie et le maintien de la tumeur.

Plusieurs systèmes d'évasion apoptotique sont décrits dans la littérature et conduisent tous à l'impossibilité d'induire l'apoptose chez les cellules mutées, favorisant leur survie et une prolifération exagérée :

- L'inhibition de l'expression de membres pro-apoptotiques tels que Bax, ou la surexpression de membres anti-apoptotiques, comme Bcl-xL ou survivine induit la suractivation de la voie cellules NFκB et permet la survie des cellules, leur prolifération et l'induction d'un environnement inflammatoire ;
- La perte ou l'inefficacité de suppresseurs de tumeurs (par exemple p53) induit la prolifération des cellules mutées ;
- La suppression d'oncogènes va permettre d'augmenter la prolifération des cellules mutées et l'apparition de cancers (Shan and Li, 2002).

La résistance des cellules cancéreuses à l'induction de l'apoptose peut aussi être liée aux récepteurs de mort cellulaire. En effet, il a été démontré qu'une augmentation des récepteurs leurres (DcR1, DcR2 et OPG) pouvait interférer avec l'activation des récepteurs activateurs de TRAIL (DR4 et DR5) et induire la résistance des cellules à la mort cellulaire induite par le ligand TRAIL (O'Leary et al., 2016). Le ligand TRAIL est utilisé, notamment par les cellules NK, afin de promouvoir leur activité antivirale et anti-tumorale cytolitique (Kayagaki et al., 1999; Sato et al., 2001). La résistance des cellules cancéreuses à l'induction de l'apoptose par le ligand TRAIL (*via* des mutations oncogéniques dans la cascade de signalisation) contribue à l'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire et permet la progression, l'invasion et la présence de métastases, notamment dans des modèles murins de cancers pancréatiques et pulmonaires (von Karstedt et al., 2015).

L'expression du ligand FasL est également augmentée dans un grand nombre de cancers et a été corrélée avec un faible taux de survie des patients atteints de cancers colorectaux, gastriques, pulmonaires, etc. (Houston and O'Connell, 2004). Le ligand FasL exprimé à la surface de ces cellules cancéreuses est fonctionnel et des études ont mis en évidence le rôle de ce ligand dans l'apoptose des cellules immunitaires anti-tumorales comme les lymphocytes (Bennett et al., 1998; Okada et al., 2000; Zheng et al., 2003).

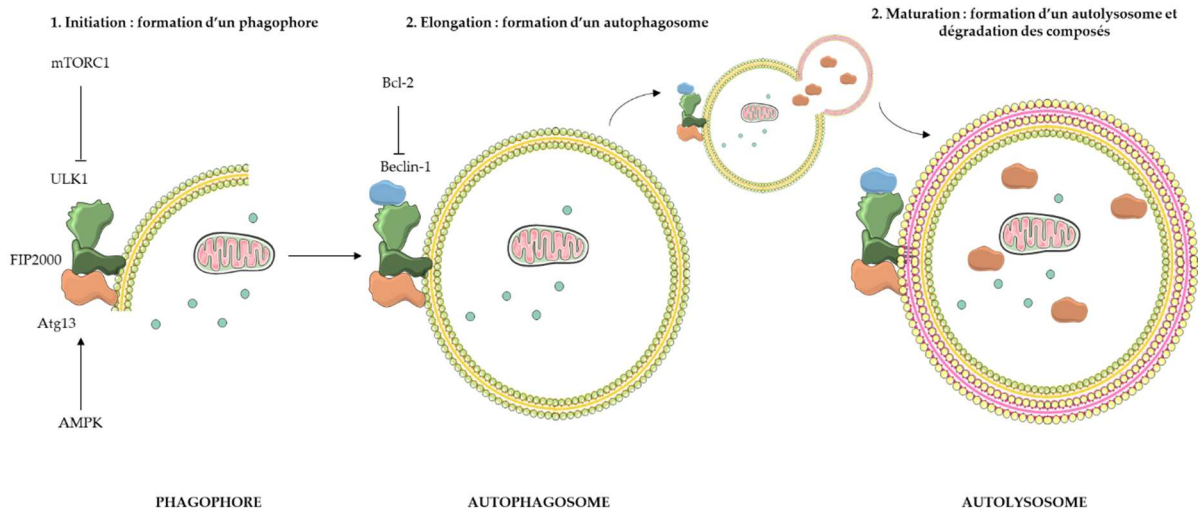


Schéma 7 : Processus moléculaire de l'autophagie (Réalisé à partir de Green et Llambi, 2015).

AMPK : AMP-activated protein Kinase ; Atg : Autophagy-related protein ; Bcl-2 : B-cell lymphoma 2 ; FIP2000 : family Integrating Protein 2000 ; mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 ; ULK1 : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1.

Cependant, l'apoptose n'est pas le seul type de mort cellulaire impliqué dans la progression des maladies hépatiques. En effet, *Kotsafti et al.*, ont démontré que l'apoptose et l'autophagie pouvaient être toutes les deux impliquées dans les phases précoces et intermédiaires d'infections aux virus des hépatites et pourraient fonctionner de concert afin de tenter de contenir l'infection virale et de limiter les dégâts dans le tissu hépatique (Kotsafti et al., 2012).

I.2.3 L'autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire caspase-indépendant de survie qui sera engagé afin de lutter contre les déplétions métaboliques (déplétion en ATP ou en nutriments essentiels au bon fonctionnement de la cellule) ou contre des mutations activatrices d'oncogènes (Gozuacik and Kimchi, 2004). Elle peut également jouer un rôle dans l'élimination de micro-organismes, de cellules tumorales ou dans la présentation d'antigènes aux cellules immunitaires. Trois types d'autophagie sont décrits à ce jour : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes. La mort cellulaire induite par autophagie se rapporte généralement à la macroautophagie.

La macroautophagie est physiologiquement inhibée par la voie de signalisation mTORC1 (*via* la protéine Beclin-1, orthologue mammifère de la protéine Atg6 chez la levure). Elle peut être activée dans certaines conditions par la voie PI3K-Akt. Cette activation conduit au confinement d'une partie des organelles du cytosol autour d'une membrane : le phagophore. Ce dernier est formé à l'aide des protéines Atg. 31 protéines Atg différentes sont connues pour être impliquées dans la formation du phagophore et son élongation. L'élongation du phagophore va aboutir à la séquestration d'une partie des organelles cytosoliques et à la formation de l'autophagosome. Cet autophagosome va ensuite fusionner avec les lysosomes pour former un autolysosome ou autophagolysosome et induire la dégradation du contenu séquestré à l'aide notamment de l'enzyme Atg15 qui induit la lyse des corps autophagiques. La mort de la cellule va résulter de l'accumulation d'autophagosomes et d'autolysosomes dans le cytoplasme cellulaire (Mizushima, 2007). Les processus moléculaires conduisant à la mort cellulaire par autophagie sont décrits sur le schéma 7.

Dans les maladies hépatiques, l'autophagie est un mode de mort cellulaire reconnu pour son rôle dans l'infection virale des hépatocytes, notamment par le VHC. En effet, l'infection par le VHC induit la translocation de la protéine Atg5 au niveau du réticulum endoplasmique, la formation de phagophores et l'enclenchement de la macroautophagie. La formation d'autophagosomes au cours de l'autophagie permet la répllication du virus, et sa dissémination aux cellules adjacentes (Wang and Ou, 2018).

L'autophagie joue également un rôle dans la stéatose et dans l'atteinte hépatique générée au cours de la NAFLD ou des maladies hépatiques alcooliques. En effet, dans la NAFLD ou les maladies alcooliques chroniques, la surconsommation d'alcool ou un régime déséquilibré en lipides, induit une diminution de l'expression des protéines Atg3 et Atg5. Ces protéines sont impliquées dans la formation du phagophore et la diminution de leur expression, réduit l'autophagie cellulaire. La diminution des capacités d'autophagie engendre l'accumulation de mitochondries défectueuses, induit un stress oxydatif et conduit à des dommages chroniques au sein du tissu hépatique (Liu et al., 2017). Les autophagosomes, dans le contexte de la NAFLD permettent également de réguler et de dégrader les lipides présents dans le tissu hépatique. Le dysfonctionnement de l'autophagie induit une augmentation de lipides au sein des hépatocytes et contribue aux dommages hépatocytaires. De plus, l'autophagie est un mécanisme cellulaire permettant aux macrophages de limiter la fibrose hépatique en protégeant les hépatocytes sains par l'élimination des déchets cellulaires (Khambu et al., 2018).

La diminution de l'autophagie au cours d'une maladie hépatique augmente la présence de déchets cellulaires et de ROS au sein du tissu hépatique et contribue à l'inflammation du tissu.

L'autophagie, ainsi que l'apoptose et d'autres types de morts cellulaires peuvent interagir ensemble et de manière parallèle afin de contrer une infection ou tenter de limiter les dommages cellulaires. L'autophagie a été associée à des morts cellulaires indépendantes des caspases au cours des hépatites fulminantes, aboutissant à la nécrose ou la nécroptose des hépatocytes (Wang, 2015).

1.2.4 La nécrose cellulaire

La nécrose ou mort cellulaire nécrotique regroupe différents processus de mort cellulaire possédant en commun une perte de l'intégrité de la membrane plasmique. La nécrose cellulaire est induite lorsque l'homéostasie et l'intégrité cellulaire sont rompues. La rupture de la membrane plasmique va induire un relargage extracellulaire du contenu cytoplasmique dont des ROS, contribuant à l'inflammation du tissu. Pendant longtemps, la nécrose cellulaire a été définie comme étant un processus passif de mort cellulaire accidentelle liée à des dommages physico-chimiques ou mécaniques. Cependant, la nécrose n'est pas toujours accidentelle et peut également être induite par une signalisation intracellulaire spécifique. Dans ces cas-là, la nécrose cellulaire programmée ou nécroptose est décrite (Green and Llambi, 2015).

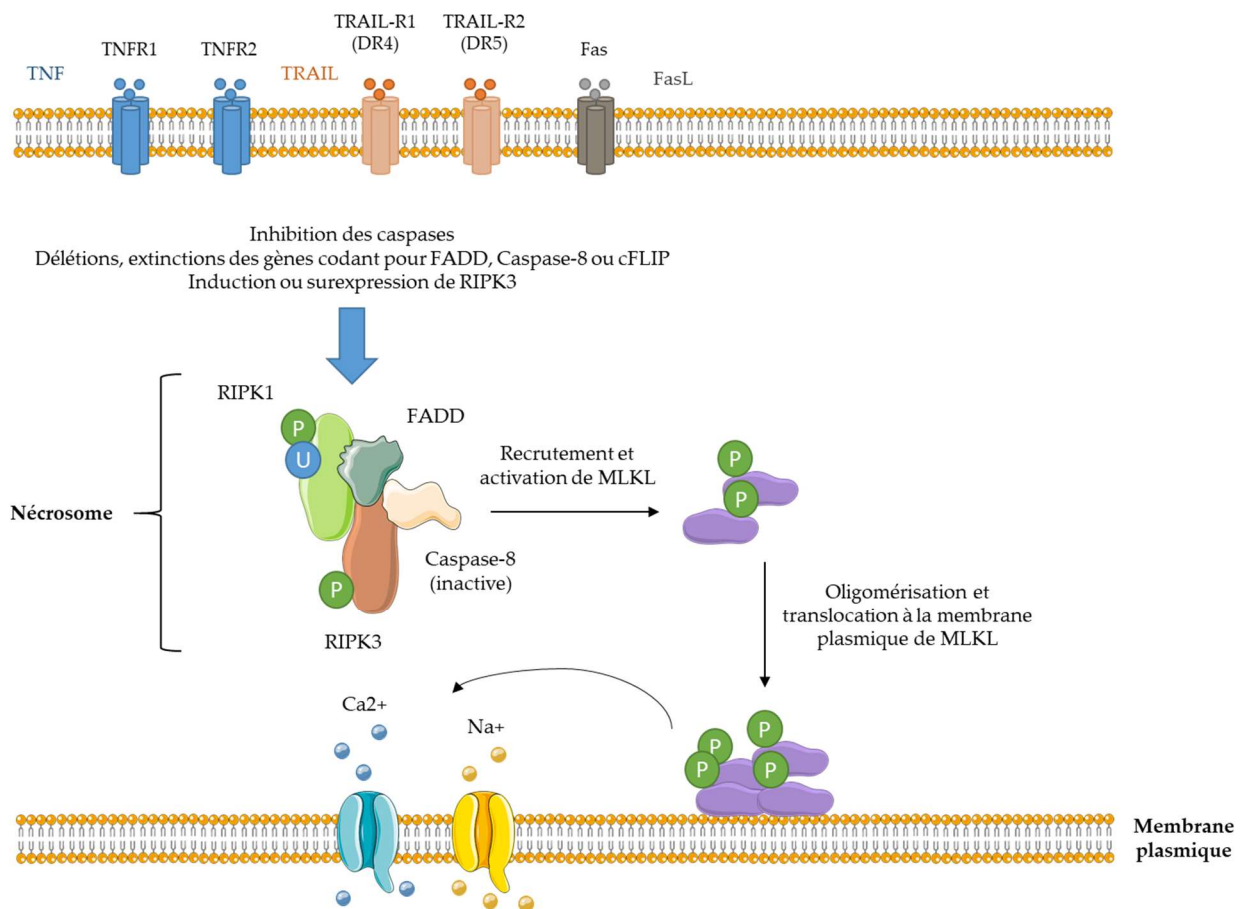


Schéma 8 : Voie de signalisation de la nécroptose (Réalisé à partir de Jouan-Lanhouet et al., 2014 ; Lafont et al., 2017).

c-FLIP : cellular FLICE-Like Inhibitory Protein ; FADD : Fas-Associated protein with Death Domain ; MLKL : Mixed Lineage Kinase domain Like ; RIPK1/3 : Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1/3 ; TNF Receptor-Associated Factor 2 ; TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand.

La nécroptose peut être induite par la fixation de ligands de la superfamille du TNF sur leurs récepteurs spécifiques et lorsque les voies de survie cellulaire et d'apoptose sont inhibées. Notamment, l'inactivation de la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain) ou des caspases, et plus particulièrement de la caspase-8, ou encore des conditions de pH extracellulaire acide peuvent favoriser une mort cellulaire par nécroptose (Holler et al., 2000; Jouan-Lanhouet et al., 2012; Meurette et al., 2007). La présence de Smac mimétiques (Second mitochondrial activator of caspases) peut également permettre d'induire la nécroptose dans certains types cellulaires. En effet, ces Smac mimétiques possèdent la capacité de bloquer les protéines cIAP1/2 et XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), impliquée dans l'induction de l'apoptose (Welsh et al., 2016).

Lorsque l'apoptose n'est pas possible, la formation d'un complexe cytosolique nommé nécrosome est formé (Zhou and Yuan, 2014). Ce complexe contient la protéine FADD, les protéines kinases RIPK1 (Receptor-Interacting serine/threonine Protein Kinase 1), RIPK3, MLKL (Mixed Lineage Kinase domain Like pseudo-kinase) et la procaspase-8.

L'autophosphorylation de RIPK1 (Ser14/15, Ser166 chez l'homme, et Ser14/15 chez la souris) ainsi que la phosphorylation de RIPK3 (Ser227 chez l'homme et Thr231/Ser232 chez la souris) permettent leur association, la formation d'oligomères et leur activation. L'activation de RIPK3 est indispensable au recrutement de la pseudo-kinase MLKL et à sa phosphorylation (Thr357 et Ser358 chez l'homme, Thr349, Ser347 et Ser352 chez la souris) (Cho et al., 2009; He et al., 2009; Moriwaki and Chan, 2017). La phosphorylation de MLKL engendre la formation d'homotrimères et sa translocation vers la membrane plasmique. Certaines études montrent que la présence d'homotrimères de MLKL à la membrane plasmique induit la formation de pores à la membrane permettant un influx d'ions Ca^{2+} et Na^{+} et rompre l'homéostasie osmotique (Chen et al., 2014). D'autres études supposent que l'oligomérisation de MLKL permettrait l'activation massive d'enzymes telles que la NADPH Oxidase 1 (NOX1) responsable de l'oxydation des lipides de la membrane plasmique au cours de la nécroptose (Belizário et al., 2015; Feoktistova and Leverkus, 2015; Kim et al., 2007) (Schéma 8).

Dans les maladies hépatiques, les morts cellulaires par nécrose ou nécroptose sont moins décrites que la mort par apoptose. Cependant, des études semblent démontrer que la présence de ce type de mort cellulaire hautement inflammatoire amplifierait les dégâts hépatiques et contribueraient à la progression de la maladie hépatique.

Modèles		RIPK1	RIPK3	MLKL
APAP	Modèles Murins (injection APAP)	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (An et al., 2013) • Inhibition de RIPK1 (<i>via</i> Nec1) : protection (Dara et al., 2015; Zhang et al., 2014) • Inhibition de RIPK1 (<i>via</i> Nec1S) : protection (An et al., 2013; Deutsch et al., 2015) • Souris RIPK1^{LPC-KO} : sensibilisation (Schneider et al., 2017) • Souris RIPK1^{LPC-KO} : protection (Dara et al., 2015) 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (An et al., 2013; Ramachandran et al., 2013; Yan et al., 2016) • Souris RIPK3^{-/-} : pas d'effet (Dara et al., 2015; Yan et al., 2016) • Souris RIPK3^{-/-} : protection (Deutsch et al., 2015; Ramachandran et al., 2013) 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (Yan et al., 2016) • Souris MLKL^{-/-} : pas d'effet (Dara et al., 2015; Günther et al., 2018)
	Cultures d'Hépatocytes Humains primaires [HHP] ou expression dans le tissu hépatique de patients	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression de RIPK1 sur HHP (Dara et al., 2015) • Inhibition de RIPK1 (<i>via</i> Nec1) : protection (Dara et al., 2015; Ramachandran et al., 2013) • Inhibition de RIPK1 (<i>via</i> siARN ou Nec1) : pas d'effet (Li et al., 2014; Zhang et al., 2014) 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de modification de l'expression de RIPK3 sur HHP (Dara et al., 2015) • Inhibition de RIPK3 : protection (Zhang et al., 2014) • Augmentation de l'expression chez les patients (Deutsch et al., 2015) • Pas de modification de l'expression chez les patients (Günther et al., 2018) 	<i>Pas de données</i>

Tableau 2 : Tableau regroupant les diverses études de la nécroptose dans les maladies hépatiques (partie 1/2).

Par exemple, une intoxication à l'acétaminophène induirait le relargage de HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) chez les patients. L'HMGB1 est une protéine nucléaire qui est passivement libérée par les cellules nécrotiques et permet d'induire une réponse immunitaire en interagissant avec différents récepteurs membranaires incluant RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) et certains TLRs (Lotze and Tracey, 2005).

La présence de nécrose cellulaire a été mise en évidence au cours des maladies hépatiques chroniques. En effet, au cours d'une maladie alcoolique chronique, la métabolisation de l'alcool induit la génération de ROS. Ces ROS induisent la mort des hépatocytes par apoptose, mais également par nécrose. La délétion de RIPK3 dans un modèle murin de consommation chronique d'alcool diminue la présence de ROS et protège le tissu hépatique des dommages hépatiques et de la stéatose (Roychowdhury et al., 2013). De plus, la nécroptose a également été évoquée dans la stéatose hépatique non alcoolique. En effet, une augmentation de la mort cellulaire, détectée par l'augmentation des transaminases hépatiques, est observée chez des patients atteints de NASH. L'augmentation de ces transaminases hépatiques a également été corrélée avec l'augmentation de l'expression de la protéine RIPK3 (Gautheron et al., 2014).

Enfin, la délétion de la protéine RIPK3 dans un modèle murin d'induction de stéatohépatite non alcoolique protège le tissu hépatique de la fibrose hépatique (Gautheron et al., 2014).

Cependant, le rôle de la nécroptose n'est pas encore clairement établi dans la littérature. En effet, de nombreuses études, notamment portant sur des modèles d'induction d'hépatite aiguë, se contredisent. Le tableau 2 rassemble la majorité des études murines et observations sur patients réalisées dans le cadre de maladies hépatiques aiguës (intoxication à l'acétaminophène, [APAP] ; maladie auto-immune, [AIH]) et chroniques (NAFLD/NASH).

En 2016, *Dara et al.*, ont publié une revue tentant d'expliquer les différences de résultats observés entre les études (Dara et al., 2016). Plusieurs points ont été soulevés : premièrement, les études sur des souris déficientes en RIPK3 (souris RIPK3^{-/-}) comparent les souris RIPK3^{-/-} avec des contrôles qui ne se sont pas les souris issues d'une même portée et proviennent parfois de lignées de souris différentes dont la susceptibilité peut varier dans certains modèles d'hépatites. Par exemple, Ramachandran et al., ont observé une protection face à la toxicité de l'APAP sur le tissu hépatique des souris déficientes pour RIPK3 (Ramachandran et al., 2013). Cependant, ces souris étaient issues de la lignée C57Bl/6N et ont été comparées à des souris sauvages provenant de la lignée C57Bl/6J. Or, la lignée C57Bl/6N est plus résistante à l'induction de dommages hépatiques par l'APAP que la lignée C57Bl/6J (Bourdi et al., 2011).

	Modèles	RIPK1	RIPK3	MLKL
AIH	Modèles murins (injection de ConA)	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (Deutsch et al., 2015; Günther et al., 2016; Liedtke et al., 2011) • Augmentation de l'activité kinase (Filliol et al., 2017a) • Inhibition de l'expression (<i>via</i> Nec1) : protection (Arshad et al., 2015; Filliol et al., 2017a; Jouan-Lanhouet et al., 2012) • Inhibition de l'expression (<i>via</i> Nec1) : sensibilisation (Deutsch et al., 2015; Suda et al., 2016) • RIPK1^{LPC-KO} : sensibilisation (Deutsch et al., 2015; Filliol et al., 2016) 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (Deutsch et al., 2015) • Pas de modification de l'expression (Günther et al., 2016) • Souris RIPK3^{-/-} : pas d'effet (Günther et al., 2016; Suda et al., 2016; Weinlich et al., 2013) • Souris RIPK3^{-/-} : protection (Deutsch et al., 2015; Kang et al., 2015) 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (Günther et al., 2016) • MLKL^{-/-} : protection (Günther et al., 2016) • MLKL^{-/-} : pas d'effet (Suda et al., 2016)
	HHP ou expression dans le tissu hépatique de patients	<i>Pas de données</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression chez les patients (Deutsch et al., 2015) 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression
NAFLD NASH	Modèles Murins	<i>Pas de données</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (souris nourries avec MCD) (Afonso et al., 2015) • Souris Ripk3^{-/-} nourries avec MCD : protection (Afonso et al., 2015; Gautheron et al., 2014) • Souris RIPK3^{-/-} nourries avec HFD : sensibilisation (Roychowdhury et al., 2016) 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression (souris nourries avec MCD) (Afonso et al., 2015)
	Cultures d'hépatocytes humains ou expression dans le tissu hépatique de patients	<i>Pas de données</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'expression chez les patients (Afonso et al., 2015) 	<i>Pas de données</i>

Tableau 3 : Tableau regroupant les diverses études de la nécroptose dans les maladies hépatiques (partie 2/2).

De plus, dans le cadre des études portant sur la NAFLD et la NASH, la diversité des régimes alimentaires disponibles peut induire des différences phénotypiques.

De même, les hépatocytes n'exprimant pas de manière basale la protéine RIPK3, la possibilité d'une mort par nécroptose au sein de ces cellules a été remise en cause. Par ailleurs, l'inhibition de l'apoptose dans les hépatocytes *in vitro* n'induit pas un switch vers une mort nécrotique, mais protège les hépatocytes de la mort cellulaire (Suda et al., 2016). Cependant, *Günther et al.*, ont démontré la possibilité d'une mort par nécroptose impliquant RIPK1 et MLKL mais indépendante de RIPK3 dans un modèle d'hépatite induite par la ConA (Günther et al., 2016).

L'ensemble de ces données démontrent l'importance de la mort cellulaire dans les maladies hépatiques aiguës ou chroniques. De plus, une récente étude menée par *Seehawer et al.*, a démontré que le type de mort cellulaire dans le foie impactait sur le type de cancer développé.

En effet, ils ont montré que lorsque les hépatocytes mouraient par apoptose, les précurseurs des cellules cancéreuses évoluaient en carcinome hépatocellulaire alors que lorsqu'elles mouraient par nécroptose, l'environnement inflammatoire associé à la nécroptose favorisait le développement d'un cholangiocarcinome intrahépatique (CCI) (Seehawer et al., 2018). Cibler de manière thérapeutique la mort cellulaire permettrait de limiter la mort des hépatocytes, l'inflammation, la régénération, la fibrose et la progression de la maladie hépatique.

I.2.5 La protéine RIPK1

a) Rôle de RIPK1 dans la mort cellulaire

La protéine RIPK1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1) est une kinase de la famille des RIP. Elle est composée d'un domaine kinase en N-ter qui lui confère toutes les fonctionnalités d'une sérine/thréonine kinase. Son domaine intermédiaire comprend un motif RHIM (RIP Homotypic Interaction Motif), qui lui permet notamment d'interagir avec la protéine RIPK3 et d'induire la mort cellulaire par nécroptose. Enfin, elle possède un domaine de mort cellulaire en C-ter (Death Domain, [DD]). Le DD est impliqué dans les interactions avec, entre autres, les récepteurs de mort cellulaires (Fas, TNFR, TRAILR) ou certaines protéines présentes au sein des différents complexes comme FADD ou TRADD (Zhang et al., 2010).

RIPK1 est centrale, à la fois dans l'induction de la survie cellulaire par la voie de signalisation du NFκB mais également dans l'induction de l'apoptose, et lorsque celle-ci n'est pas possible, de la nécroptose. Ses fonctions ont été historiquement associées à la mort cellulaire induite par le TNF-α.

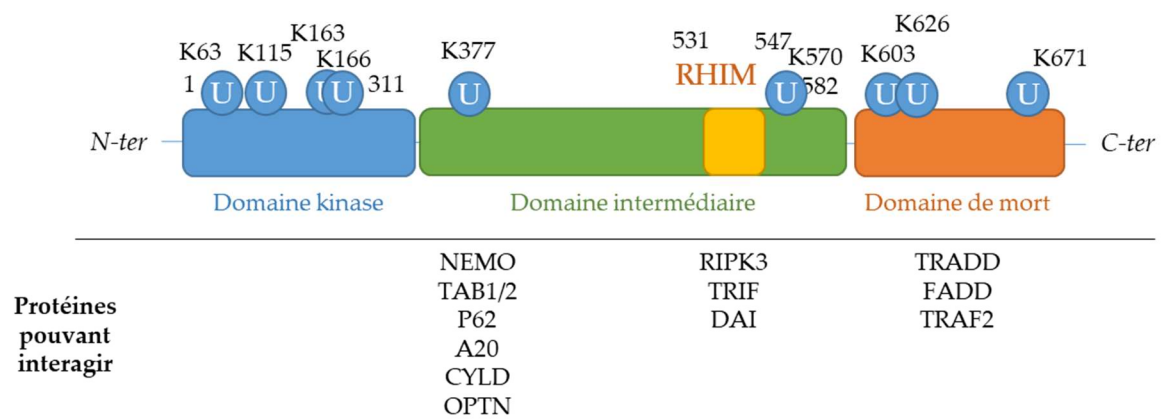


Schéma 9 : Domaines et modifications post-traductionnelles de la protéine RIPK1 (Réalisé à partir de Zhang et al., 2010).

DAI : DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors ; FADD : Fas-Associated protein with Death Domain ; OPTN : Optineurine ; RIPK1/3 : Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1/3 ; TAB1/2 : TGF-beta-activated kinase 1/2 ; TRADD : TNFR1-Associated Death Domain ; TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2 ; TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ;

Dans le complexe I, l'ubiquitination de la protéine RIPK1 par cIAP1 et cIAP2 permet le recrutement des protéines TAK1 (Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1), TAB2/3 (TGF-Beta-Activated kinase) et de LUBAC. LUBAC va ajouter une chaîne d'ubiquitine linéaire de type M1 à l'ubiquitine déjà présente, ce qui va permettre le recrutement des autres composants du complexe I, incluant NEMO et l'activation de la voie de signalisation du NFκB. La translocation nucléaire de NFκB va induire l'expression de gènes liés à la survie cellulaire mais également à l'inflammation (Annibaldi et al., 2018).

L'ubiquitination de RIPK1 sur la Lys115 permet l'assemblage du nécrosome (complexe IIc) (Almagro et al., 2017). RIPK1 est associée avec RIPK3 *via* le domaine RHIM. L'association de ces deux protéines conduit à l'autophosphorylation de RIPK1 qui est alors activée et peut phosphoryler RIPK3. La phosphorylation de RIPK3 induit son activation, le recrutement et la phosphorylation de MLKL pour induire la nécroptose au sein des cellules (Sun et al., 2012). Il a été également démontré que la protéine RIPK1 était ubiquitinylée au sein du nécrosome.

Cette ubiquitination est indépendante de RIPK3 et MLKL et permet de maintenir son activité kinase indispensable à l'induction de la nécroptose (Almagro et al., 2017). Cependant, à l'heure actuelle, la E3-ubiquitine ligase qui serait responsable de cette ubiquitination n'a pas été découverte. L'ensemble des sites potentiels d'ubiquitination de RIPK1 et les protéines connues pour interagir avec RIPK1 sont décrits sur le schéma 9.

b) Rôle de RIPK1 dans les maladies hépatiques chroniques

La protéine RIPK1 possède un rôle essentiel dans la survie cellulaire et dans le maintien de l'homéostasie générale. Elle est indispensable pour le développement embryonnaire de la souris puisque la délétion totale de la protéine RIPK1 chez la souris n'est pas viable (Dillon et al., 2014). Cependant, chez l'Homme, la mutation inactivatrice de la protéine RIPK1 n'induit pas le décès des personnes même si elle provoque une immunodéficience sévère ainsi qu'une inflammation intestinale (Cuchet-Lourenço et al., 2018).

Cependant, des études ont pu être menées *in vivo* par la création de lignées murines transgéniques viables dont le domaine kinase de la protéine RIPK1 est inactif ou muté (Souris RIPK1^{KA5A}, RIPK1^{D138N}). Ces souris présentent une résistance à la mort cellulaire et à l'inflammation induite par le TNF-α, validant la nécessité du domaine kinase actif de RIPK1 dans la signalisation du TNF-α (Newton et al., 2014; Polykratis et al., 2014).

Les souris dont la protéine RIPK1 a été délétée dans les cellules parenchymateuses hépatiques (lignée RIPK1^{LPC-KO}) sont également viables, et possède une fonction hépatique comparable aux souris sauvages (Schneider et al., 2017). Cependant, ces souris sont plus sensibles :

- A l'apoptose induite dans les hépatocytes dans un modèle murin d'induction d'hépatite par l'injection de lipopolysaccharides (LPS), qui est un agoniste du récepteur TLR4. Le LPS va activer massivement les KC et induire le relargage de cytokines pro-inflammatoires, et notamment de TNF- α , qui vont conduire à une hépatite aiguë (Filliol et al., 2017b) ;
- A l'apoptose induite dans les hépatocytes dans un modèle d'hépatite auto-immune (injection de concanavaline A [ConA]). L'injection de ConA aux souris induit l'activation des lymphocytes, des KC et des LSEC, entraîne la libération massive de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- α et l'IFN- γ et provoque une hépatite aiguë (Filliol et al., 2016) ;
- A l'apoptose induite dans les hépatocytes dans un modèle murin d'hépatite par l'injection d'un agoniste de Fas (mAb-Jo2) (Filliol et al., 2017).

Dans un modèle de cancer hépatique chimio-induit, la délétion de la protéine RIPK1 au sein des hépatocytes (RIPK1^{LPC-KO}) diminue la taille et le nombre de tumeurs présentes dans le tissu hépatique après l'injection de DEN (Diethylnitrosamine). Cet effet est dépendant de l'expression du récepteur TNFR1 dont l'expression est augmentée dans les hépatocytes lorsque l'expression de RIPK1 est absente, ce qui permet de réduire le nombre de tumeurs en induisant la mort des hépatocytes et limitent l'accumulation de mutations oncogéniques au sein des hépatocytes (Van et al., 2017). De plus, l'inhibition de l'activité kinase de RIPK1 chez des souris NEMO^{LPC-KO}/RIPK1^{D138N} diminue l'hépatite et la fibrose et prévient la formation de CHC après l'injection de DEN, par comparaison aux souris NEMO^{LPC-KO} (Kondylis et al., 2015). Dans ces modèles, la présence de la protéine RIPK1 active semble favoriser l'apparition et l'expansion tumorale.

Cependant, chez certains patients atteints de CHC, l'expression de RIPK1 a été retrouvée diminuée et a été associée avec un faible taux de survie (Koppe et al., 2016; Schneider et al., 2017). Le rôle de la protéine RIPK1 dans le développement du carcinome hépatocellulaire n'est, pour l'heure, pas élucidé et nécessite des expérimentations supplémentaires.

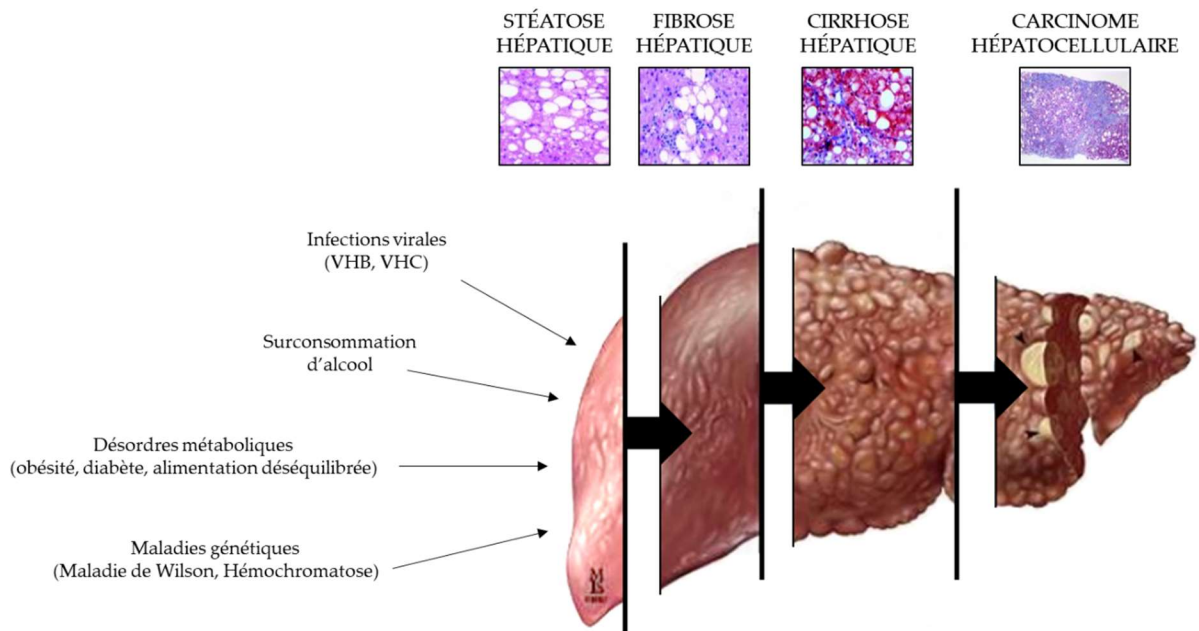


Schéma 10 : Stades de développement du carcinome hépatocellulaire (CHC)

(à partir de Davis et al., 2008 et Zoller and Tilg, 2016).

I.3 Le carcinome hépatocellulaire (CHC)

I.3.1 Généralités sur le CHC

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un cancer primitif du foie. Ces cancers font partie des cancers digestifs les plus agressifs et représentent la 4^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde. Quatre types de cancers primitifs du foie sont décrits :

- Le carcinome hépatocellulaire : il s'agit du cancer hépatique le plus commun et représente entre 85 et 90% des cancers primitifs du foie (Bray et al., 2018). Il se développe généralement à partir des hépatocytes et sur une maladie chronique sous-jacente ;
- Le carcinome fibrolamellaire : il s'agit d'un sous-type de carcinome hépatocellulaire. Il s'agit d'une tumeur plus susceptible d'apparaître chez des sujets de moins de 40 ans et qui n'est généralement pas associée à une infection au virus de l'hépatite B ou C ou à une cirrhose ;
- Le cholangiocarcinome : ce type de cancer primitif du foie est parfois appelé cancer des voies biliaires. Il peut se développer à l'intérieur (cholangiocarcinome intra-hépatique) ou à l'extérieur des canaux biliaires (cholangiocarcinome extra-hépatique). Ce type de cancer primitif du foie est commun chez les patients atteints de cholangite sclérosante primaire ;
- L'angiosarcome (ou hémangiosarcome) : il s'agit d'un type de cancer primitif du foie extrêmement rare qui se développe dans les vaisseaux sanguins hépatiques. Il est le plus souvent diagnostiqué chez des personnes âgées de plus de 70 ans ("Trends in incidence of primary liver cancer subtypes,").

I.3.2 Facteurs de risque du CHC

Le carcinome hépatocellulaire se développe généralement à partir d'hépatopathies chroniques qui peuvent être d'ordre toxiques (alcool ou médicaments), virales (infection au virus de l'hépatite B ou C) ou métaboliques (hémochromatose ou maladie de Wilson). En France, le premier facteur de risque responsable de l'apparition d'un cancer primitif du foie reste la surconsommation d'alcool puis les infections par le virus de l'hépatite C et enfin la stéatohépatite non-alcoolique (NASH). Ces facteurs de risques vont induire une stéatose hépatique qui peut évoluer en fibrose hépatique puis en cirrhose hépatique. Dans plus de 90% des cas, le diagnostic est associé à la présence au préalable d'une cirrhose hépatique (Davis et al., 2008). Les stades de développement de CHC à partir d'une maladie chronique sont développés dans le schéma 10.

L'évolution des modes de vie tels que la sédentarité et les régimes alimentaires hypercaloriques augmentent les risques de développer une obésité, notamment dans les pays développés. L'obésité, l'intolérance à l'insuline et le diabète de type II, ont été démontrés comme étant des facteurs de risque émergents du développement d'un CHC (Zoller and Tilg, 2016). Ces maladies métaboliques favorisent l'apparition d'une stéatose hépatique non alcoolique (NAFL) qui peut progresser vers une stéatohépatite (NASH) qui est elle-même reconnue comme étant un facteur de risque majeur d'apparition de cirrhose hépatique et de carcinome hépatocellulaire. La NAFLD est présente chez 70% des patients diabétiques et chez 45% des patients obèses (Benedict and Zhang, 2017).

I.3.3 Le développement du CHC

Comme mentionné ci-dessus, la stéatose hépatique non alcoolique représente un facteur de risque important de développement du CHC. Elle peut être subdivisée en deux formes :

- La NAFL (Non Alcoholic Fatty Liver) forme légère et généralement non progressive de NAFLD ;
- La NASH (Non Alcoholic Steato Hepatitis ou stéatohépatite non alcoolique) qui représente la forme sévère et qui peut évoluer vers une cirrhose et un CHC.

La NAFLD est caractérisée par une accumulation d'acides gras et de triglycérides dans le tissu hépatique, associée à la présence de lésions hépatocytaires, de ballonnisation hépatocytaire, et parfois de fibrose hépatique. Day et James ont proposé un modèle permettant d'expliquer les mécanismes physiopathologiques du développement de la NAFLD et de son évolution vers le carcinome hépatocellulaire (Day and James, 1998). Ce modèle est décrit ci-dessous.

Les mécanismes de la carcinogenèse induite par un syndrome métabolique (obésité et/ou diabète de type II) ou dans certains cas, par l'infection par le virus de l'hépatite C ont en commun la présence d'une insulino-résistance. En effet, les syndromes métaboliques présentent généralement une dyslipidémie, une hypertension artérielle et une intolérance au glucose.

L'insulino-résistance va d'une part induire une augmentation de la production hépatique de glucose et de triglycérides et d'autre part causer une augmentation de la sécrétion d'insuline. L'augmentation de la production hépatique de glucose et de triglycérides va induire une accumulation d'Acides Gras libres (AG) dans le tissu hépatique et contribuer à l'avancée de la stéatose hépatique (Kawano and Cohen, 2013).

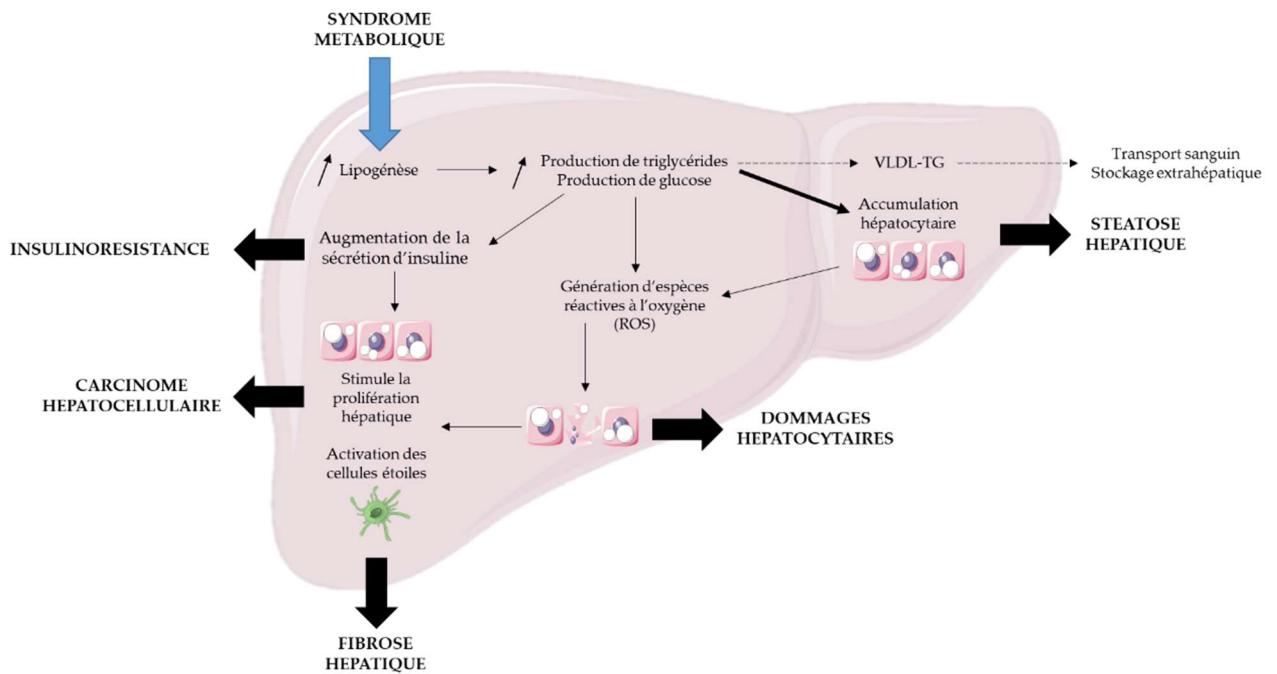


Schéma 11 : Impacts des syndromes métaboliques sur l'avancée de la maladie hépatique.

L'infection chronique par le VHC, induit également l'augmentation de la production de glucose par le tissu hépatique (Negro, 2014). L'augmentation de la sécrétion d'insuline entraîne une augmentation de la fixation de cette molécule sur son récepteur. Ce dernier, fortement exprimé par les hépatocytes, induit l'activation des voies de signalisation de survie et de prolifération cellulaire PI3K/AKT/mTOR (Phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B/Akt) et MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular signal-Regulated Kinase). L'augmentation de la prolifération hépatocytaire va favoriser l'apparition de mutations pro-oncogéniques et de tumeurs hépatiques. De plus, la voie de signalisation MAPK active également d'autres voies cellulaires, comme la voie WNT/ β -caténine, connue pour son rôle dans la fibrose hépatique (Perugorria et al., 2019).

La production et l'accumulation de lipides dans le tissu hépatique induit la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Ces ROS peuvent agir au niveau des mitochondries et engendrer le relargage du cytochrome c *via* une rupture de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le cytochrome c agit sur les hépatocytes en activant la voie apoptotique mitochondriale et contribue aux dommages hépatocytaires, à la fibrose hépatique et à la progression de la maladie (Hirsova et al., 2016). Mais les ROS peuvent également agir sur la voie de signalisation NF κ B, induire une augmentation d'expression d'IKK β et permettre la survie des hépatocytes associée à une réponse hépatique inflammatoire. En effet, les ROS peuvent induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les KC telles que le TNF- α , l'IL-6 (cytokines impliquées dans l'activation de voies de signalisation pro-oncogéniques comme la voie NF κ B), ou encore la leptine (cytokine pro-fibrotique et pro-angiogénique) (Browning and Horton, 2004; Sumida et al., 2013). Les ROS peuvent ainsi participer à l'apparition de mutations pro-oncogéniques et de tumeurs hépatiques (Schéma 11).

D'autres mécanismes ont également été mis en évidence dans la progression de la NAFL vers le cancer :

- Des mécanismes génétiques et épigénétiques : la mutation de certains gènes (induisant la surexpression d'un oncogène par exemple), ou des changements épigénétiques (telles qu'une augmentation de la méthylation, induisant une diminution d'expression de gènes suppresseur de tumeurs par exemple liés à une prolifération excessive des hépatocytes, sont des mécanismes induisant le développement du CHC. Le rôle des micro-ARN (miARN) a été également largement décrit pour leurs impacts sur le développement du CHC. Le miARN le plus décrit étant le mir-122 dont la diminution d'expression induit une augmentation de l'activation des voies de signalisation MAPK et WNT/ β -caténine, deux voies largement décrites pour leur rôle dans la carcinogénèse (de Conti et al., 2017) ;
- Des mécanismes métaboliques : ajouté à la surcharge hépatique en lipides, l'excès de fer retrouvé chez les patients atteints de NAFLD a également été mis en évidence dans la progression de la maladie hépatique. En effet, l'augmentation du taux de fer hépatique amplifie la peroxydation du glutathion et aboutit à la production supplémentaire de ROS (Nelson et al., 2011). Ces ROS vont participer à l'inflammation et aux dommages hépatiques ;
- D'autres mécanismes, liés par exemple aux hormones sexuelles ou encore aux modifications de la flore intestinale sont également à l'étude et pourrait contribuer au développement du CHC.

Tous ces mécanismes conduisent à un état hépatique inflammatoire, stimulent la prolifération hépatocytaire ainsi que la production de matrice extracellulaire et contribuent à l'avancée de la maladie.

I.3.4 Modifications immunitaires durant le développement du CHC

Le système immunitaire joue un rôle important dans le développement des maladies hépatiques et plus particulièrement dans l'apparition et l'expansion des cellules cancéreuses. En effet, certaines populations immunitaires, comme les lymphocytes ou les Natural Killer sont connues pour leurs actions anti-tumorales. D'autres, telles que les LTregs jouent un rôle dans l'évasion des cellules cancéreuses et contribuent à la progression du cancer.

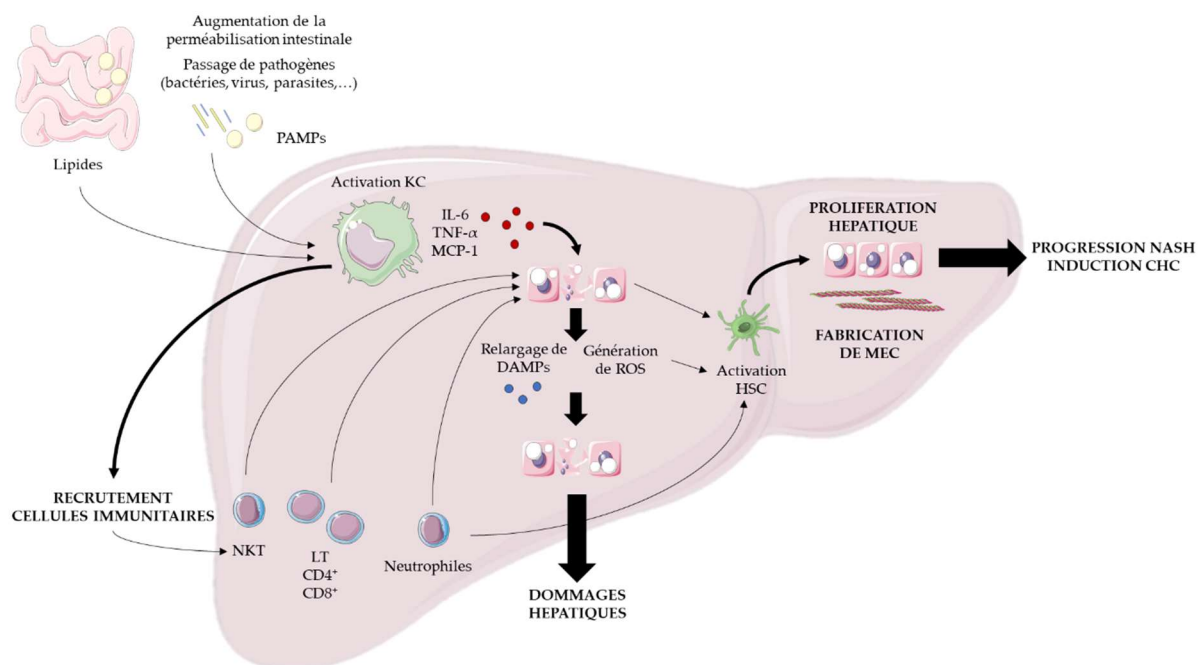


Schéma 12 : Implication des cellules immunitaires dans la progression de la maladie hépatique.

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns ; HSC : Hepatic Stellate Cell ; IL-6 : Interleukine-6 ; KC : Kupffer Cell ; LT : Lymphocytes T ; MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1 ; MEC : Matrice Extracellulaire ; NKT : Natural Killer T cell ; PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns ; ROS : Espèces réactives à l'oxygène ; TNF : Tumor Necrosis Factor.

a) Rôle du système immunitaire dans la progression de la NAFLD au CHC

Au cours de la NAFLD, le système immunitaire résidant, et plus particulièrement les cellules de Kupffer sont sollicitées. Durant la NAFLD, l'excès de lipides et d'acides gras (AG) dans le tissu hépatique induit une lipotoxicité et des dommages hépatocytaires qui vont aboutir au relargage de DAMPs. De plus, les patients atteints de NAFLD présentent une augmentation de la perméabilité intestinale qui induit la présence plus importante de pathogènes. Ces pathogènes (bactéries, virus, parasites et champignons) relarguent des PAMPs dans le sang qui peuvent être détectées par les KC lors de leur passage hépatique (Akira et al., 2006; Ganz and Szabo, 2013).

La présence de DAMPs ou PAMPs va activer des KC. Les KC vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 ou encore CCL-2 et la génération de ROS.

Ces cytokines pro-inflammatoires, associées aux ROS, vont induire des lésions hépatiques. La mort des hépatocytes va stimuler la prolifération des hépatocytes adjacents et également activer les cellules étoilées. Ces cellules vont fabriquer de la matrice extracellulaire (MEC), contribuant à la fibrose hépatique (Houben et al., 2017).

Les chimiokines relarguées par les KC vont permettre le recrutement de leucocytes au sein du tissu hépatique. Les neutrophiles recrutés vont relarguer diverses protéases dont la myéloperoxydase (MPO) qui va induire une perméabilité des mitochondries et la mort des hépatocytes, ainsi que des métalloprotéinases (MMP-9 par exemple) qui peuvent activer les cellules étoilées et engendrer la formation de MEC (Nati et al., 2016). Les lymphocytes T, quant à eux, sont composés de lymphocytes T-CD8⁺, T-CD4⁺ (ou T helper) et des Tregs. Les lymphocytes T-CD8⁺ sont retrouvés augmentés chez les patients atteints de NAFLD ou de NASH. En effet, leur rôle cytotoxique contribue à l'inflammation hépatique et à l'élimination de cellules anormales. Cependant, ils peuvent également interagir avec les hépatocytes et activer la voie de signalisation du NF κ B et permettre leur survie. Les T-CD4⁺ ainsi que les Tregs, sont, quant à eux, retrouvés diminués au cours de la progression de la maladie hépatique. Une étude a démontré que les Tregs, cellules immunosuppressives permettant le contrôle de la réponse immunitaire, étaient sensibles à la présence de ROS. Ces derniers, présents lors d'une inflammation hépatique induisent l'apoptose des Tregs, empêchant ainsi la régulation de la réponse immunitaire pro-inflammatoire, ce qui va aboutir à une amplification des dommages hépatiques induits (Byun and Yi, 2017).

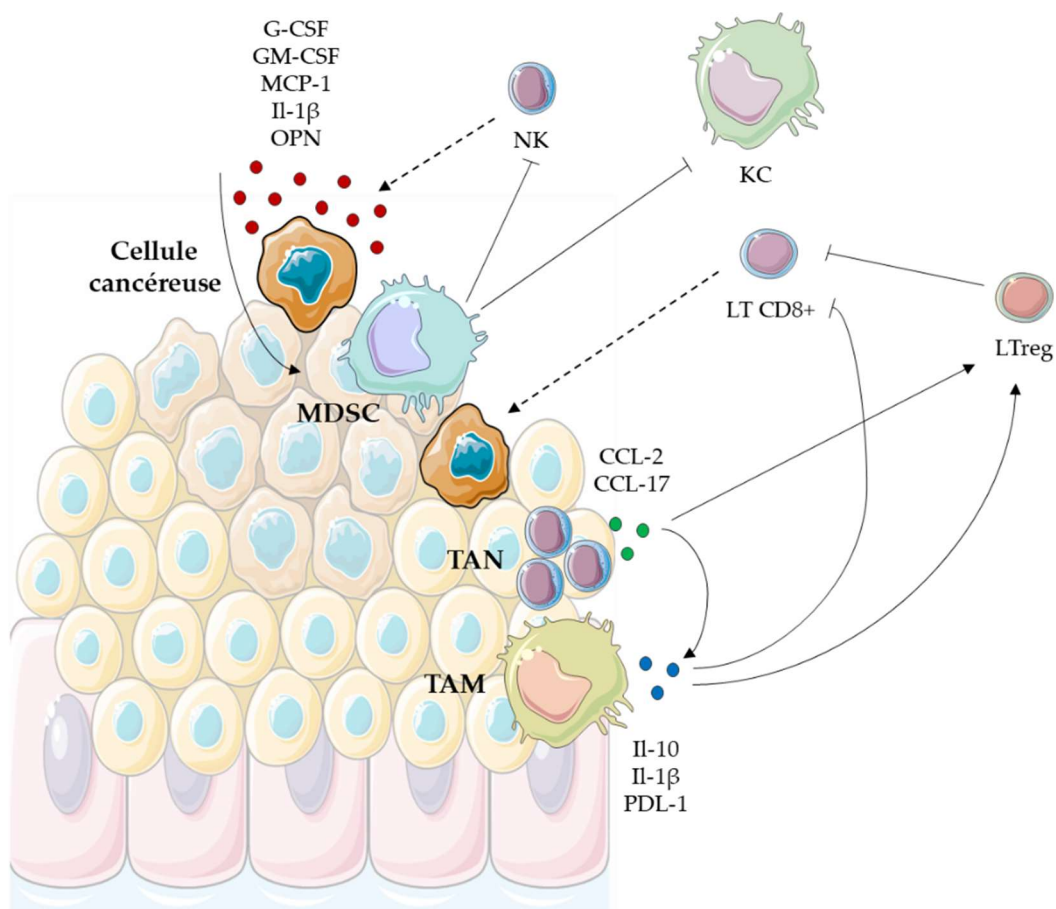


Schéma 13: Stratégies d'évasion des cellules cancéreuses.

CCL-2/17 : C-C Motif Chemokine Ligand 2/17 ; G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor ; GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; KC : Kupffer Cell ; MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells ; NK : Natural Killer cell ; OPN : Ostéopontine ; PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1 ; IL-1 β /10 : Interleukine1 β /10 ; TAN : Tumor-Associated Neutrophil ; TAM : Tumor-Associated Macrophages ;

Les cellules NKT, qui peuvent être activées par la fixation de lipides sur leur marqueur de surface CD1d ou par la présence de cytokines pro-inflammatoires, sont retrouvées généralement diminuées chez les patients atteints de NAFLD. En effet, la présence de lipides en excès provoque leur activation. Une fois activées, les NKT vont relarguer des cytokines pro-inflammatoires et contribuer à l'inflammation hépatique avant de mourir par apoptose (Cai et al., 2019).

Les principaux mécanismes conduisant à la progression de la maladie hépatique sont décrits sur le schéma 12.

b) Rôle du système immunitaire dans la persistance et l'expansion tumorale

L'environnement tumoral est un système complexe, composé à la fois de cellules cancéreuses, de cytokines sécrétées par les cellules tumorales, mais également de MEC et de cellules immunitaires. Cet environnement, favorable à la prolifération tumorale, impacte également les cellules immunitaires et leurs capacités à détruire les cellules défectueuses (Schéma 13).

Les cellules tumorales produisent des cytokines notamment du G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), du GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), CCL-2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2) et d'IL-1 β (Interleukine 1- β) qui vont induire le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-Derived Suppressor Cells [MDSC]).

Les MDSC vont permettre :

- D'inhiber la toxicité des KC et des NK sur les cellules tumorale en induisant l'expression de PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1). Ce ligand peut se fixer sur son récepteur (Programme Death 1, [PD-1]), fortement exprimé par les KC et induire leur anergie ;
- D'activer les Tregs afin d'inhiber les lymphocytes anti-tumoraux et cytotoxiques présents dans le microenvironnement tumoral (Fu et al., 2019).

Les cellules cancéreuses vont également produire de l'ostéopontine (OPN). L'OPN permet l'infiltrat de macrophages associés aux tumeurs dans le stroma (Tumor-Associated Macrophages [TAM]) qui vont sécréter de l'IL-1 β , du PD-L1, cytokines connues pour inhiber l'activation de certaines cellules immunitaires anti-tumorale comme les LT CD8⁺. Elles vont également sécréter de l'IL-10, une cytokine qui permet de recruter et de différencier des lymphocytes naïfs en LTreg et LThelper (Th17), contribuant à l'inhibition des cellules immunitaires anti-tumorales (Capece et al., 2013).

Certains types de lymphocytes peuvent également infiltrer la tumeur : les LT CD8⁺ sont parfois retrouvés dans les tissus cancéreux de certains patients atteints de CHC. Leur présence est généralement associée à un bon pronostic même si leur efficacité à détruire les cellules tumorales peut être compromise. En effet, souvent les tissus cancéreux sont également infiltrés par des LTregs, qui possèdent la capacité d'inhiber la production de granzymes et de perforines secrétées par les NK et LT CD8⁺ et de rendre ainsi ces cellules cytotoxiques inefficaces. Chez des patients atteints de cirrhose ou de CHC, le ratio entre les LT CD8⁺ et LTregs représente un bon marqueur de l'avancée de la maladie hépatique (Ghiringhelli et al., 2006; Prieto et al., 2015).

D'autres cellules immunitaires peuvent également infiltrer la tumeur hépatique. C'est le cas de neutrophiles (Tumor-Associated Neutrophils, [TAN]) qui permettent l'infiltration de TAMs au sein du tissu tumoral ainsi que de Tregs *via* la sécrétion de chimiokines comme le CCL-2 ou le CCL-17. Ils peuvent également induire l'apoptose des cellules LT CD8⁺ qui auraient infiltrées la tumeur dans le but de la détruire. Ces TANs permettent la progression tumorale, mais également l'invasion tumorale et procure une protection tumorale face aux traitements thérapeutiques (Michaeli et al., 2017).

Enfin, même si les cellules NKT représentent une part importante des cellules immunitaires hépatiques, très peu d'études décrivent leurs rôles dans la carcinogénèse. Les NKT peuvent infiltrer les tumeurs hépatiques et remplir un rôle similaire aux LTregs en inhibant les capacités cytotoxiques des LT CD8⁺. Cependant, elles peuvent également exercer des fonctions anti-tumorales et limiter l'apparition de métastases, puisqu'une étude a démontré que l'ablation des NKT invariants dans un modèle murin, cellules majoritaires dans le tissu hépatique, accélère l'apparition tumorale par une activation de la voie Wnt/ β -caténine (Anson et al., 2012).

I.3.5 Traitements du CHC

Le carcinome hépatocellulaire peut être divisé en 3 stades (A, B et C) selon la progression de la maladie d'après la nomenclature de Barcelone (Barcelona-Clinic Liver Cancer, [BCLC]). Le CHC est généralement diagnostiqué à un stade intermédiaire (B) ou tardif (C) ce qui réduit les possibilités thérapeutiques.

Le traitement du CHC peut être curatif ou palliatif. Les traitements curatifs sont peu nombreux et regroupent la transplantation hépatique, la résection tumorale ou l'ablation d'un lobe hépatique.

Ces traitements ne peuvent être réalisés que chez des patients dont le cancer a été diagnostiqué à des stades précoces de développement (stade A) et dont la fonction hépatique reste conservée.

Pour les patients diagnostiqués à des stades intermédiaires (B) ou avancés (C), seuls des traitements palliatifs peuvent être envisagés. Ces derniers comprennent :

- La chimioembolisation transartérielle (TACE) : ce traitement consiste à bloquer la circulation sanguine au sein d'une tumeur en bouchant l'artère qui la relie à la circulation sanguine générale, afin de priver les cellules cancéreuses de nutriments essentiels et induire leur mort. Un traitement chimiothérapeutique peut être injecté en même temps ;
- La radioembolisation transartérielle (TARE) : ce traitement consiste à aller irradier la tumeur directement en passant par les vaisseaux sanguins qui la nourrissent. Utilisé généralement pour des tumeurs inopérables, la dose de radiation ainsi délivrée à la tumeur est largement supérieure à celle distribuée de manière systémique ;
- La thérapie ciblée : dans le cadre du cancer du foie, une seule molécule, le Sorafenib (Nexavar®) est autorisée dans le cadre du traitement du cancer du foie. Le Sorafenib est un inhibiteur de tyrosine kinase qui agit en diminuant la croissance des vaisseaux sanguins qui alimentent la tumeur hépatique. D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase sont actuellement à l'étude telles que le Sunitinib, le Linifanib, le Brivanib, le Tivantinib ou encore le Regorafenib (Kumari et al., 2018).

Le système immunitaire jouant un rôle important dans le développement et la progression du CHC, de nouvelles thérapies, basées sur l'activation d'un système immunitaire efficace dans l'élimination tumorale sont en cours d'études. Plusieurs thérapies, ciblant notamment des molécules immunosuppressives telles que PD-L1 ou CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4) afin de les inactiver et de réactiver la réponse immunitaire sont actuellement en essais cliniques. C'est le cas notamment du Nivolumab, un anticorps monoclonal humain, qui se lie au récepteur PD-1 et bloque son interaction avec ses ligands (PD-L1 et PD-L2), permettant ainsi de potentialiser l'activation des lymphocytes T et d'induire une réponse anti-tumorale (Johnston and Khakoo, 2019).

Les modèles murins permettant l'étude des maladies hépatiques aiguës ou chroniques sont nombreux dans la littérature. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle parfait : chaque modèle est adapté à l'étude d'une pathologie précise et présente ses avantages et inconvénients.

Dans le cadre des maladies hépatiques chroniques et du développement du CHC, divers modèles sont disponibles. Ces modèles peuvent permettre l'étude d'un stade précoce au développement du CHC ou d'étudier le cancer en lui-même. Ils peuvent également être utilisés afin de tester de nouvelles approches thérapeutiques.

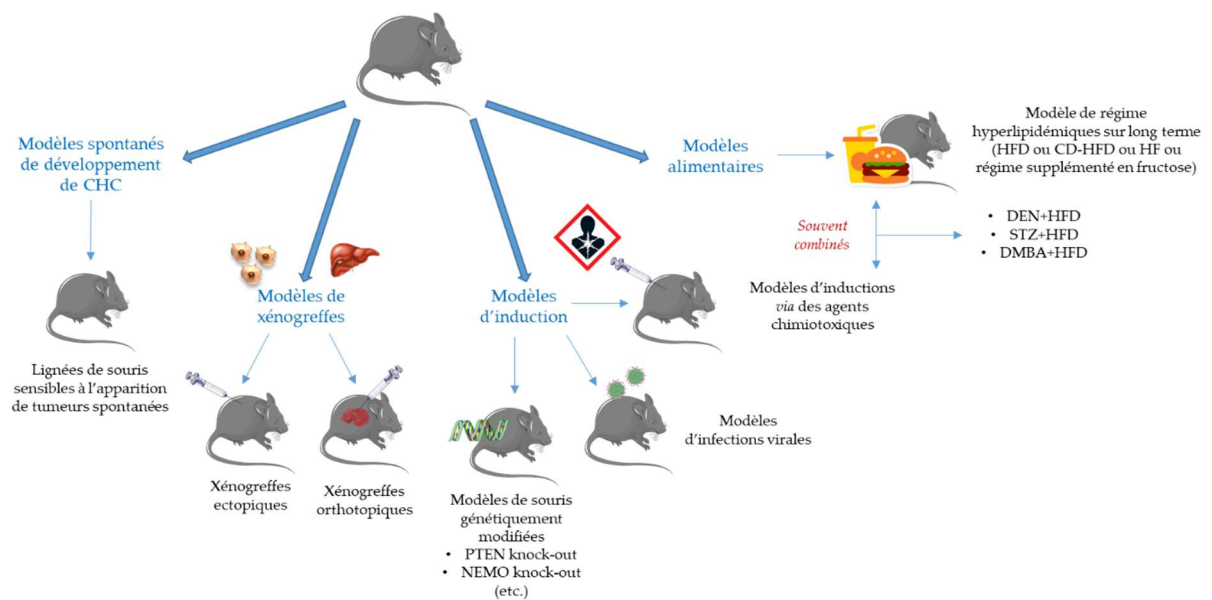


Schéma 14: Principaux modèles murins expérimentaux de carcinome hépatocellulaire (Réalisé à partir de Nakagawa et al., 2015 et Santos et al., 2017).

CD-HFD : Choline-Déficient HFD ; DEN : Diethylnitrosamine ; DMBA : 7,12-dimethylbenzanthracene ; HFD : High-Fat Diet ; NEMO : NF-kB Essential Modulator ; PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog ; STZ : Streptozotocine

I.4 Modèles murins d'étude du carcinome hépatocellulaire

I.4.1 Généralités

A l'heure actuelle, la souris (*mus musculus*) est le modèle le plus utilisé dans la recherche expérimentale et représente à elle seule 59% des animaux utilisés dans l'expérimentation animale en France (données du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation, enquête de 2017).

Diverses lignées de souris peuvent être utilisées dans l'étude du carcinome hépatocellulaire. Certaines lignées, plus sensibles, peuvent développer un CHC naturellement sans intervention, comme les lignées C3H/HeJ ou B6C3F1. Cependant, pour la majorité des lignées de souris existantes, le développement du CHC doit être induit (Hanigan et al., 1988; Maronpot, 2009).

Les modèles d'études du CHC les plus courants peuvent être divisés en trois catégories : une première catégorie regroupant les modèles sans intervention sur la souris. Cette première catégorie regroupe les lignées de souris qui développent spontanément des CHC ainsi que les modèles permettant le développement de tumeurs après modification du régime alimentaire. Une seconde catégorie regroupe les modèles de xénogreffes. Ces modèles consistent en l'injection de cellules issues de lignées de CHC aux souris de manière intrapéritonéales ou sous-cutanées (xénogreffes ectopiques), ou également des cellules ou des fragments de tumeurs hépatiques issues de patients atteints de CHC qui sont directement implantées dans le foie des souris (xénogreffes orthotopiques). Une dernière catégorie de modèles murins d'induction de CHC regroupe tous les modèles animaux nécessitant l'utilisation d'agents carcinogènes (ou agents chimiotoxiques), de virus ou de modèles murins génétiquement modifiés. Les modèles les plus utilisés sont résumés dans le schéma 14 (Nakagawa, 2015; Santos et al., 2017).

I.4.2 Modèles de souris génétiquement modifiés

Les modèles de souris génétiquement modifiées sont aujourd'hui des outils précieux dans l'étude du développement du CHC. Deux catégories de souris génétiquement modifiées peuvent être définies : la première comporte les souris transgéniques et la seconde pour les souris mutantes pour un gène ciblé.

Les souris transgéniques sont des souris dont un segment d'ADN étranger a été incorporé dans leur génome par recombinaison non homologue ou par un vecteur rétroviral. Dans le cadre d'étude du CHC, des protéines virales, comme par exemple la protéine X du virus de l'hépatite B ou la protéine core du virus de l'hépatite C, peuvent être exprimées de manière constitutive. Pour cela, le gène de la protéine d'intérêt est inséré dans le génome d'embryons de souris.

Grâce à ces souris transgéniques, il est également possible d'induire l'expression conditionnelle d'une protéine au sein d'un organe cible. En effet, l'association d'un gène avec le promoteur d'une protéine qui ne s'exprime que dans un organe spécifique (comme par exemple le promoteur de l'albumine pour le foie) permet de n'exprimer la protéine cible que dans l'organe souhaité. Pour les études du CHC, ce système est souvent utilisé pour induire l'expression de proto-oncogènes comme *c-myc* ou *Tgf- α* au sein des hépatocytes murins (Santos et al., 2017).

Les souris mutantes pour un gène ciblé sont des souris dont l'expression d'un gène suppresseur de tumeurs a été inhibée par le biais de la technologie du knock-out ou du knock-in. Ces modèles de souris génétiquement modifiées reposent sur l'utilisation de recombinaisons spécifiques d'un organe cible telle que la *Cre*-recombinase pour le foie (Heindryckx et al., 2009).

Dans l'ensemble de ces modèles, le temps de développement du CHC est généralement supérieur à 12 mois et la fréquence d'apparition tumorale dépend du sexe et de la souche de la souris utilisée, mais surtout du transgène.

I.4.3 Modèles de xénogreffes

Les modèles murins de xénogreffes consistent en l'injection de cellules provenant soit de lignées de carcinomes hépatocellulaires humains soit de tissus tumoraux provenant de biopsies de patients atteints de CHC. Ces injections sont généralement effectuées sur des souris dont le système immunitaire est défaillant, comme les souris athymiques (souris nude) ou des souris présentant un déficit immunitaire combiné sévère (SCID). Différents types de xénogreffes existent :

- Les xénogreffes ectopiques : ces xénogreffes consistent en l'injection de cellules hépatiques tumorales humaines en sous-cutanée ;
- Les xénogreffes orthotopiques : ces xénogreffes consistent en l'injection de cellules hépatiques tumorales directement dans le foie des souris. Ce modèle permet notamment d'observer les capacités de formation de métastases à partir des tumeurs hépatiques (Heindryckx et al., 2009).

L'avantage majeur de l'utilisation de modèles murins de xénogreffes est que le développement de tumeurs est relativement rapide et reste un modèle efficace pour démontrer des preuves de concept lorsque suffisamment de lignées cellulaires sont utilisées.

Ce modèle permet également d'étudier l'effet d'une molécule sur une tumeur hépatique ainsi que la toxicité, l'absorption ou bien la pharmacocinétique de cette molécule sur les cellules tumorales mais également sur les cellules saines lors de xéno greffes orthotopiques (Kelland, 2004). Cependant, les phénotypes tumoraux pouvant varier d'une lignée cellulaire à une autre, ce modèle nécessite de tester diverses lignées de tumeurs hépatiques, augmentant le nombre d'animaux utilisés. Afin de diminuer ce nombre, un modèle de greffes orthotopiques a été inventé. Ce modèle permet d'insérer les cellules tumorales dans un système de fibres creuses. Plusieurs systèmes, contenant diverses lignées cellulaires peuvent ensuite être implantés et récupérés à la fin de l'étude au sein d'une même souris (Li et al., 2008). Enfin, les modèles murins de xéno greffes ne permettent pas d'étudier l'environnement péri-tumoral ou le développement naturel de tumeurs hépatiques ainsi que la réponse immunitaire.

I.4.4 Modèles d'induction par des agents chimiotoxiques

Certains agents chimiotoxiques sont connus pour induire des tumeurs hépatiques lorsqu'ils sont injectés à des doses relativement fortes et de manière répétées. Deux types de composés chimiotoxiques sont connus :

- Les composés génotoxiques qui sont reconnus comme étant des composés capables d'induire des dommages dans la structure de l'ADN. Le diethylnitrosamine (DEN) et le tétrachlorométhane (CCL₄) sont les composés les plus utilisés ;
- Les composés dits « promoteurs » qui ne possèdent pas d'activité génotoxiques mais qui augmente la probabilité de formation tumorale *via* leur activité hépatotoxique (Pitot and Dragan, 1991).

a) Le diethylnitrosamine

Le diethylnitrosamine (DEN) est l'un des agents chimiotoxiques les plus utilisés dans l'induction de carcinomes hépatocellulaires. Cet agent mutagène, tératogène et carcinogène, injecté à des souriceaux de moins de 15 jours de vie, permet le développement d'un cancer du foie entre 26 et 40 semaines (Binato et al., 2008). Les tumeurs hépatiques sont généralement accompagnées de métastases intra-abdominales et pulmonaires (Wang et al., 1992).

Le DEN est hydroxylé en α -hydroxy-nitrosamine à l'aide du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1). L'activité du CYP2E1 va induire la formation de peroxyde d'hydrogène et d'anions superoxydes et engendrer un stress oxydatif au sein du tissu hépatique. Après d'autres modifications supplémentaires, un ion méthyldiazonium est formé : cet ion va induire des dommages à l'ADN en réagissant avec les bases nucléophiles (Henderson et al., 2017).

Au-delà de 15 jours de vie, il doit être combiné avec une autre molécule, comme le phénobarbital, le tétrachlorométhane (CCL₄) ou le N-Nitrosodiméthylamine (NDMA) pour permettre l'apparition d'un cancer. Le DEN peut également être combiné avec un régime hyperlipidémique déficient en choline (High-Fat Deficient Choline Diet, [HFDCD]), et permet l'apparition d'une obésité et d'une résistance à l'insuline dès 12 semaines de régime et le développement de tumeurs hépatiques après 20 semaines (Kishida et al., 2016).

Lorsqu'un traitement au DEN est combiné avec un régime HFDCD, ce modèle possède l'avantage d'être relativement proche de la physiopathologie humaine. Cependant, il induit des mutations au sein des hépatocytes qui ne sont généralement pas retrouvées chez l'homme, comme la mutation H-Ras. De plus, le développement de métastases gastro-intestinales, pulmonaires et de mélanomes, rarement présentes chez l'homme, peut représenter une limite de ce modèle.

b) Le tétrachlorométhane

Le tétrachlorométhane ou tétrachlorure de carbone (CCL₄) est un composé toxique couramment retrouvé dans le milieu industriel. Son ingestion par voie orale chez la souris induit une hépatite aigüe ou chronique selon la dose ingérée. Le CCL₄ est métabolisé par le cytochrome P450 2E1, engendrant la production de ROS qui vont induire une peroxydation lipidique et une mort hépatocytaire par nécrose (Sheweita et al., 2001). De plus, en réponse à la production de ROS, les cellules de Kupffer sont activées et induisent une réponse pro-inflammatoire *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α ou l'IL-6 (Sato et al., 2014). Cette réponse pro-inflammatoire, au-delà de son action cytotoxique directe sur les hépatocytes, va également permettre le recrutement et l'activation de cellules immunitaires telles que les monocytes, les neutrophiles ou encore les lymphocytes, et aggraver les dommages hépatiques.

La répétition de ces agressions va conduire à l'apparition d'une fibrose hépatique et au développement éventuel de CHC. Dans un protocole nécessitant une ingestion trois fois par semaines de CCL₄ aux souris, *Confer et al.*, ont observé le développement de CHC au bout de 25 mois de traitement (Confer and Stenger, 1966). C'est pourquoi généralement, le CCL₄ est combiné avec l'injection de DEN ou de NDMA afin d'accélérer le processus de carcinogénèse (Dragani et al., 1986).

I.4.5 Modèles en lien avec des régimes alimentaires

Chez des patients atteints de NASH, les déséquilibres alimentaires jouent un rôle majeur dans la progression de la maladie. En effet, il a été démontré qu'une alimentation riche en lipides ou en glucides pouvaient permettre une progression plus rapide de la maladie (Toshimitsu et al., 2007). Des modèles murins, basés sur des régimes riches en graisses ou en sucres ont été développés afin de permettre d'étudier l'impact de ces déséquilibres alimentaires sur l'apparition et l'évolution des maladies hépatiques.

Seuls, ces modèles sont généralement utilisés afin d'étudier les stades qui précèdent le développement du carcinome hépatocellulaire comme la NAFLD ou sa forme plus sévère, la NASH ainsi que les maladies métaboliques qui en découlent (diabète, obésité, etc.) (Heydemann, 2016; Takahashi et al., 1999). Le développement spontané d'un carcinome hépatocellulaire nécessite, quant à lui, plus d'une année selon le régime alimentaire choisi. Par exemple, une étude réalisée sur des souris C57Bl/6J a démontré que 50% des souris développaient un CHC après 18 mois de régime enrichi en lipides et contenant un taux moyen de carbohydrates. Dans la même étude, ils ont mis en évidence l'importance des glucides dans le développement du cancer puisque 30% des souris nourries pendant 18 mois avec un régime enrichi en sucres et faibles en lipides développaient un CHC (Tessitore et al., 2017).

Différents types de régimes hyperlipidémiques peuvent être utilisés pour ces études. Les plus couramment utilisés sont les régimes déficients en méthionine et choline (Methionine and Choline Deficient [MCD]), les régimes enrichis en lipides (High-Fat Diet, HFD) et les régimes enrichis en glucides contenant un taux moyen de lipides (Western Diet, [WD]). Le régime MCD, composé de 40% de carbohydrates environ et de seulement 20% de gras, est le régime le plus utilisé pour induire une NASH sévère et reproductible en 8 semaines de régime alimentaire (Machado et al., 2015). Cependant, il reste assez critiqué car il n'induit pas les désordres métaboliques associés à la NASH observés chez l'homme : il n'y a pas d'obésité présente et les souris ne développent pas d'insulinorésistance. Les régimes HFD ou WD, quant à eux, peuvent posséder des compositions variables selon les études et les fournisseurs. Néanmoins, les régimes HFD sont composés d'un taux supérieur à 50% de lipides et de faibles taux de carbohydrates (< à 15%) alors que les WD possèdent un taux élevé en carbohydrates (> à 45%) et un taux moyen de lipides (entre 10 et 20%). Ces deux types de régimes alimentaires permettent le développement à long terme d'une NASH modérée (Mells et al., 2012). Combinés avec certains agents chimiotoxiques, ces régimes alimentaires permettent le développement de carcinomes hépatocellulaires à moyen terme et leurs études.

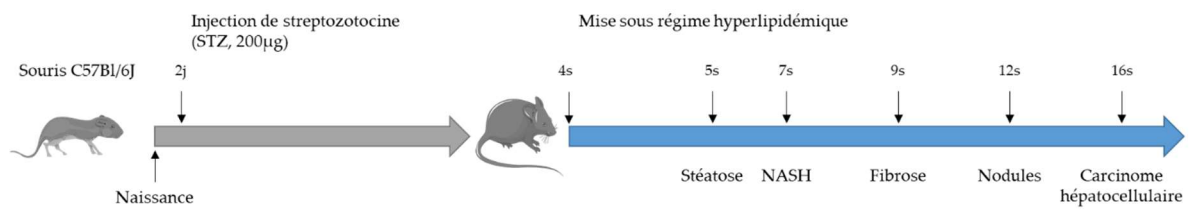


Schéma 15 : Modèle murin de NASH-HCC réalisé par Fujii et al.
 Stéatohépatite non-alcoolique ; STZ : Streptozotocine.

NASH :

Par exemple, l'injection de DEN juste avant la mise en régime MCD permet d'observer le développement de tumeurs hépatiques au bout de 5 mois (contrairement à 18 mois avec le régime seul) (Kishida et al., 2016).

I.4.6 Le modèle NASH-HCC

A l'heure actuelle, peu de modèles murins de développement spontané de carcinome hépatocellulaire existent. Comme précédemment décrits, les modèles les plus courants nécessitent au minimum une année de traitement avant d'observer un éventuel développement de CHC. L'équipe de Fujii a mis au point en 2013 un modèle basé sur des souris C57Bl/6J mâles permettant le développement de CHC en 20 semaines (Fujii et al., 2013). Ce modèle combine l'action de la streptozotocine à un régime hyperlipidémique (voir Schéma 15).

a) Induction d'un diabète de type I via l'action de la streptozotocine

La streptozotocine ou 2-Deoxy-2-([(methylnitrosoamino)carbonyl]amino)-D-glucopyranose (STZ) est un antibiotique à large spectre qui a été isolé pour la première fois en 1960 chez *streptomyces achromogenes*. Ses propriétés diabétogènes ont été identifiées par la suite par l'équipe de Junod (Junod et al., 1967). Depuis, sa toxicité envers les cellules bêta des îlots de Langerhans situées dans le pancréas a été caractérisée dans la littérature (Deeds et al., 2011). Cette molécule entre dans les cellules pancréatiques *via* le transporteur GLUT2. Son accumulation engendre l'alkylation de l'ADN et la génération de ROS qui vont provoquer des dommages à l'ADN. La cellule va activer les poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) afin de réparer l'ADN endommagé. Cette activation va causer une diminution des stocks cellulaires de Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺) et d'Adénosine Triphosphate (ATP) et induire la mort des cellules par nécrose (Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001).

La streptozotocine (STZ) est très couramment utilisée dans l'induction et l'étude du diabète chez la souris ou le rat. Chez certaines lignées de souris, l'injection de faibles doses (40mg/kg) en intrapéritonéale durant 5 jours consécutifs ou d'une seule dose forte (200mg/kg) de STZ permet l'induction d'un diabète de type I (Furman, 2015). Cependant, la réponse à la streptozotocine peut varier selon la lignée et le sexe des souris. En effet, certaines lignées de souris, comme les DAB/2 ou les C57Bl/6, sont connues pour être plus sensibles que d'autres, comme les BALB/c, qui présentent une résistance à la destruction des cellules bêta par la STZ (Gurley et al., 2006).

De plus, les femelles sont également plus résistantes à l'action de la STZ que les mâles : l'œstradiol, hormone présente uniquement chez les femelles, possède la capacité de protéger les cellules bêta de Langerhans de l'apoptose induite par le stress oxydatif engendré par la streptozotocine (Le May et al., 2006).

b) Développement du carcinome hépatocellulaire

Afin de permettre le développement d'un cancer du foie, les souris rendues diabétiques sont placées sous un régime hyperlipidémique *ab libitum* contenant 32% de lipides, 29.4% de glucides et 25% de protéines. L'équipe de Fujii a observé l'apparition d'un foie stéatosique après 1 semaine de régime (5 semaines d'âge), validé par la présence de macrovésicules hépatiques. Ils démontrent également l'apparition d'une NASH dès 3 semaines de régime (7 semaines d'âge) avec la présence de fibres de collagènes dans le tissu hépatique. Des nodules précancéreux sont détectés dès 8 semaines de régime (12 semaines d'âge) et un HCC est présent chez 100% des souris à 12 semaines de régime hyperlipidémique (16 semaines d'âge) (Saito et al., 2017).

Ce modèle récent est de plus en plus utilisé dans l'étude du développement de la NASH et du carcinome hépatocellulaire. Il est de plus plébiscité en raison de sa pertinence vis-à-vis de la physiopathologie humaine. En effet, en plus de l'apparition « spontanée » de tumeurs, les souris de ce modèle présentent :

- Une augmentation des transaminases hépatiques (aspartate aminotransférase [AST] et alanine aminotransférase [ALT]) également retrouvée chez les patients atteints de NAFLD et de NASH (Adams and Ratziu, 2015; Sattar et al., 2014) ;
- Une élévation des taux de triglycérides, cholestérol, lipoprotéine de basse densité (Low-Density Lipoprotein cholesterol, [LDL]) et lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoprotein cholesterol [HFL]), également observée chez les patients atteints de NAFLD et de NASH. Le taux de triglycérides représente également un marqueur de la présence de NAFLD chez les patients. (TOMIZAWA et al., 2014) ;
- Une augmentation de la cytokératine 18 (CK18) plasmatique, nouveau marqueur proposée afin d'identifier la présence de NASH chez les patients (Feldstein et al., 2009).

Des données fournies par le laboratoire qui est à l'origine de ce modèle ont également démontré que les souris répondaient partiellement au Sorafenib, traitement de référence du carcinome hépatocellulaire. Le traitement avec le Sorafenib permet de limiter l'expansion tumorale et améliore la survie des souris (SMC Laboratories Inc.).

Une autre étude sur ce modèle a été réalisée en 2017 et a étudié le profil d'expression des mirARN : l'augmentation de l'expression de certains mirARN tels que les mir93-5p, mir221-3p ou encore mir222-3p, retrouvée dans les CHC murins sont également connus pour être surexprimés dans les CHC humains. Ces mirARN jouent un rôle majeur dans l'activation de certaines voies d'hépatocarcinogénèse telle que la voie du TGF- β , de la voie Wnt/ β -caténine ou encore de la voie ERK (de Conti et al., 2017).

CONTEXTE ET OBJECTIFS

II. Contexte et Objectifs

Ces travaux de thèse étaient consacrés à l'étude de la protéine RIPK1 et de la mort cellulaire par nécroptose induite par le ligand TRAIL dans le développement du carcinome hépatocellulaire.

Le CHC est le cancer primitif du foie le plus fréquent et représente la 4^{ème} cause mondiale de décès par cancer. La maladie hépatique se manifeste par le développement successif de l'inflammation, de fibrose, de cirrhose avant d'aboutir au cancer. La mort des hépatocytes est un élément clé dans l'initiation et la progression de la maladie hépatique : elle induit leur prolifération, permettant ainsi l'apparition de mutations oncogéniques qui favorisent la persistance et l'expansion des cellules cancéreuses. La protéine RIPK1 est une protéine centrale dans les voies de signalisation de mort cellulaire induite par les récepteurs de mort. En effet, cette protéine joue un double rôle, à la fois dans la mort, mais également dans la survie cellulaire. Dans les maladies hépatiques, la fonction de RIPK1 n'est pas totalement élucidée.

Différentes voies de signalisation, activées par les ligands de mort cellulaire, peuvent être impliquées dans la progression des maladies hépatiques. Le ligand TRAIL est un ligand de la superfamille du TNF qui peut induire de l'apoptose mais également de la nécroptose lorsque l'apoptose n'est pas possible. Des études ont démontré que ce ligand pouvait induire spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses sans impacter les cellules saines et présenterait donc un intérêt thérapeutique. Cependant, les cellules cancéreuses sont capables de développer des mécanismes de résistance à l'induction de l'apoptose par TRAIL. Mieux comprendre la signalisation induite par le ligand TRAIL et l'importance de la mort cellulaire dans la progression de la maladie hépatique pourrait permettre à l'avenir le développement de nouvelles thérapies plus efficace face au CHC.

Ces travaux de thèse visaient, d'une part, à mieux caractériser la signalisation nécrotique induite par le ligand TRAIL à l'aide de modèles *in vitro* ainsi que l'importance de la nécroptose dans le développement du CHC. Et d'autre part, de mieux comprendre la fonction de la protéine RIPK1 au cours de la progression de la maladie hépatique, de la stéatohépatite (NASH) au CHC à l'aide d'un modèle *in vivo*.

Ainsi, mes travaux de thèse s'ancraient autour de 3 axes de recherches principaux :

- **Caractérisation du nécrosome au cours de la nécroptose induite par le ligand TRAIL.**

Durant la nécroptose induite par le ligand TRAIL, l'activation du complexe inducteur de mort, le nécrosome composé des protéines RIPK1, RIPK3 et MLKL, conduit à des modifications post-traductionnelles dont l'ubiquitination de RIPK1. Cependant, à l'heure actuelle, la E3-ubiquitine ligase qui contribuerait à maintenir l'activité kinase de RIPK1 n'est pas connue. Les objectifs de ce travail étaient : (i) d'identifier de nouveaux partenaires dans le nécrosome à l'aide d'une étude protéomique et (ii) de caractériser la fonction d'un nouveau partenaire découvert au cours de cette étude, TRIM21, une E3-ubiquitine ligase, dans la nécroptose induite par TRAIL. Ces travaux font l'objet d'un article *en préparation*.

- **Etude de l'impact du régime alimentaire sur le développement du CHC.**

Le modèle NASH-HCC représente un modèle murin pertinent permettant l'étude de la progression de la maladie hépatique de la NAFLD à la NASH jusqu'à l'apparition d'un cancer. Après la mise en place de ce modèle au sein de l'unité, les objectifs de ce projet consistaient en : (i) l'étude de l'impact de la composition du régime hyperlipidique en lipides, glucides et protéines sur le développement de la stéatose, de la NASH et sur le développement du CHC et (ii) déterminer l'importance du régime alimentaire sur la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces travaux font l'objet d'un article *soumis pour publication*.

L'étude du rôle de la protéine RIPK1 dans le développement du CHC a été envisagée, mais n'a pas pu aboutir dans le temps imparti. Le sujet sera abordé dans la discussion.

- **Rôle de la protéine RIPK1 dans le développement de la NASH.**

Afin d'étudier l'importance de la protéine RIPK1 dans le développement de la NASH, des souris issues d'une lignée transgénique dont l'expression de RIPK1 a été invalidée dans les cellules du parenchyme hépatique (lignée RIPK1^{LPC-KO}) ont été nourries avec un régime hyperlipidique (HFHCD) reconnu pour induire une NASH sévère. L'objectif principal de ce projet était de déterminer le rôle de la protéine RIPK1 au cours de la progression de la maladie hépatique, de la stéatose, à la fibrose et à la stéatohépatite. Ces travaux sont présentés dans un article *en cours de préparation*.

RESULTATS

Article n°1

TRIM21 est un nouveau partenaire du nécrosome dans la nécroptose induite par le ligand TRAIL

Mélanie Simoes Eugénio^{*1,3}, Florence Faurez^{*1,3}, Ghania H. Kara-Ali^{1,3}, Mélanie Lagarrigue^{2,4}, Marion C. Bonnet^{1,3}, Sandrine Jouan-Lanhouet^{1,3}, Isabelle Gallais^{1,3}, Emmanuelle Com^{2,4}, Charles Pineau^{2,4}, Jacques Le Seyec^{\$1,3}, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{\$#1,3}.

Article en préparation.

Le ligand TRAIL fait partie de la superfamille du TNF et joue un rôle dans l'induction de l'apoptose ou de la nécroptose. La fixation de TRAIL sur ses récepteurs agonistes (TRAIL-R1 ou TRAIL-R2), induit la formation d'un complexe de signalisation primaire inducteur de mort cellulaire ainsi que le recrutement des protéines FADD, RIPK1 et de la Caspase-8. En cas d'inhibition de l'activité des caspases, la fixation de TRAIL sur son récepteur induit la formation du nécrosome, le recrutement des protéines FADD, RIPK1, RIPK3 et MLKL et l'induction de la mort cellulaire par nécroptose. A l'heure actuelle, l'ensemble des mécanismes moléculaires permettant d'induire la nécroptose ne sont pas élucidés. Notamment, la protéine RIPK1 semble subir des modifications post-traductionnelles (ubiquitinations) démontrant la présence d'autres protéines, encore inconnues, dans le complexe nécrotique.

Ce travail consistait en l'étude de nouveaux partenaires du nécrosome dans la nécroptose induite par le ligand TRAIL *in vitro* à l'aide des lignées cellules HT29 (lignée cancéreuse de cancer colorectal) et HaCat (lignée de kératinocytes transformés).

Principaux résultats :

- L'analyse en spectrométrie de masse de la composition du nécrosome après induction de la nécroptose induite par le TRAIL a mis en évidence la présence d'un nouveau partenaire : la E3-ligase TRIM21 ;
- L'invalidation génique par ARN interférence ou CRISPR-Cas9 de l'expression de TRIM21 ainsi que la surexpression de cette protéine ont défini le rôle de modulateur positif de TRIM21 dans la nécroptose induite par le ligand TRAIL ;
- Une analyse en cinétique a permis de démontrer que l'absence de TRIM21 dans les cellules induisait un retard et une diminution du signal nécroptotique.

Article n°1

**Proteomic analysis identifies TRIM21 as a new component
of TRAIL-induced endogenous necrosome complex**

Mélanie Simoes Eugénio^{*1,3}, Florence Faurez^{*1,3}, Ghania H. Kara-Ali^{1,3}, Mélanie Lagarrigue^{2,4}, Marion C. Bonnet^{1,3}, Sandrine Jouan-Lanhouet^{1,3}, Isabelle Gallais^{1,3},
Emmanuelle Com^{2,4}, Charles Pineau^{2,4}, Jacques Le Seyec^{\$1,3},
Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{\$#1,3}.

Article en préparation

TRIM21 is a new component of TRAIL-induced endogenous necrosome complex and a positive modulator of necroptosis

Mélanie Simoes Eugénio^{*1,3}, Florence Faurez^{*1,3}, Ghania H. Kara-Ali^{1,3}, Mélanie Lagarrigue^{2,4}, Marion C. Bonnet^{1,3}, Sandrine Jouan-Lanhouet^{1,3}, Isabelle Gallais^{1,3}, Emmanuelle Com^{2,4}, Charles Pineau^{2,4}, Jacques Le Seyec^{§1,3}, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{§#1,3}.

¹ INSERM UMR1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail, F-35043 Rennes, France

² Protim, INSERM UMR1085, IRSET, Campus de Beaulieu, Rennes, 35042, France

³ Biosit UMS3080, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

⁴ Biogenouest, Core facility network in western France

* These authors contributed equally to this work

§ These authors share senior authorship

Corresponding author: e-mail: marie-therese.boitrel@univ-rennes1.fr ; tel: +33 2 23 23 48 99 and jaques.leseyec@univ-rennes1.fr ; tel : +33 2 23 23 48 62

ABSTRACT

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a well-known apoptosis inducer and a potential anticancer agent. When caspases and IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) are inhibited, TRAIL can induce necroptosis. While apoptosis is depended on caspase activation, necroptosis, another form of regulated cell death, depends on the kinase activation following the formation of a cytosolic necrosome complex, of the Receptor-Interacting Protein Kinase 1 and 3 (RIPK1, RIPK3), and the Mixed lineage kinase domain like protein (MLKL). Understanding the molecular mechanisms involved in TRAIL-induced necroptosis might provide new insights into TRAIL death signaling pathway. Here, thanks to mass spectrometry analysis, we identified TRIM21 (Tripartite Motif Containing 21) as a new partner of endogenous necrosome during TRAIL-induced necroptosis. In order to understand the role of this protein in TRAIL-induced necroptosis, a transient transfection with TRIM21-targeted siRNAs or cDNA plasmid coding for TRIM21 in HT29 or HaCat cells demonstrated that TRIM21 is a positive regulator of this pathway. Furthermore, the invalidation of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR-Cas9 technology showed a decrease in TRAIL-induced necroptosis, linked to a decrease in phosphorylation of RIPK1 and RIPK3, as well as the phosphorylation of MLKL, the executioner of necroptosis. Altogether, these data confirmed the positive and new regulator role of TRIM21 in TRAIL-induced necroptosis.

KEYWORDS

RIPK3-dependent necrosome; mass spectrometry; TRAIL; TRIM21

INTRODUCTION

The Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) belongs to the TNF superfamily ligands. These ligands bind to their cognate Death Receptors (DRs) to activate the extrinsic death pathway. In particular, TRAIL binds to DR4 and DR5, resulting in the formation of a primary membrane-associated complex leading to caspase-8 or -10 activation and cell death by apoptosis [1]. Apart from the induction of apoptosis, TRAIL can trigger necroptosis, a caspase-independent cell death [2-4]. Several years ago, a secondary cytoplasmic signaling complex following TRAIL binding to DR4 and DR5 was described and related to MAP kinases and NF- κ B pathway activation [5]. More recently, progress on the understanding of TRAIL-induced signaling pointed out that TRAIL triggers the formation of two complexes I and II, that control the cell outcome towards cell death by apoptosis, cell death by necroptosis, or gene activation (for review, see [7]). In a comparable way to TNF-induced necroptosis signaling (8), necroptosis induced by TRAIL is characterized by the formation of a stable cytosolic complex termed necrosome, comprised among others of RIPK1 and RIPK3, MLKL, Fas-associated with death domain protein (FADD) and caspase-8 [9].

The activation of MAP kinases and NF- κ B pathway by TRAIL can promote cell survival and proliferation but induce a pro-inflammatory setting which could be beneficial for tumor cells (for review, see [6]). However, tumor cells express high levels of TRAIL receptors thus enhancing their sensibility to TRAIL-induced death. TRAIL seems to be a very interesting tool for cancer therapy since it selectively induces cell death in cancer cells, while sparing normal cells in vitro and in vivo [10, 11]. However, a number of cancer cells are resistant to TRAIL-induced death, related to the high expression of anti-apoptotic factors (for review see [12]).

Among anti-apoptotic factors, inhibitors of apoptosis (IAPs) are known to regulate the balance between apoptosis and necroptosis (for review [13]). Several SMs have been developed to sensitize resistant cancer cells to apoptosis by inhibiting cIAP1 (cellular IAP1), cIAP2 and XIAP (X-linked IAP). Specifically, SMs alone sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [14] whereas a combination of TRAIL with SMs and z-VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor, activates necroptosis [15]. This has been shown, for example, with Birinapant, a SM with a pan-IAP antagonist activity targeting cIAP1/2 and XIAP, which increases TRAIL cytotoxicity independently of TNF- α in breast cancer cells [16]. In order to better characterize the necroptotic death signal induced by TRAIL, we used the combination of TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB) as a necroptotic trigger in human HT29 colon cancer cells [15]. Affinity purification combined with mass spectrometry (AP-MS) analysis of the TRAIL-induced

endogenous RIPK3-dependent necrosome protein complex showed the presence of the known interactors RIPK3, RIPK1, MLKL, FADD and caspase-8, and put in evidence a new partner, TRIM21 (Tripartite Motif Containing 21), an E3-ubiquitin ligase. The presence of TRIM21 was furthermore confirmed in the endogenous necrosome by immunoprecipitation. Moreover, by using RNA interference and CRISPR-Cas9 technology, TRIM21 expression was abolished and conferred cell resistance to TRAIL-induced necroptosis. On the contrary, overexpression of TRIM21 lead to an increase in TRAIL-induced cell death sensitivity, highlighting the positive and specific function of TRIM21 in the regulation of TRAIL-induced necroptosis.

RESULTS

Treatment with TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB) induces RIPK1/RIPK3/MLKL-dependent necroptosis in human HT29 colon carcinoma cells

TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB) induced necroptosis in a time-dependent manner as shown by the increased percentage of necroptotic cells (~65% after 8 h of treatment) and the increased ATP depletion (~60% after 8 h of treatment) compared to non-treated (NT) cells (Figure 1A, left and right panels). Furthermore, TzB-dependent death was inhibited by both necrostatin-1 (Nec-1), a RIPK1 inhibitor [21], and necrosulfosamide (NSA), an inhibitor of RIPK3-MLKL interaction [22] (Figure 1B), and also inhibited by siRNA mediated silencing of RIPK1 or RIPK3 expression (Figure 1C). These results showed that TzB-treatment induces RIPK1/RIPK3/MLKL-dependent necroptosis in HT29 cells.

Besides, blocking TRAIL death receptors by antagonistic antibodies against DR4 and DR5 (aDR4/aDR5), led to the inhibition of TzB-induced necroptosis. Treatment with SM is known to lead to TNF secretion which could contribute to cell death induction via an autocrine/paracrine loop [23, 24]. However, TzB-induced necroptosis was not inhibited by etanercept, a TNF inhibitor. This inhibitor was nevertheless able to inhibit necroptosis induced by TNF/zVAD/Birinapant (Figure 1D). These results indicate that TRAIL-induced necroptosis in HT29 cells is dependent on death signaling via DR4 and DR5 but independent of TNF.

Mass spectrometry analysis of endogenous TRAIL-induced RIPK3-dependent necrosome identifies TRIM21 as a new component

In order to investigate TRAIL-induced necrosome, cytoplasmic extracts from HT29 cells were immunoprecipitated using an anti-RIPK1 antibody after 2 h, 3 h and 4 h of TzB stimulation. Immunoblot analysis showed an interaction of endogenous RIPK3 with RIPK1 upon TzB-induced necroptosis. Interestingly, an up-shift of RIPK3 was observed, with a peak at 3 h (Figure 2A) suggesting RIPK3 phosphorylation as previously described upon TNF/SM/zVAD treatment [15]. This was confirmed by immunoprecipitation using an anti-RIPK3 antibody, which showed a strong interaction of RIPK1 with RIPK3 at 3 h. An up-shift of RIPK3 and upper bands for RIPK1 were also observed in RIPK3 immunoprecipitate at 3 h (Figure 2A) suggesting RIPK3 phosphorylation and post-translational modifications of RIPK1 upon TzB-induced necroptosis.

Immunoprecipitation using anti-RIPK3 antibody was used to characterize by mass spectrometry protein interactors of endogenous RIPK3 at 0 h and 3 h post-stimulation with TzB treatment. Based on the model of RIPK3 oligomerization by RIPK1 in response to receptor signaling [25], for each time point, we pooled eight RIPK3 immunoprecipitates which were analyzed by LC-MS/MS. Proteins identified for each condition were compared by spectral count label-free quantification. We detected the presence of RIPK3 and MLKL peptides at time point 0 h (Figure 2B) which corroborated the results showing basal level association between RIPK3 and its substrate MLKL [22]. Detection of RIPK1, FADD and caspase 8 was only observed at time 3 h and suggested a RIPK3-dependent necrosome formation upon TzB treatment in HT29 cells. None of these proteins have been found in the IgG control immunoprecipitate (Figure 2B) (see Table EV1 for peptide and protein identification).

Interestingly, our data identified for the first time the presence of TRIM21 peptide in RIPK3 immunoprecipitate at time point 0 h. Spectral count quantification revealed a significant increase in the abundance of TRIM21 at time point 3 h (Figure 2B) suggesting increased recruitment of TRIM21 in RIPK3-dependent necrosome upon TzB stimulation.

TRIM21 is recruited to the endogenous cytosolic RIPK3-dependent necrosome upon TzB treatment

To corroborate the recruitment of TRIM21 into the RIPK3-dependent necrosome, HT29 cells were treated with TzB at different time points followed by immunoprecipitation using an anti-RIPK3 antibody. As shown in Figure 3, low level of TRIM21 was detected at time point 0 h and the amount of TRIM21 increased in a time-dependent manner in the RIPK3-dependent complex upon TzB treatment. This confirms that TRIM21 is a new partner of the RIPK3-dependent necrosome complex and supports the proteomic data (Figure 2B). We also confirmed that MLKL and RIPK3 were pre-associated at time point 0 h, as suggested by the proteomic analysis and previous study [22]. Moreover, an up-shift of RIPK3 was observed after 2 h of treatment and persisted up to 4 h post-stimulation (Figure 3), suggesting RIPK3 phosphorylation as previously shown after TNF/Smac mimetic/zVAD stimulation in HT29 cells [8]. In parallel, the phosphorylation of MLKL was increased upon necroptosis induction from 2 h to 4 h after TzB treatment as showed by P-MLKL antibody. In the corresponding lysates (input), a time-dependent increased phosphorylation of MLKL was also observed from 2 h to 4 h. Upper bands were also observed for RIPK1 from 2 h to 4 h after TzB treatment suggesting a post-translational modifications of RIPK1 (Figure 3). Altogether, these data showed for the first time the formation of RIPK3-dependent endogenous necrosome complex upon TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant treatment in HT29 cells with the presence of RIPK1, MLKL, FADD, caspase-8 and TRIM21.

TRIM21 is a positive regulator of TzB-induced necroptosis in HT29 and HaCat cells

To further understand the role of the new necrosome component TRIM21 in the TRAIL-induced necroptosis pathway, we used two different cell lines, human HT29 colon cancer cells and human HaCat immortalized keratinocytes. First, small interfering RNA was used to decrease TRIM21 expression. Transient transfection with TRIM21 targeted siRNA, reduced the expression of the protein, but did not alter RIPK1, RIPK3 or MLKL protein expression in HT29 and HaCat cells (Figure 4A). The reduced expression of TRIM21 significantly decreased necroptotic cell death induced by TzB treatment and obviously increased both HT29 and HaCat viability (Figure 4B, C, respectively). On the other hand, transfection with a plasmid coding for TRIM21 tagged with GST (pTRIM21-GST) was used to overexpress TRIM21 in HT29 and HaCat cells. Transient transfections with pTRIM21-GST induced the expression of TRIM21-

GST in HT29 and HaCat cells (Figure 5A) without modifying the expressions of endogenous TRIM21, RIPK1, RIPK3 or MLKL (Figure 5A). TRIM21 overexpression significantly sensitized both HT29 and HaCat cells to TzB treatment (Figures 5B, C, respectively). Altogether, these data showed that TRIM21 is a new positive modulator of TRAIL-induced necroptosis.

CRISPR/Cas9 mediated TRIM21 knockout in HT29 cells confirms that TRIM21 is a positive and specific modulator of TzB-induced necroptosis.

For TRIM21-KO cells studies, human HT29 cells were transfected with two distinct CRISPR-Cas9 sgRNA-lentiviral constructs to minimize the risk of off-target effects, which can compromise specificity. Western blot analysis validated the complete loss of TRIM21 expression in HT29 TRIM21-KO cells as compared to HT29 wild-type (WT) cells. No change in expression of RIPK1, RIPK3 or MLKL was observed in HT29 TRIM21-KO cells (Figure 6A).

The loss of TRIM21 significantly decreased necroptotic cells death (propidium iodide positive cells) in HT29 TRIM21-KO cells in comparison to the HT29 WT cells after TzB treatment (Figure 6B, C, respectively), confirming previous results shown with TRIM21 targeted siRNA (Figure 4B, C). In addition, transient transfection of pTRIM21-GFP in HT29 TRIM21-KO cells rendered these cells more sensitive to TzB-induced necroptosis, rescuing the WT sensitive phenotype and further validating TRIM21 as a positive modulator of this cell death pathway (Figure 6D). Interestingly, TRIM21 was a specific and positive regulator only of TzB-induced necroptosis. Moreover, the loss of TRIM21 expression did not affect the sensitivity of HT29 TRIM21-KO cells to apoptosis induced by the combination of Birinapant (Bp) with TRAIL, Ig-FasL or TNF, nor to necroptosis induced by zVAD/Bp with TNF or Ig-FasL (Supplementary Figure 1A, B).

In order to characterize the impact of TRIM21 loss in HT29 cells, the TzB-induced necroptosis cell death was followed using SytoxGreen dye in kinetics in both HT29 TRIM21-KO and WT cells (Figure 7A). SytoxGreen intensity was quantified by immunofluorescence imaging using Incucyte technology. In Figure 7A, HT29 WT cells began to die by necroptosis at 2 h with a maximum of SytoxGreen intensity (1.5×10^8) reached at 6 h after TzB treatment, whereas HT29 TRIM21-KO cells began to die around 3 h, with a 3 times lower level of SytoxGreen intensity (5.0×10^7) reached at 6 h, showing a delay and an inhibition of the necroptotic death signal. In

parallel, western blot analysis showed that, after TzB treatment, an important decrease in phosphorylation of RIPK1, RIPK3 and MLKL as well as a delay in phosphorylation of MLKL were observed in HT29 TRIM21-KO cells in comparison with HT29 WT cells (Figure 7B). In fact, after TzB treatment, phosphorylation of MLKL was detected from 3 h to 5 h in HT29 WT cells, whereas only low level of P-MLKL was observed from 4 h to 5 h in HT29 TRIM21-KO cells. Altogether, these data suggest that TRIM21 is a positive and specific regulator of TzB necroptotic cell death pathway by regulating phosphorylation levels of the two serine-threonine kinases RIPK1 and RIPK3 as well as the pseudokinase MLKL, indispensable for the induction of necroptosis.

DISCUSSION

TRAIL is a potential anticancer drug that can induce apoptosis or necroptosis depending on the cell conditions [9]. A lot of hope has been put on TRAIL to fight carcinomas, but cancer cells have developed several molecular mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis [12]. New strategies are proposed to force cancer cells into undergoing apoptosis induced by TRAIL based on new TRAIL receptor agonists or sensitizers [26]. Another way to overcome apoptosis resistance is to induce necroptosis, a backup cell death pathway that can be induced when apoptosis cannot take place [27]. A better knowledge of the TRAIL-induced necroptosis signaling could improve cancer treatment based on this death ligand from the TNF superfamily.

In this work, TRAIL treatment in combination with z-VAD-fmk (a pan-caspase inhibitor) and Birinapant (a pan-IAP inhibitor) (TzB) was used to induce necroptosis in HT29 cells as previously described by He et al. [15]. We demonstrated that this necroptotic death pathway is triggered via TRAIL death receptors (DR4 and DR5) and is dependent on RIPK1, RIPK3 and MLKL, but independent of TNF signaling, showing that this necroptotic pathway is specific of TRAIL and may be useful to characterize protein interactors into the necrosome. First, experiments of co-immunoprecipitation of RIPK3 with RIPK1 demonstrated that both of these serine-threonine kinases bind to each other upon TzB-induced necroptosis with a strong interaction of RIPK1 with RIPK3 at 3 h post-treatment. This time point was used thereafter to characterize by proteomics the protein interactors of the endogenous necrosome induced by TzB in HT29 cells and immunoprecipitated with an antibody anti-RIPK3 [25]. In fact, in the past years, the protein composition of the necrosome has mainly been studied in response to TNF. Notably, several RIPK3 interactors in TNF-induced necroptosis have been identified with

exogenous expression of tagged-RIPK3 in different cell lines (HEK293, NIH3T3 or L929-RIPK3^{-/-} cells) [28-31]. Here, we characterized for the first time by mass spectrometry proteins present into the endogenous necrosome complex immunoprecipitated with an anti-RIPK3 antibody upon TzB treatment. Three hours post-stimulation with TzB, known constituents of necrosome complex such as RIPK1, FADD, caspase-8 and MLKL were identified in the anti-RIPK3 immunoprecipitate. More interestingly, a new protein in the RIPK3-dependent necrosome, TRIM21, was also put in evidence. TRIM21 (also known as Ro52) belongs to the RING E3 ligases family of tripartite motif (TRIM) proteins [32] that functions in the process of ubiquitination regulating multiple proteins important in the cell cycle (p27) [33], viral immune response (FADD, IRF7) [34] and apoptosis (Bcl-2, c-FLIP) [35, 36]. In particular, TRIM21 has been shown to antagonize the anti-apoptotic effect of GSK3 β sensitizing non-small cell lung cancer H1299 cells to TRAIL-induced apoptosis [37]. However, nothing is known about the role of TRIM21 in TRAIL-induced necroptotic pathway.

Among others interactors found in the endogenous RIP3-dependent necrosome, phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5), HS90B (Heat shock protein 90-beta), TNF Receptor-Associated Factor 2 (TRAF2) and TNF-receptor-associated death domain protein (TRADD) peptides were detected in RIPK3 immunoprecipitate at time point 3 h (Figure 2B and Table EV1). A study showed that phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5) may play a role in TNF/Smac mimetic/zVAD-induced necroptosis via its recruitment to the necrosome by RIPK3, leading to mitochondrial fragmentation and ROS production [30]. HSP90 and its cochaperone CDC37 were characterized in HA-Flag-tagged RIPK3 after TNF/Smac mimetic/zVAD in HT29 cells and were required for RIPK3 activation and necroptosis induction [38]. TNF Receptor-Associated Factor 2 (TRAF2) was shown to be constitutively associated with MLKL and to act as a suppressor of TNF-induced necroptosis [39] and TRAIL-induced necroptosis [40]. As for TRADD, it has been shown to protect MEFs from TRAIL-induced apoptosis by limiting FADD binding to the TRAIL receptor and favoring RIPK1 recruitment to the TRAIL receptor complex [41]. Nonetheless, further studies are needed for a better understanding of the role of PGAM5, HSP90B, TRAF2 or TRADD in TRAIL/zVAD/Birinapant-induced necroptosis. However, we did not identify peptides of other known RIPK3 interactors such as Ppm1b [31], PYGL, GLUD1 and GLUL [29]. These proteins may have been in too of a small amounts to be identified at time point 3 h. Or, in the case of PYGL, GLUD1 and GLUL, these proteins have been characterized in Flag-tagged-RIPK3 complex after 2 h of TNF/zVAD stimulation in NIH3T3 cells and could be specific of this necroptotic pathway or of this murine cell line [29].

The recruitment of TRIM21 into the RIPK3-dependent necrosome was confirmed in a kinetic experiment of TzB-induced necroptosis. Besides RIPK1, FADD, caspase-8 and MLKL, TRIM21 was detected in the RIPK3-dependent necrosome. A low level of TRIM21 was found at time point 0 min and increased from 2 h to 4 h post-treatment with TzB, confirming the recruitment of TRIM21 into the necrosome. Presently, we did not characterize the specific interactor of TRIM21 into the necrosome. It is well known that TRIM21 can interact with numerous proteins. FADD has been shown to interact with TRIM21 to negatively regulate virus-induced interferon production but this interaction may not affect Fas-induced apoptosis [34]. This suggests that specific interaction of TRIM21 with a particular partner of the necrosome could regulate the TRAIL/zVAD/Bp necroptotic signal. Possible candidates are RIPK1 and RIPK3 which are known to be ubiquitinated during TRAIL-induced cell death [7].

To further characterize the role of TRIM21 in TzB-induced necroptosis, experiments of RNA interference to downregulate TRIM21 and of human TRIM21 cDNA transfection to overexpress TRIM21, were used in two human cell lines HT29 (colon cancer cells) and HaCat (immortalized keratinocyte cells). Both cell lines express RIPK1, RIPK3 and MLKL, and can respond to a necroptotic stimulus such as TzB. Downregulation or overexpression of TRIM21 in both cell lines showed a decrease or an increase in the percentage of necroptotic cells respectively, suggesting that TRIM21 is a positive modulator of TzB-induced necroptosis. This role of TRIM21 was confirmed in TRIM21 knockout HT29 cells (TRIM21-KO cells) obtained by CRISPR/Cas9, which are more resistant to TzB-induced necroptosis in comparison to HT29 WT cells. Furthermore, transfection of human TRIM21 cDNA in TRIM21-KO cells rendered these cells more responsive to TzB-induced necroptosis and rescued the sensitive phenotype of HT29 WT cells. Finally, in a time course experiment, TRIM21 was shown to positively modulate the phosphorylation of the three key proteins RIPK1, RIPK3 and MLKL involved in the induction of necroptosis induced by TRAIL. Altogether our data showed that TRIM21 is a positive modulator of TRAIL-induced necroptosis.

Since TRIM21 has previously been shown to sensitize H1299 cells to TRAIL-induced apoptosis [33], we compared the sensitivity of TRIM21 WT and TRIM21-KO cells to apoptosis or necroptosis induced by several death ligands (TRAIL, FasL or TNF). Unexpectedly, TRIM21-KO cells appear to be only resistant to TRAIL/zVAD/Bp-induced necroptosis suggesting that TRIM21 is a specific and positive modulator of this necroptotic pathway.

Besides a role for TRIM21 in many cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, and innate and adaptive immunity, several studies have shown that TRIM21 is involved in the

progression of human cancers. Decreased expression of TRIM21 has been found in hepatocellular carcinoma, diffuse large B-cell lymphoma and breast cancer and was associated with a poor prognosis and enhanced proliferation capacity of cancer cells in vitro and tumor growth in vivo [42-44]. Our present data also suggest that cancer with low TRIM21 expression could be more resistant to TRAIL-induced necroptosis, a backup cell death pathway that can be triggered when apoptosis cannot occur. In this context, novel therapeutic approaches to restore TRIM21 expression could be clinically beneficial.

CONCLUSION

Our data show for the first time the characterization by mass spectrometry of proteins which are co-immunoprecipitated with endogenous RIPK3 upon TRAIL/zVAD/Bp-induced necroptosis in HT29 cells. Among these proteins, we found known proteins to be associated with TNF-or TRAIL-induced necrosome such as RIPK1, MLKL, FADD and caspase-8. Very interestingly, our data highlights a new partner in the necrosome complex, the E3 ubiquitin ligase TRIM21, which modulates TRAIL-induced necroptosis by regulating positively the phosphorylation of RIPK1, RIPK3 and MLKL. In TRAIL death signaling pathway, biological functions of RIPK1 and RIPK3 are tightly regulated by ubiquitination and phosphorylation events. Further studies are needed to better understand the role of TRIM21 in the regulation of TRAIL necroptotic pathway.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

All cell lines were obtained from ATCC and were cultured at 37°C in a humidified incubator with an atmosphere of 5% CO₂. HT29 cell lines were cultured in MEM (Gibco; 31095-029) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Eurobio; CVFSVF00-01), 100U/ml penicillin and 100µg streptomycin (1% Pen-Strep) (Gibco; 15140-122), 2 mM L-glutamine (Invitrogen; 25030149) and MEM Non Essential Amino Acid 1X (1% MEM NEAA 100X) (Gibco; 11140-035). HaCat cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco; 41966-029), supplemented with 10 % of FBS (Hyclone; ABY49068) and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen).

Reagents and antibodies

Recombinant human Superkiller TRAIL (TRAIL-SK), Necrostatin-1 (Nec1) and zVAD-fmk (zVAD) were purchased from Enzo Life Sciences. Hoechst, propidium iodide (PI), dithiothreitol (DTT), iodoacetamide, ammonium bicarbonate and formic acid were obtained from Sigma-Aldrich. Proteases inhibitor and PhosStop Phosphatase inhibitor cocktails were purchased from Roche. Dynabeads protein G, TNF α and SytoxGreen (SG) were obtained from Invitrogen (Life Technologies), Birinapant was from Selleck Chemicals and Necrosulfonamide (NSA) was from Calbiochem. The TNF α inhibitor (Etanercept, Enbrel) was obtained from Pfizer. The multi-aggregated Ig-CD95L (or Ig-FasL) was a gift from Dr Patrick Legembre (CLCC Eugène Marquis, Rennes).

Antibodies used were mouse monoclonal antibodies to caspase-8 clone C15 (ALX-804-429) (Alexis Biochemicals), FADD (556402) (Becton Dickinson), TRIM21 E-11 (sc-48430) and HSC70 (sc-7298) (Santa-Cruz); β -actin (A5316) (Sigma); rabbit polyclonal antibodies to TRAIL-R1/DR4 (1139), TRAIL-R2/DR5 (2019), RIPK3 (48-909) (ProSci Incorporated), RIPK1 (D94C12) XP (3493S) (Cell Signaling), Phospho-MLKL (ab187091) (Abcam), RIPK3 (PA1-41533) (Pierce), Phospho-RIP (Ser166) (D1L3S) and Phospho-RIP3 (Ser227) (D6W2T) (Cell Signaling), FADD (06711) (Millipore); goat polyclonal antibodies to RIPK3 (clone N-14) (sc-47368), TRIM21 M-20 (sc-21367) (Santa-Cruz) and rat monoclonal antibodies to MLKL (MABC604) (Millipore). Horseradish-peroxydase-conjugated secondary antibodies were provided by Dako and Clean Blot IP detection kit provided by Life Technologies.

Antagonistic mouse monoclonal antibodies directed against extracellular domain of human TRAIL-R1/DR4 (HS101) and TRAIL-R2/DR5 (HS201) were purchased from Alexis Biochemicals.

Cell death assays

Cell survival was determined using CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay kit (Promega) as follows: 10,000 cells were seeded in 96 well plate and allowed to adhere for 24h. 20 μ l per well of assay solution were then added and left to incubate for 2 h at 37°C. The absorbance was measured at 490 nm and at 630 nm using a microplate reader (SPECTROstar Nano, BMG Labtech). The results were corrected by subtracting the background (after 2 h incubation with blank medium) and cell viability was calculated using:

Viability (%) = ((OD490-OD630)treated cells/mean(OD490-OD630)non-treated cells)*100.

Cell viability was also determined by a methylene blue colorimetric assay as previously described [39]. The absorbance was measured at 620 nm (SPECTROstar Nano, BMG Labtech). Cell viability was calculated as follow:

Viability (%) = ((OD620)treated cells/(OD620)non-treated cells)*100.

Microscopic detection of apoptosis or necroptosis was carried out in both floating and adherent cells using Hoechst 33342 (1 µg/ml) and propidium iodide (1 µg/ml) staining dyes, as previously described [40]. At least 300 cells were counted on fluorescent microscope (Zeiss AX10 Imager) and the percentage of alive, apoptotic and necroptotic cells was evaluated for each condition. Cells were defined as follow: alive cells were Hoechst+/Propidium iodide-; apoptotic cells were Hoechst-/Propidium iodide+ with apoptotic bodies and necroptotic cells were Hoechst-/Propidium iodide+.

Necroptotic cells were also detected by flow cytometry analysis (FL-2) (FACScalibur, Becton Dickinson) using propidium iodide staining dye. Cells were seeded in a 24-well plate at a density of 150,000 cells per well. Detection was carried out in both floating and adherent cells using staining dye at 0.5 µg/ml.

Real-time analysis of necroptosis by immunofluorescence live imaging

HT29 WT and TRIM21-KO cells were seeded at 30,000 cells per well in a 96-well plate and allowed to adhere for 24 h. The following day, MEM medium (with no supplement) was used and cells were treated with TRAIL-SK (100 ng/ml) in the presence of z-VAD-fmk (25 µM), Birinapant (1µM) (TzB) and SYTOX™ Green reagent (5 µM). IncuCyte S3® live-cell imaging system (Essen Bioscience Inc., Germany) was used for kinetic monitoring of cell death. Fluorescent and phase contrast images were taken every hour from 0 to 8 h post-treatment. Data of total integrated fluorescent signal intensity were generated by the IncuCyte® S3 Software.

ATP concentration measurement

Concentration of cellular ATP was measured using CellTiter-Glo® Luminescent Cell viability assay (Promega) according to the manufacturer's instruction and as previously described [2].

Small interfering RNA transfection

Cells were transfected by reverse transfection with double-stranded SMARTpool siRNAs targeting mRNAs of hRIPK1 (EG:8737), hRIPK3 (EG:11035), hTRIM21 (EG:6737) (GE

Healthcare). A non-specific targeting siRNA (siNT1, control siRNA, GE Healthcare) was used as a negative control for all experiments. 80 nM of siRNA was transfected per well using DharmaFECT-4 transfection reagent (ThermoFisher Scientific).

Plasmids and transfections

Transfection with Amaxa 4D

HT29 cells were transfected using 4D-Nucleofector™ (Lonza) as per the manufacturer's instructions. Control plasmid (pcDNA3.1+/N-GST-[Thrombin], GeneScript) and TRIM21 plasmid (pcDNA3.1+/N-GST-[Thrombin-hTRIM21], GeneScript) were used for transfection. Briefly, 1,000,000 of cells were placed in SF transfection buffer provided by the supplier and 10 µg of plasmid was added. Transfections were performed using FF137 program. After the transfection, cells were seeded in 6-well plate with supplemented medium as described previously. 48h post-transfection, cells were treated with TzB during 24h and cell viability was analyzed by MTS assay.

Calcium phosphate mediated transient transfection of HT29 TRIM21-KO cell line

HT29 TRIM21-KO cells were seeded at 2,000,000 cell per well in a 6-well plate, and allowed to plate for 4 to 6 h. The following solutions were prepared for transfection experiments CaCl₂ (2 M) and HBS 2X (280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1.5 mM Na₂HPO₄; 12 mM dextrose; 50 mM HEPES and pH between 7.05 – 7.12). 3 µg of DNA (pEGFP-N1-Ro52, a gift from Dr Mary Wahren-Helenius [17], or p EGFP-N1 vector (Clontech Laboratories) and 125 µl of CaCl₂ were mixed and then added to 125 µl HBS 2X (ratio 1:1). After 16 h of incubation with the mixture, cells were washed for 1 min with PBS supplemented with 10% DMSO and incubated at 37°C with fresh supplemented medium. 24 h post-transfection, MEM medium (with no supplement) was used and cells were treated with TzB and Propidium Iodide (2µg/ml). IncuCyte S3® live-cell imaging system was used for kinetic monitoring of cell death. Fluorescent and phase contrast images were taken every hour from 0 to 8 h post-treatment. Data of total integrated fluorescent signal intensity normalized by the total object count, were generated by the IncuCyte® S3 Software.

CRISPR-mediated TRIM21 knockout in HT29 cell line

Two gRNA targeting human TRIM21 sequences (AGCACGCCTTGACAA/TGATGT GGG and TGGCTAGCTGTCTGA/TTGGGC CGG) were designed using the CRISPR Design Tool

from the Zhang Laboratory and cloned into the pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmid (Addgene # 48138, a gift from Feng Zhang) by BbsI digestion and ligation.

1,000,000 of HT29 cells were transfected with 5 µg of both plasmids by electroporation using Amaxa 4D technology (Synnanovect platform, Biosit, Rennes) as previously described. GFP positive cells were sorted by flow cytometry 48 h after electroporation (Cell Sorter Aria, Becton Dickinson). A monoclonal cell line which does not express TRIM21 was obtained after serial dilution in a 96-well plate.

Immunoprecipitation and Immunoblotting

Cell pellets were collected and lysed using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 1% Triton X-100; 25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 0.2% SDS; 5 mM MgCl₂; 1 mM Na₃VO₄) completed with protease inhibitors (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) and phosphatase inhibitor (PhosSTOP™, Roche). After lysis and sonication, the samples were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, at 4°C.

For RIPK3 immunoprecipitation, 50,000,000 cells were stimulated with 500 ng/ml TRAIL-SK for the indicated times at 37 °C. Anti-RIP3 (Pierce, PA1-41533) or IgG control was incubated with lysates for 3 h at 4 °C. Then 25 µl of Protein G Dynabeads was added and left to incubate overnight at 4 °C. After immunoprecipitation, magnetic beads were washed three times with lysis buffer and one time with PBS. Immunoprecipitated proteins were then eluted using elution buffer (200 mM Glycine pH 2.5). The acidic pH of the elution was neutralized by adding 1 M Tris-HCl, pH 8.

After Bradford quantification, immunoprecipitated proteins and lysates were separated by SDS-PAGE and transferred into nitrocellulose membrane. The membranes were then blocked with 4 % Bovine Serum Albumine (BSA) in TBS 1X (20 mM Tris, 137 mM NaCl) during 1 h and then incubated overnight at 4 °C with indicated primary antibodies as previously described [40]. Protein-antibody complexes were revealed by enhanced chemoluminescence (Millipore) and imager analysis (ChemiDoc XRS+, BioRad). The Image Lab™ software (BioRad) was used for western blot visualization. Densitometry analysis of RIPK1, RIPK3, MLKL and phosphorylated forms was performed using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>; provided in the public domain by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Mass Spectrometry: identification of immunoprecipitated proteins

This experiment was realized in duplicate. For each time point treatment with TzB, 0 h and 3 h, eight RIPK3 immunoprecipitates were pooled (240 μ L) and subjected to enzymatic digestion: proteins were reduced with 25 μ L of 65 mM DTT (15 min at 37°C) then alkylated with 25 μ L of 135 mM iodoacetamide (15 min at room temperature in the dark). The sample was completed with 170 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) and finally digested with 2 μ g of modified trypsin (Promega) for 5 h at 37°C. The peptide mixture was then desalted and concentrated using a micro spin-column C18 from Harvard Apparatus according to manufacturer's instructions. The resulting sample was completely dried, then solubilized with 17 μ L of 0.1% acid formic and injected in a nanoflow high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Dionex, LC Packings Ultimate 3000) connected to a hybrid LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nano-electrospray ionization (ESI) source (New Objective). Mobile A (99.9 % MilliQ water and 0.1% formic acid (v:v)) and B (99.9% acetonitrile and 0.1% formic acid (v:v)) phases for HPLC were delivered by an Ultimate 3000 nanoflow LC system (Dionex, LC Packings). The sample (10 μ L) was loaded onto a trapping precolumn (5 mm \times 300 μ m i.d., 300 Å pore size, Pepmap C18, 5 μ m) during 3 min with 2% buffer B at a flow rate of 25 μ L/min. Reverse-phase separation was then performed at a flow rate of 0.250 μ L/min using an analytical column (15 cm \times 300 μ m i.d., 300 Å pore size, Pepmap C18, 5 μ m, Dionex, LC Packings) thermostated at 30°C. A gradient from 2% to 35% buffer B for the first 60 min, 35% to 60% buffer B from 60 to 85 min, and 60% to 90% buffer B from 85 to 105 min was used. Finally, the column was washed with 90% buffer B for 16 min, and with 2% buffer B for 19 min. The peptides were directly eluted from the column into the ESI source of the mass spectrometer. A voltage of 1.6 kV was applied to the HPLC buffer using the liquid junction provided by the ESI source and the ion transfer tube temperature was set to 200°C. The LTQ-Orbitrap XL instrument was operated in the data-dependent mode by automatically switching between full scan MS and consecutive MS/MS acquisitions. Full scan MS spectra were acquired in the Orbitrap with a resolution of 60000 at m/z 400 in the mass range 400–2000; ion injection times were calculated to allow the accumulation of 106 ions in the Orbitrap for each spectrum. The ten most intense ions (with an intensity \geq 2000 counts and a charge state \geq 2) of each full scan MS were sequentially isolated and fragmented in the linear ion trap by collision-induced dissociation (normalized collision energy at 35%, activation time of 30 ms). Peaks selected for fragmentation were automatically subjected to dynamic exclusion for 60 s with a mass tolerance of \pm 10 ppm to avoid the selection of the same ion for

fragmentation more than once. For Orbitrap measurements, an external calibration was used before each injection series ensuring an overall error mass accuracy below 5 ppm for the detected ions. MS data were saved in RAW file format (Thermo Fisher Scientific) using XCalibur 2.0.7 with tune 2.4.

Proteome Discoverer 1.2 software (Thermo Fisher Scientific) supported by Mascot (Mascot server v2.2.07; <http://www.matrixscience.com>) database search engine was used for peptide and protein identification using its automatic decoy database search to calculate a false discovery rate (FDR). MS/MS spectra were compared to the UniProt Human Reference proteome set database (UniProt release 2015_09, September 29 2015, 70075 sequences, 23655377 residues). Mass tolerance for MS and MS/MS was set at 10 ppm and 0.5 Da, respectively. The enzyme selectivity was set to full trypsin with one miscleavage allowed. Protein modifications were fixed carbamidomethylation of cysteines and variable oxidation of methionine.

Identification validation and spectral count label-free quantification

Proline Studio 1.1 software was used for the validation and the spectral count comparison of the identified proteins in each samples [<http://proline.profi-proteomics.fr/>; 18]. After importation of the mascot .dat files from each query, search results were validated with a peptide rank = 1 and a FDR of 1% on the e-value at the peptide spectrum match level. Proteins identified with exactly the same set of peptides or with a subset of the same peptides were grouped in a Protein Set. This Protein Set is then represented by a Typical Protein which is the best identified protein (best score) or in case of same set proteins, the SwissProt one if possible. When proteins with shared peptides were identified with other peptides not belonging to the Protein Set, different Protein Sets were created, even if there are no specific peptides (i.e. if these peptides were also shared by other Protein Sets). For the spectral count comparison, a parent dataset corresponding to the merge of the individual validated identification result was created. This parent dataset is used to define the shared and specific peptides and the Protein Set list to compare. For each protein we chose to calculate weighted spectral counts, as suggested in Abacus [19], where shared peptides are combined and weighted according to the associated Protein Sets. Briefly, for each shared peptide, we define which proportion of spectra is allocated to the different Protein Sets. These weights take into account the specific spectral counts of the different Protein Sets sharing the same peptide(s). To detect significant difference between samples, a beta-binomial test was performed on these weighed spectral counts and a p-value

was calculated for each Protein Set using the R package BetaBinomial 1.2 implemented in Proline Studio [20].

Statistical analysis

Three independent experiments, each consisting of three replicates, were performed for each assay. A Student's t-test was used to compare means between different treatment groups. Statistical tests were performed using Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Author Contributions

FF, MTDB and JLS designed the experiments and supervised the project; MSE, GKA, PU and IG carried out the experiments; FF, ML and EC performed the immunoprecipitation and mass spectrometry experiment; MB and EC provided suggestions and comments; FF, MSE, GKA, MTDB and JLS wrote the manuscript with contributions from all authors.

Fundings

This research was funded by, the National Institute for Cancer (INCa), the Ligue Contre le Cancer (Ille et Vilaine, Loire-Atlantique and Maine et Loire Committees), the National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the University of Rennes 1 and the Région Bretagne. F Faurez was supported by INCa (post-doctoral fellow). MC Bonnet was supported by the European University of Brittany (Excellence Research Chair). M Simoes Eugenio and G. H. Kara-Ali were supported by a PhD studentship cofunding by the Région Bretagne and the Ligue Contre le Cancer (committee Ille et Vilaine).

Acknowledgements

We would like to thank Christophe Bruley for the critical reading of the Proline Studio Materiel and Method part. We also thank Dr Marie Wahren-Helenius for the plasmid human TRIM21-EGFP gifted and Dr Patrick Legembre for the Ig-FasL gifted. We also thank Dr Feng Zhang for the gift of pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmid.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

REFERENCES

1. Zamaraev, A.V., Kopeina, G.S., Zhivotovsky, B., Lavrik, I.N. (2014) Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role. *Cell Mol Life Sci* 72, 505-517 <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1757-2>
2. Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F. et al. (2012) TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ* 19, 2003-2014 <http://doi.org/10.1038/cdd.2012.90>
3. Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti S. et al. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495 <http://doi.org/10.1038/82732>
4. Goodall, M.L., Fitzwalter, B.E., Zahedi, S., Wu, M., Rodriguez, D., Mulcahy-Levy, J.M. et al. (2016) The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Dev Cell* (2016) 37, 337-349 <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.018>
5. Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D. et al. (2005) Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280, 40599-40608 <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.018>
6. Azijli, K., Weyhenmeyer, B., Peters, G.J., de Jong, S., Kruyt, F.A (2013) Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ* 20, 858-868 <http://doi.org/10.1038/cdd.2013.28>
7. Lafont, E., Hartwig, T., Walczak, H. (2018) Paving TRAIL's Path with Ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 43, 44-60 <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.002>.
8. Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P. (2014) Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15,135-147 <http://doi.org/10.1038/nrm3737>
9. Lafont, E., Kantari-Mimoun, C., Draber, P., De Miguel, D., Hartwig, T., Reichert, M. et al. (2017) The linear ubiquitin chain assembly complex regulates TRAIL-induced gene activation and cell death. *EMBO J* 36, 1147-1166 <http://doi.org/10.15252/emj.201695699>
10. Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A. et al. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104,155-162 <http://doi.org/10.1172/JCI6926>
11. Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M. et al. (1999) Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5,157-163 <http://doi.org/10.1038/5517>
12. Newsom-Davis, T., Prieske, S., Walczak, H. (2009) Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 14, 607-623. <http://doi.org/10.1007/s10495-009-0321-2>.

13. Vasilikos, L., Spilgies, L.M., Knop, J., Wong, W.W. (2017) Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins. <http://doi.org/10.1038/icb.2016.118>
14. Fulda, S., Wick, W., Weller, M., Debatin, K.M. (2002) Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 8, 808-815 <http://doi.org/10.1038/nm735>
15. He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L. et al. (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necroptotic response to TNF- α . *Cell* 137, <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>
16. Allensworth, J.L., Sauer, S.J., Lyster, H.K., Morse, M.A., Devi, G.R. (2013) Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF- α -independent mechanism. *Breast Cancer Res Treat* 137, 359-371 <http://doi.org/10.1007/s10549-012-2352-6>
17. Espinosa, A., Zhou, W., Ek, M., Hedlund, M., Brauner, S., Popovic, K. et al. (2006) The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J Immunol* 176, 6277-6285 <http://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.6277>
18. Carapito, C., Lane, L., Benama, M., Opsomer, A., Mouton-Barbosa, E., Garrigues, L. et al. (2015) Computational and Mass-Spectrometry-Based Workflow for the Discovery and Validation of Missing Human Proteins: Application to Chromosomes 2 and 14. *J Proteome Res* 14, 3621-3634 <http://doi.org/10.1021/pr5010345>
19. Fermin, D., Basrur, V., Yocum, A.K., Nesvizhskii, A.I. (2011) Abacus: a computational tool for extracting and pre-processing spectral count data for label-free quantitative proteomic analysis. *Proteomics* 11, 1340-1345 <http://doi.org/10.1002/pmic.201000650>
20. Pham, T.V., Piersma, S.R., Warmoes, M., Jimenez, C.R. (2010) On the beta-binomial model for analysis of spectral count data in label-free tandem mass spectrometry-based proteomics. *Bioinformatics* 26: 363-369 <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp677>
21. Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X. et al. (2008) Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 4, 313-321 <http://doi.org/10.1038/nchembio.83>
22. Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D. et al. (2012) Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148, 213-227 <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
23. Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P. et al. (2007) IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131: 669-681 <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.030>
24. Vince, J.E., Wong, W.W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U. et al. (2007) IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131, 682-693 <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.037>

25. Orozco, S., Yatim, N., Werner, M.R., Tran, H., Gunja, S.Y., Tait, S.W. et al. (2014) RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death Differ* 21, 1511-1521 <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.76>
26. Kretz, A.L., Trauzold, A., Hillenbrand, A., Knippschild, U., Henne-Bruns, D., von Karstedt, S. et al. (2019) TRAILblazing Strategies for Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 11 pii, E456 <http://doi.org/10.3390/cancers11040456>
27. Han, J., Zhong, C.Q., Zhang, D.W. (2011) Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol* 12,1143-1149 <http://doi.org/10.1038/ni.2159>
28. Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughon, K. et al. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6, 97-105 <http://doi.org/10.1038/ncb1086>
29. Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C. et al. (2009) RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325, 332-336 <http://doi.org/10.1126/science.1172308>
30. Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., Wang, X. (2012) The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necroptotic death pathways. *Cell* 148, 228-243 <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.030>
31. Chen, W., Wu, J., Li, L., Zhang, Z., Ren, J., Liang, Y. et al. (2015) Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. *Nat Cell Biol* 17, 434-444 <http://doi.org/10.1038/ncb3120>
32. Tomar, D. and Singh, R. (2015) TRIM family proteins: emerging class of RING E3 ligases as regulator of NF- κ B pathway. *Biol Cell* 107, 22-40 <http://doi.org/10.1111/boc.201400046>
33. Sabile, A., Meyer, A.M., Wirbelauer, C., Hess, D., Kogel, U., Scheffner, M. et al. (2006) Regulation of p27 degradation and S-phase progression by Ro52 RING finger protein. *Mol Cell Biol* 26, 5994-6004 <http://doi.org/10.1128/MCB.01630-05>
34. Young, J.A., Sermwittayawong, D., Kim, H.J., Nandu, S., An, N., Erdjument-Bromage, H. et al. (2011) Fas-associated death domain (FADD) and the E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 interact to negatively regulate virus-induced interferon production. *J Biol Chem* 286, 6521-6531 <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.172288>
35. Jauharoh, S.N., Saegusa, J., Sugimoto, T., Ardianto, B., Kasagi, S., Sugiyama, D. et al. (2012) SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochem Biophys Res Commun* 6, 582-587 <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.010>
36. Zhang, J., Fang, L., Zhu, X., Qiao, Y., Yu, M., Wang, L. et al. (2012) Ro52/SSA sensitizes cells to death receptor-induced apoptosis by down-regulating c-FLIP(L). *Cell Biol Int* 36, 463-468 <http://doi.org/10.1042/CBI20110322>
37. Gao, X., Xu, F., Zhang, H.T., Chen, M., Huang, W., Zhang, Q. et al. (2016) PKC α -GSK3 β -NF- κ B signaling pathway and the possible involvement of TRIM21 in

- TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Cell Biol* 94, 256-264 <http://doi.org/10.1139/bcb-2016-0009>
38. Li, D., Xu, T., Cao, Y., Wang, H., Li, L., Chen, S. et al. (2015) A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5017-5022 <http://doi.org/10.1073/pnas.1505244112>
 39. Petersen, S.L., Chen, T.T., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Gonzalvez, F., Ashkenazi, A. (2015) TRAF2 is a biologically important necroptosis suppressor. *Cell Death Differ* 22, 1846-1857 <http://doi.org/10.1038/cdd.2015.35>
 40. Karl, I., Jossberger-Werner, M., Schmidt, N., Horn, S., Goebeler, M., Leverkus, M. et al. (2014) TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis. *Cell Death Dis* 9, e1444 <http://doi.org/10.1038/cddis.2014.404>
 41. Cao, X., Pobezienskaya, Y.L., Morgan, M.J., Liu, Z.G. (2011) The role of TRADD in TRAIL-induced apoptosis and signaling. *FASEB J* 25, 1353-1358 <http://doi.org/10.1096/fj.10-170480>
 42. Ding, Q., He, D., He, K., Zhang, Q., Tang, M., Dai, J. et al. (2015) Downregulation of TRIM21 contributes to hepatocellular carcinoma carcinogenesis and indicates poor prognosis of cancers. *Tumour Biol* 36, 8761-8772 <http://doi.org/10.1007/s13277-015-3572-2>
 43. Brauner, S., Zhou, W., Backlin, C., Green, T.M., Folkersen, L., Ivanchenko, M. et al. (2015) Reduced expression of TRIM21/Ro52 predicts poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients with and without rheumatic disease. *J Intern Med* 278, 323-332 <http://doi.org/10.1111/joim.12375>
 44. Zhou, W., Zhang, Y., Zhong, C., Hu, J., Hu, H., Zhou, D. et al. (2018) Decreased expression of TRIM21 indicates unfavorable outcome and promotes cell growth in breast cancer. *Cancer Manag Res* 10, 3687-3696 <http://doi.org/10.2147/CMAR.S175470>

Figure 1: TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB) induces necroptosis in HT29 cell line.

(A) HT29 cells were treated or not (NT) with TRAIL-SK (100 ng/ml), zVAD (25 μ M), Birinapant (Bp, 1 μ M) (TzB) for the indicated times. Left panel: percentages of apoptosis and necrosis were estimated by Hoechst/Propidium iodide staining (mean \pm SD, n=3). Right panel: cellular ATP levels were determined by Cell Titer-Glo kit assay (mean \pm SD, n=3). **(B)** HT29 cells were pretreated with DMSO (0,1%), or Necrostatin-1 (Nec1, 10 μ M), or Necrosulfonamide (NSA, 1 μ M) for 1 h. Cells were then treated with TzB (in grey) or not (NT, in white) for 24 h. Percentage Propidium iodide (PI) positive cells were measured by flow cytometry (mean \pm SD, n=3). **(C)** Upper panel: HT29 cells were transiently transfected with the following siRNAs: siRIPK1, siRIPK3, siRIPK1/siRIPK3, or siNT1 (negative control). 48 h after transfection, HT29 were treated for 24 h with TzB (in grey) or not (in white). Percentage of Propidium iodide (PI) positive cells were measured by flow cytometry (mean \pm SD, n=3). Lower panel: western blot of HT29 transiently transfected cells with siNT1, siRIPK1 or siRIPK3 siRNAs (72h post-transfection). Anti-human β -actine was used as protein loading control. One representative of three independent experiments. **(D)** HT29 cells were pretreated or not (NT) with 10 μ g/ml of antagonistic antibodies: anti-DR4, anti-DR5, anti-DR4/anti-DR5, or etanercept (aTNF) for 1 h. After, cells were treated with TzB for 24 h. Moreover, HT29 cells were pretreated or not (NT) with 10 μ g/ml etanercept (aTNF) for 1 h and treated with TNF (20 ng/ml), zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) for 24 h. Cell viability was measured using MTS assay (mean \pm SD, n=3). (#), P<0.05; (##), P<0.01 and (###), P<0.001 compared NT to treated cells; (*), P<0.05; (**), P<0.01 and (***), P<0.001 compared treated conditions.

Figure 1: TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB) induces necroptosis in HT29 cell line.

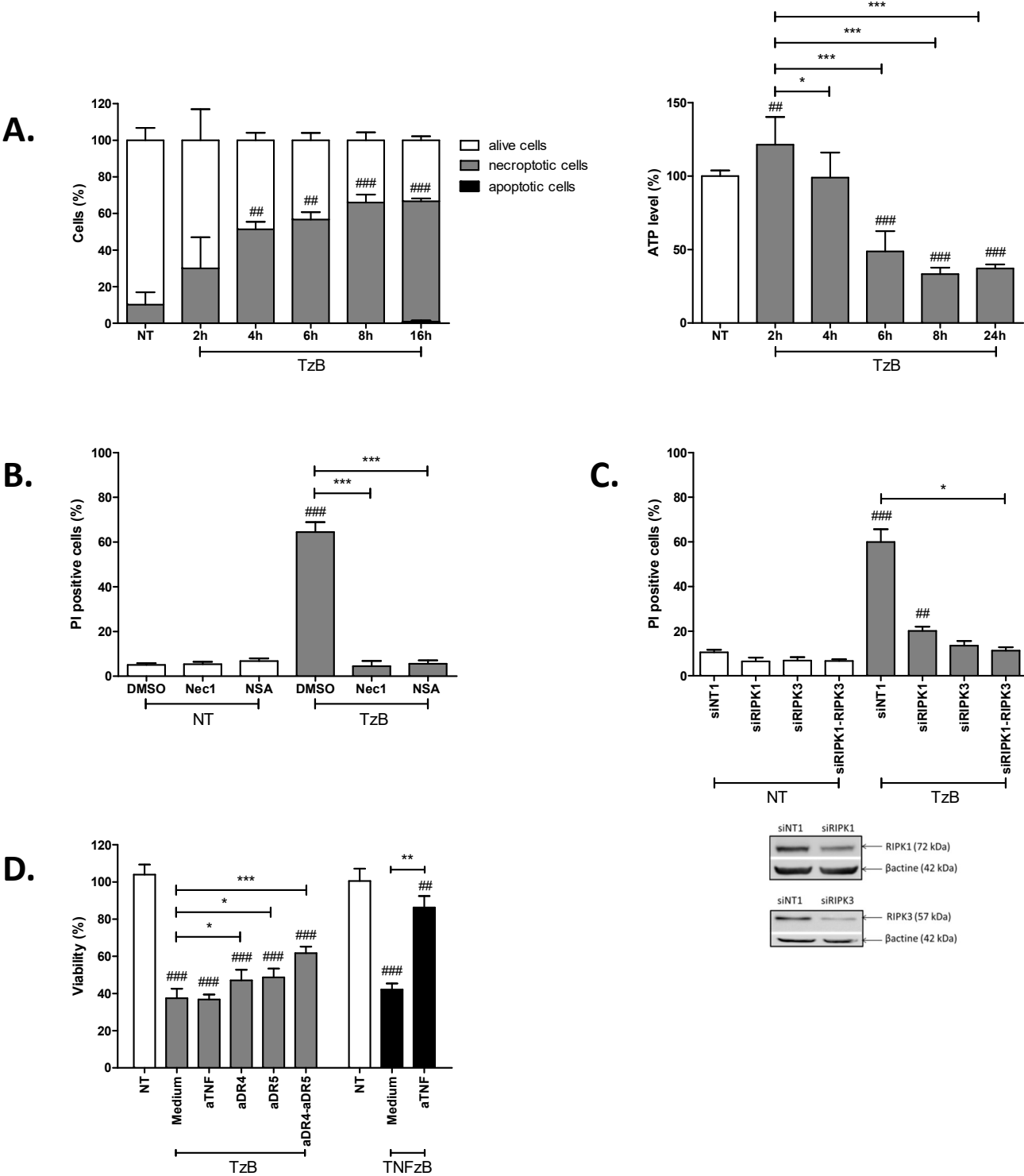
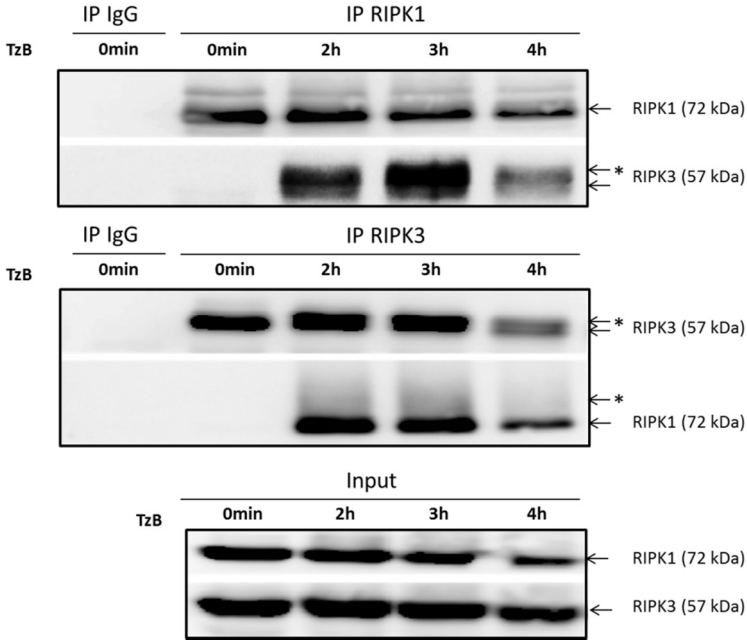


Figure 2: RIPK3 forms complex with RIPK1 upon necroptotic induction.

(A) HT29 cells were treated or not (0 min) with TRAIL-SK (500 ng/ml), zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) for the indicating times. 4 mg of cell lysates were immunoprecipitated with RIPK1 or RIPK3 antibody or control IgG. The RIPK1 or RIPK3 immunocomplexes were analyzed by Western blot. * upper bands for RIPK1 or RIPK3. One representative of three independent experiments. **(B)** Label-free quantification of protein of interest by mass spectrometry. Weighted spectral counts were calculated (mean \pm SD, n=2) from the analysis of two different pools of eight RIPK3 immunoprecipitates for RIPK3, MLKL, RIPK1, FADD, Caspase 8, HS90B, TRIM21 and PGAM5 observed in IgG control and at times 0 h and 3 h post-stimulation. (**) P<0.01.

Figure 2: RIPK3 forms complex with RIPK1 upon necroptotic induction.

A.



B.

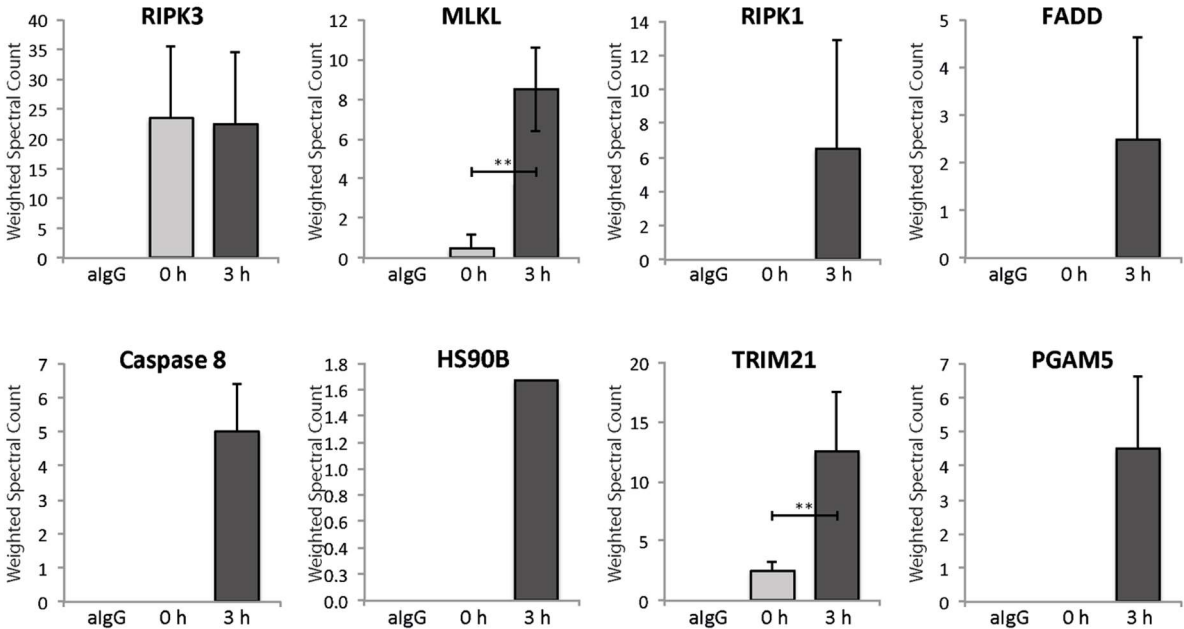


Figure 3: RIPK1, MLKL, P-MLKL and TRIM21 are recruited to the endogenous RIPK3-dependent necrosome.

HT29 cells were treated or not (0 min) with TRAIL-SK (500 ng/ml), zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) for the indicating times. 4 mg of cell lysates were immunoprecipitated with RIPK3 antibody or control IgG as described in materials and methods. Upper panel: RIPK3 immunocomplexes were analyzed for indicated proteins by immunoblotting. * upper bands for RIPK1 or RIPK3. Lower panel: expression of the indicated proteins in cell's lysates was analyzed by immunoblotting. Anti-human β -actine was used as protein loading control. One representative of three independent experiments.

Figure 3: RIPK1, MLKL, P-MLKL and TRIM21 are recruited to the endogenous RIPK3-dependent necrosome.

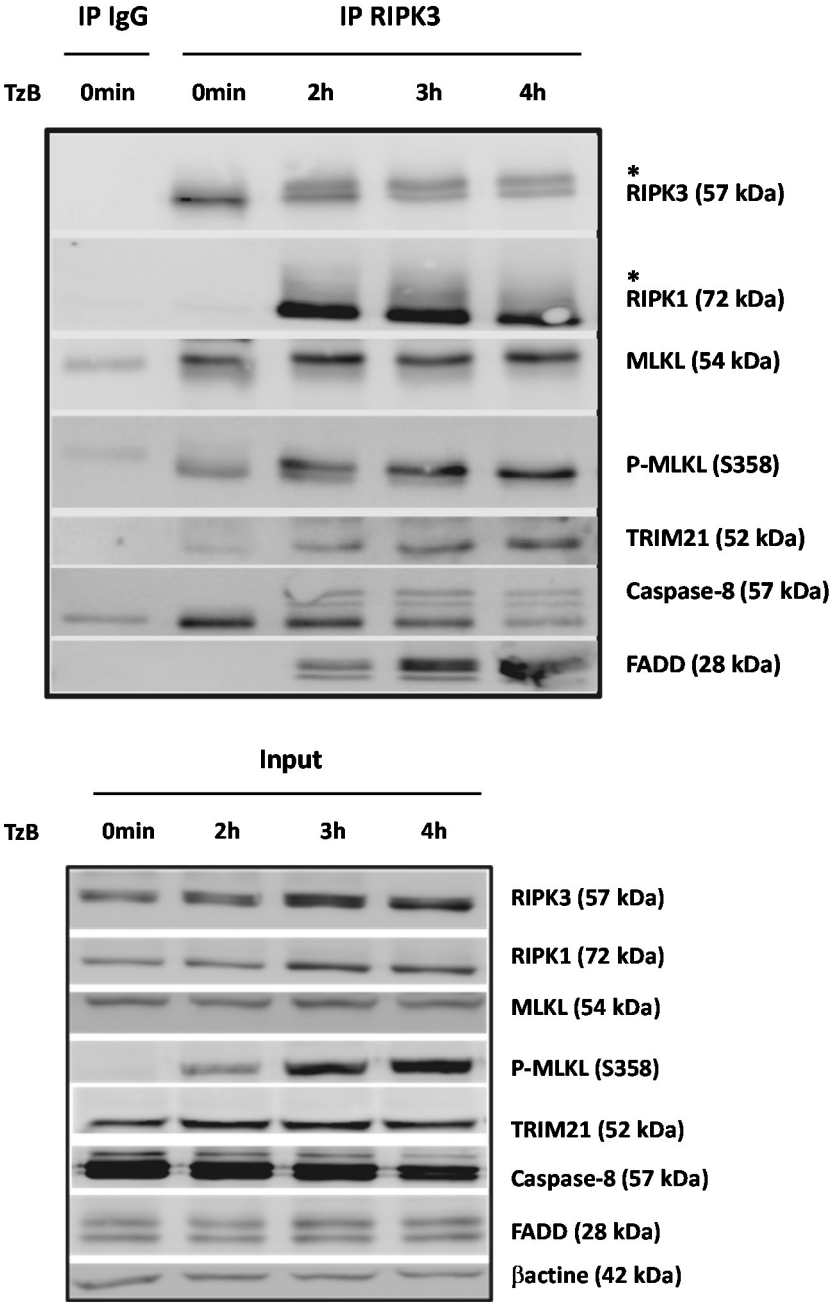


Figure 4: Downregulation of TRIM21 expression negatively regulates TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

(A) HT29 and HaCat cells were transiently transfected with siTRIM21 or siNT1 (negative control). Immunoblot analysis of TRIM21, RIPK1, RIPK3 and MLKL expressions was carried out 72 h post-transfection. Anti-human Hsc-70 was used as protein loading control. One representative of three independent experiments. (B) 48 h after siRNA transfections, HT29 and HaCat cells were treated (in grey) or not (in white) with TRAIL-SK (100 ng/mL), zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) for 24 h. Percentages of necrosis was estimated by Hoechst/Propidium iodide staining (mean \pm SD, n=3). (C) 48 h after siRNA transfections, HT29 (black) and HaCat (grey) cells were treated (dashed line) or not (solid line) with TRAIL-SK, zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) for 24 h. Cell viability (%) was evaluated by a MTS assay. (mean \pm SD, n=3). (#), P<0.05; (##), P<0.01 and (###), P<0.001 compared NT to treated cells; (*), P<0.05; (**), P<0.01 and (***), P<0.001 compared treated conditions.

Figure 4: Downregulation of TRIM21 expression negatively regulates TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

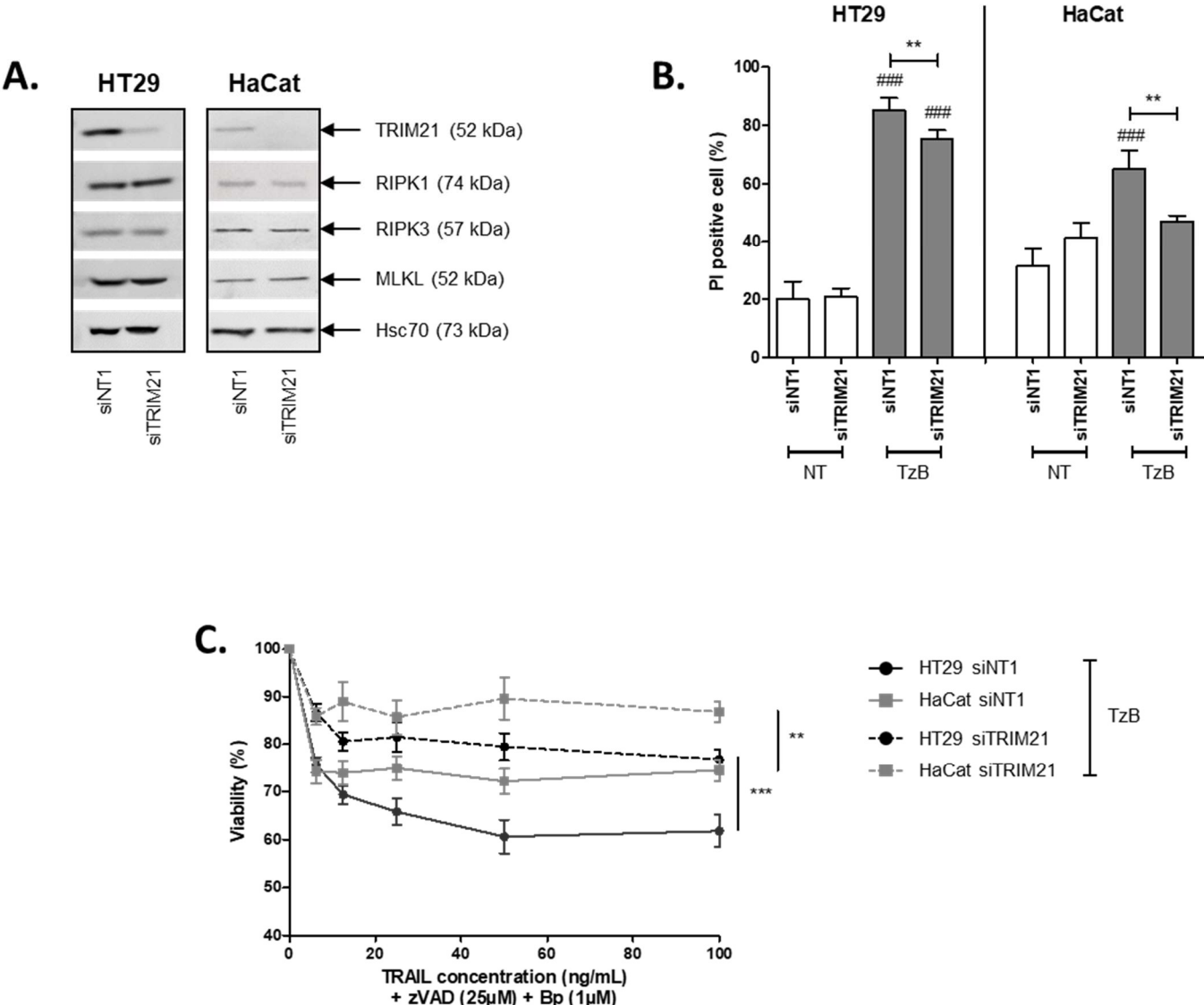


Figure 5: Overexpression of TRIM21 positively regulates TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

(A) HT29 and HaCat cells were transiently transfected with pTRIM21-GST or control plasmid (used as a negative control). Immunoblot analysis of TRIM21, RIPK1, RIPK3 and MLKL expressions was carried out 72 h after transfection. Anti-human Hsc-70 was used as protein loading control. One representative of three independent experiments. (B) 48 h after siRNA transfection, HT29 and HaCat cells were treated or not with TRAIL-SK (100 ng/mL), zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) (TzB) for 24 h. Percentage of necrosis was estimated by Hoechst/Propidium iodide staining (mean \pm SD, n=3). (C) 48 h after siRNA transfection, HT29 (in black) and HaCat (in grey) cells were treated (dashed line) or not (solid line) with TRAIL-SK, zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) for 24 h. Cell viability (%) was evaluated by a MTS assay. (mean \pm SD, n=3). (#), P<0.05; (##), P<0.01 and (###), P<0.001 compared NT to treated cells; (*), P<0.05; (**), P<0.01 and (***), P<0.001 compared treated conditions.

Figure 5: Overexpression of TRIM21 positively regulates TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

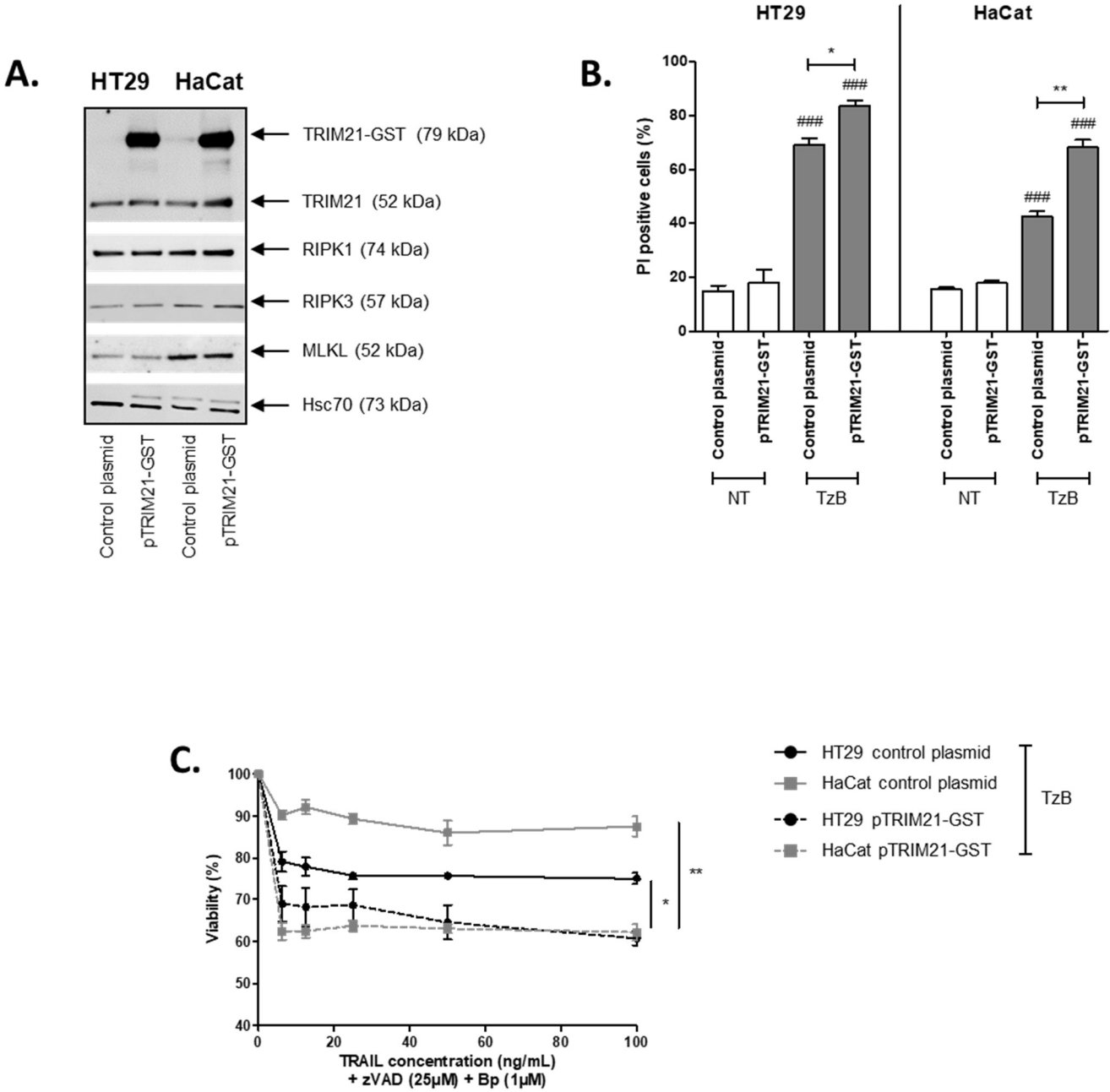


Figure 6: Knock-out of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR/Cas9 negatively regulates TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

(A) HT29 TRIM21-KO cell line was obtained by CRISPR-Cas9 as described in materials and methods. Immunoblot analysis of TRIM21, RIPK1, RIPK3 and MLKL expressions was performed. Anti-human Hsc-70 was used as protein loading control. One representative of three independent experiments. **(B)** HT29 WT and HT29 TRIM21-KO cells were treated or not (NT) with TRAIL-SK (100ng/ml), zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) during 24 h. Percentage of necrosis was evaluated by Hiechst/Propidium Iodide staining (mean \pm SD, n=3). **(C)** HT29 WT (in grey) and HT29 TRIM21-KO (in light grey) cells were treated or not (NT) with TRAIL-SK, zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) (TzB) during 24 h. Cell viability (%) was estimated by MTS assay (mean \pm SD, n=3). (#), P<0.05; (##), P<0.01 and (###), P<0.001 compared NT to treated cells; (*), P<0.05; (**), P<0.01 and (***), P<0.001 compared treated conditions. **(D)** HT29 TRIM21-KO cell line was transiently transfected with EGFP control plasmid or pTRIM21-GFP plasmid. Upper panel: Microscopical pictures of HT29 TRIM21-KO transfected or not (Control). Lower Panel: HT29 TRIM21-KO transfected or not cells were treated with TzB during 8 h. Cell mortality was estimated by using Propidium Iodide dye.

Figure 6: Knock-out of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR/Cas9 negatively regulates TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

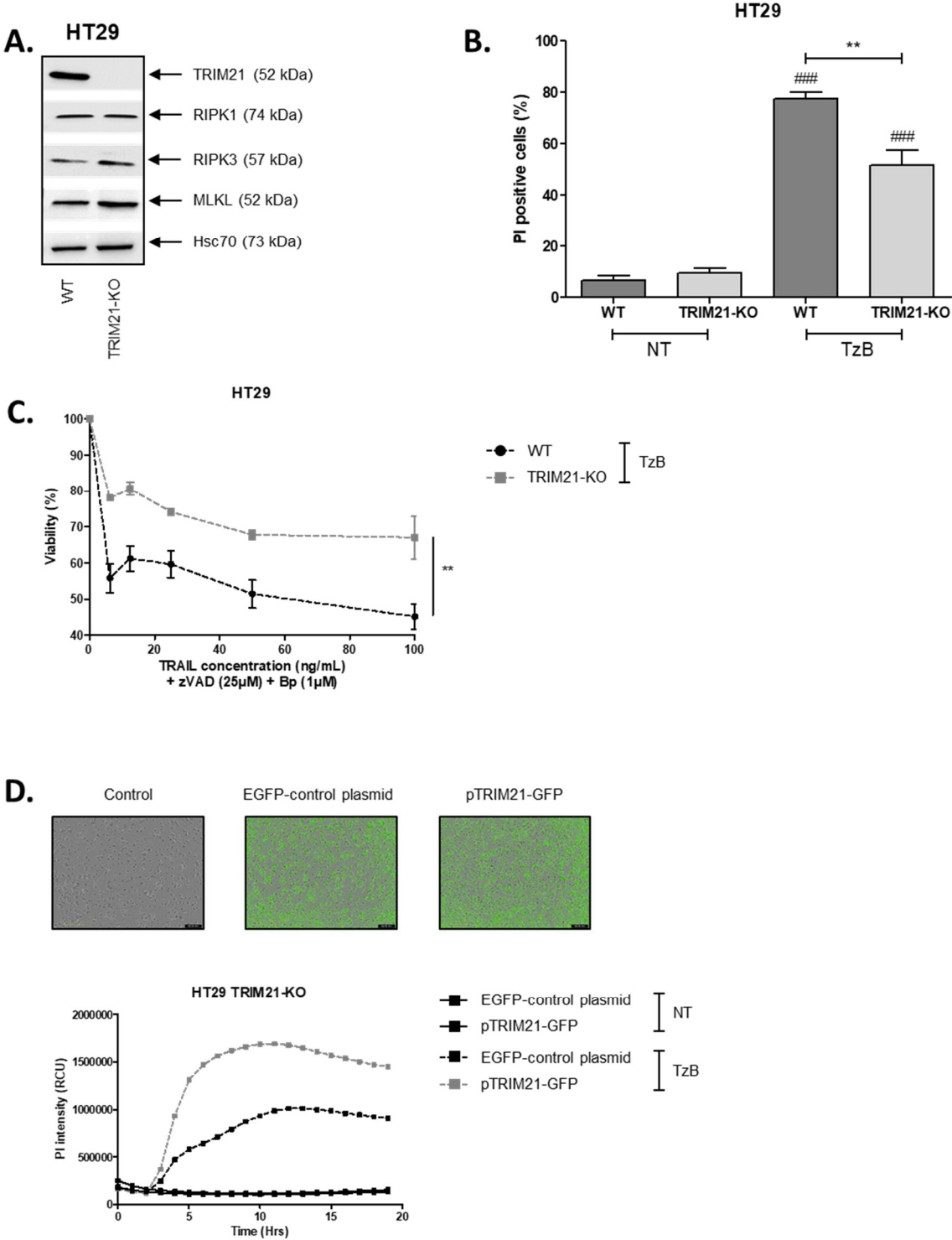


Figure 7: Knock-out of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR/Cas9 induces a delay and a decrease of TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

(A) HT29 TRIM21-KO cell line was obtained by CRISPR-Cas9 as described in materials and methods. HT29 WT (in black) or HT29 TRIM21-KO (in grey) cells were treated (dashed line) or not (solid line) with TRAIL-SK (100 ng/ml), zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) (TzB) during 8 hours. Necroptosis was evaluated by measuring SYTOX™ Green (SG) intensity (RFU) as described in materials and methods. **(B)** HT29 WT and HT29 TRIM21-KO cells were treated with TzB during the indicating times. Immunoblot analysis of TRIM21, RIPK1, RIPK3, MLKL and phosphorylated forms of RIPK1, RIPK3 and MLKL were evaluated. Anti-human Hsc-70 was used as protein loading control. One representative of three independent experiments. **(C)** Densitometry analysis of RIPK1, RIPK3, MLKL and phosphorylated forms on the western blot above. Data are shown as the P-RIPK3 (upper band)/P-RIPK3 (lower band) ratio, P-RIPK1/Hsc-70 ratio, P-MLKL/Hsc-70 ratio, RIPK1/Hsc-70 ratio, RIPK3/Hsc-70 ratio and MLKL/Hsc-70 ratio.

Figure 7: Knock-out of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR/Cas9 induces a delay and a decrease of TRAIL/zVAD-fmk/Birinapant (TzB)-induced necroptosis.

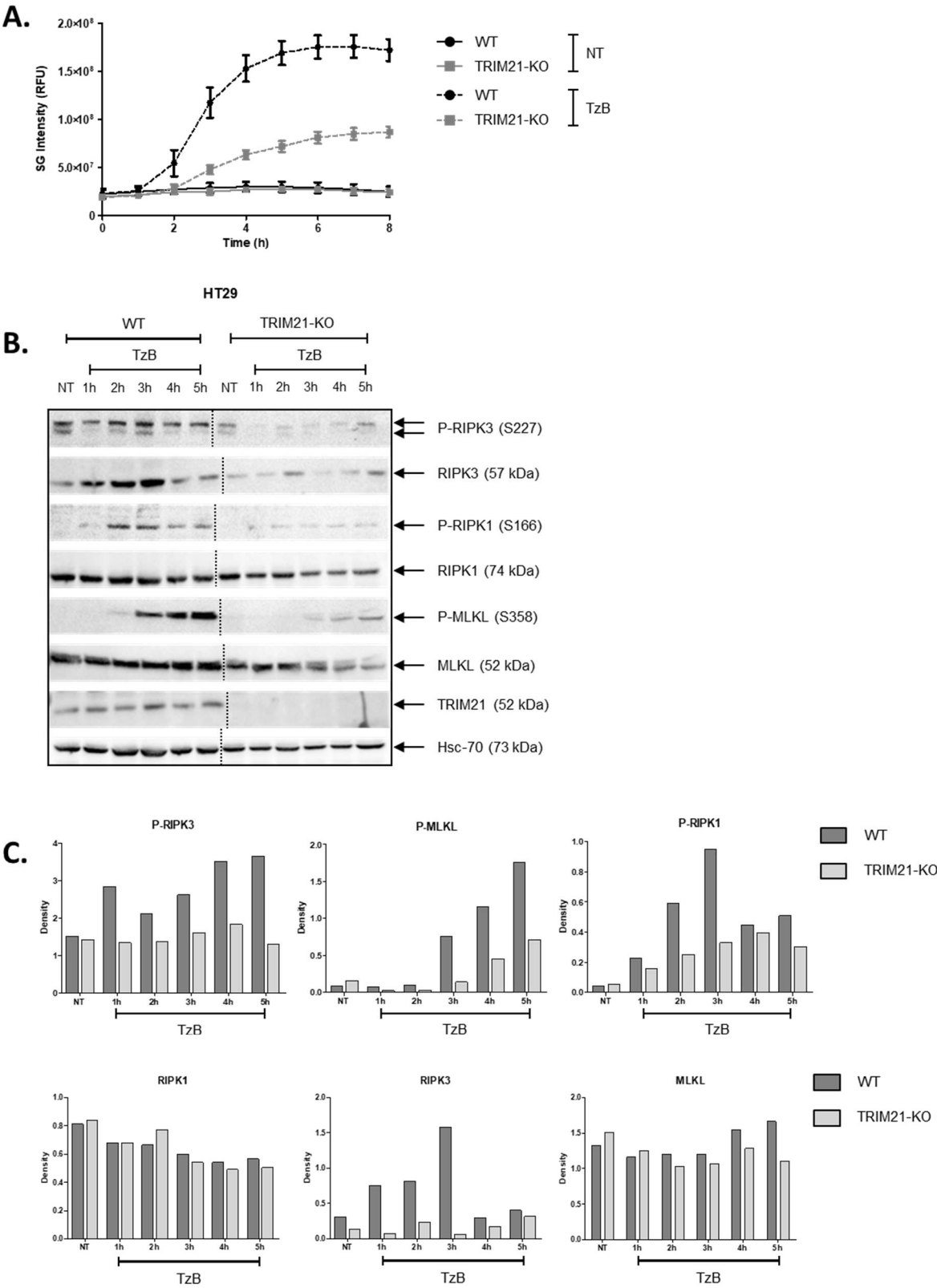
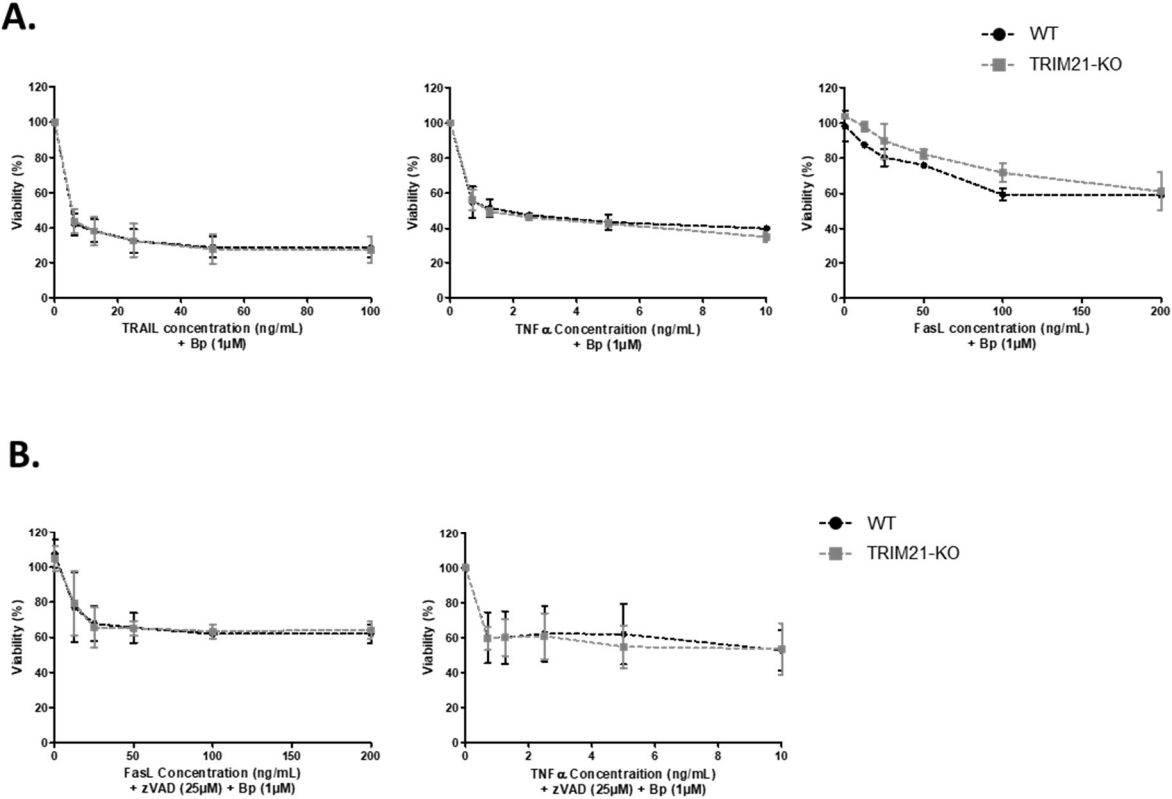


Figure Supp 1: Knock-out of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR/Cas9 did not modify cell sensitivity to apoptosis induced by TRAIL, FasL or TNF or necroptosis induced by FasL or TNF.

(A) HT29 WT and HT29 TRIM21-KO cells were treated with TRAIL-SK, TNF- α or FasL and Birinapant (Bp, 1 μ M) during 24 h. Cell viability (%) was estimated by MTS assay (mean \pm SD, n=3). (B) HT29 WT and HT29 TRIM21-KO cells were treated with TRAIL-SK, TNF- α or FasL, zVAD (25 μ M) and Birinapant (Bp, 1 μ M) during 24 h. Cell viability (%) was estimated by MTS assay (mean \pm SD, n=3). (#), P<0.05; (##), P<0.01 and (###), P<0.001 compared NT to treated cells; (*), P<0.05; (**), P<0.01 and (***), P<0.001 compared treated conditions.

Figure Supp 1: Knock-out of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR/Cas9 did not modify cell sensitivity to apoptosis induced by TRAIL, FasL or TNF or necroptosis induced by FasL or TNF.



Article n°2

L'apparition d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) chez des souris diabétiques atteintes de stéatohépatite non alcoolique (NASH) dépend de la composition du régime hyperlipidique et est associé avec la réponse immunitaire intrahépatique.

Mélanie Simoes Eugénio, Muhammad Farooq, Sarah Dion, Christelle Devisme, Céline Raguènes-Nicol, Claire Piquet-Pellorce, Michel Samson, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel, Jacques Le Seyec.

Article soumis pour publication.

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la 4^{ème} cause mondiale de décès par cancer. Un accroissement du nombre de patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est remarqué dans les pays développés, augmentant le risque de développement de NASH, de cirrhose hépatique et de CHC. Actuellement, peu de thérapies sont disponibles pour les patients atteints d'un CHC de stade avancé. De même, peu de modèles murins mimant la physiopathologie humaine et permettant l'étude du développement de ce cancer sont disponibles. Dans notre unité, nous avons mis en place un modèle murin de développement de CHC, basé sur des souris diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique. Ce modèle permet le développement d'une stéatose associée à une fibrose et à une stéatohépatite (NASH) et enfin l'apparition de tumeurs hépatiques.

L'objectif de cette étude était de caractériser l'impact de deux régimes hyperlipidiques possédant une composition différente en lipides, glucides et protéines (High-Fat-High-Cholesterol Diet, [HFHCD] et High-Fat-High-Sugar Diet, [HFHSD]) sur le développement de la NASH et l'apparition d'un cancer hépatique.

Principaux résultats :

- Deux physiopathologies différentes ont été observées : le régime HFHCD induit l'apparition d'une NASH sévère (dommages hépatiques, inflammation, fibrose, infiltrats immunitaires), qui est plus modérée avec le régime HFHSD ;
- La NASH modérée observée avec le régime HFHSD a été associée avec l'apparition plus rapide et d'un plus grand nombre de tumeurs hépatiques ;
- Le développement d'une NASH sévère, liée à la présence d'un infiltrat immunitaire conséquent semble limiter l'apparition de tumeurs hépatiques.

Article n°2

Hepatocellular carcinoma emergence in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis depends on High-fat diet composition and correlates with the intrahepatic immune response

Mélanie Simoes Eugénio, Muhammad Farooq, Sarah Dion, Christelle Devisme, Céline Raguènes-Nicol, Claire Piquet-Pellorce, Michel Samson, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel, Jacques Le Seyec.

Article soumis pour publication

Hepatocellular carcinoma emergence in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis depends on High-fat diet composition and correlates with the intrahepatic immune response.

Mélanie Simoes Eugénio^{1,2}, Muhammad Farooq^{1,3}, Sarah Dion^{1,2}, Christelle Devisme^{1,2}, Céline Raguènes-Nicol^{1,2}, Claire Piquet-Pellorce^{1,2}, Michel Samson^{1,2}, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{1,2}, Jacques Le Seyec^{#1,2}

¹ INSERM UMR1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail, F-35043 Rennes, France

² Biosit UMS3080, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

³ Department of Clinical Sciences, College of Veterinary and Animal Sciences, Jhang, Pakistan

Corresponding author: e-mail: jacques.leseyec@univ-rennes1.fr ; tel: +33 2 23 23 48 62

ABSTRACT

The increase of sedentary lifestyle and high-calorie diet have modified the etiological landscape of hepatocellular carcinoma (HCC), with a recrudescence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), especially in Western countries. The purpose of our study was to evaluate the impact of high-fat diet feeding on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) establishment and HCC development. Streptozotocin-induced diabetic male mice were fed with High-Fat-High-Cholesterol Diet (HFHCD) or High-Fat-High-Sugar Diet (HFHSD) from 1 to 16 weeks. Two distinct physiopathological patterns were evidenced, with much more severe NASH hallmarks (liver injury, inflammation and fibrosis) in diabetic mice fed with HFHCD than those fed with HFHSD. The mild hepatic injury, weak inflammation and fibrosis observed in HFHSD was interestingly associated with earlier emergence and more liver tumors. The delay in the appearance of tumor nodules and the limitation of their numbers in the liver of HFHCD-fed diabetic mice coincided with the presence of infiltrating LT CD4⁺ and LT CD8⁺ activated cells known to be involved in tumor surveillance. These data highlighted two different mouse models of HCC progression in diabetic mice depending on diet, which could be useful to evaluate new therapeutic approaches for HCC by targeting the immune response.

KEYWORDS

NAFLD, NASH, Hepatocellular carcinoma, NASH-HCC murine model

Introduction

The liver is the fifth organ most affected by cancer and the fourth leading cause of cancer-related deaths. Between 85 and 90% of primary liver cancers derived from hepatocytes [1]. Many risks factors for the development of this hepatocellular carcinoma (HCC) are relatively well known. The most important ones include chronic viral hepatitis, linked to Hepatitis B or C virus (HBV or HCV) infections, environmental toxins as aflatoxins, abuse of alcohol consumption, metabolic diseases such as obesity or diabetes mellitus, genetic disorders (Wilson's disease and hemochromatosis for instance) and more recently non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [2].

In the past few years, Western countries are facing a significant increase in the incidence of obesity and diabetes mellitus. These two human diseases are frequently associated with NAFLD [3], which is subdivided in two categories in adults according to their severity. At the first stage, the nonalcoholic fatty liver (NAFL) only shows some hepatocellular injury and steatosis. Besides, the nonalcoholic steatohepatitis (NASH) phase is a progressive liver disease, characterized by steatosis, liver inflammation and fibrosis, and could lead to cirrhosis and HCC [4].

The liver plays an important role in immunological surveillance, especially for gut-derived products containing many exogenous elements, mainly harmless but sometimes pathogenic. Thus, the liver tissue contains a broad collection of immune cells, including Kupffer cells (resident macrophages) and lymphocytes (LT and NK cells), which represent 50% of total immune cells in the liver [5]. This hepatic innate and adaptive immune system are also involved in the recognition and destruction of cancerous cells [6]. However, during chronic liver disease, the constant established inflammation results in the recruitment of systemic immune cells and increase of pro-inflammatory cytokine production (mostly TNF- α and IFN- γ). This unusual intrahepatic immune status promotes disease progression and contributes to carcinogenesis [7]. Once settled, tumors manage to control the anti-tumor functions of immune cells by producing immunosuppressive cytokines, such as TGF- β and IL-10 [8]. Besides, the intra-tumoral infiltration of immunosuppressive lymphocytes Treg is correlated with HCC progression and poor patient prognosis [9,10].

To better understand the role of the immune response during HCC progression, and thus to allow the development of new therapeutics, pertinent murine models are required. Fujii et al. have established a murine model enabling the study of HCC progression in a context of

nonalcoholic steatosis. This model, based on diabetic-induced C57Bl6J mice fed with a High Fat Diet (HFD) showed systematic development of tumors after 16 weeks under HFD and is considered to be a pertinent model for HCC development studies [11].

In the present work, we investigated the physiopathological differences during liver cancer progression in diabetic mice fed with two different high fat diets. Diabetic mice fed with high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) or high-fat high-sugar diet (HFHSD) were monitored during 16 weeks to evaluate steatosis, NASH severity and HCC development. The inflammation status and immune response were also followed in both conditions during the course of the disease.

RESULTS

High Fat Diet-induced steatosis was associated with severe liver injuries only for HFHCD.

In order to compare NASH evolution according to high calorie diet type, an experimental protocol using diabetic male mice was conducted. These protocol was described to induce chronic hepatitis leading to HCC development [11]. A type 1 diabetes was first triggered in C57Bl/6J male mouse pups using streptozotocin (STZ) treatment. Mice were then subjected, at post-weaning stage and for 16 weeks, to high-fat diets supplemented by an excess of cholesterol or of sugar (high-fat high-cholesterol diet [HFHCD] or high-fat high-sugar diet [HFHSD], respectively). Two control groups of non-diabetic and diabetic mice were bred in parallel under a standard diet (SD). Body weight monitoring showed that, unlike the other groups, mice under HFHCD tended to lose weight at the time of diet-switch to remain stable thereafter (Figure S3a). This minor weight loss was probably due, in part, to the poor palatability of HFHCD, as revealed by diet consumption follow-up (Figure S3b).

The induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) starts with asymptomatic hepatic steatosis, a process followed on mice enrolled in the different protocols, at 4, 8, 12 and 16 weeks on histological sections stained with H&E (Figure 1a). Macrovesicular steatosis appeared as early as 8 weeks, and seemed to be larger in mice fed with HFHSD. However, triglyceride quantification did not show any differences between the two groups. Thus, compared with control groups, the triglyceride levels doubled in the liver of mice under both HFD (Figure 1b).

During NAFLD evolution, oxidative stress sets and influences pathogenesis. Two markers of the oxidative state of the hepatic tissue were analyzed by an RT-qPCR approach. It turned out that HFHCD-fed mice displayed significant higher levels of NADPH oxidase 2 (*Nox2*) and

Heme oxygenase 1 (*Hmox-1*) mRNA than mice fed with HFHSD (Figure 1c). This difference was maintained throughout all the experimental kinetics, from the 4th to the 16th week. Note that diabetes alone also caused some hepatic oxidative stress, a phenomenon already described [12]. To evaluate liver injury in parallel, serum transaminase levels were monitored over time. While alanine transaminase (ALT) concentrations remained consistently normal for mice under HFHSD, blood from HFHCD-fed animals showed higher concentrations from 4 weeks of diet, which persisted until the end of the protocol (Figure 1d). Such values (averaging at 500 and up to 1000 UI/mL) revealed severe chronic liver damage, a typical NASH symptom. Besides, only HFHCD also caused a sustained systematic hepatomegaly, as shown by the analysis of liver to body weight ratio (Figure 1e).

These initial investigations showed that both tested hyper-caloric diets resulted in quantitatively identical steatosis in diabetic mice, but that the first explored symptoms of NASH appeared much more pronounced in the HFHCD-fed cohort.

The fibrotic stage reached in the livers of diabetic mice differed according to the type of high-fat diet.

During NASH, the continuous presence of liver damage related to the chronic inflammatory state will activate stellate cells that will be responsible for the excessive deposition of the extracellular matrix, transforming the liver structure into scar tissue. Fibrosis was investigated in our models, directly within the tissue using Sirius Red staining (Figure 2a). Strikingly, huge quantities of collagen fibers gradually accumulated in the liver of diabetic mice fed with HFHCD. In comparison, HFHSD only induced mild fibrosis. Signal quantification revealed that, in both cases, fibrosis began as early as week 4 and gradually intensified, with a much more pronounced slope for diabetic mice on HFHCD (Figure 2b). To support this histological data, the mRNA levels of genes known to be involved in fibrosis (*Colla1*, *Tgfb1*) were quantified in liver extracts. Both high-fat diets systematically upregulated tested mRNA, with again more marked inductions in samples issued from HFHCD-fed diabetic mice (Figure 2c).

A new level of illness, fibrosis, had been rapidly reached in diabetic mice fed with high-fat diets. Thus, diabetic mice subjected to the tested high-fat diets developed a similar steatosis but a NASH syndrome of different severity. The evaluated physiopathological parameters (oxidative stress, liver injuries and fibrosis) remained mild for HFHSD but became severe for HFHCD.

Mild NASH, a breeding ground for HCC.

Livers of mice included in protocols were isolated and macroscopically analyzed. While the liver of control diabetic mice looked normal, those issued from diabetic mice fed for 16 weeks with one of the HFD displayed an abnormal morphology, with a granular surface, a stiffer texture and a pale color. This deterioration, typical of fibrotic livers, was much more pronounced in animals under HFHCD than under HFHSD (Figure 3a).

Macroscopic observation also revealed that some tumors protruded from the surface of the organ isolated exclusively from HFHSD- and HFHCD-fed diabetic mice. Their quantification showed that more visible tumors recovered livers taken from diabetic mice fed with HFHSD (Figure 3b). Liver tissue sections were systematically stained with H&E after 4, 8, 12 and 16 weeks of feeding with HFHCD or HFHSD for histological observation. Tumors, detected by changes in the liver histology, were identified in all diabetic mice under HFD after 8, 12 and 16 weeks of feeding (Figure S4a).

Since glutamine synthetase (GS) has been described as an early biological marker of HCC (Long et al., 2010), its immunostaining was performed on liver sections from all animal groups and at all times of kinetics (Figure 3c). Basal physiological staining of GS appeared in the centrilobular zone III on all tested specimen. Otherwise, GS positive (GS+) nodules arose only in diabetic mice on HFD and never in SD-fed animals. The emergence of GS+ nodules began very early (at week 4) in diabetic mice fed with HFHSD, whereas the first GS+ nodules were detected only from week 8 in the liver of diabetic mice fed with HFHCD. In addition to the rapidity of their appearance in the liver of mice under HFHSD, the study of their density (number of GS+ nodules relative to the analyzed tissue surface) revealed that these livers contained a significantly larger number of GS+ nodules (Figure 3d). On the other hand, when comparing GS+ tumor sizes for same times of HFD, no difference emerged between the 2 experimental groups which received HFHCD or HFHSD (Figure S4b). These results indicated that in HFHCD mice, the liver environment seemed to restrict tumor onset.

Despite the differences detected in carcinogenesis according to the type of HFD, the life expectancy of diabetic mice under HFHCD or HFHSD remained similar. Indeed, their respective survival curves showed no significant difference (Figure S4c).

Finally, according to HFD type, diabetic mice with mild hepatitis and fibrosis developed more tumors in their liver than diabetic mice suffering from severe hepatitis and fibrosis.

HFD-composition affected the amplitude and nature of the immune infiltrate.

Distinct immunological liver microenvironments could explain the disparities observed between tumorigenesis occurring in diabetic mice fed with HFHCD or HFHSD. To initiate the analysis of elicited intrahepatic immune response, lobular inflammation and immune infiltrate were studied on liver sections stained with H&E (Figure S5). Lobular inflammation linked to steatohepatitis was only detected in diabetic mice fed with HFHCD and was accompanied by massive immune cell infiltrate from 8 to 16 weeks of feeding (Figure S5a). On the contrary, in diabetic mice fed with HFHSD, mild inflammation and only few spots of immune cells were observed on liver sections stained with H&E. Hepatic inflammation was also detected by an increase of *Tnf- α* and *Ccl-2* mRNA expression only in diabetic mice fed with HFHCD (Figure S5b).

In order to confirm immune cell presence in the livers of diabetic mice fed with used-HFD, immunocytochemistry staining was performed on tissue sections with a CD45 antibody (Figure 4). CD45 is a common marker of immune cells, strongly expressed on leukocytes and weakly expressed on myeloid cells. Immune cell infiltrates appeared in the livers of all diabetic mice fed with either HFHCD or HFHSD. However, in tissues derived from HFHSD-fed diabetic mice, the CD45 positive staining was lower than in those from mice fed with HFHCD and, regarding to the CD45 expression and cells morphology, seemed to be predominantly represented by myeloid cells (Figure 4a). Signal quantification confirmed that the level of immune cell infiltrates increased over time in both experimental groups but with greater magnitude in diabetic mice fed with HFHCD (Figure 4b).

To clarify cell infiltrate composition, hepatic immune cells were isolated to be identified and quantified by a flow cytometry approach. Thus, lymphocytes B (LB), lymphocytes T (LT4, LT8 and LTreg), natural killer (NK) cells, natural killer T (NKT) cells, macrophages and neutrophils were characterized in diabetic mouse livers after 1, 4 and 8 weeks of either HFHCD or HFHSD (Figure 5). All these immune cell populations and their activation were evaluated beforehand in the liver of healthy non-diabetic mice fed with SD (Figure S6b & S6c).

According to previously published data, the diabetic status of mice alone led to a progressive increase in the number of LT8, a situation found in all diabetic mice fed either with SD, HFHCD or HFHSD [14]. In addition, a decrease in NKT cells and neutrophils was observed in diabetic mice fed with SD (Figure 5b).

A significant recruitment of macrophages arose in the liver of HFHCD-fed diabetic mice at week 1. Concomitantly with this recruitment, LT4 and LT8, which are cells implied in the tumor immune surveillance, were activated only in the liver of mice fed with HFHCD from week 4 (Figure 5b & 6a). Regarding LTreg cells, which own immunosuppressive functions and thus control the immune response, their number and their activation state increased at week 4 and further at week 8 in the liver of diabetic mice fed with HFHCD (Figure 5b & 6a). Only in these mice, NKT cells gradually disappeared from livers, as previously reported [15], showing NASH progression in mice fed with HFHCD.

On the contrary, no drastic change occurred in the hepatic immune cell population of HFHSD-fed diabetic mice, either on their number or on their activation status.

Altogether these data suggested that the immune system was less solicited in the liver of mice fed with HFHSD since this diet did not induce hepatic inflammation, nor important recruitment of macrophages, nor activation of LT4, LT8 or LTreg nor decrease in NKT cells, contrary to what was observed in the liver of mice fed with HFHCD.

DISCUSSION

An inappropriate feeding behaviour can lead to steatosis (hepatic fat accumulation), liver inflammation or even hepatocellular carcinoma (HCC). To evaluate the impact of high-fat diet (HFD) composition on the progression of these pathologies, two groups of diabetic mice were fed with two distinct HFDs, one supplemented with cholesterol and cholate (HFHCD) and the other enriched in sugar (HFHSD). The induction of diabetes in itself led to overconsumption in mice, from a daily intake of 3 g of standard diet (SD) to almost 5 g of SD. However, the low palatability of HFDs was most likely responsible, at least in part, for the observed drop in daily food intake by diabetic mice, reaching 3 g for HFHSD and only 1.6 g for HFHCD. Finally, while the calorie intake of lipid origin represented a consumption of 1.8 kcal per day for SD-fed diabetic mice, that of diabetic mice on HFHCD or HFHSD reached 9 and 9.2 kcal per day, respectively. The indistinguishable steatosis levels measured in livers of diabetic mice fed with HFHCD or HFHSD may be explained by this similar high caloric intake of lipid origin.

HFHSD contained high percentages of carbohydrates, which, when combined with high fat diet, added a risk factor to develop HCC [16], and could contribute to tumors expansion in mice fed with HFHSD. Some studies showed that carbohydrates are associated with liver damage

and NAFLD [17,18]. In liver, carbohydrates stimulate lipogenesis that generates high levels of ATP and citrate, and induce fatty acids and triglycerides biosynthesis [19]. The high carbohydrate levels in HFHSD most likely contributed to steatosis hepatic damage, leading to hepatocyte proliferation, mild fibrosis and cancer development.

Not only did the proportions of lipid, carbohydrates and proteins differ between used diets but also the type of fatty acids. Thus, HFHCD is mainly composed by saturated fatty acid (SFA) of plant origin whereas HFHSD contains more monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) of animal origin. SFA accumulation has been shown to induce hepatic toxicity and endoplasmic reticulum stress that can stimulate the pro-inflammatory profile of macrophages [20,21]. On the contrary, PUFAs promote the prevention and the resolution of tissue inflammation. Accordingly, the inflammatory profile of macrophages depends on the ratio between SFA and PUFA. Thus, the SFA:PUFA ratio was much higher in HFHCD (17.35) than in HFHSD (2.31). The excess of SFA in HFHCD most probably contributed to the observed severe symptoms (inflammation and fibrosis) found in diabetic mice under this diet. Moreover, in the livers of HFHCD-fed mice, the increase of the CD69 marker on LT CD4+, which reflected their activation, may also be explained by this overabundance of SFA [22].

Besides, cholate and cholesterol, which enrich HFHCD, would also take part in its detrimental impact since these compounds has been respectively described to exacerbate inflammation and fibrosis [23,24]. Cholesterol is also, involved in cell death. This lipotoxic molecule increases the release of cytochrome c and adenosine triphosphate (ATP) leading to c-Jun N-terminal kinases 1 (JNK1) activation and cell death by apoptosis or necrosis [25].

During NASH progression, the excess of lipids and fatty acids leads to liver lipotoxicity and hepatocyte injuries that initiate inflammation. Hepatocyte injury results in the release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) which could activate Kupffer Cells (KC). In addition, patients with NASH have impaired intestinal permeability and a higher incidence of bacterial overgrowth leading to Pathogen-Association Molecular Patterns (PAMPs) release in blood [26]. PAMPs, commonly release by bacteria, viruses, parasites, fungi but also lipids contained in high-fat diets, could be detected by KC and also induce their activation [27]. DAMPs or PAMPs activated KC produce pro-inflammatory (TNF- α , IL-6, IL-1 β) and chemotactic factors (CCL-2, CCL-5), fuelling the inflammation and inducing immune cell recruitment [28]. Liver of HFHCD-fed diabetic mice exhibited an inflammatory reaction signature, with a strong expression of TNF- α and CCL-2. Thus, our histological analyses confirmed the presence of numerous immune cells resulting from active infiltration (CD45+

cells) and some of which was proliferating in the liver (Ki67+ cells) (data not shown). These hepatic infiltrates contained many macrophages, probably responsible for the strong activation of the lymphocyte population, especially found in this group of HFHCD-fed diabetic mice. In parallel, it was found that, compared to diabetic mice under HFHSD, those included in the experimental protocol using HFHCD developed less liver tumor nodules. In combination with NK cells, lymphocytes T (CD4+ T helper and CD8+ cytotoxic T cells) are known to be key players of the tumors immunosurveillance [29]. Thus, the presence of a greater number of active immune cells involved in tumor immunosurveillance in the liver of NASH-diabetic mice coincided with a limited emergence of hepatic tumors, despite an advanced fibrotic stage. This observation supports the hypothesis that a weak recrudescence and activation of invasive immune cells in the liver of diabetic mice fed with HFHSD allowed cancerous hepatocytes to persist, proliferate and give rise to numerous tumor nodules. In these mice, the absence of liver inflammation does not result in macrophages and lymphocytes recruitment and activation. In fact, a weak activating signal of LT CD4+ and LT CD8+ could lead to lymphocytes apoptosis [30]. These data supports the lack of immune surveillance inside liver tissue in mice fed with HFHSD and allow a suitable environment to tumors onset. This last in vivo experimental condition may reproduce a part of patients with NAFLD without advanced fibrosis, but who still develop HCC [31]. This subpopulation represents around 35% of NAFLD-associated HCC. Interestingly, larger tumors are also found in this subclass of clinical cases [32].

The massive influx of immune cells into the liver of HFHCD-fed diabetic mice also involved regulatory T cells (Tregs). These specialized lymphocytes are immunosuppressive cells and help to contain the immune response to prevent any drift risk towards autoimmune reactions. Conversely, their inhibitory functions could impede the protective functions of anti-tumors immune response, promoting cancerous cell expansion [33]. This murine model of HCC development in a NASH background on diabetic mouse under HFHCD will afford the opportunity to test a therapeutic strategy targeting Tregs, an approach described as a promising cancer treatment [34].

MATERIAL ET METHODS

Animal model and chemicals treatment

All experimental protocols on animals were conducted in compliance with French laws and the institution's guidelines for animal welfare (authors were authorized to conduct animal

experimentation by “La direction des Services Vétérinaires” (license M Samson, #A3523840), the project was authorized by the “Comité Régional d’Ethique d’Expérimentation Animal” [CREAA], license given by the “Ministère de l’Education Nationale et de la Recherche”, #5656-2016061401105051). Figure S1a depicts the general experimental plan. Diabetes mellitus was induced by a single subcutaneous injection of 200µg of Streptozotocin (STZ) (Sigma, #S0130) in C57Bl/6J male mice two days after birth. Four groups were designed: STZ-treated group under standard diet (STZ+SD), STZ-treated group under high-fat high-cholesterol diet (STZ+HFHCD) and STZ-treated group under high-fat high-sugar diet (STZ+HFHSD) and a control group under standard diet, without STZ treatment. At weaning, the diabetic status of mice was checked (Figure S1b). After, mice were fed ad libitum with a standard diet (SD) (2016, Teklad Diet, Envigo) or HFHCD, with vegetal fat (#9G21, LabDiet, St. Louis, MO) or HFHSD, with animal fat (TD.06414, Teklad Custom Diet, Envigo) during 1, 4, 8, 12 or 16 weeks (Figure S2). Animals were housed in individual cages and bred in specific pathogen-free conditions in conventional animal facility with a 12h dark light cycle.

Biochemical parameters

All animals were monitored daily and weighed once a week. Glycemia tests using glucometer (Freestyle Optium Neo, Abbott) were performed after weaning and at slaughtering with submandibular blood collection using a lancet (#GR-3,5mm, Goldenrod Animal Lancet, Bioseb Lab).

Serum alanine aminotransferase (ALT) transaminase levels were measured according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine primary reference procedures using an Olympus AU2700 Autoanalyser (Olympus Optical).

Histological analysis

Mouse liver was collected after slaughtering. Liver fragments were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections of 4 µm were used for hematoxylin-and-eosin (H&E), red sirius (RS) and immunohistochemistry stainings. For immunolocalization of glutamine synthetase (GS, Abcam, ab73593, 1/100), or of CD45 (BioLegend, #103107, 1/30), tissue sections were dried 1 h at 58 °C, followed by antigen retrieval and incubated with the corresponding primary antibody in a Ventana automated staining platform (Ventana Medical Systems, USA). Revelation of primary antibody was carried out using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Dako, USA) and DAB substrate kit (Ventana, #760-124). Slides were then counterstained with hematoxylin.

All paraffin-embedded liver sections were scanned with a digital slide scanner (Nanozoomer 2.0-RS, Hamamatsu) and files were analyzed with the NDP viewer 2.5 software (Hamamatsu). Quantification of glutamine synthetase and CD45 positive signals was performed with an image analysis software (NIS-Element AR analysis software, Nikon, Tokyo, Japan).

Hepatic triglyceride quantification assay

Fragments of mouse liver, collected after slaughtering and preserved at -80°C after rapid freezing in liquid nitrogen, were weighted and lysed by a 5% NP40 buffer (#FNN0021, Invitrogen) using an Ultra-Turrax® homogenizer. Triglycerides were solubilized at 90°C for 3 min and cleared by centrifugation at 15,000 rpm for 2 min. The Triglyceride Assay Kit (ab65336, Abcam) was used for quantification, according to manufacturer's instructions.

RNA Analysis

Total RNA was extracted from frozen liver fragments using the Nucleospin RNA kit (#740955, Macherey-Nagel) and an Ultra-Turrax® homogenizer according to manufacturer's instructions. After RNA quantification using the NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer), cDNA was synthesized using the SuperScript™ II Reverse Transcriptase (#18064022, Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed using the fluorescent SYBR Green dye (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) and the CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The primer sequences used for qPCR are detailed in Table S1 in supporting information. Each measurement was performed in triplicate. The relative gene expression was normalized against the 18S gene expression. Healthy control mouse group under SD, without STZ treatment was used as a reference for mRNA expression (control mRNA level was arbitrarily set at 1).

Liver immune cell analysis by flow cytometry

In order to remove blood, mouse livers were flushed by perfusion with PBS through inferior vena cava. Then, livers were crushed on a 70 µm cell strainer (Falcon #352350, Fisher Scientific). Parenchymal cells were removed by sedimentation for 1 h. Liver immune cells were isolated with density separation by centrifugation on RPMI media (RPMI 1640 Media, Gibco) with 35% Percoll (Percoll density gradient media, GE Healthcare, Life Sciences). For each liver, red blood cells were lysed by a treatment with ammonium chloride potassium (ACK) buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.01 mM EDTA). Cell suspensions were labeled for 30 minutes with LIVE/DEAD fixable green stain (#L34959, Life technologies) to exclude dead

cells. Cells were also incubated with an anti-CD16/CD32 antibody (2.4G2, BD Pharmingen) to block non-specific binding before staining with fluorochrome-conjugated antibodies described in Table S2. Fluorescence of stained cells was measured on LSRFortessa x20™ flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using Flowlogic software (MACS Miltenyi Biotec). Dead cells and doublets were excluded on the basis of LIVE/DEAD labeling and forward/side scatter, respectively. The immuno-phenotyping used was as follows: B-lymphocytes: CD19+/CD3- cells; T-lymphocytes: CD3+/TCRVβ+/NK1.1-; NKT cells: CD3+/TCRVβ+/NK1.1+; NK cells: CD3-/NK1.1+; neutrophils: GR1+/CD11b+ and macrophages: GR1+/CD11b- (Figure S6a). Lymphoid activation was studied by analyzing the expression of CD69. We calculated the percentage of each immune cell population, by considering the sum of events of all immune cell populations analyzed (sum of T, NK, NKT, B cells and myeloid cells) as 100% of the total immune cells.

Statistical analysis

Data were expressed as means ± SEM for all mice treated similarly. Mean differences between experimental groups were assessed using the non-parametric Mann–Whitney U-test. All statistical analysis were achieved with the GraphPad Prism5 software. Calculated p values are integrated on histograms and graphs. Significance is shown as follows: #p < 0.05, ##p < 0.01 and ###p < 0.001 (comparison between diabetic mice under SD to healthy mice under SD groups); \$p < 0.05, \$\$p < 0.01 and \$\$\$p < 0.001 (comparison between STZ+SD and STZ+HFHCD or STZ+HFHSD groups) and *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 (comparison between STZ+HFHCD and STZ+HFHSD groups).

CONCLUSION

In this study, we investigated the impact of high fat diet composition on HCC development. STZ-induced diabetic male mice were fed with High-Fat-High-Cholesterol (HFHCD) or High-Fat-High-Sugar (HFHSD). Our results showed that the physiopathological conditions leading to the development of HCC was different in mice according to the diet. Mice fed with HFHCD developed severe liver injury, inflammation and fibrosis. This pro-inflammatory liver environment induced massive immune cell infiltrates, which seemed to be able to partly control tumor onset. On the contrary, diabetic mice fed with HFHSD presented moderate liver injury and mild fibrosis. This hepatic microenvironment with low inflammation and weak immune cell infiltrates was propitious to tumor development. Finally, these two in vivo mouse models

of HCC progression in diabetic mice and depending on diet could be useful to better understand the heterogeneity of liver tumors and are therefore relevant supports for evaluating new therapeutic approaches, such as immune therapy.

Author Contributions

M.S.E., M.F, S.D., C.P.-P., M.S., M.-T.D.-B. and J.L.-S. conceived and designed research; M.S., J.L.-S. and M.-T.D.-B. collected the funds for this project; M.S.E and M.F. maintained research data; M.S.E. analyzed data, prepared figures and drafted manuscript; M.S.E., M.F., E.M., S.D., C.D., C.R.-N., C.P.-P., M.S., M.-T.D.-B. and J.L.-S. performed experimentations and collected all data; C.P.-P., M.S., J.L.-S. and M.-T.D.-B. supervised the project; M.S. managed the project; S.D., C.P.-P., M.S., M.-T.D.-B. and J.L.-S. supervised and validated the research and participated in the review and edition of manuscript.

Funding

This work was supported by the INSERM (<https://www.inserm-fr.gate2.inist.fr/en>); the University of Rennes 1 (<https://www.univ-rennes1.fr/>); the “Région Bretagne” (<http://www.bretagne.bzh/>); the “Ligue Contre le Cancer, Comités du Grand Ouest” (<https://www.ligue-cancer.net/>); and the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM, <https://www.frm.org/>). M.S.E. was supported by a PhD fellowship from “Région Bretagne” and “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”. M.F. was supported by a PhD fellowship from the Government of Pakistan (Higher Education Commission).

Acknowledgments

For immunohistochemistry analysis, bead-based immunoassays, and animal house facilities, we would like to thank dedicated platforms (i.e. H2P2, flow cytometry and cell sorting, and animal house platforms) of SFR BIOSIT, University of Rennes 1, France.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018, 68, 394–424.
2. Fujiwara, N.; Friedman, S.L.; Goossens, N.; Hoshida, Y. Risk factors and prevention of hepatocellular carcinoma in the era of precision medicine. *J Hepatol* 2018, 68, 526–549.
3. Desai, A.; Sandhu, S.; Lai, J.-P.; Sandhu, D.S. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol* 2019, 11, 1–18.
4. Adams, L.A.; Ratzliff, V. Non-alcoholic fatty liver – Perhaps not so benign. *Journal of Hepatology* 2015, 62, 1002–1004.
5. Racanelli, V.; Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006, 43, S54–S62.
6. Eggert, T.; Greten, T.F. Tumor regulation of the tissue environment in the liver. *Pharmacol Ther* 2017, 173, 47–57.
7. Schreiber, R.D.; Old, L.J.; Smyth, M.J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011, 331, 1565–1570.
8. Makarova-Rusher, O.V.; Medina-Echeverez, J.; Duffy, A.G.; Greten, T.F. The yin and yang of evasion and immune activation in HCC. *Journal of Hepatology* 2015, 62, 1420–1429.
9. Kobayashi, N.; Hiraoka, N.; Yamagami, W.; Ojima, H.; Kanai, Y.; Kosuge, T.; Nakajima, A.; Hirohashi, S. FOXP3⁺ Regulatory T Cells Affect the Development and Progression of Hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2007, 13, 902–911.
10. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004, 22, 531–562.
11. Fujii, M.; Shibasaki, Y.; Wakamatsu, K.; Honda, Y.; Kawauchi, Y.; Suzuki, K.; Arumugam, S.; Watanabe, K.; Ichida, T.; Asakura, H.; et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 2013, 46, 141–152.
12. Mohamed, J.; Nazratun Nafizah, A.H.; Zariyantey, A.H.; Budin, S.B. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2016, 16, e132-141.

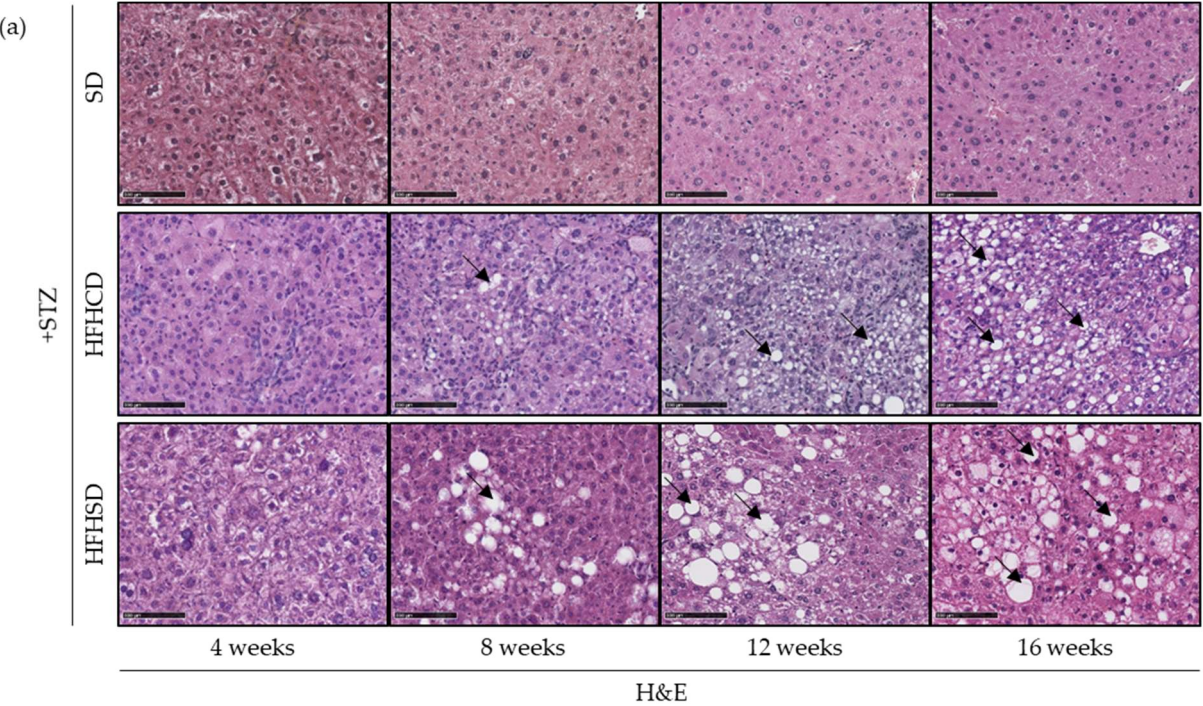
13. Long, J.; Wang, H.; Lang, Z.; Wang, T.; Long, M.; Wang, B. Expression level of glutamine synthetase is increased in hepatocellular carcinoma and liver tissue with cirrhosis and chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2010, 5, 698–706.
14. Zhou, T.; Hu, Z.; Yang, S.; Sun, L.; Yu, Z.; Wang, G. Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 2018, 2018.
15. Vasseur, P.; Dion, S.; Filliol, A.; Genet, V.; Lucas-Clerc, C.; Jean-Philippe, G.; Silvain, C.; Lecron, J.-C.; Piquet-Pellorce, C.; Samson, M. Endogenous IL-33 has no effect on the progression of fibrosis during experimental steatohepatitis. *Oncotarget* 2017, 8, 48563–48574.
16. Tessitore, A.; Mastroiaco, V.; Vetusch, A.; Sferra, R.; Pompili, S.; Cicciarelli, G.; Barnabei, R.; Capece, D.; Zazzeroni, F.; Capalbo, C.; et al. Development of hepatocellular cancer induced by long term low fat-high carbohydrate diet in a NAFLD/NASH mouse model. *Oncotarget* 2017, 8, 53482–53494.
17. Basaranoglu, M.; Basaranoglu, G.; Bugianesi, E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2015, 4, 109–116.
18. Garbow, J.R.; Doherty, J.M.; Schugar, R.C.; Travers, S.; Weber, M.L.; Wentz, A.E.; Ezenwajaku, N.; Cotter, D.G.; Brunt, E.M.; Crawford, P.A. Hepatic steatosis, inflammation, and ER stress in mice maintained long term on a very low-carbohydrate ketogenic diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011, 300, G956-967.
19. Cantley, L.C. Cancer, metabolism, fructose, artificial sweeteners, and going cold turkey on sugar. *BMC Biol.* 2013, 12, 8.
20. Leroux, A.; Ferrere, G.; Godie, V.; Cailleux, F.; Renoud, M.-L.; Gaudin, F.; Naveau, S.; Prévot, S.; Makhzami, S.; Perlemuter, G.; et al. Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J. Hepatol.* 2012, 57, 141–149.
21. Hubler, M.J.; Kennedy, A.J. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *J. Nutr. Biochem.* 2016, 34, 1–7.
22. Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function. - PubMed - NCBI Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352844> (accessed on Oct 3, 2019).

23. Ibrahim, S.H.; Hirsova, P.; Malhi, H.; Gores, G.J. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammate. *Dig Dis Sci* 2016, 61, 1325–1336.
24. Vergnes, L.; Phan, J.; Strauss, M.; Tafuri, S.; Reue, K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 42774–42784.
25. Kutlu, O.; Kaleli, H.N.; Ozer, E. Molecular Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis- (NASH-) Related Hepatocellular Carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018, 2018.
26. Ganz, M.; Szabo, G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int* 2013, 7, 771–781.
27. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, 124, 783–801.
28. Grunhut, J.; Wang, W.; Aykut, B.; Gakhal, I.; Torres-Hernandez, A.; Miller, G. Macrophages in Nonalcoholic Steatohepatitis: Friend or Foe? *Eur Med J Hepatol* 2018, 6, 100–109.
29. Sachdeva, M.; Chawla, Y.K.; Arora, S.K. Immunology of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015, 7, 2080–2090.
30. Crispe, I.N. Immune Tolerance in Liver Disease. *Hepatology* 2014, 60, 2109–2117.
31. Wong, C.R.; Nguyen, M.H.; Lim, J.K. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2016, 22, 8294–8303.
32. Bengtsson, B.; Stål, P.; Wahlin, S.; Björkström, N.K.; Hagström, H. Characteristics and outcome of hepatocellular carcinoma in patients with NAFLD without cirrhosis. *Liver Int.* 2019, 39, 1098–1108.
33. Chaudhary, B.; Elkord, E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines (Basel)* 2016, 4.
34. Togashi, Y.; Shitara, K.; Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019, 16, 356–371.

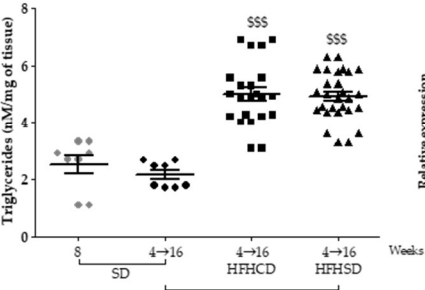
Figure 1: High-fat diet type influenced hepatitis severity in diabetic mice without affecting steatosis grade.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** H&E staining of liver sections. Black arrows show lipid macrovesicles. Scale bars: 100 μm , original magnification x200; **(b)** Triglyceride concentration measured in liver extracts; **(c)** Hepatic mRNA expression levels of Hmox-1 and Nox2 genes; **(d)** Liver to body weight (LBW) ratio, percentage of liver weight on body weight; **(e)** Plasma alanine transaminase (ALT) concentrations (UI/L). For all graph, each grey dots, black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, $P < 0.05$; \$\$, $P < 0.01$ and \$\$\$, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

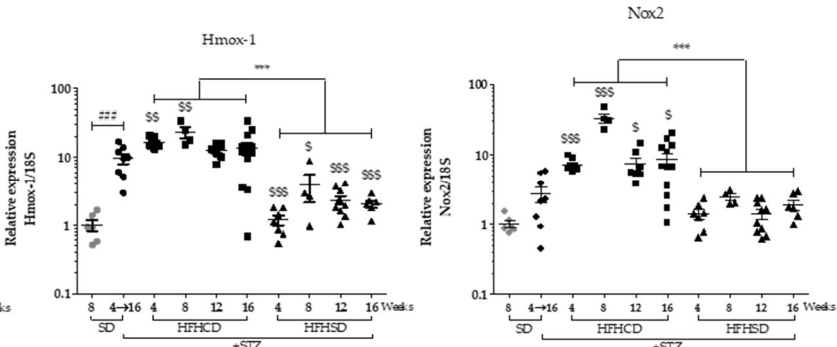
Figure 1: High-fat diet type influenced hepatitis severity in diabetic mice without affecting steatosis grade.



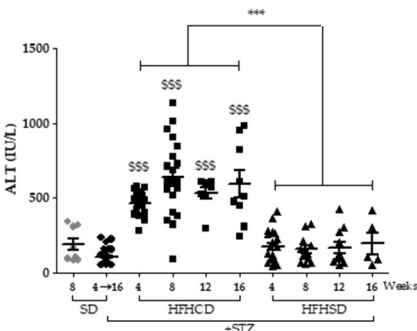
(b) Triglyceride quantification



(c) Oxidative stress response



(d) Transaminases



(e) Mouse liver to body weight ratio

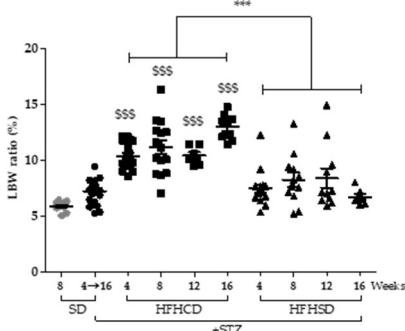
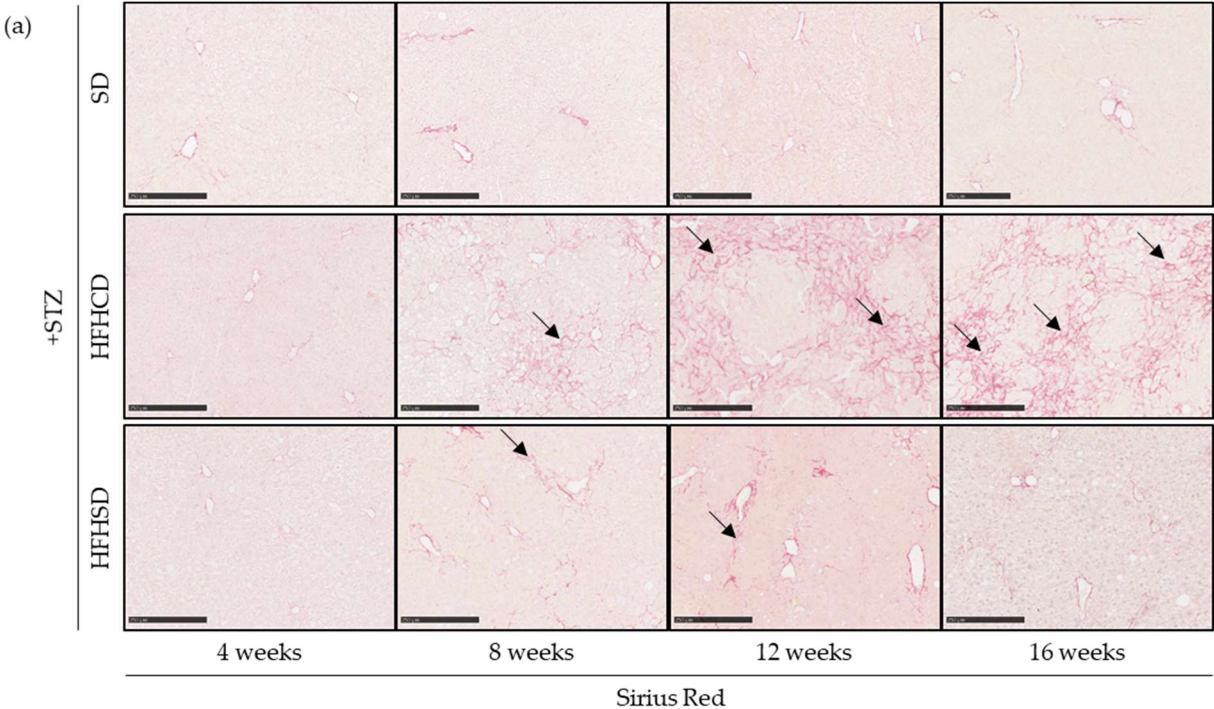


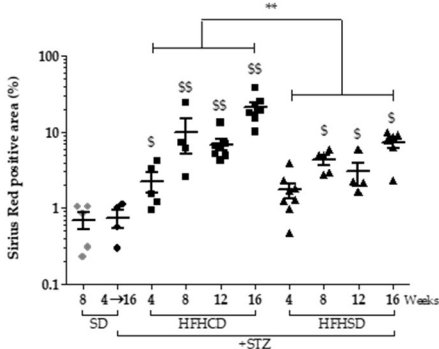
Figure 2: High-fat diet type affected fibrosis progress in diabetic mice.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** Sirius Red staining of liver sections. Black arrows show collagen deposition. Scale bars: 250 μ m, original magnification x100; **(b)** Quantification of fibrosis as determined by the percentage of Sirius Red positive area; **(c)** Hepatic mRNA expression levels of *Coll1a1* and *Tgfb1* genes. For all graph, each grey dots, black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, $P < 0.05$; \$\$, $P < 0.01$ and \$\$\$, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

Figure 2: High-fat diet type affected fibrosis progress in diabetic mice.



(b) Fibrosis quantification



(c)

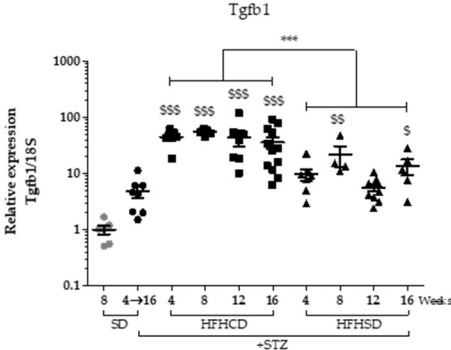
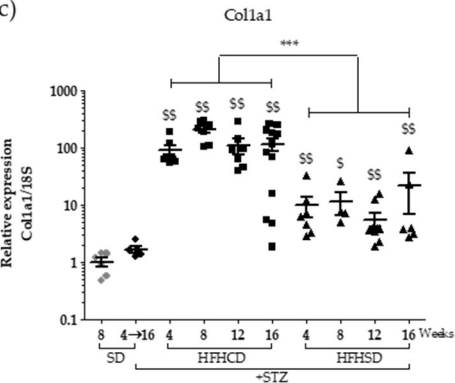
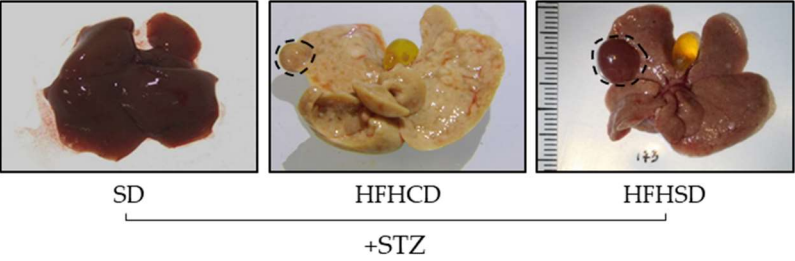


Figure 3: NASH-driven hepatic carcinogenesis in diabetic mice depended on high-fat diet type.

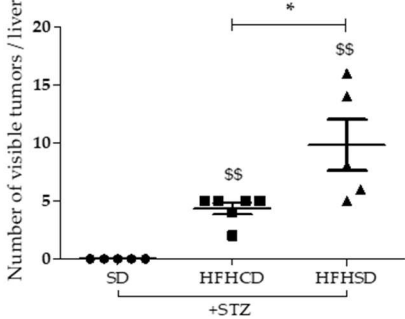
Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** Representative macroscopic liver pictures. Dashed lines delimit visible tumors; **(b)** Tumour density measured from liver pictures; **(c)** Glutamine Synthetase staining of liver sections. Dashed lines delimit positive Glutamine Synthetase (GS+) tumors. Scale bars: 500 μm , original magnification x50; **(d)** Hepatocellular carcinoma quantification measured from GS+ area. For all graph, each grey dots, black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, $P < 0.05$; \$\$, $P < 0.01$ and \$\$\$, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

Figure 3: NASH-driven hepatic carcinogenesis in diabetic mice depended on high-fat diet type.

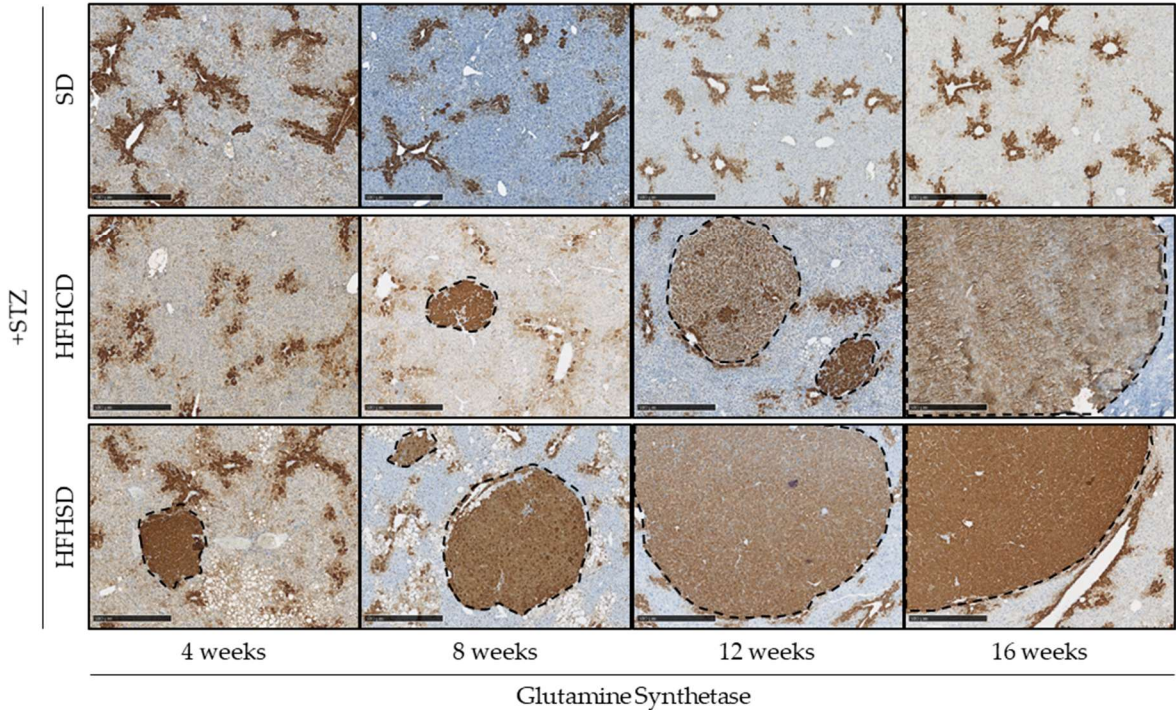
(a) Macroscopical pictures of mouse liver (16 weeks)



(b) Tumor density (16 weeks)



(c)



(d) HCC quantification

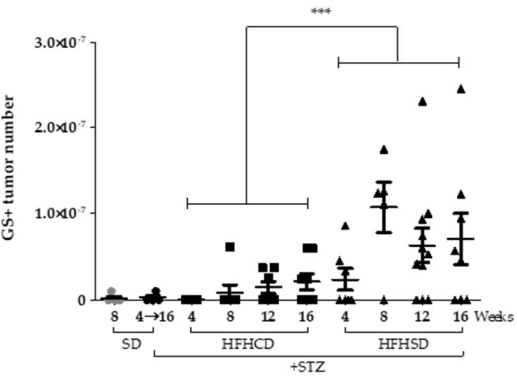


Figure 4: Immune infiltrate presence during HCC development on NASH background.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 1, 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** CD45 staining of liver sections. Black arrows show CD45⁺ immune infiltrates. Scale bars: 100 μ m, original magnification x100; **(b)** Quantification of immune infiltrates measured from CD45 positive area. For all graph, each grey dots, black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, P<0.05; ##, P<0.01 and ###, P<0.001 compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, P<0.05; \$\$, P<0.01 and \$\$\$, P<0.001 compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, P<0.05; **, P<0.01 and ***, P<0.001 compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

Figure 4: Immune infiltrate presence during HCC development on NASH background.

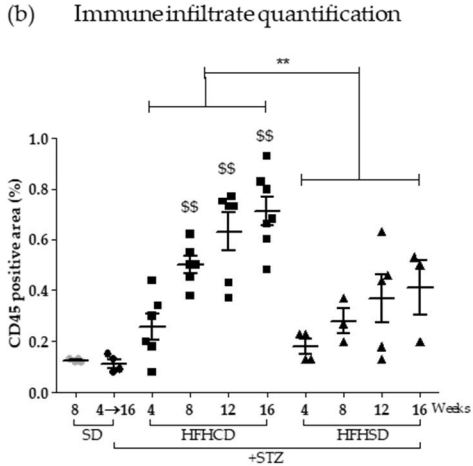
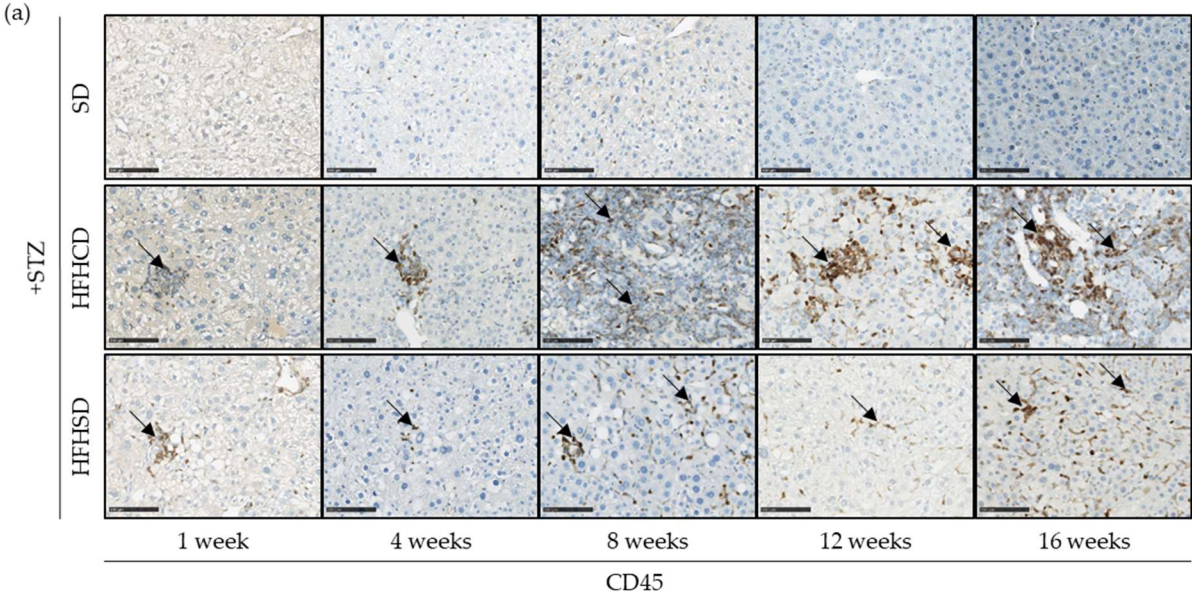
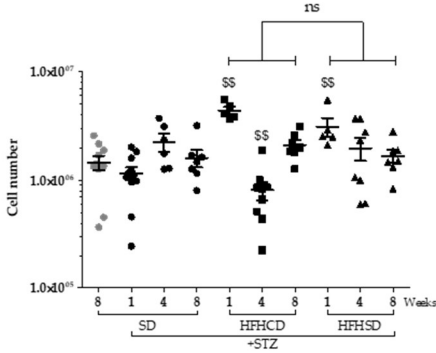


Figure 5: Analysis of hepatic immune infiltrates during HCC development on NASH background.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 1, 4, 8 weeks. **(a)** Total immune cells in mice liver determined by flow cytometry; **(b)** Percentages of Lymphocytes B (LB), Lymphocytes T-CD4⁺ (LT4), Lymphocytes T-CD8⁺ (LT8), Lymphocytes Treg (LTreg), Natural Killer (NK) cells, Natural Killer T (NKT) cells, Macrophages and Neutrophils in the different experimental conditions (percentage of total cells). For all graph, each grey and black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, P<0.05; ##, P<0.01 and ###, P<0.001 compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, P<0.05; \$\$, P<0.01 and \$\$\$, P<0.001 compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, P<0.05; **, P<0.01 and ***, P<0.001 compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

Figure 5: Analysis of hepatic immune infiltrates during HCC development on NASH background.

(a) Total immune cells in mouse liver



(b)

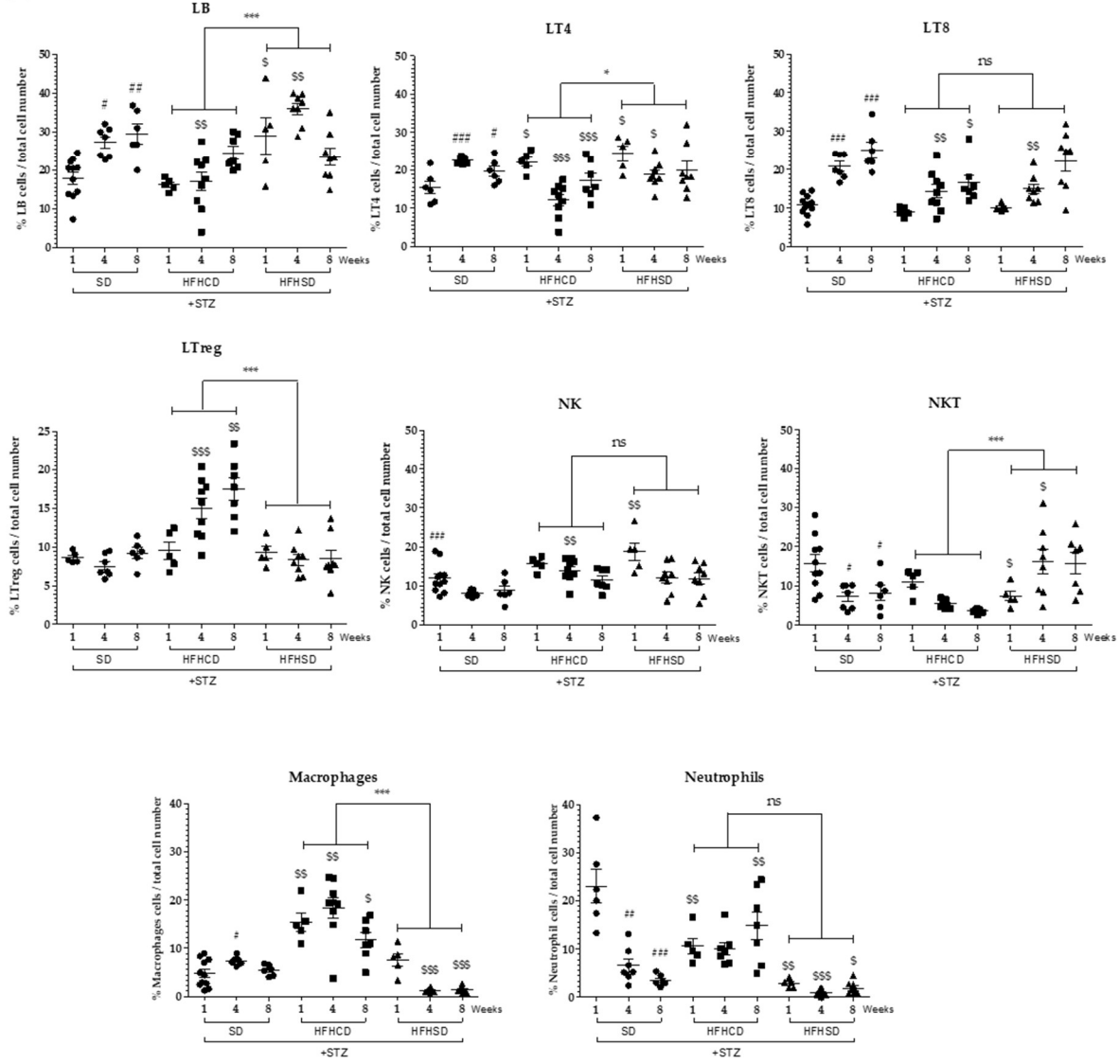


Figure 6: Analysis of the activation of hepatic immune infiltrates during HCC development on NASH background.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 1, 4, 8 weeks. (a) Percentages of activated Lymphocytes T-CD4⁺ (Activated LT4), Lymphocytes T-CD8⁺ (Activated LT8), Lymphocytes Treg (Activated LTreg), Lymphocytes B (Activated LB), and Natural Killer (Activated NK) cells. For all graph, each black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, P<0.05; ##, P<0.01 and ###, P<0.001 compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, P<0.05; \$\$, P<0.01 and \$\$\$, P<0.001 compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, P<0.05; **, P<0.01 and ***, P<0.001 compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

Figure 6: Analysis of the activation of hepatic immune infiltrates during HCC development on NASH background.

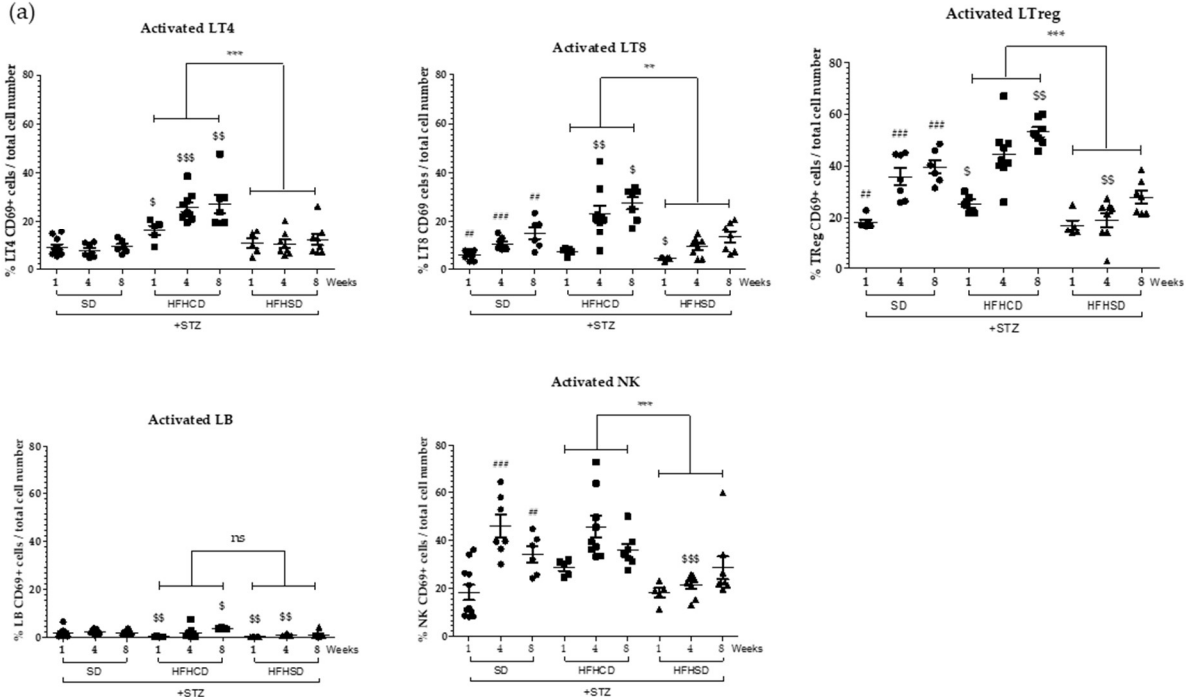
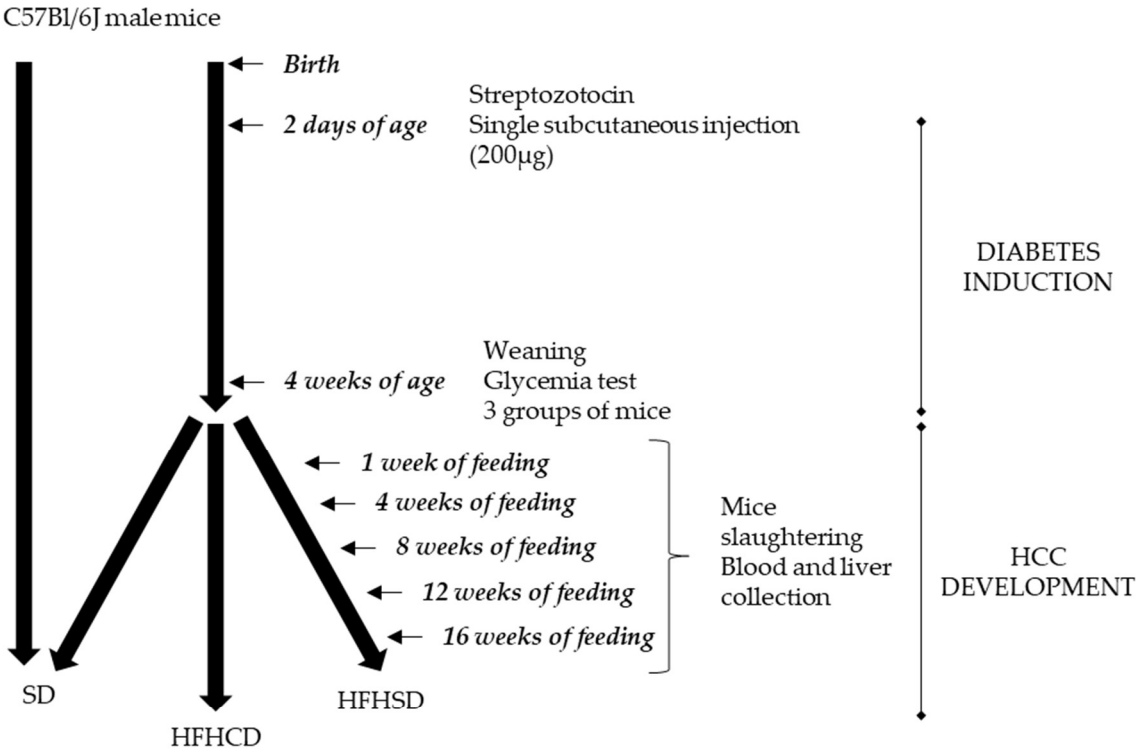


Figure supplementary 1: Experimental design of in vivo experiments.

Two days old C57Bl/6J male mice were subcutaneously injected with streptozotocin (STZ). After weaning, diabetes status were validated and diabetic mice were fed either a Standard Diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 1, 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** Experimental protocol; **(b)** Serum glucose levels of mice at weaning. For all graph, each grey and black dots represent individuals from the different groups: healthy mice under SD and STZ-treated mice before feeding with SD, HFHCD or HFHSD diets. ###, $P < 0.001$ compared STZ-treated mice under SD to healthy mice under SD.

Figure supplementary 1: Experimental design of in vivo experiments.

(a) NASH-HCC model



(b) Glucose level at weaning

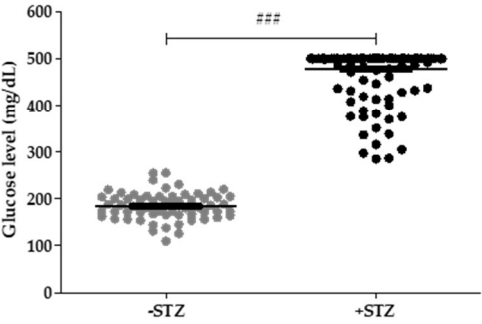


Figure supplementary 2: Diet characteristics.

Diet compositions were provided by suppliers. **(a)** Energy density (Kcal/g) with energetic part of protein, carbohydrates and fat of Standard diet (SD), High-Fat High-Cholesterol Diet (HFHCD) and High-Fat High-Sugar Diet (HFHSD); **(b)** Composition in lipids (% by weight) of Standard diet (SD), High-Fat High-Cholesterol Diet (HFHCD) and High-Fat High-Sugar Diet (HFHSD).

Figure supplementary 3: Mice monitoring.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 1, 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** Mice body weight; **(b)** Diet consumption per mice per week (upper panel). Mean of daily food (g), daily calorie intake (kcal) and daily lipid calorie intake (kcal) for mice fed with SD; HFHCD or HFHSD. For all graph, each grey dots, black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, $P < 0.05$; \$\$, $P < 0.01$ and \$\$\$, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

Figure supplementary 2: Diet characteristics.

(a) SD, HFHCD and HFHSD composition in proteins, fat and carbohydrates

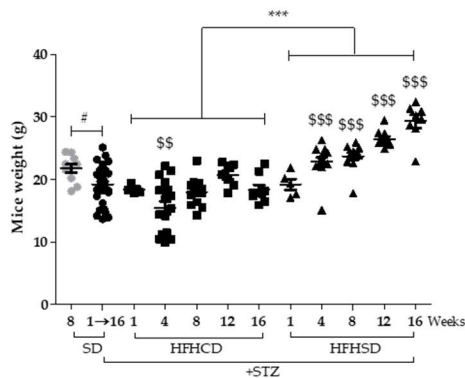
	SD	HFHCD	HFHSD
Energy density (Kcal/g)	3	6,5	5,1
Proteins	22%	6%	18%
Fat	12%	86%	60%
Carbohydrates	66%	8%	22%

(b) SD, HFHCD and HFHSD composition in fat

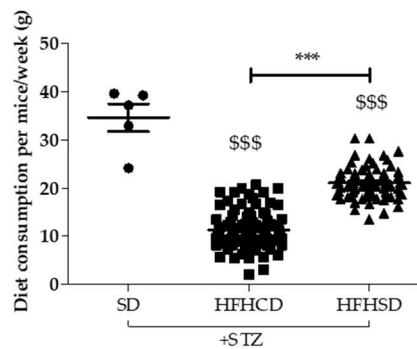
	SD	HFHCD	HFHSD
Total Fat (% by weight)	4	61,9	34,3
Total saturated fatty acids	0,6	36,4	12,7
Total monounsaturated fatty acids	0,7	20,4	16,1
Polyunsaturated fatty acids	2,1	2,1	5,5
Cholesterol	0	1,5	0

Figure supplementary 3: Mice monitoring.

(a) Mouse body weight



(b) Diet consumption



	SD	HFHCD	HFHSD
Daily food intake (g)	5	1,6	3
Daily calorie intake (Kcal)	15	10	15
Daily lipid calorie intake (Kcal)	1,8	9	9,2

Figure supplementary 4: HCC development and mouse survival.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** H&E staining of liver sections. Dashed lines delimit tumor nodules. Scale bars: 500 μm , original magnification x50; **(b)** Glutamine synthetase positive (GS+) tumor size (μm^2); **(c)** Mice survival curves. Grey dot, black dots, black squares and black triangles represent the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compared healthy mice under SD to diabetic mice under SD, HFHCD or HFHSD.

Figure supplementary 4: HCC development and mouse survival.

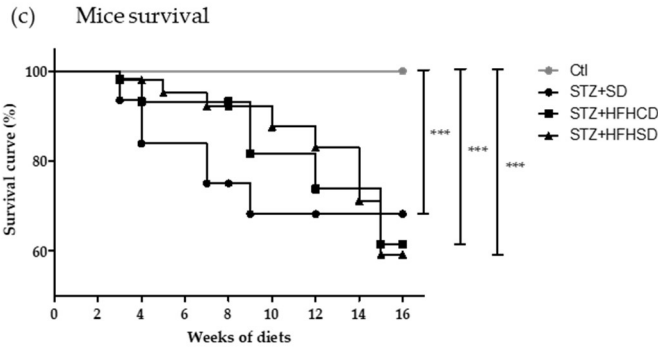
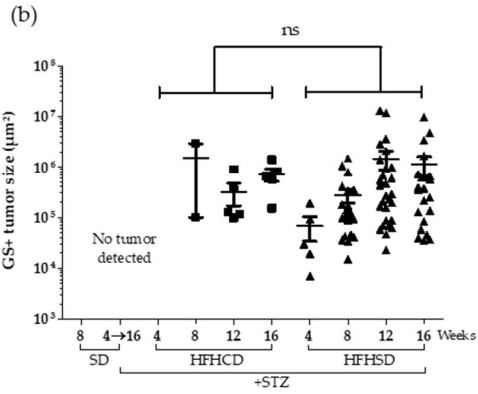
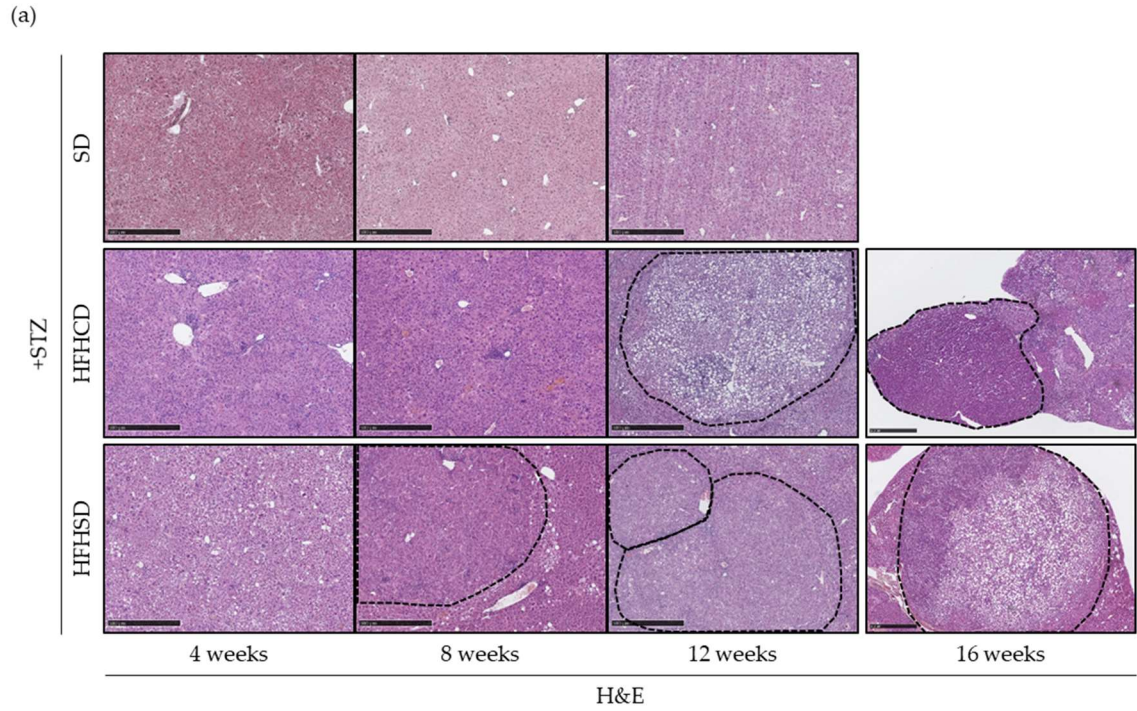


Figure supplementary 5: Liver immune infiltrates in diabetic mice under distinct HFDs.

Healthy or diabetic (STZ, Streptozotocin) C57Bl6/J male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat diet (HFHCD, High-Fat High-Cholesterol Diet; HFHSD, High-Fat High-Sugar Diet) during 1, 4, 8, 12 or 16 weeks. **(a)** H&E staining of liver sections. Black arrows show visible immune infiltrates. Scale bars: 100 μ m, original magnification x100; **(b)** Hepatic mRNA expression levels of *Tnf- α* and *Ccl-2* genes. For all graph, each grey dots, black dots, black squares and black triangles represent individuals from the different groups: healthy mice under SD, diabetic mice under SD, diabetic mice under HFHCD or HFHSD, respectively. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ compared diabetic mice under SD to healthy mice under SD; \$, $P < 0.05$; \$\$, $P < 0.01$ and \$\$\$, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD or HFHSD to diabetic mice under SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compared diabetic mice under HFHCD to diabetic mice under HFHSD.

Figure supplementary 5: Liver immune infiltrates in diabetic mice under distinct HFDs.

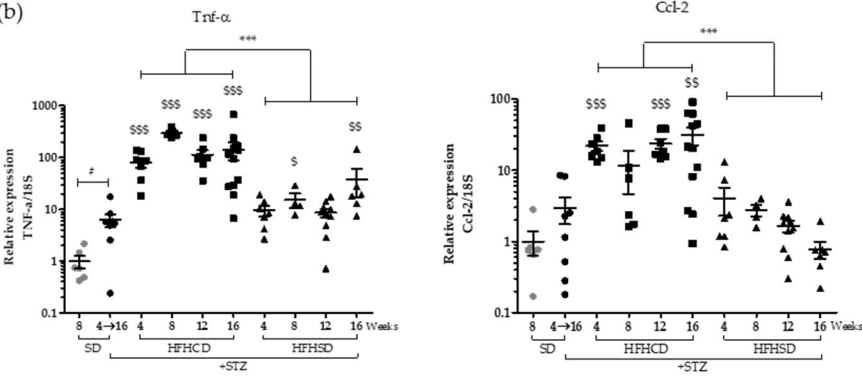
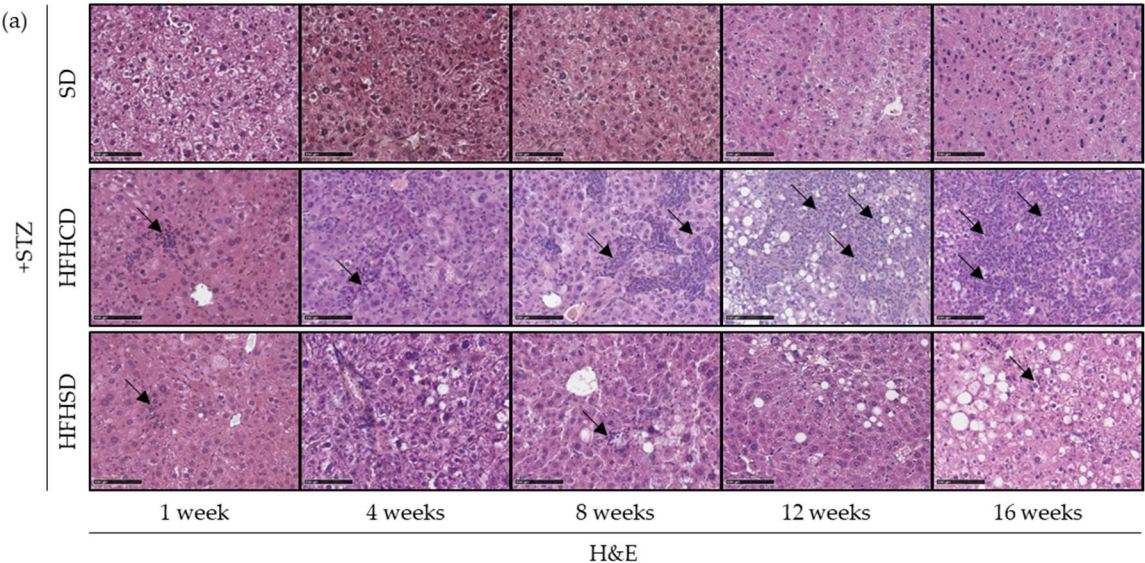
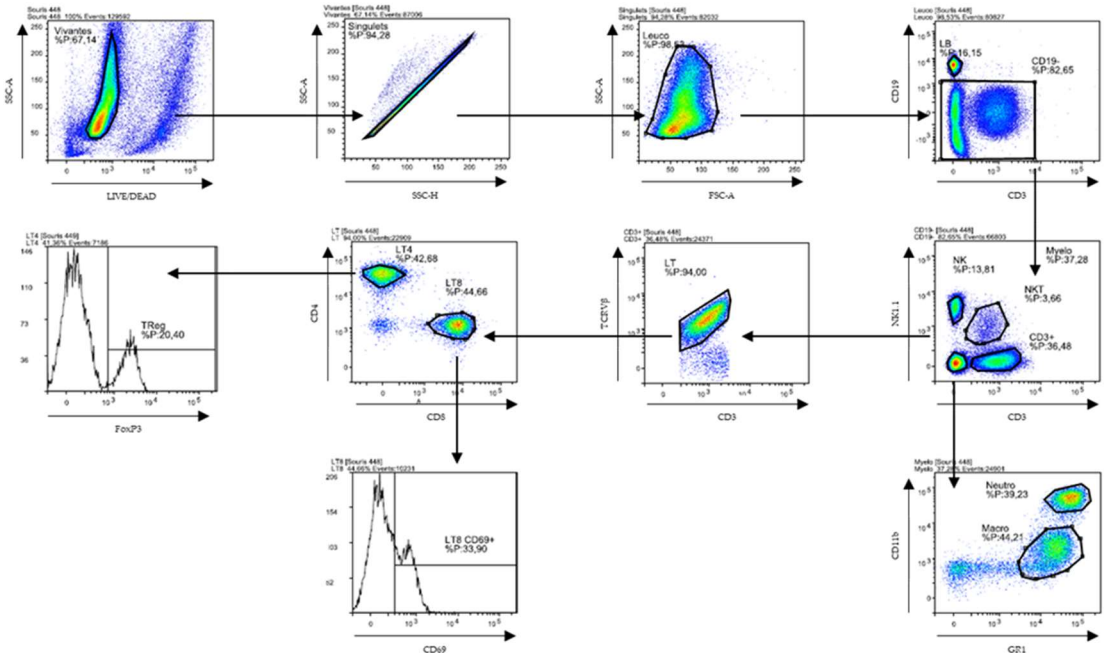


Figure supplementary 6: Liver immune infiltrates in diabetic mice under distinct HFDs.

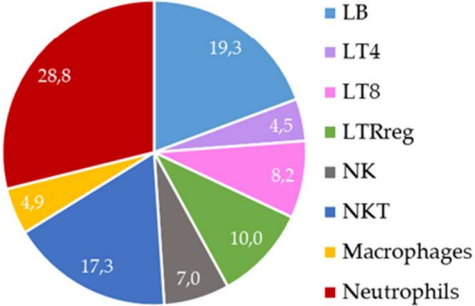
(a) Gating strategy used to identify the different populations of hepatic immune cells. Lymphocytes B (CD19⁺/CD3⁻), Lymphocytes T-CD8⁺ (CD3⁺/TCRV β ⁺/NK1.1⁻/CD8⁺), Lymphocytes T-CD8⁺ (CD3⁺/TCRV β ⁺/NK1.1⁻/CD4⁺), Lymphocytes TReg (CD3⁺/TCRV β ⁺/NK1.1⁻/CD4⁺/FoxP3⁺), NKT cells (CD3⁺/TCRV β ⁺/NK1.1⁺), NK cells (CD3⁻/NK1.1⁺), neutrophils (GR1⁺/CD11b⁺) and macrophages (GR1^{+/-}/CD11b⁺) were first gates for singlets and on a viability marker. CD69⁺ marker were used to define LB, LT4, LT8 and NK activated cells; **(b)** Lymphocytes B (LB; light blue), Lymphocytes T-CD4⁺ (LT4; purple), Lymphocytes T-CD8⁺ (LT8; pink), Lymphocytes TReg (LTReg; green), Natural killer (NK; grey) cells, Natural Killer T (NKT; dark blue) cells, Macrophages (M ϕ ; orange) and Neutrophils (N; red) proportion in liver of healthy mice under SD(% of total cells); **(c)** Activated Lymphocytes B (LB; light blue), Lymphocytes T-CD4⁺ (LT4; purple), Lymphocytes T-CD8⁺ (LT8; pink), Lymphocytes TReg (LTReg; green), Natural killer (NK; grey) cells, Natural Killer T (NKT) cells, Macrophages and Neutrophils proportion in liver of healthy mice under SD (%).

Figure supplementary 6: Liver immune infiltrates in diabetic mice under distinct HFDs.

(a) Gating strategy



(b) Healthy mice (% of total immune cells)



(c) Activated cells in healthy mice

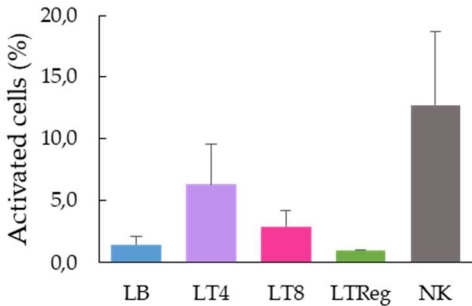


Table S1: Sequences of primers used for qPCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3)
<i>18s</i>	TTGGCAAATGCTTTCGCTC	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
<i>Nox2</i>	AGTGCGTGTTGCTCGACAA	GCGGTGTGCAGTGCTATCAT
<i>Hmox1</i>	AGGTACACATCCAAGCCGAGA	CATCACCAGCTTAAAGCCTTCT
<i>Col1a1</i>	GCTCCTGCTCCTCTTAGGG	GCAGAAAGCACAGCACTCG
<i>Tgfb1</i>	CACCATCCATGACATGAACC	CAGAAGTTGGCATGGTAGCC
<i>Tnf-α</i>	TAGCTCCCAGAAAAGCAAGC	TTTTCTGGAGGGAGATGTGG
<i>Ccl-2</i>	TCCAATGAGTAGGCTGGAG	TCTGGACCCATTCCTTCTTG

Table S2: Fluorochrome-conjugated antibodies used for flow cytometry.

Antigen (conjugate)	Clone	Reference
GR1 (eFluor 450)	RB6-8C5	#48-5931-82, eBioscience
CD4 (BV510)	RM4-5	#561099, BD Pharmingen™
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
CD69 (PerCPy5.5)	H1.2F3	#104522, Biolegend
FoxP3 (PE)	150D/E4	#12-4774-42, eBioscience
NK1.1 (PEeFluor)	PK136	#61-5941-80, eBioscience
CD11b (PECy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD8 (APCCy7)	53-6-7	#557654, BD Pharmingen™

Article n°3

La deletion de RIPK1 dans les cellules parenchymateuse hépatique aggrave la fibrose induite par un regime hyperlipidique dans un modèle murin de NASH. *

Muhammed Farooq^{*1,2}, Mélanie Simoes Eugénio^{*1,3}, Claire Piquet-Pellorce^{1,3}, Sarah Dion^{1,3}, Céline Raguènes-Nicol^{1,3}, Kathleen Santamaria^{1,3}, Aveline Filliol^{1,3}, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{1,3}, Michel Samson^{1,3}, Jacques Le Seyec^{#1,3}.

Article en préparation.

Dans les pays développés, l'évolution des modes de vie, l'augmentation de la sédentarité et les modifications alimentaires sont responsables de l'accroissement des personnes atteintes de maladies hépatiques, et notamment de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). La stéatohépatite non alcoolique (NASH), forme la plus sévère de NAFLD est irréversible et entraîne le développement d'une cirrhose hépatique et à l'apparition potentielle d'un cancer du foie. Les processus de mort cellulaire jouent un rôle central dans la NASH et contribuent à l'évolution de la pathologie. L'expression de facteurs majeurs associés à la mort cellulaire (TNF- α , Fas, TRAIL, etc.) est augmentée chez les patients atteints de NASH. La protéine RIPK1 joue un rôle pivot dans les processus de survie mais également de mort cellulaire. Son rôle hépatoprotecteur a été montré dans l'équipe à l'aide de divers modèles d'hépatites induites par l'injection de lipopolysaccharide (LPS), de TNF- α ou d'un agoniste de FasL par exemple. Cependant, la fonction exacte de RIPK1 dans la progression de la NASH n'est pas connue.

Le but de cette étude était de définir le rôle de la protéine RIPK1 dans la NASH à l'aide de souris transgéniques dont l'expression de RIPK1 a été délétée dans les cellules du parenchyme hépatiques (RIPK1^{LPC-KO}). Pour cela, ces souris ont été nourries pendant 12 semaines avec un régime hyperlipidique enrichi en cholestérol (High-Fat-High-Cholesterol, [HFHCD]).

Principaux résultats :

- La mise en régime HFHCD induit l'apparition d'une NASH sévère associée à une forte inflammation hépatique, à une fibrose sévère, à l'augmentation des dommages hépatiques, et au recrutement massif de cellules immunitaires chez les souris sauvages (RIPK1^{fl/fl}) mais également chez les souris RIPK1^{LPC-KO} ;
- La déplétion de RIPK1 dans le parenchyme hépatique ne modifie pas l'atteinte hépatique, l'inflammation, ni la réponse immunitaire induite durant la NASH ;
- RIPK1 jouerait un rôle dans le contrôle de la fibrose hépatique : les souris RIPK1^{LPC-KO} présentent une fibrose plus sévère que les souris RIPK1^{fl/fl}.

Article n°3

RIPK1 ablation in liver parenchymal cells exacerbates liver fibrosis in western diet-induced murine NASH.

Muhammed Farooq^{*1,2}, Mélanie Simoes Eugénio^{*1,3}, Claire Piquet-Pellorce^{1,3}, Sarah Dion^{1,3},
Céline Raguènes-Nicol^{1,3}, Kathleen Santamaria^{1,3}, Aveline Filliol^{1,3}, Marie-Thérèse
Dimanche-Boitrel^{1,3}, Michel Samson^{1,3}, Jacques Le Seyec^{#1,3}.

Article en préparation

RIPK1 ablation in liver parenchymal cells exacerbates liver fibrosis in western diet-induced murine NASH.

Muhammed Farooq^{*1,2}, Mélanie Simoes Eugénio^{*1,3}, Claire Piquet-Pellorce^{1,3}, Sarah Dion^{1,3}, Céline Raguènes-Nicol^{1,3}, Kathleen Santamaria^{1,3}, Aveline Filliol^{1,3}, Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{1,3}, Michel Samson^{1,3}, Jacques Le Seyec^{#1,3}.

¹ INSERM UMR1085, Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail, F-35043 Rennes, France

² Department of Clinical Sciences, College of Veterinary and Animal Sciences, Jhang, Pakistan

³ Biosit UMS3080, Université de Rennes 1, F-35043 Rennes, France

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author: e-mail: jacques.leseyec@univ-rennes1.fr ; tel: +33 2 23 23 48 62

ABSTRACT

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a chronic liver disease, is 2nd leading cause of liver transplantation in USA and predicted to be the leading cause in next decade. NASH can further progress into liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatocyte death carried through different death ligands plays key role in this progression. Previously, we showed that RIPK1 in hepatocytes exhibits a protective role in this ligand-induced death. Our new study aims to investigate the role of RIPK1 in NASH. To decipher the role of RIPK1 in NASH, we took advantage of Ripk1^{LPC-KO} mice which are deficient for RIPK1 only in liver parenchymal cells. NASH was induced by feeding both Ripk1^{LPC-KO} animals and their WT (Ripk1^{fl/fl}) littermates with High-Fat High Cholesterol Diet (HFHCD). Mice were slaughtered at 3, 5 and 12 weeks of HFHCD feeding and were compared to mice fed with normal chow diet. Cytometry was performed to analyze the recruitment of inflammatory cells during the course of NASH. Plasma cytokine levels were measured by Legend Plex. Liver damage was assessed by histological staining and serum transaminase dosages. Liver fibrosis was quantified by Sirius red labelling. Liver transcript expression was assessed by qPCR. Irrespective of their genotype, mice fed with HFHCD, showed elevated levels of ALT and liver to body weight ratio during the development of NASH. Important liver infiltrations of immune cells, including NKT cells, were detected at week 3 of HFHCD. Then, after 5 and 12 weeks of treatment, the number of total immune cells decreased with a total loss of NKT cells. However, some cells such as macrophages and cytotoxic lymphocytes remained over-represented. This inflammation and immune cell infiltration were accompanied by higher plasma doses of cytokines such as TNF alpha and CCL2. IL-27 and IFN beta were specifically increased at week 3 of HFHCD. Despite similar inflammatory responses, more fibrosis was significantly evidenced at week 12 in Ripk1^{LPC-KO} as compared to their WT littermates. These findings were further supported by more elevated mRNA expression of TGFB1 and TIMP2 (genes indicative of fibrosis) in Ripk1^{LPC-KO} compared to WT mice. In conclusion, our results show that RIPK1 in hepatocyte limits the progression of liver fibrosis during NASH.

KEYWORDS

NASH, RIPK1, cell death, fibrosis

INTRODUCTION

The evolution to a sedentary lifestyle, also accompanied by more caloric diet intakes, is responsible for the emergence of a new silent epidemic in human. Indeed, nearly a quarter of the world's population, with some geographical disparity, would be affected by non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) (1, 2). These cover a spectrum of hepatic disorders ranging from benign steatosis to inflammatory status, defined as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), responsible for the development of fibrosis that will eventually worsen, leading to cirrhosis and even hepatocellular carcinoma (HCC) with high rates of morbidity and mortality (3). NASH is currently the second leading cause of liver transplantation in USA after hepatitis C and is expected to predominate in the future among the US and European population (4).

Although influenced by genetic and epigenetic factors, the pathogenesis of NAFLD would result from multiple concomitant insults originating from gut and adipose tissue. Thus, a “multiple parallel hits” theory has recently been proposed to explain the NAFLD pathogenesis leading to NASH (5, 6). At this pathological stage, an inflammatory state is established due to the stress experienced by hepatocytes. In parallel, hepatocyte death is compensated by the activation of a regeneration process. Repetition of these events over time eventually leads to liver tissue remodeling, characterized by the development of fibrosis. Thus, activated Kupffer cells (KCs), infiltrating macrophages and damaged hepatocytes release various cytokines that activate quiescent hepatic stellate cells (HSCs) in collagen-secreting myofibroblasts (7). This fibrosis results from an imbalance characterized by an overproduction of extracellular matrix (ECM) (8) and an exacerbated inhibition of the HSCs and KCs secreted matrix metalloproteinases (MMPs) by different specific endogenous tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (9, 10).

Hepatocyte death fuels the inflammation that causes liver fibrosis and eventually promotes HCC development when chronic (11, 12). The death factors, tumor necrosis factor (TNF), Fas Ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), are found overexpressed in liver tissue during NASH (13). Cellular responses induced by these members of the TNF superfamily involve the receptor interacting protein kinase-1 (RIPK1) (14-16). Within the intracellular transduction pathway specifically triggered by TNF, RIPK1 directs signaling to a pathway of cell survival or death, either by caspase-dependent apoptosis or by necroptosis regulated by RIPK3 and the mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL). The role of this molecular switch between cell survival and death has been widely investigated during acute hepatitis.

Thus, in murine models of viral or autoimmune hepatitis, RIPK1 expressed in hepatocytes promotes their survival in a microenvironment rich in death ligands (17, 18, 27). During NASH, the associated dysfunction of the intestinal barrier leads to significant leaks of pro-inflammatory bacterial pathogen associated molecular patterns (PAMPs) to which the liver is exposed (19-22). Thus, it has been demonstrated that RIPK1 expressed in hepatocytes protects them from TNF-dependent death in an inflammatory context induced by PAMPs (23-25). In the present study, we investigated the functions of RIPK1 in liver parenchymal cells in the context of high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) induced NASH, mimicking human disease (26).

RESULTS

HFHCD promoted overexpression of hepatic transcripts of death ligands, their cognate receptors and of RIPK1.

Hepatocyte death occurring during NASH fuels the inflammatory status of the liver. These events are thought to be partly affected by an imbalance within cell death signalling pathways. Thus, to evaluate these types of disruption in HFHCD-fed mice, transcript rates of death ligands and their receptors were compared to those issued from livers of age and sex matched mice fed with SD. Twelve weeks of HFHCD resulted in upregulation of all tested transcripts of death ligands (*Tnf*, *FasL* and *Trail*) as well as of their cognate receptors (*Tnfr1*, *Tnfr2*, *Fas* and *Dr5*) (Fig. 1). Downstream of these cues, the RIPK1 protein redirect the intracellular signal towards inflammatory or cell death processes. By analysing the RIPK1 transcript, it turned out that higher concentrations were also detected in the liver of mice fed during 12 weeks of HFHCD (Fig. 1).

Severity of HFHCD-induced hepatomegaly and liver damage was not affected by Ripk1-depletion in liver parenchymal cells.

HFHCD disturbed the transcript level in the liver of RIPK1, a key death signal switch, but to know whether this kinase influences the NASH physiopathology, mice deficient for *Ripk1* specifically in liver parenchymal cells (*Ripk1LPC-KO*) and their wild type littermates (*Ripk1^{fl/fl}*) were subjected to this diet during 3, 5 or 12 weeks. First, body weight monitoring revealed a non-statistically significant tendency for progressive weight loss for both genotypes (Fig. 2A, left panel), most likely due to the NASH-linked morbidity induced by HFHCD. The

average daily food consumption per animal was limited to 1.6 g, while it reached 3.5 g with the SD. However, the daily calorie intake remained similar, around 10.5 kcal (data not shown). In contrast, a progressive hepatomegaly systematically settled in all animals whatever the genotype (Fig 2A, right panel). Along with this symptom, hepatic tissue degradation progressively worsened over time as evidenced by plasma levels of transaminases (Fig. 2B).

Ripk1 defect in parenchymal liver cells did not reshape hepatic inflammatory response during NASH.

Systematic histological analysis of H&E-stained liver sections showed the appearance of hepatocyte ballooning and of local accumulation of immune cells as early as 3 weeks post-HFHCD feeding (Fig. 2C). To quantitatively compare the hepatic inflammatory status induced by the HFHCD feeding in Ripk1fl/fl and Ripk1LPC-KO mice, the expression alteration of major pro-inflammatory cytokines was assessed. Whether at hepatic transcript levels or at plasma protein levels, significant progressive increases occurred for TNF- α , IL6 and CCL2 as the HFHCD intake continued for 12 weeks, with no differences between both genotypes (Fig. 3). Otherwise, for IFN β only a transient protein overexpression arose in blood samples taken at 3 weeks of HFHCD regardless of genotype, a timing that coincided with immune cell infiltration wave in the liver (see below).

The hepatic inflammation was further characterize by isolating the immune cells from Ripk1fl/fl and Ripk1LPC-KO mouse livers that have been on SD or HFHCD for 3, 5 or 12 weeks. A flow cytometry approach was applied to identify and enumerate cell types (Fig. S1A). Irrespective of the genotype, huge recruitment of inflammatory cells appeared in liver at 3 weeks post-HFHCD feeding, which then decreased at 5 and 12 weeks post-HFHCD feeding (Fig. 4, upper panel). We then distinguished the significant changes in liver immune cell populations among lymphoid (LT4, LT8, LTregs, NK, NKT and LB) and myeloid (macrophages and neutrophils) cells during the course of NASH development. All intrahepatic immune cells were significantly more numerous at 3 weeks of HFHCD, with different induction rates for each cell type. Thus, macrophages and lymphocytes were more than 10 times more abundant, while the number of NKT cells only doubled (Fig S1B). Over longer periods of HFHCD, this excess of infiltrating immune cells progressively diminished, with maintenance of a still large number of macrophages and LT8 at the 5th week. Compared to a healthy liver, most immune cells remained slightly more abundant in livers after 12 weeks of HFHCD, except

neutrophils, NK and NKT cells. Thus, as previously reported (28), the NKT cells were almost depleted at 12 weeks post-HFHCD feeding.

All these tested biological parameters evaluated during the course of the disease never differed according to the genotype of the mice.

RIPK1 partially protected from HFHCD-induced fibrosis.

NASH induced by HFHCD led to the progressive development of liver fibrosis. A Sirius red staining was performed on liver sections of mice subjected to SD or HFHCD. Collagen accumulated in the liver tissue of all animals fed with the HFHCD. This deposit increased over time but reached significantly higher levels at 12 weeks post-HFHCD feeding in Ripk1LPC-KO mice as compared to their Ripk1fl/fl littermates (Fig. 5A).

The mRNA levels of several genes involved, directly or indirectly in the remodelling of the extracellular matrix (ECM) were evaluated in the liver of Ripk1fl/fl and Ripk1LPC-KO mice during the kinetics of HFHCD (Fig. 5B). A progressive increase over time was found for all studied mRNAs, in both animal groups. Thus, the upregulation of the transforming growth factor beta 1 (Tgfb1) transcript followed the gradual worsening of fibrosis. This cytokine is a key inducer of the transdifferentiation of hepatic stellate cells (HSCs) into myofibroblasts that produce the excess of ECM. In agreement with these variations of Tgfb1 mRNA levels, a time-dependant enrichment of collagen type I alpha 1 chain (Colla1) mRNA occurred. Similarly, mRNA amounts of the transforming growth factor beta-induced (Tgfb1) steadily increased, but reached a significant higher level in Ripk1LPC-KO mice after 12 weeks of HFHCD. Over-induction was also supposed for liver transcripts of the matrix metalloproteinase-2 (Mmp-2), of two tissue inhibitors of metalloproteinases (Timp1 and Timp2) and of the NADPH oxidase 2 (Nox2). This last enzyme has been described to participate to the production of reactive oxygen species (ROS) implied in the activation of HSCs.

In conclusion, depletion of Ripk1 in liver parenchymal cells increased liver fibrosis in mice with HFHCD-induced NASH.

DISCUSSION

Cell death plays pivotal role in the progression of NASH (28). The interaction of various death ligands such as TNF- α , FAS ligand and TRAIL with their respective cognate receptors TNFR1, FAS and DR5 triggers intracellular signalling resulting in cell death. Transcripts of all these proteins were upregulated in the liver of mice fed with a high fat diet enriched in cholesterol and cholate (HFHCD). These results were consistent with previous studies that showed the involvement of these death ligand-receptor pairs in the pathogenesis of NASH (7, 29-30). Thus, while the role of TNF neutralization in the amelioration of liver injury remains controversial, knockout of TRAILR or TNFR1 protects mice from diet-induced NASH (17, 31). Recently, our team demonstrated the protective role of RIPK1 in TNF- α , anti-Fas antibody (Jo2) or TRAIL mediated acute liver injury (17-18). The scaffolding properties and the kinase activity of RIPK1 respectively control cell survival and cell death (32). Inhibition of its kinase activity by the Necrostatin-1 (Nec-1) (33) limits both the toxicity of fatty acids on primary mouse hepatocytes and the pathophysiology of NASH induced by methionine choline deficient diet (MCD) (34-35). However, this chemical inhibitor shows some drawbacks, its limited specificity and its short half-life (36). Therefore, further investigations were required to explore the role of RIPK1 in NASH. HFHCD has been shown to reproduce hepatic histological lesions of NASH observed in human liver, including hepatocyte ballooning and injury, inflammation, hepatic insulin resistance and extensive liver fibrosis (26-27). Here, we demonstrated that deletion of Ripk1 specifically in liver parenchymal cells increased liver fibrosis in HFHCD-induced NASH.

The recruitment of inflammatory cells in the liver is a key characteristic in patients with NASH (37). In an early phase of HFHCD-induced NASH, a massive infiltration of immune cells transiently occurred in mouse livers. These infiltrates contained macrophages, neutrophils, lymphocytes, regulatory T cells, NK and NKT cells. Subsequently, their number tended to decrease while maintaining relative high levels for macrophages, NK cells and CD8⁺ T cells, which corresponded to a low-grade inflammatory state in the late phase of NASH. Conversely, NKT cells gradually disappeared as previously described (27, 38-40). This depletion may be due to their death following their over-activation by macrophages presenting them lipid antigens (40). IL-12, produced in part by macrophages, would also contribute to NKT cell population decline in the liver, by triggering their apoptotic death (39). Ripk1 deficiency in liver parenchymal cells never affected the profile of the immune cell population during the

course of NASH. Previous reports suggest that discrepancy in abundance of NKT cells in diet induced NASH could be due to difference in dietary model or stage of NASH (40-43).

Chemokines and cytokines play also key role in the development of NASH. In accordance with previous studies, transcripts of TNF, IL-6 and CCL2 increased in the liver of Ripk1^{fl/fl} control mice fed with HFHCD, as well as plasma levels of the corresponding proteins (37, 39, 44). While inflammatory cytokine production has been shown to be impaired in Ripk1 deficient primary or immortalized monocytes (45), its depletion in liver parenchymal cells never affected the HFHCD-induced upregulation of liver transcripts of TNF, IL-6 and CCL2 inflammatory cytokines, nor their plasma levels. Similarly, the pattern of inflammatory cells recruited in the liver of Ripk1^{LPC-KO} mice during the progression of HFDHCD-induced NASH was not altered.

In response to chronic and persistent liver injury occurring during NASH, the cytokine microenvironment activates HSCs that differentiate into myofibroblasts. This myofibroblastic phenotypic evolution leads to an excessive synthesis of matrix proteins such as collagens, elastin and fibronectins (46,47). In parallel, these activated myofibroblast-like HSCs increase their production of proteins involved in the regulation of matrix degradation, including matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs). However, a disproportionate activity of TIMPs hampers ECM degradation. Together, these disorders are responsible for the establishment of liver fibrosis (9). All these pathological imbalances were found in the liver of mice fed with the HFHCD, but Ripk1 deficiency in liver parenchymal cells significantly increased liver fibrosis. This worsening correlated with a higher overexpression trend of TIMP-1 and TIMP-2 transcripts in Ripk1^{LPC-KO} mice. This tendency probably counterbalanced the significantly larger presence of MMP2 transcripts in Ripk1^{LPC-KO} liver of mice under HFHCD, since ECM degradation function of MMPs are regulates at the protein levels by TIMPs (49). Besides, another significant difference was detected between Ripk1^{LPC-KO} mice and their Ripk1^{fl/fl} control littermates with HFHCD-induced NASH at the transcript level of Nox2 (a marker of oxidative stress), probably reflecting the over-activation of hepatic myofibroblasts implied in the observed liver fibrosis aggravation (50). Future studies elucidating the role of Ripk1 in the control of the oxidative stress during NASH, will pave the way to unveil the involved mechanism.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Animal studies were reviewed and approved by the “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale” (C2EA – 07) under the supervision of the French Ministry of Higher Education and Research (permission #: 5656-2016061401105051). Investigations were carried out in strict compliance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, EEC Council Directive 2010/63/EU. Male C57BL/6 mice, with Ripk1LPC-KO (deficient for RIPK1 specifically in liver parenchymal cells) or Ripk1fl/fl (control littermates with homozygous floxed Ripk1 gene) genotypes (17), were fed either a standard diet (SD; 2016, Teklad Diet, Envigo) or a high-fat high-cholesterol diet enriched in cholate (HFHCD, #9G21, LabDiet, St. Louis, MO) ad libitum for 3, 5 or 12 weeks. Genotyping was performed by conventional PCR for Alfp-Cre gene from tail-extracted DNA. Experiments included homogeneous groups of 8 to 20 weeks old mice.

Histological and biochemical analysis

The histopathological study of livers was performed on hematoxylin and eosin (H&E)-stained tissue sections to characterize steatosis, lobular infiltrates and hepatocyte ballooning. Fibrosis was assessed after Sirius red coloration by evaluating the proportion of the stained area, using the NIS-Elements software (Nikon). Plasma alanine transaminases (ALT) were measured according to the IFCC primary reference procedures using Olympus AU2700 Auto-analyser® (Olympus Optical, Tokyo, Japan).

RNA Isolation and RT-qPCR

Total RNA was extracted from mice liver tissues using the NucleoSpin® RNA kit (Macherey-Nagel, #740955). First-strand cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, #4368813, Foster City, CA, ®USA). Real-time quantitative PCR was performed using the double-strand specific SYBR® Green system (Applied Biosystems, #4367659) on CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad). Each measurement was performed in triplicate. The relative gene expression was normalized against the 18S gene expression. Samples from SD-fed mice were used as reference for mRNA expression (control mRNA level was arbitrarily set at 1). The primer sequences are all depicted in Table S1 in supporting information.

Serum cytokine immunoassay by flow cytometry

Murine cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-27, CCL-2, IFN- β and TNF- α) were quantified by bead-based immunoassays according to manufacturer protocol, using a filter plate and a vacuum filtration system for washing steps (BioLegend's LEGENDPLEX, multi-analyte flow assay kit). Samples were analyzed on a LSR X-20 FortessaTM flow cytometer (BD Biosciences).

Isolation of liver immune cells and flow cytometry

Immune cells were isolated from livers as follows. Before liver excision, the organ was flushed by perfusion of PBS through inferior vena cava, to remove non-infiltrated blood cells. Isolated livers were then ground on a 70- μ m cell strainer. Parenchymal cells were removed by decantation for 1h. Cells in suspension were recovered by centrifugation and then resuspended in 35% isotonic Percoll (GE Healthcare Life Science) for a new centrifugation, before red blood cell lysis. Viability of isolated immune cells consistently exceeds 95%. Cells were resuspended in staining buffer (10% fetal calf serum in PBS) and incubated with an anti-CD16/32 antibody (clone 2.4G, BD Pharmingen) to block non-specific binding. The cells were then labeled with the appropriate fluorochrome-conjugated antibodies/reagents (Table S2) according to the manufacturer's instructions. Stained cells were analyzed on a LSR X-20 FortessaTM flow cytometer (BD Bioscience) and the data analyzed using FlowlogicTM (Miltenyi Biotec). Doublets and dead cells were excluded on the basis of forward/side scatter and LIVE/DEAD labeling, respectively. We calculated the percentage of each immune cell population, by considering the sum of events of all immune cell populations analyzed (sum of T, NK, NKT, B cells or myeloid cells) as 100% of the total immune cells. The absolute number in each immune cell population was calculated by multiplying the percentage of each population by the total number of immune cells.

Statistical analysis

The results are expressed as the means \pm SEM for each group of mice, two independent experiments were led for the 12 weeks HFHCD treatment. Mean differences between experimental groups were assessed using the nonparametric Mann-Whitney U-test, as implemented in GraphPad Prism5 software. Significance is shown as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Acknowledgments

For immunohistochemistry analysis and animal house facilities, we would like to thank dedicated platforms (i.e. H2P2 and animal house platforms) of SFR BIOSIT, University of Rennes 1, France. This work was supported by the INSERM (<https://www.inserm.fr/en>); the University of Rennes 1 (<https://www.univ-rennes1.fr/>); the “Région Bretagne” (<http://www.bretagne.bzh/>); the “Ligue Contre le Cancer, Comités du Grand Ouest” (<https://www.ligue-cancer.net/>); a “Contrat de Plan Etat-Région” (CPER) grant named “Infectio”; and the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM, <https://www.frm.org/>). MF was supported by a PhD fellowship from the Government of Pakistan (Higher Education Commission). MSE was supported by a PhD fellowship from “Région Bretagne” and “Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

REFERENCES

1. Z. M. Younossi *et al.*, Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **64**, 73-84 (2016).
2. Z. Younossi *et al.*, Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **15**, 11-20 (2018).
3. L. Calzadilla Bertot, L. A. Adams, The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International journal of molecular sciences* **17**, (2016).
4. R. J. Wong *et al.*, Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* **148**, 547-555 (2015).
5. E. Buzzetti, M. Pinzani, E. A. Tsochatzis, The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental* **65**, 1038-1048 (2016).
6. H. Tilg, A. R. Moschen, Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **52**, 1836-1846 (2010).
7. P. Hirsova, G. J. Gores, Death Receptor-Mediated Cell Death and Proinflammatory Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* **1**, 17-27 (2015).
8. S. Hemmann, J. Graf, M. Roderfeld, E. Roeb, Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of hepatology* **46**, 955-975 (2007).
9. M. J. Arthur, Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **279**, G245-249 (2000).

10. B. C. Jackson, D. W. Nebert, V. Vasiliou, Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Human genomics* **4**, 194-201 (2010).
11. T. Luedde, N. Kaplowitz, R. F. Schwabe, Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* **147**, 765-783. e764 (2014).
12. R. F. Schwabe, T. Luedde, Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **15**, 738-752 (2018).
13. P. Hirsova, G. J. Gores, Death Receptor-Mediated Cell Death and Proinflammatory Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* **1**, 17-27 (2014).
14. B. Z. Stanger, P. Leder, T. H. Lee, E. Kim, B. Seed, RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**, 513-523 (1995).
15. P. M. Chaudhary *et al.*, Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* **7**, 821-830 (1997).
16. H. Hsu, J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, D. V. Goeddel, TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387-396 (1996).
17. A. Filliol *et al.*, RIPK1 protects from TNF-alpha-mediated liver damage during hepatitis. *Cell death & disease* **7**, e2462 (2016).
18. A. Filliol *et al.*, RIPK1 protects hepatocytes from death in Fas-induced hepatitis. *Sci Rep* **7**, 9205 (2017).
19. Y. Ilan, Leaky gut and the liver: a role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **18**, 2609-2618 (2012).
20. P. Brun *et al.*, Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **292**, G518-525 (2007).
21. L. Miele *et al.*, Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **49**, 1877-1887 (2009).
22. J. Luther *et al.*, Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **1**, 222-232 (2015).
23. A. Filliol *et al.*, RIPK1 protects hepatocytes from Kupffer cells-mediated TNF-induced apoptosis in mouse models of PAMP-induced hepatitis. *Journal of hepatology* **66**, 1205-1213 (2017).
24. A. T. Schneider *et al.*, RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer. *Cancer cell* **31**, 94-109 (2017).
25. T.-M. Van *et al.*, Kinase-independent functions of RIPK1 regulate hepatocyte survival and liver carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* **127**, 2662-2677 (2017).
26. N. Matsuzawa *et al.*, Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **46**, 1392-1403 (2007).
27. Vasseur P, Dion S, Filliol A, Genet V, Lucas-Clerc C, Jean-Philippe G, Silvain C, Lecron J-C, Piquet-Pellorce C, Samson M. 2017. Endogenous IL-33 has no effect on the progression of fibrosis during experimental steatohepatitis. *Oncotarget* **8(30)**:48563-48574.
28. Younossi, Z. et al. Non-alcoholic Steatohepatitis is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, doi:10.1016/j.cgh.2018.05.057 (2018).

29. Feldstein, A. E. et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437-443 (2003).
30. Feldstein, A. E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 40, 185-194, doi:10.1002/hep.20283 (2004).
31. Idrissova, L. et al. TRAIL receptor deletion in mice suppresses the inflammation of nutrient excess. *Journal of hepatology* 62, 1156-1163, doi:10.1016/j.jhep.2014.11.033 (2015).
32. Pasparakis, M. & Vandenabeele, P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517, 311-320, doi:10.1038/nature14191 (2015).
33. Degtarev, A. et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology* 4, 313-321, doi:10.1038/nchembio.83 (2008).
34. Afonso, M. B. et al. Necroptosis is a key pathogenic event in human and experimental murine models of non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical science* (London, England : 1979) 129, 721-739, doi:10.1042/cs20140732 (2015).
35. von Montfort, C. et al. Mitochondrial GSH determines the toxic or therapeutic potential of superoxide scavenging in steatohepatitis. *Journal of hepatology* 57, 852-859, doi:10.1016/j.jhep.2012.05.024 (2012).
36. Takahashi, N. et al. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell death & disease* 3, e437, doi:10.1038/cddis.2012.176 (2012).
37. Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M. & Feldstein, A. E. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 15, 349-364, doi:10.1038/s41575-018-0009-6 (2018).
38. Hua, J. et al. Dietary fatty acids modulate antigen presentation to hepatic NKT cells in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of lipid research* 51, 1696-1703, doi:10.1194/jlr.M003004 (2010).
39. Li, Z., Soloski, M. J. & Diehl, A. M. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 42, 880-885, doi:10.1002/hep.20826 (2005).
40. Tang, T., Sui, Y., Lian, M., Li, Z. & Hua, J. Pro-inflammatory activated Kupffer cells by lipids induce hepatic NKT cells deficiency through activation-induced cell death. *PLoS One* 8, e81949, doi:10.1371/journal.pone.0081949 (2013).
41. Syn, W. K. et al. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 51, 1998-2007, doi:10.1002/hep.23599 (2010).
42. Byun, J. S. & Yi, H. S. Hepatic Immune Microenvironment in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease. *BioMed research international* 2017, 6862439, doi:10.1155/2017/6862439 (2017).
43. Haukeland, J. W. et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *Journal of hepatology* 44, 1167-1174 (2006).
44. Jarrar, M. H. et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 27, 412-421, doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03586.x (2008).
45. Cuchet-Lourenco, D. et al. Biallelic RIPK1 mutations in humans cause severe immunodeficiency, arthritis, and intestinal inflammation. *Science* (New York, N.Y.), doi:10.1126/science.aar2641 (2018).
46. Gabele, E., Brenner, D. A. & Rippe, R. A. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, d69-77 (2003).

47. Bataller, R. & Brenner, D. A. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 115, 209-218, doi:10.1172/JCI200524282 (2005).
48. Afdhal, N. H. & Nunes, D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *The American journal of gastroenterology* 99, 1160-1174, doi:10.1111/j.1572-0241.2004.30110.x (2004).
49. Duarte, S., Baber, J., Fujii, T. & Coito, A. J. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46, 147-156, doi:10.1016/j.matbio.2015.01.004 (2015).
50. Liang, S., Kisseleva, T. & Brenner, D. A. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. *Frontiers in Physiology* 7, 17, doi:10.3389/fphys.2016.00017 (2016).

Figure 1. HFHCD induces liver transcript expression of death ligands and their cognate receptors as well as RIPK1.

Liver transcript expression of death ligands (TNF- α , FASL, TRAIL) and their cognate receptors (TNFR1, TNFR2, FAS, DR5) in SD and HFHCD fed WT mice. Liver transcript expression of RIPK1. Statistical analysis was performed by applying non-parametric Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns= non-significant).

Figure 1. HFHCD induces liver transcript expression of death ligands and their cognate receptors as well as RIPK1.

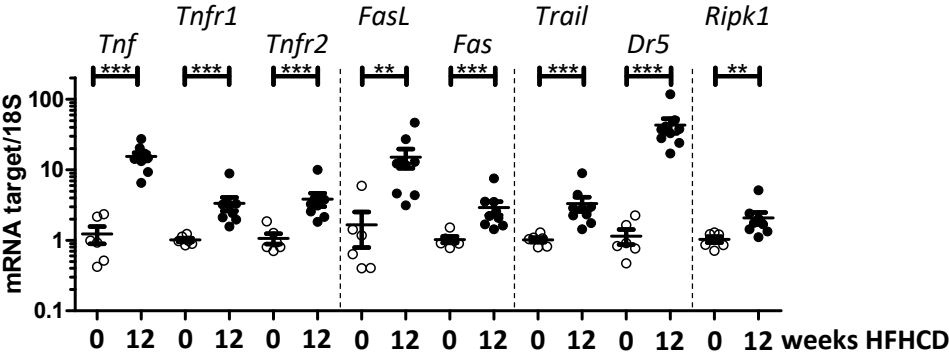


Figure 2. HFHCD feeding resulted in progressive liver damage and hepatomegaly.

(A) Both Ripk1^{fl/fl} and Ripk1^{LPC-KO} mice were fed HFHCD and SD for 3, 5 and 12 weeks. Left panel : mice body weight after 3, 5 and 12 weeks of feeding. Right panel : Liver to body weight ratio. (B) Alanine Transaminase (ALT) plasma level (IU/L) of mice fed with HFHCD during 3, 5 and 12 weeks. (C) H&E stained liver tissue from both Ripk1^{fl/fl} and Ripk1^{LPC-KO} mice. Statistical analysis was performed by applying non-parametric Mann-Whitney test (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 2. HFHCD feeding resulted in progressive liver damage and hepatomegaly.

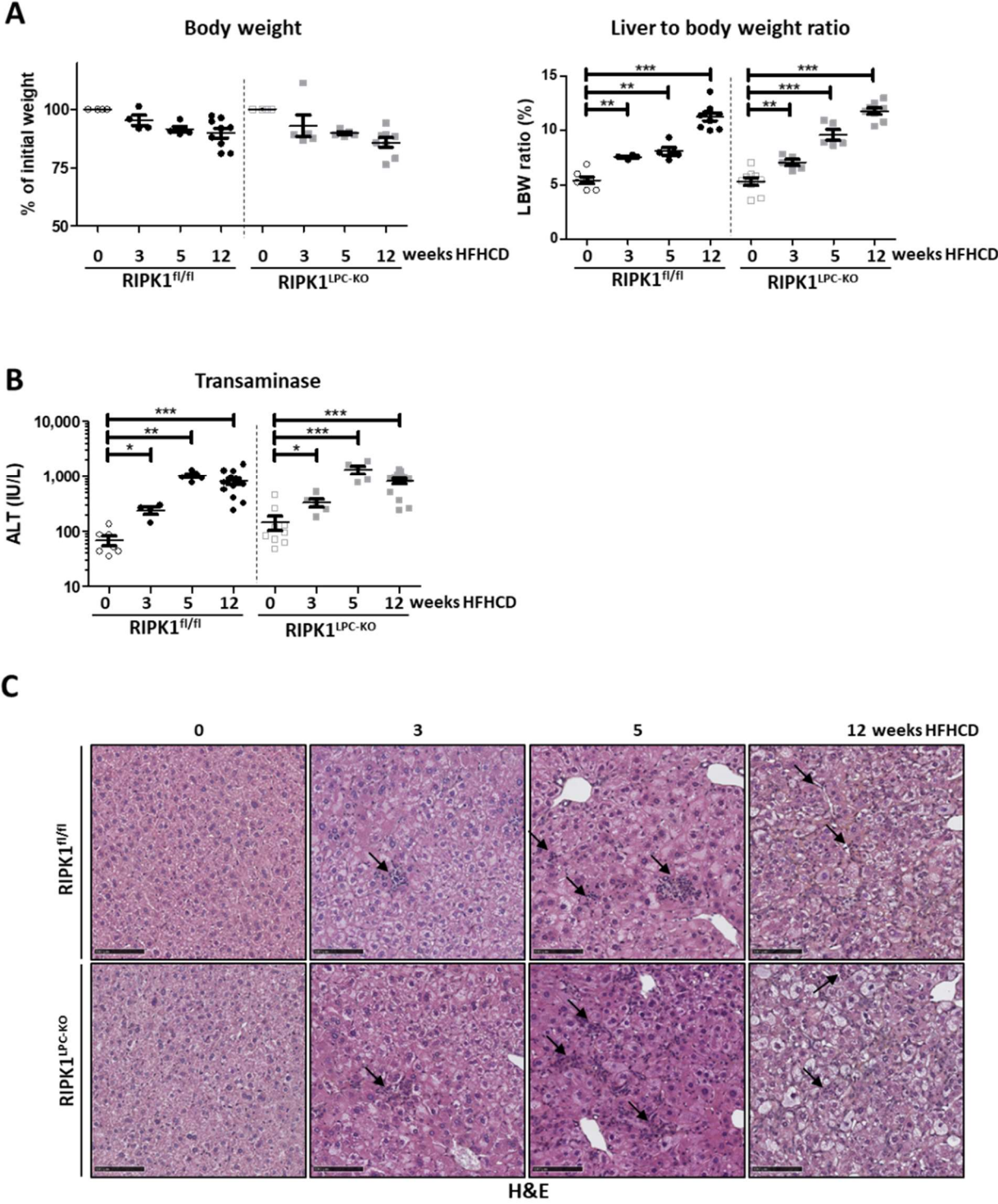


Figure 3. HFHCD feeding resulted in significant changes expression of cytokines.

(A) Liver transcript expression of TNF- α , IL-6 and CCL2. **(B)** Plasma levels of TNF- α , IL-6, CCL2, TNF- α and IFN- β . Statistical analysis was performed by applying non-parametric Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns= non-significant).

Figure 3. HFHCD feeding resulted in significant changes expression of cytokines.

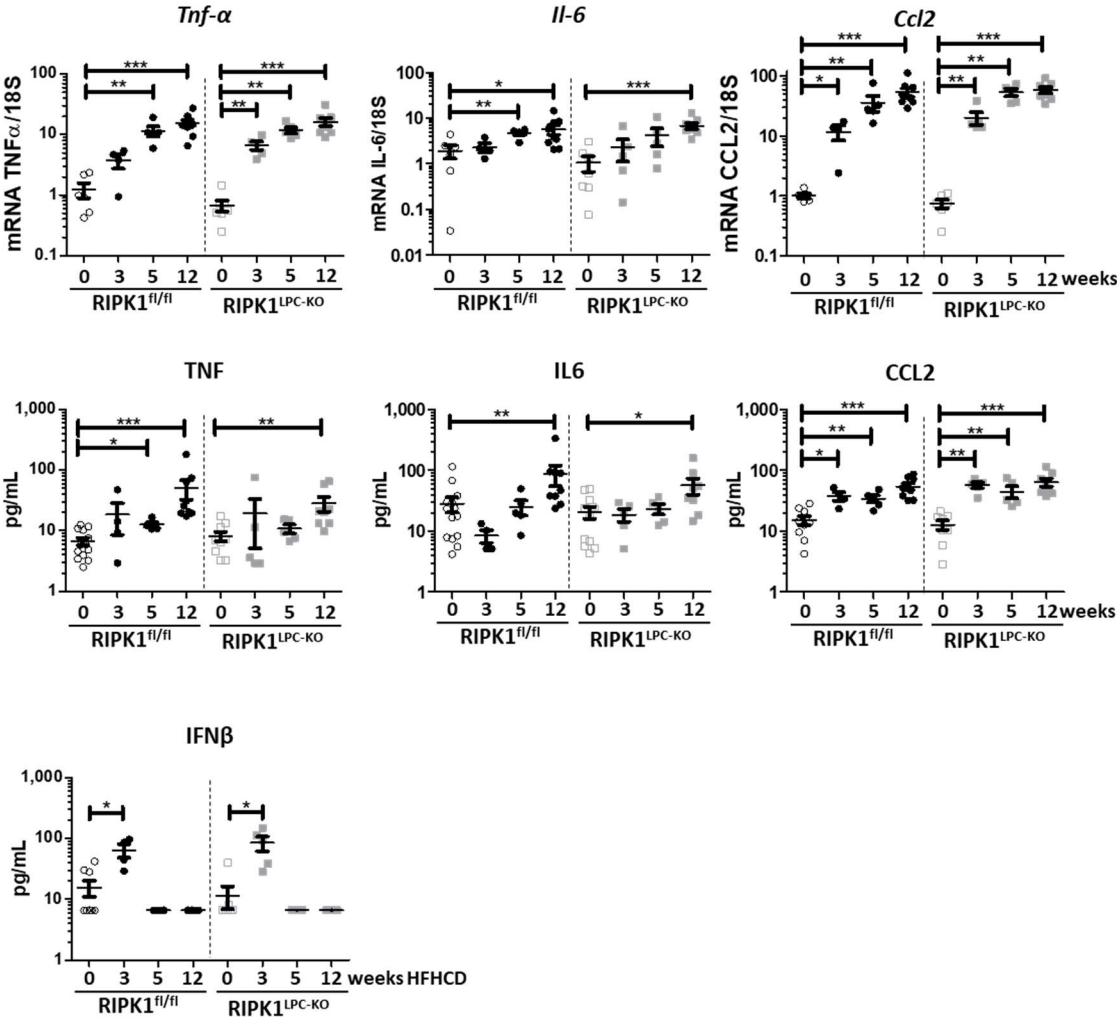


Figure 4. HFHCD feeding resulted in significant inflammatory changes in both Ripk1^{fl/fl} and Ripk1^{LPC-KO} mice.

(A) Total immune cells in mice liver determined by flow cytometry. **(B)** Number of Lymphocytes T-CD4⁺ (LT4), Lymphocytes T-CD8⁺ (LT8), Lymphocytes TReg (LTreg), Natural Killer (NK) cells, Natural Killet T (NKT) cells, Lymphocytes B (LB), Macrophages and Neutrophils. Statistical analysis was performed by applying non-parametric Mann-Whitney test (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 4. HFHCD feeding resulted in significant inflammatory changes in both $Ripk1^{fl/fl}$ and $Ripk1^{LPC-KO}$ mice.

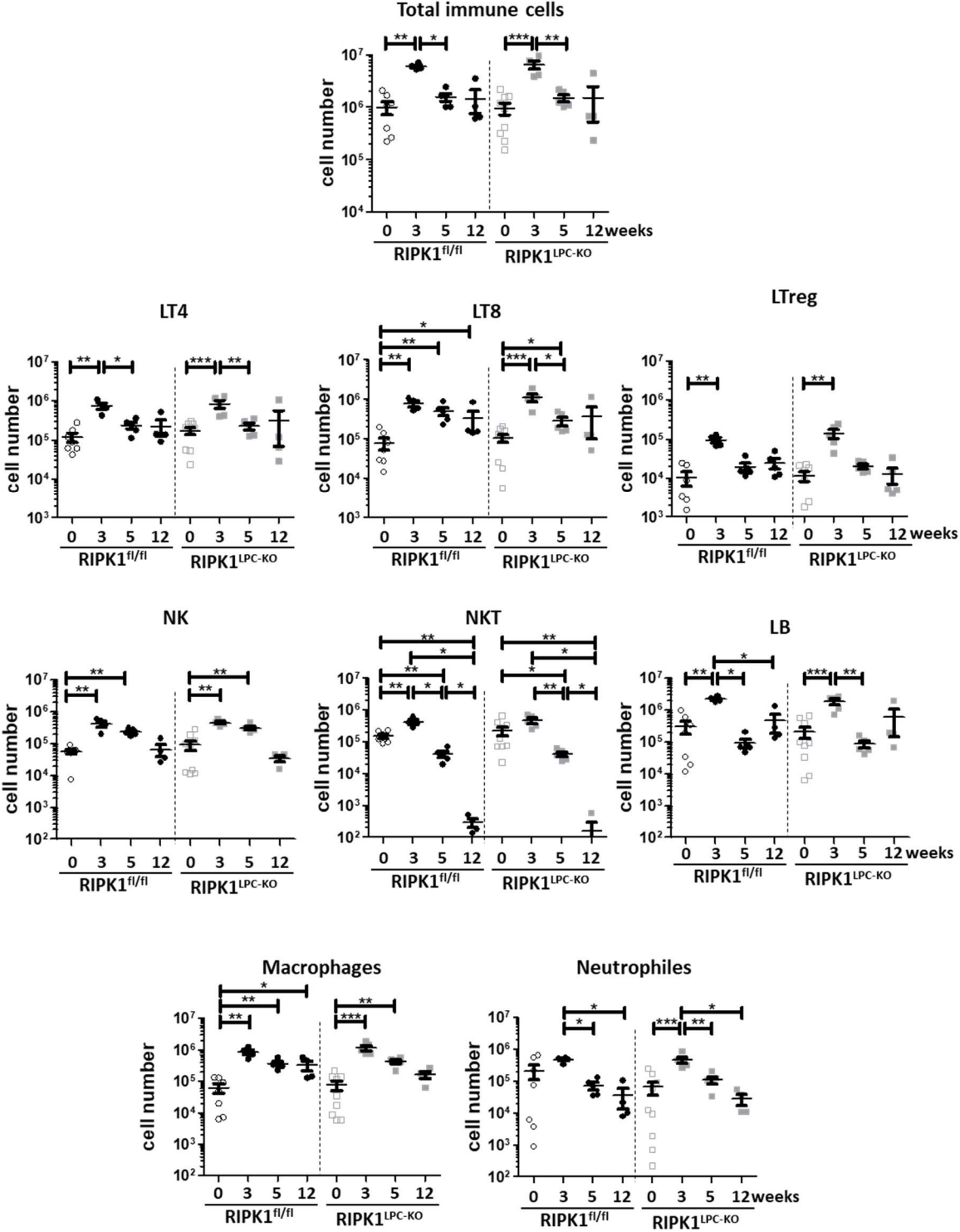


Figure 6. Deficiency of RIPK1 in liver parenchymal cells sensitized to liver fibrosis.

(A) Left panel : Sirius red stained liver tissue issued from Ripk1^{fl/fl} and Ripk1^{LPC-KO} mice. Right panel : Quantification of fibrosis as determined by the percentage of Sirius Red positive area.

(B) Liver transcript expression of *Tgfb1*, *Colla1*, *Tgfbi*, *Mmp2*, *Timp1*, *Timp2* and *Nox2* in Ripk1^{fl/fl} and Ripk1^{LPC-KO} mice. Statistical analysis was performed by applying nonparametric Mann-Whitney test (*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 6. Deficiency of RIPK1 in liver parenchymal cells sensitized to liver fibrosis.

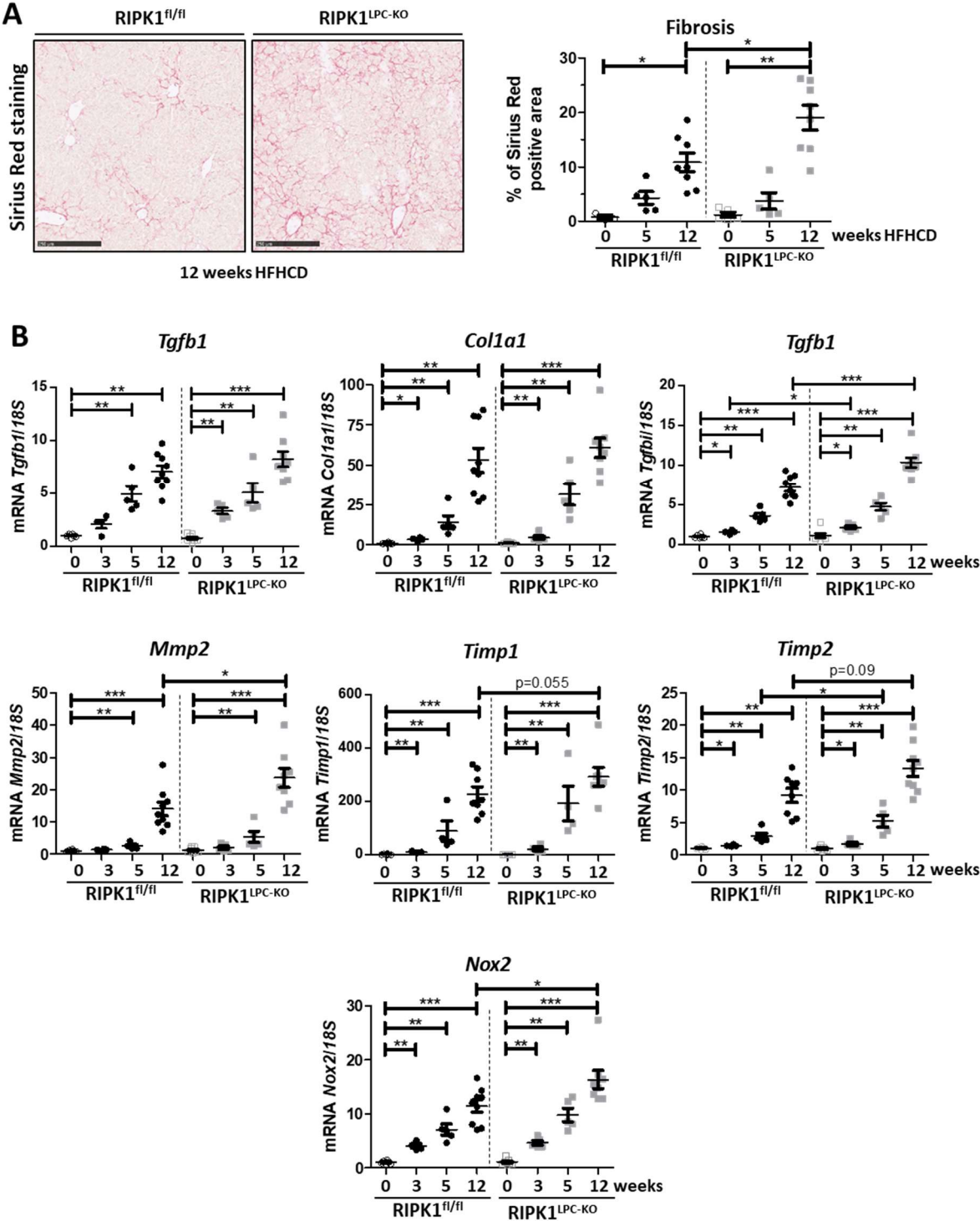


Figure supplementary 1: Liver immune infiltrates in RIPK1^{fl/fl} and RIPK1^{LPC-KO} mice fed with HFHCD.

(A) Gating strategy used to identify the different populations of hepatic immune cells. Lymphocytes B (CD19⁺/CD3⁻), Lymphocytes T-CD8⁺ (CD3⁺/TCRVβ⁺/NK1.1⁻/CD8⁺), Lymphocytes T-CD8⁺ (CD3⁺/TCRVβ⁺/NK1.1⁻/CD4⁺), Lymphocytes TReg (CD3⁺/TCRVβ⁺/NK1.1⁻/CD4⁺/FoxP3⁺), NKT cells (CD3⁺/TCRVβ⁺/NK1.1⁺), NK cells (CD3⁻/NK1.1⁺), neutrophils (GR1⁺/CD11b⁺) and macrophages (GR1^{+/-}/CD11b⁺) were first gates for singlets and on a viability marker. **(B)** Immune cells recruitment at 3, 5 and 12 weeks In both RIPK1^{fl/fl} et RIPK1^{LPC-KO}.

Figure supplementary 1: Liver immune infiltrates in RIPK1^{fl/fl} and RIPK1^{LPC-KO} mice fed with HFHCD.

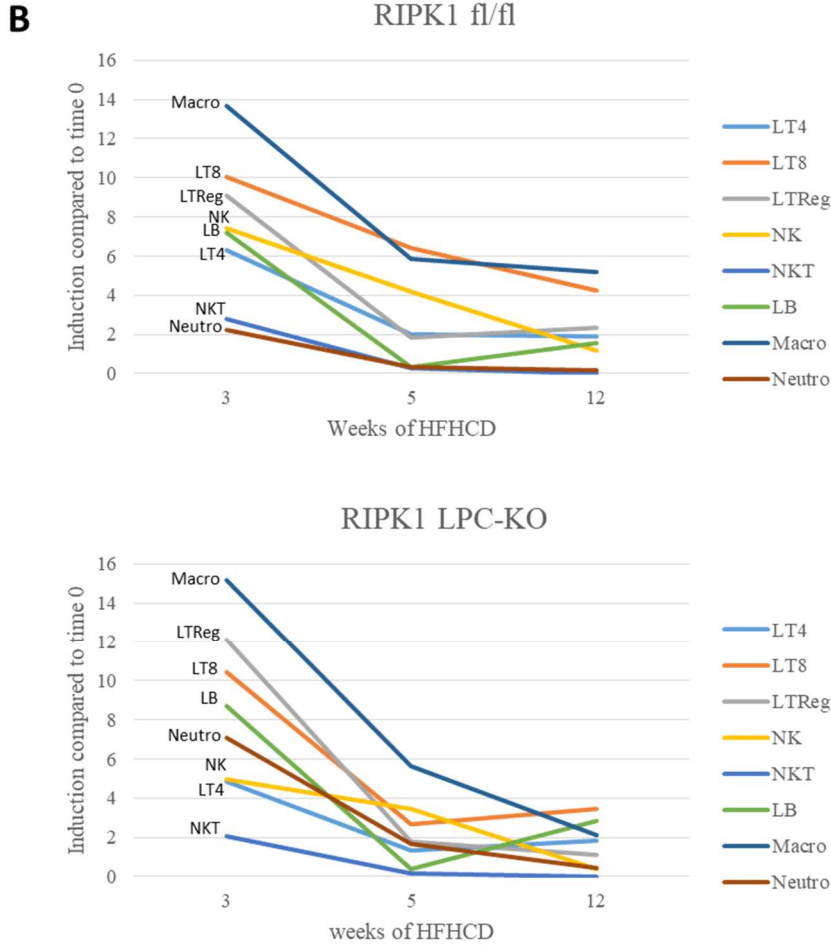
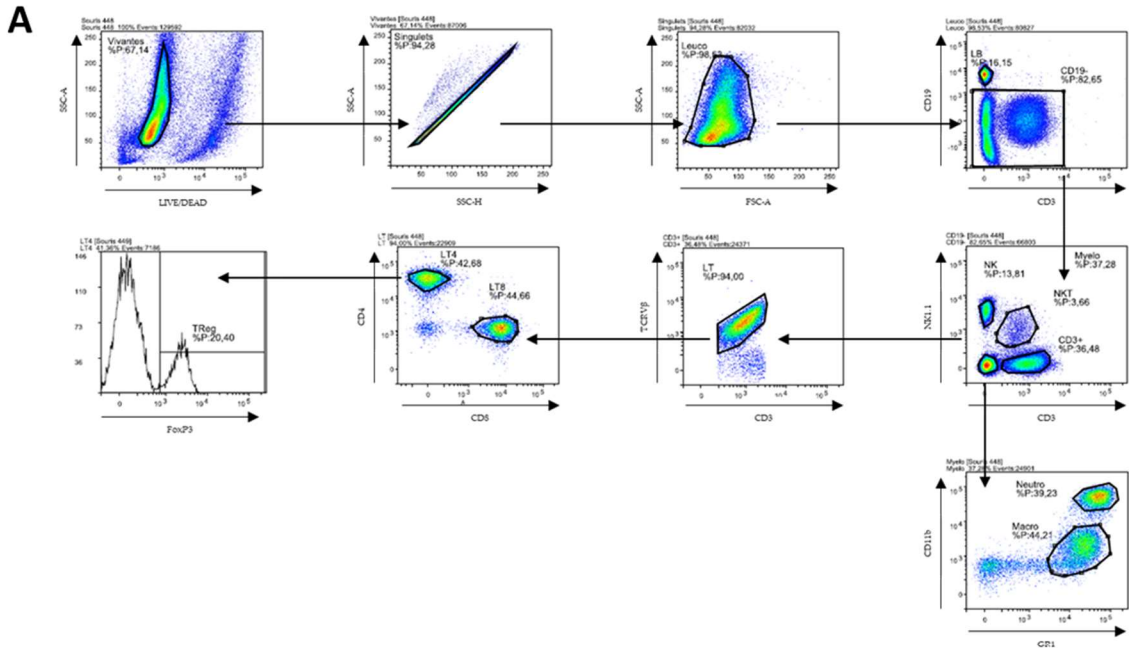


Table S1. Sequences of primers used for qPCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>18s</i>	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TTGGCAAATGCTTTCGCTC
<i>Tnf-α</i>	TAGTCCCAGAAAAGCAAGC	TTTTCTGGAGGGAGATGTGG
<i>Il-6</i>	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	CAGAATTGCCATTGCACAAC
<i>Timp1</i>	TTCCAGTAAGCCTGTAGC	TTATGACCAGGTCCGAGTT
<i>Timp2</i>	CTGGGACACGCTTAGCATCA	GACAGCGAGTGATCTTGAC
<i>Ccl2</i>	TCCCAATGAGTAGGCTGGAG	TCTGGACCCATTCTTCTTG
<i>Col1a1</i>	GCTCCTGCTCTTAGGG	GCAGAAAGCACAGCACTCG
<i>Mmp2</i>	ATGGTAAACAAGGCTTCATG	TTGAGAAGGATGGCAAGTAT
<i>Tgfb1</i>	CACCATCCATGACATGAACC	CAGAAGTTGGCATGGTAGCC

Table S2. Fluorochrome-conjugated antibodies used for flow cytometry.

Antigen (conjugate)	Clone	Reference
GR1 (eFluor 450)	RB6-8C5	#48-5931-82, eBioscience
CD4 (BV510)	RM4-5	#561099, BD Pharmingen™
TCR (BV605)	H57-597	#562840, BD Pharmingen™
CD19 (BV786)	ID3	#563333, BD Pharmingen™
FoxP3 (PE)	150D/E4	#12-4774-42, eBioscience
NK1.1 (PEeFluor)	PK136	#61-5941-80, eBioscience
CD11b (PECy7)	M1/70	#552850, BD Pharmingen™
CD3 (APC)	145.2.C11	#17-0031-81, eBioscience
CD8 (APCCy7)	53-6-7	#557654, BD Pharmingen™

I. Discussion générale et perspectives

1. La E3-Ubiquitine ligase TRIM21

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer hépatique le plus courant et représente la 4^{ème} cause mondiale de décès par cancer. Il se développe généralement à partir d'une maladie hépatique chronique préexistante. La stéatose hépatique (NAFLD) et notamment sa forme sévère la stéatohépatite (NASH) représente l'une des principales causes de développement de cirrhose, qui est le facteur de risque le plus important d'apparition de cancer hépatique.

La mort cellulaire joue un rôle important dans la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC. Les transaminases hépatiques, qui reflètent la présence de mort cellulaire au sein du tissu hépatique, sont généralement augmentées durant la NAFLD et la NASH. Elles sont également corrélées avec la progression de la maladie hépatique (Wen et al., 2012). Dans le cadre de la NAFLD, l'augmentation des lipides présents dans le tissu hépatique induit une lipotoxicité et le relargage de ROS qui vont provoquer la mort des hépatocytes (Malhi et al., 2007). Cette lipotoxicité va également induire une régénération des hépatocytes afin de préserver la fonction hépatique et favoriser l'apparition de mutations spontanées qui peuvent être pro-oncogènes et le développement du cancer. La mort des hépatocytes va également favoriser un environnement pro-inflammatoire qui va amplifier les dégâts cellulaires et permettre l'activation des cellules étoilées hépatiques, la fabrication de matrice extracellulaire et le développement de la fibrose.

De nombreux types de mort cellulaire peuvent jouer un rôle dans la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC : l'apoptose, la nécrose, la nécroptose, l'autophagie ou encore la pyroptose. Cependant, la majorité des études se concentre sur l'apoptose, la nécrose ainsi que la nécroptose, dont le rôle n'est pas encore clairement défini à ce jour (Schwabe and Luedde, 2018).

Au cours de notre première étude, nous nous sommes intéressés à la nécroptose induite par le ligand TRAIL. Le ligand TRAIL, en se fixant sur ces récepteurs activateurs (DR4 et DR5), peut induire la mort cellulaire par apoptose, et dans le cas où celle-ci n'est pas possible, la nécroptose. Des études ont mis en évidence que les cellules cancéreuses possédaient une augmentation de l'expression des récepteurs activateurs (DR4 et DR5) de TRAIL, les rendant plus sensibles à la mort cellulaire induite par ce ligand.

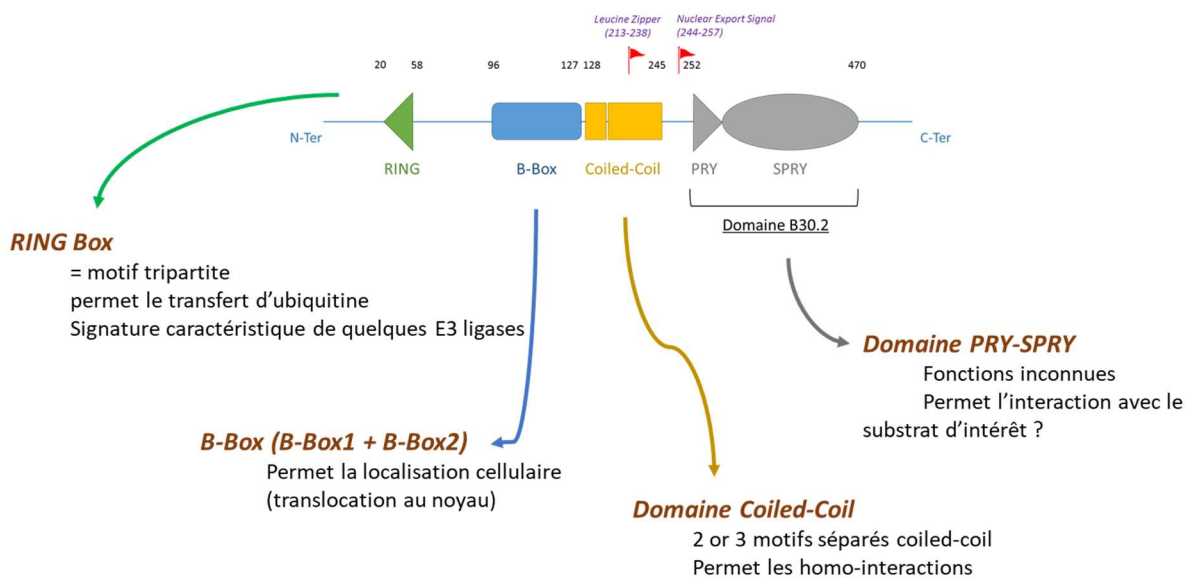


Schéma 16 : Domaines de la E3-ligase TRIM21 (Réalisé à partir de Meroni et al., 2005 et Reymond et al., 2001).

Cependant, dans la majorité des cas, même si les cellules cancéreuses possèdent une augmentation de DR4 et DR5, elles développent d'autres stratégies d'évasion à l'induction de la mort cellulaire. Par exemple, l'expression de cFLIP, XIAP, Bcl-2 et Bcl-xL, facteurs anti-apoptotiques, est couramment augmentée dans les cellules cancéreuses, bloquant ainsi l'exécution de l'apoptose (Ion et al., 2019).

D'un autre côté, d'autres études ont démontré que TRAIL possédait également des capacités pro-tumorales et serait impliqué dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, la signalisation de TRAIL peut induire la mort cellulaire, mais également activer des facteurs de survie, en passant par la voie de signalisation du NFκB. La résistance des cellules cancéreuses à TRAIL favorise l'activation de la voie NFκB et la survie des cellules cancéreuses. L'activation de la voie NFκB est associée à la production de cytokines pro-inflammatoires comme CCL-2, IL-8, CSCL-1 ou CXCL-5, favorables à l'expansion tumorale (Lafont et al., 2018).

Au niveau moléculaire, la nécroptose induite par le ligand TRAIL reste moins étudiée que celle induite par le TNF-α. Une meilleure connaissance de la signalisation du ligand TRAIL permettra de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par le ligand TRAIL. Nos travaux ont porté sur la nécroptose induite par le ligand TRAIL. L'étude protéomique des composants du nécrosome par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence la présence d'un nouveau partenaire: TRIM21. L'utilisation de lignées cellulaires (HT29, HaCat) dont l'expression de TRIM21 a été inhibée (par ARN interférence ou CRISPR Cas9) ou surexprimée (transfection de plasmides) a démontré le rôle sensibilisateur de cette protéine à la nécroptose induite par TRAIL.

TRIM21 (ou Ro52) est une E3-ubiquitine ligase de la famille TRIM (Tripartite Motif Family) et se compose de 4 domaines : un premier domaine, le domaine RING (Really Interesting New Gene) qui permet le transfert d'ubiquitine de TRIM21 à sa cible. Elle possède une B-Box (B-Box-1 + B-Box2) qui rend possible sa translocation du cytoplasme jusqu'au noyau cellulaire. Elle a également une superhélice (domaine Coiled-Coil) qui permet aux protéines de la famille TRIM d'interagir entre elles. Enfin, la fonction du domaine PRY-SPRY (ou B30.2) permet l'interaction de la E3-ligase avec son substrat de manière spécifique (Meroni and Diez-Roux, 2005; Reymond et al., 2001) (Schéma 16).

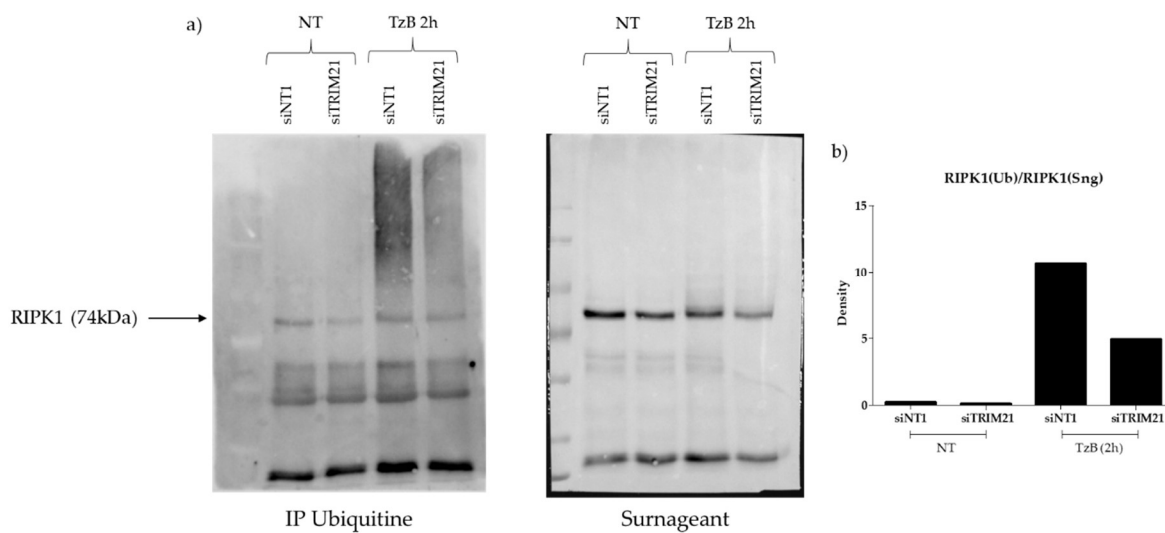


Schéma 17 : Ubiquitination de RIPK1 durant la nécroptose induite par le ligand TRAIL. Les cellules HT29 ont été transfectées avec les siARNs suivants : siTRIM21 ou siNT1 (contrôle négatif). 48h après transfection, les cellules ont été traitées avec du TRAIL (100ng/mL), zVAD (25µM) et Birinapant (1µM) (TzB) pendant 2h. a) Western blot de l'immunoprécipitation des ubiquitines avec un anticorps anti-RIPK1 ; b) Densitométrie associée.

TRIM21 joue un rôle dans l'induction de l'apoptose au cours de certaines pathologies. L'expression de TRIM21 est augmentée dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) de patients atteints du syndrome de Sjögren (SS) et de lupus érythémateux disséminé. La surexpression de cette protéine entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et engendre la mort des cellules par apoptose chez ces patients (Espinosa et al., 2006). *Jauharoh et al.* ont démontré que TRIM21 permettait également d'induire l'apoptose dans les cellules infectées durant une infection virale. Au cours de l'infection virale, la sécrétion d'IFN- α par les cellules immunitaires induit une augmentation de l'expression de TRIM21. TRIM21 peut alors réguler négativement l'expression de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique et induire la mort de la cellule par apoptose (Jauharoh et al., 2012). Ces études suggèrent un rôle pro-apoptotique de la protéine TRIM21. Nos travaux suggèrent que TRIM21, en plus de jouer un rôle dans l'apoptose, se révèle également être un modulateur positif de la nécroptose.

Les travaux de *Almagro et al.*, sur la nécroptose induite par le TNF- α ont mis en évidence que la protéine RIPK1 était ubiquitinylée au sein du nécrosome. Cette ubiquitination permet de favoriser l'activation de RIPK1 et notamment d'améliorer l'efficacité de son activité kinase. Cependant, la E3-ligase responsable de cette ubiquitination n'a pas été identifiée (Almagro et al., 2017). Au cours de nos travaux, des modifications post-traductionnelles de RIPK1 sembleraient indiquer que la protéine RIPK1 serait également ubiquitinylée au sein du nécrosome durant la nécroptose induite par TRAIL. Des premiers tests ont mis en évidence que l'inhibition de l'expression de TRIM21 par ARN interférence permettrait de diminuer l'ubiquitination de RIPK1 (Schéma 17). La protéine TRIM21 participerait ainsi à l'ubiquitination de RIPK1 ce qui permettrait l'activation optimale de cette protéine et l'induction de la nécroptose. Cependant, nos travaux ont montré que l'absence de TRIM21 dans les cellules n'inhibait pas totalement la nécroptose induite par le ligand TRAIL, mais ralentissait le processus. Il est probable que TRIM21 ne soit pas indispensable à l'induction d'un signal nécroptotique par TRAIL mais que cette E3-ubiquitine ligase favoriserait l'activité kinase de RIPK1 dans le nécrosome.

TRIM21 joue un rôle dans la détection et l'élimination des pathogènes intracellulaires. L'équipe de McEwan a démontré que la reconnaissance d'anticorps intracellulaires fixés sur les pathogènes intracellulaires permettait d'activer la voie de signalisation du NF κ B et l'induction de l'expression des protéines AP-1, IRF3, IRF5 et IRF7. La voie de signalisation du facteur NF κ B est impliquée dans la survie cellulaire associée à une réponse pro-inflammatoire, à un stress oxydatif et à la production de ROS (McEwan et al., 2013).

La présence de ROS induit le dysfonctionnement des hépatocytes et leur mort par apoptose mais permet également l'activation des KC et des cellules étoilées du foie ainsi que l'infiltration de macrophages et lymphocytes. Les ROS induisent également l'expression de diverses protéines dont p62. Cette protéine possède la capacité de se lier aux ubiquitines fixées sur les protéines et de les adresser au protéasome afin de les dégrader. Son expression est induite par deux facteurs de transcription majeurs : NFR2 et NFκB dont l'expression est couramment augmentée durant un stress oxydatif et dans les maladies hépatiques.

Dans les maladies hépatiques chroniques, p62 se retrouve accumulée au sein des hépatocytes. Son expression a été corrélée avec l'apparition de tumeurs et est liée à la survie des patients. La délétion de la protéine p62 dans le modèle murin NASH-HCC supprime l'apparition du CHC, mettant en évidence un rôle pro-oncogénique de p62 (Umemura et al., 2016). Une étude de *Pan et al.*, a démontré que TRIM21 pouvait interagir avec p62 et induire la séquestration de ce dernier dans le cytoplasme et permettant la diminution du stress oxydatif (Pan et al., 2016). Dans les tissus tumoraux hépatiques, l'expression de TRIM21 est diminuée et est corrélée avec l'avancée de la pathologie hépatique et un mauvais pronostic pour les patients (Ding et al., 2015).

Nos travaux ont démontré un rôle sensibilisateur de TRIM21 dans la nécroptose induite par le ligand TRAIL. La diminution de l'expression de TRIM21 dans les cellules cancéreuses pourrait expliquer la résistance de ces cellules à la mort cellulaire induite par le ligand TRAIL. TRIM21 pourrait représenter une cible thérapeutique afin de rétablir la sensibilité des cellules à l'induction de la mort par TRAIL et permettre ainsi de détruire les cellules cancéreuses.

Perspectives d'études sur la E3-ubiquitine ligase TRIM21 :

- Au niveau moléculaire, des études supplémentaires sont nécessaires afin de valider les fonctions de TRIM21 dans la nécroptose induite par TRAIL. Plus précisément, des expérimentations d'immunoprécipitation permettront de définir l'influence de TRIM21 sur les modifications post-traductionnelles de RIPK1 et RIPK3. De plus, d'autres expériences d'immunoprécipitation permettront de définir avec précisions le site d'ubiquitination ciblé par TRIM21 (K48, K63, etc.) et le type d'ubiquitination réalisé (mono-ubiquitination, polyubiquitination, chaîne linéaire, etc.) afin de définir le rôle de cette modification post-traductionnelle dans la régulation du signal nécroptotique ;

- Une étude sur des souris transgéniques dont l'expression de TRIM21 a été délétée (TRIM21^{-/-}) pourrait également permettre d'étudier l'impact de la protéine TRIM21 sur le développement du carcinome hépatocellulaire. Le rôle de TRIM21 sur l'évolution de la pathologie hépatique, de la NAFLD à la NASH ainsi que sur le développement de CHC sera évalué sur des souris TRIM21^{-/-} à l'aide du modèle NASH-HCC et comparé à des souris sauvages.

2. Le modèle NASH-HCC

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est devenue la principale cause d'hépatite chronique dans les pays développés, où elle peut représenter jusqu'à 30% de la population. L'augmentation de la prévalence de la NAFLD peut être expliquée par l'évolution des modes de vie vers une sédentarité plus importante associée à une alimentation plus calorique. Ces changements ont induit l'augmentation de la proportion de personnes atteintes de maladies métaboliques communément associées à la NAFLD comme l'obésité ou le diabète (Rhee, 2019). Dans une étude réalisée par *Lonardo et al.*, la présence de NAFLD a été retrouvée chez plus de 50% des patients atteints d'un diabète de type II (Lonardo et al., 2015). On estime que 20 à 30% des patients atteints de NAFLD développent une maladie hépatique chronique progressive avec une fibrose qui peut évoluer en cirrhose dans 10 à 20% des cas. La cirrhose hépatique est le facteur de risque majeur de développement de carcinome hépatocellulaire (CHC) (Kulik and El-Serag, 2019).

Nos travaux ont démontré que la composition du régime alimentaire impactait l'environnement hépatique ainsi que le développement de la NASH et du CHC. Dans notre étude, nous avons comparé deux régimes alimentaires de composition différentes en glucides, protéines et lipides : High-Fat High Cholesterol (HFHCD) et High-Fat High Sugar (HFHSD), et observé l'apparition plus rapide et d'un plus grand nombre de tumeurs chez les souris diabétiques nourries avec HFHSD. Ce régime, contrairement au HFHCD, contient à la fois un taux élevé de lipides mais également de glucides. Les glucides, et notamment le fructose, sont impliqués dans le développement du CHC. En effet, au niveau hépatique, les glucides stimulent, d'une part la lipogénèse et induisent la production d'acides gras et de triglycérides qui seront stockés dans les hépatocytes (Cantley, 2013). D'autre part, les glucides induisent l'activation de certaines voies de signalisation, comme la voie mTOR qui va causer une diminution de l'activité autophagique.

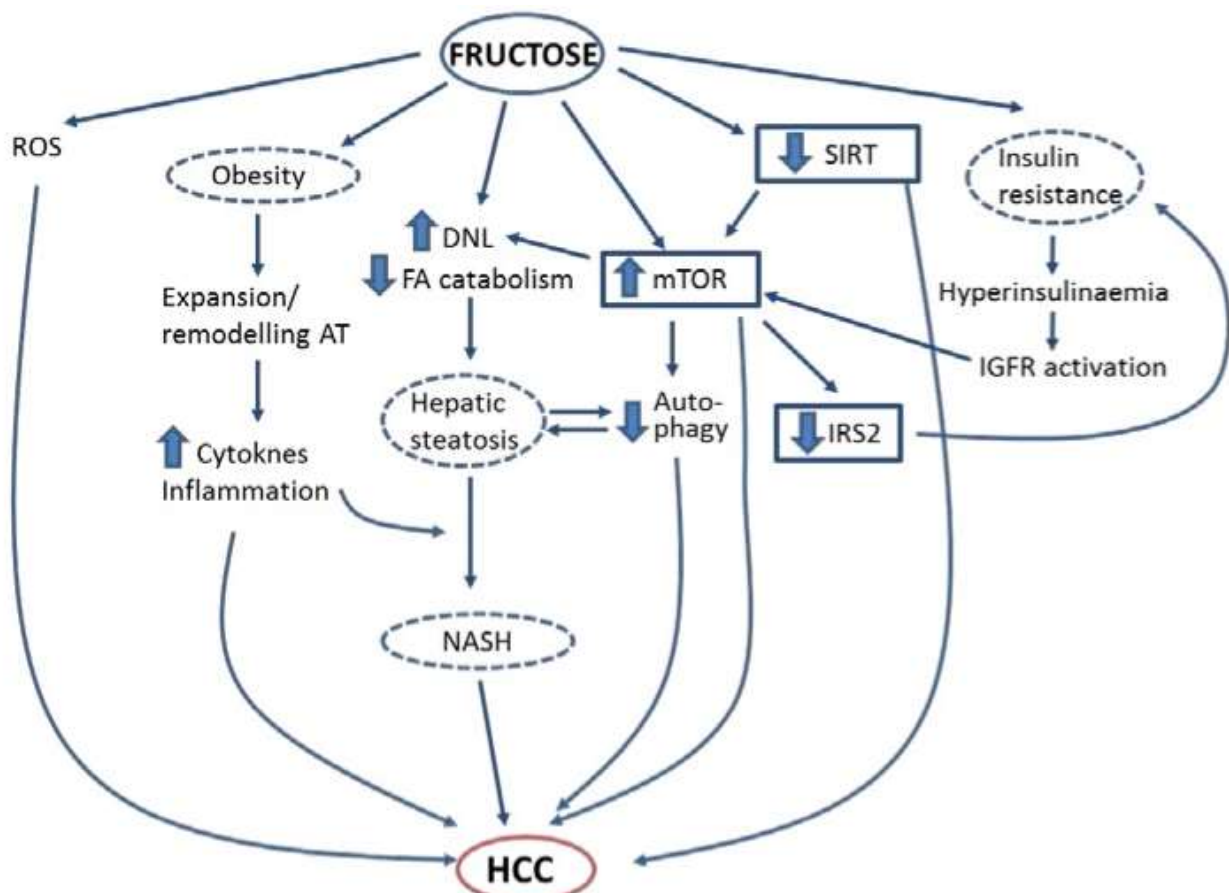


Schéma 18 : Représentation des voies de signalisations impactées par la présence de fructose et contribuant à l'apparition du CHC (Schéma de Laguna et al., 2014).

HCC : Hepatocellular carcinoma ; IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor ; IRS2 : Insulin Receptor Substrate 2 ; NASH : Stéatohépatite non alcoolique ; ROS : Espèce réactives à l'oxygènes ; SIRT : Sirtuine 1

L'autophagie permet la dégradation de certains composants cytoplasmiques cellulaire, notamment les lipides, afin de permettre la production d'ATP. La réduction de l'autophagie est liée à l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes et la progression de la stéatose hépatique (Singh et al., 2009). La voie de signalisation de mTOR, impliquée dans la survie cellulaire et le métabolisme intracellulaire, est également impliquée dans la progression de la NASH et l'apparition du CHC et est fréquemment activée au sein des tumeurs de patients atteints de CHC (Okuno et al., 2018). D'autres mécanismes ont également décrit l'implication du fructose dans le développement de la maladie hépatique et l'apparition du cancer (Laguna et al., 2014) (Schéma 18).

A l'aide d'un modèle murin, *Tessitore et al.* ont démontré que l'ajout de glucides dans l'eau de boisson de souris nourries avec un régime hyperlipidique accélérerait le développement d'un carcinome hépatocellulaire (Tessitore et al., 2017). Ces résultats sont en concordance avec nos travaux puisque, dans notre étude, la présence de glucides dans le régime hyperlipidique HFHSD entraîne l'apparition plus rapide et d'un plus grand nombre de tumeurs hépatiques chez nos souris diabétiques.

Cependant, les glucides ne sont pas les seuls composés mis en cause dans la progression de la maladie hépatique. Des études ont également mis en évidence que la composition lipidique en acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) du régime alimentaire influençait le développement du CHC. En effet, dans le cas d'un régime contenant une importante proportion d'AGS, l'accumulation dans le tissu hépatique induisait un stress du réticulum endoplasmique dans les hépatocytes et leurs morts par nécrose. La nécrose des hépatocytes provoque le relargage de molécules qui vont activer les cellules de Kupffer et la production de cytokines pro-inflammatoires (Hubler and Kennedy, 2016; Leroux et al., 2012). La présence dans l'environnement hépatique de cytokines pro-inflammatoires va aboutir au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires telles que les LT CD4⁺ (de Jong et al., 2014). Au contraire, la présence d'AGPI est reconnue pour protéger le tissu hépatique de l'inflammation, et active la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Le ratio entre ASG et AGPI semble important dans la détermination du profil d'expression cytokiniques des macrophages résidents.

Dans notre étude, la proportion en acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) diffère selon le régime alimentaire. Plus précisément, le ratio ASG/AGPI est plus élevé dans le régime HFHCD (17,35) par comparaison au régime HFHSD (2,1).

Conformément aux données de la littérature, l'excès d'AGS dans le HFHCD induit une inflammation hépatique, le recrutement de cellules immunitaires et contribue à la progression de la NASH chez les souris diabétiques. De plus, le régime HFHCD est enrichi en cholates et cholestérols. Ces deux composants participent également à l'environnement pro-inflammatoire et à la fibrose hépatique (Ibrahim et al., 2016; Vergnes et al., 2003). Le cholestérol est également impliqué dans la mort cellulaire. En effet, cette molécule lipotoxique induit le relargage intracellulaire du cytochrome c et d'ATP conduisant à l'activation de la voie de signalisation JNK1 et à l'induction de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Kutlu et al., 2018).

Durant la progression de la NASH, l'excès de lipides et d'acides gras induit une lipotoxicité hépatique et la mort des hépatocytes qui initie l'inflammation du tissu hépatique. La mort des hépatocytes conduit au relargage de DAMPs qui vont activer les cellules de Kupffer. De même, les patients atteints de NASH possèdent une augmentation de la perméabilité intestinale qui provoque le passage de pathogènes (bactéries, virus ou parasites) dans le sang. La présence de pathogènes induit le relargage de PAMPs qui peuvent être détectés par les KC et les activer (Akira et al., 2006). L'activation des KC par les DAMPs ou les PAMPs induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β) et de chimio-attractants (CCL-2, CCL-5) qui vont aboutir à l'inflammation du tissu hépatique et au recrutement de cellules immunitaires (Grunhut et al., 2018). La présence d'un infiltrat immunitaire massif observé par un marquage CD45⁺ chez les souris diabétiques nourries avec le HFHCD peut sans doute être expliquée par la présence de lipides hépatiques toxiques (AGS, cholates et cholestérol) qui induisent l'activation des KC et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et CCL-2. Ces molécules sont augmentées dans le tissu hépatique des souris diabétiques nourries avec le HFHCD et induisent le recrutement de cellules immunitaires actives. L'analyse en cytométrie de flux des infiltrats immunitaires présents dans le tissu hépatique des souris diabétiques nourries avec HFHCD a permis d'identifier la présence abondante de macrophages. Ces macrophages sont probablement responsables du recrutement et de l'activation massive des lymphocytes observés chez ces souris. Ces souris présentent également moins de tumeurs hépatiques que les souris nourries avec HFHSD. Associées aux cellules NK, les lymphocytes Thelper CD4⁺ et TCD8⁺ cytotoxiques sont reconnus pour leur rôle dans l'immunosurveillance (Sachdeva et al., 2015). Ainsi, la présence d'un plus grand nombre de cellules immunitaires anti-tumorales actives dans le foie des souris diabétiques nourries avec le régime HFHCD permettrait de contrôler l'apparition des tumeurs hépatiques, et ce, malgré un stade fibrotique avancé.

Au contraire, les souris nourries avec le régime HFHSD ne présente pas d'inflammation du tissu hépatique. Les macrophages ne sont donc pas activés et ne sécrètent pas de cytokines permettant le recrutement de cellules immunitaires anti-tumorales. De plus, *Crispe et al.*, ont mis en évidence qu'un faible signal d'activation sur les lymphocytes LT CD4⁺ et LT CD8⁺ entraînait l'apoptose de ces cellules (Crispe, 2014). L'absence de surveillance immunitaire dans le tissu hépatique des souris diabétiques nourries avec le régime HFHSD permettrait aux hépatocytes cancéreux de persister, de proliférer et de donner naissance à de nombreux nodules tumoraux.

A l'heure actuelle, le modèle NASH-HCC représente le modèle murin le plus pertinent pour l'étude du carcinome hépatocellulaire et de l'environnement tumoral (Macek Jilkova et al., 2019). Comme décrit dans l'introduction, le développement du CHC dans ce modèle présente de nombreux points communs avec les CHC humains. Ce modèle pourrait aider à mieux comprendre la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC. Il s'agit également d'un bon modèle pour l'étude de nouvelles thérapies pour le traitement de ce cancer hépatique. En effet, de nos jours, plus de 70% des patients présentent une maladie à un stade avancé et ne sont pas éligibles aux transplantations, ou résection tumorale. De plus, la majorité des cancers hépatiques se développant sur une cirrhose préexistante, le foie, après une résection tumorale, présente un environnement favorable au développement de nouvelles tumeurs hépatiques (Portolani et al., 2006). Pour la majorité des patients, peu d'options thérapeutiques sont disponibles, malgré l'apparition du Sorafenib en 2007 (Llovet et al., 2019).

Récemment, de nouvelles molécules reposant sur les immunothérapies ont été développées, dans le but d'améliorer les stratégies disponibles pour les patients atteints d'un CHC avancé. En 2018, le nivolumab a été ajouté en tant que première molécule d'immunothérapie approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis dans le traitement du CHC (Marrero et al., 2018). Le nivolumab est un inhibiteur de PD-1 (Programmed cell Death protein-1). PD-1 est un marqueur de surface exprimé sur un bon nombre de cellules immunitaires actives (LT CD4⁺, LT CD8⁺, LB, Treg). La liaison de PD-1 avec l'un de ces ligands (PD-L1 ou PD-L2) induit l'inactivation de la cellule immunitaire et sa mort par apoptose (Shen et al., 2019). Les cellules tumorales détournent la signalisation PD-L1/PD-1 en surexprimant les ligands PD-L1 et PD-L2 afin d'activer PD-1 dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs, inhiber ainsi leurs actions et échapper au système immunitaire (Hato et al., 2014). Des études cliniques ont démontré que l'expression de PD-L1 et PD-1 dans les tumeurs était corrélée avec le stade avancé de la maladie, la récurrence tumorale et le pronostic vital des patients (Shi et al., 2011).

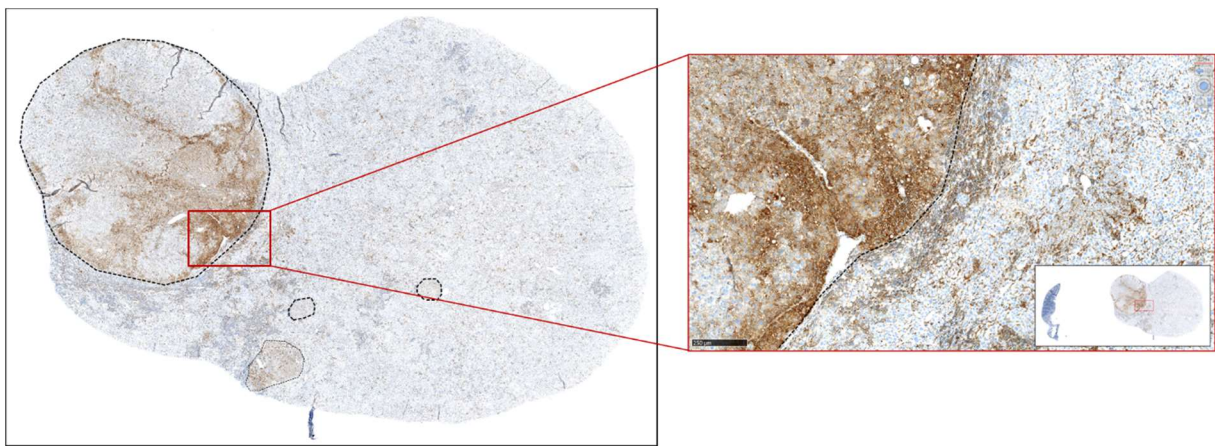


Schéma 19 : Expression de PD-L1 dans le tissu hépatique d'une souris diabétique nourrie pendant 16 semaines avec le régime HFHCD. Les lignes en pointillés délimitent les différentes tumeurs identifiées.

HFHCD: High-Fat High Cholesterol Diet; PD-L1: Programmed death-ligand 1.

Des premiers tests sur nos souris NASH-HCC nourries avec le HFHCD ont démontré que l'expression de PD-L1 était augmentée dans les tumeurs hépatiques et pourrait en partie expliquer la persistance de ces tumeurs dans le tissu hépatique malgré la présence d'un grand nombre de cellules immunitaires anti-tumorales actives (Schéma 19).

L'étude de l'expression des immune checkpoints dans nos modèles de souris NASH-HCC nourries avec HFHCD ou HFHSD pourrait permettre d'identifier et de tester de nouvelles cibles thérapeutiques afin de limiter l'apparition de CHC ou d'activer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

Une autre population de cellules immunitaires, les lymphocytes T régulateurs (Treg) représente un intérêt thérapeutique. En effet, cette population immunitaire possède des fonctions immunosuppressives et contribue au contrôle de la réponse immunitaire, principalement afin de préserver l'organisme des réactions auto-immunes. Cependant, ces fonctions inhibitrices peuvent également diminuer l'efficacité des réponses immunitaires et promouvoir l'expansion tumorale (Wong et al., 2016). Dans notre étude, les souris diabétiques nourries avec le régime HFHCD présentent une réponse immunitaire anti-tumorale efficace mais également de nombreux Tregs actifs. La présence de ces Tregs pourraient expliquer que malgré un infiltrat important de cellules immunitaires anti-tumorales (LT CD4⁺ et LT CD8⁺), des tumeurs apparaissent et subsistent dans le tissu hépatique. Ce modèle peut offrir la possibilité de tester de nouvelles molécules ciblant les Tregs et évaluer ainsi leurs intérêts thérapeutiques dans le traitement du CHC (Bengtsson et al., 2019).

Perspectives d'études sur le modèle NASH-HCC :

- Chez les souris diabétiques nourries avec HFHSD, l'étude des modifications génétiques et épigénétiques associées aux mécanismes moléculaires en lien avec l'apparition et l'expansion des cellules cancéreuses permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients atteints d'un CHC ;
- L'analyse des Tregs pourrait permettre de définir leur rôle anti- ou pro-tumoral dans le tissu hépatique et d'envisager des thérapies ciblées sur ces populations afin d'améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale chez les patients atteints de CHC ;
- L'analyse des immune checkpoints dans le tissu hépatique des souris nourries avec HFHCD et HFHSD permettra de mieux comprendre les stratégies d'évasion vis-à-vis du système immunitaire des cellules cancéreuses et d'envisager de nouvelles molécules thérapeutiques ;

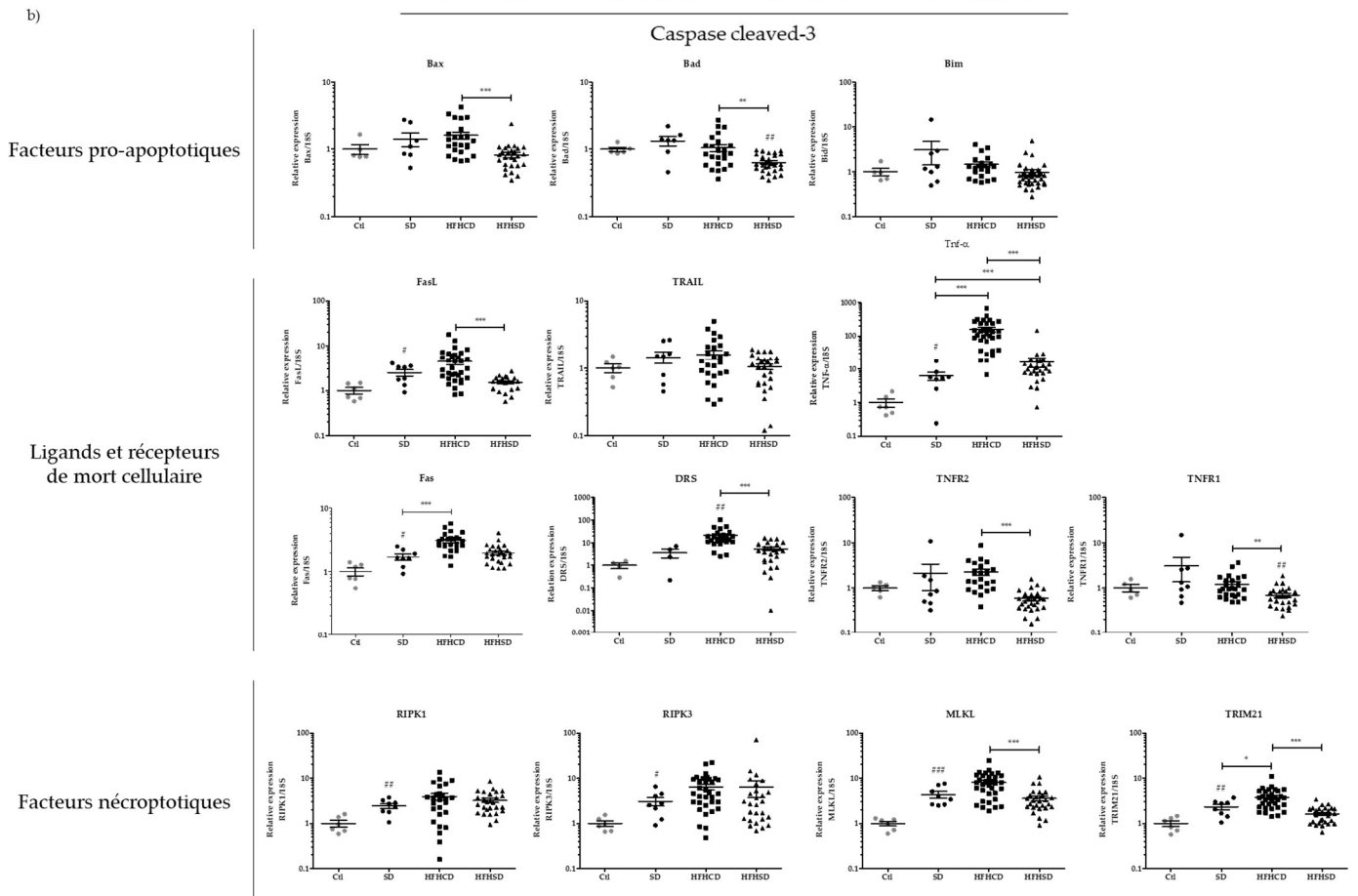
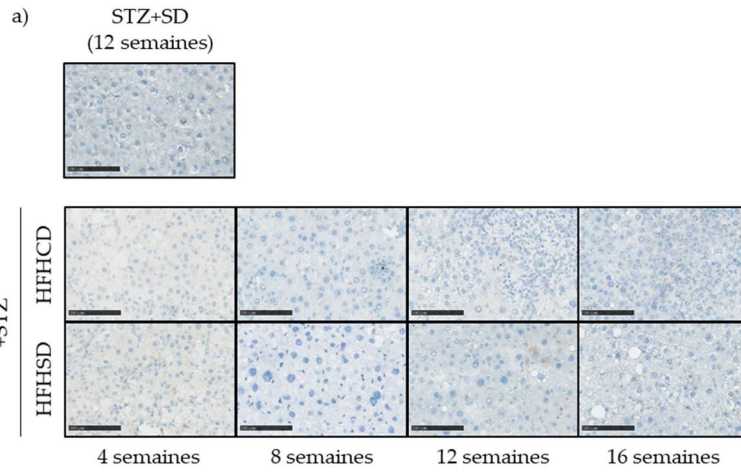


Schéma 20 : Marqueurs de mort cellulaire dans le modèle NASH-HCC. a) Marquages immunohistochimiques Caspase-3 clivée chez les souris diabétiques nourries avec SD, HFHCD ou HFHSD durant 4 à 16 semaines ; b) Niveau d'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire par apoptose ou nécroptose. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ compare les souris diabétiques sous SD aux souris non-diabétiques sous SD; \$, $P < 0.05$; \$\$, $P < 0.01$ and \$\$\$, $P < 0.001$ compare les souris diabétiques sous HFHCD ou HFHSD aux souris diabétiques sous SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.001$ compare les souris diabétiques sous HFHCD aux souris diabétiques sous HFHSD.**

- Le modèle NASH-HCC représente un bon modèle pour tester l'efficacité de molécules thérapeutiques envisagées dans le traitement du carcinome hépatocellulaire. Une étude de l'effet du Nivolumab sur le développement du carcinome hépatocellulaire est envisagée afin d'analyser l'importance de la voie de signalisation PD-1/PD-L1 chez des souris diabétiques nourries avec HFHCD et HFHSD.

3. Le rôle de la mort cellulaire et de RIPK1 dans la progression de la maladie hépatique

La connaissance des mécanismes cellulaires permettant d'induire la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses représente un enjeu majeur dans la recherche et le développement de nouvelles thérapies. L'apoptose et la nécroptose sont les principaux types de mort cellulaire reconnus comme des éléments clés des maladies hépatiques. La nécroptose est contrôlée par deux sérine-thréonine kinases, RIPK1 et RIPK3 et par une pseudo-kinase MLKL associées dans un complexe appelé le nécrosome (Zhou and Yuan, 2014). L'implication de la nécroptose au cours de l'évolution de la NASH reste controversée (Dara et al., 2016), même si certaines données soutiennent cette hypothèse (Afonso et al., 2015; Gautheron et al., 2014). Par ailleurs, un excès de mort des hépatocytes pourrait accélérer la carcinogenèse (Fabregat, 2009).

Chez les patients atteints de NAFLD ou NASH, l'atteinte hépatique est généralement caractérisée par une augmentation des transaminases hépatiques. L'apoptose est le type de mort cellulaire le plus décrit dans la littérature. Chez des patients atteints de NAFLD et de NASH, l'augmentation de l'expression et de l'activation des caspase-3 et caspase-7 ont été corrélées avec la mort des hépatocytes et la progression de la maladie hépatique (Feldstein et al., 2003). Nos travaux ont mis en évidence des dommages hépatocytaires uniquement chez les souris diabétiques nourries avec HFHCD. Cependant, le marquage du tissu hépatique avec un anticorps ciblant la caspase-3 clivée n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'apoptose chez nos souris diabétiques (nourries avec HFHCD ou HFHSD) (Schéma 20).

L'inhibition de la caspase-8 dans les cellules parenchymateuses hépatiques de souris (Caspase-8^{LPC-KO}) nourries avec un régime hyperlipidique (MCD) a permis de mettre en évidence l'importance de cette protéine et de l'apoptose dans la progression de la maladie hépatique. Les souris Caspase-8^{LPC-KO} présentent moins de dommages hépatiques ainsi qu'une diminution de l'inflammation et des infiltrats immunitaires que les souris sauvages (Hatting et al., 2013).

L'absence de caspase-8 diminue l'activation des caspases effectrices (caspase-3 et caspase-7) ce qui limite l'apoptose hépatocytaires et permet ainsi de réduire les dommages hépatiques.

La caspase-3 active clive certains composants intracellulaires comme la cytokératine-18 (CK-18) au cours de l'apoptose. S'il y a présence d'apoptose, la CK-18 va être clivée pour donner le fragment M30. La présence de CK-18 clivée en M30 a été corrélée avec la présence d'une NASH chez les patients (Maher et al., 2015). De même, la surexpression de la cytokératine-18 chez des souris transgéniques nourries avec un régime hyperlipidique provoque une augmentation des dommages hépatiques, l'apoptose des hépatocytes et une inflammation du tissu hépatique (Kucukoglu et al., 2014). La cytokératine-18 est également augmentée dans le modèle NASH-HCC (SMC Laboratories Inc.). D'autres facteurs pro-apoptotiques sont également surexprimés dans le tissu hépatique des patients atteints de NASH : Bax, Bad et Bim (Malhi et al., 2007). Ces facteurs pro-apoptotiques favorisent le relargage du cytochrome c et l'induction de l'apoptose intrinsèque dans le tissu hépatique. Au cours de nos travaux, nous n'avons pas observé de modifications d'expression des messagers de ces facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bad et Bim) (Schéma 20).

L'augmentation de l'expression de Fas et FasL au niveau hépatique a été associée à l'apparition de la NAFLD. De plus, les patients atteints de NASH présentent une augmentation des niveaux de Fas et FasL solubles (Alkhoury et al., 2015; Kanda et al., 2018). L'expression de TRAIL est également augmentée chez les patients atteints de NASH dans les premiers stades de la maladie. Ce ligand est sécrété par les cellules NK et participe à l'instauration d'un environnement pro-inflammatoire (Gomez-Santos et al., 2012). Nous nous sommes intéressés à l'expression des messagers des ligands de mort cellulaire et de leurs récepteurs respectifs dans le foie de souris diabétiques nourries avec HFHCD et HFHSD durant la progression de la maladie hépatique. L'expression des récepteurs de mort cellulaire Fas et DR5 est augmentée chez les souris nourries avec le régime HFHCD. Au niveau des ligands de mort cellulaire, seul le TNF- α voit son expression augmentée chez les souris diabétiques nourries avec un régime hyperlipidique, notamment avec HFHCD (Schéma 20). Enfin, nous avons également quantifié l'expression des protéines RIPK1, RIPK3, MLKL et TRIM21 dans le tissu hépatique des souris diabétiques nourries avec SD, HFHCD et HFHSD. L'expression de l'ensemble de ces protéines est augmentée lorsqu'un diabète est induit. La mise sous régime HFHCD des souris diabétiques semblent induire l'expression de MLKL et de TRIM21. Nous supposons que cette augmentation d'expression est liée au recrutement de cellules immunitaires qui expriment fortement ces deux protéines.

Ces résultats semblent cohérents avec la présence d'une maladie chronique dont la mort cellulaire est modérée. De plus, dans le modèle NASH-HCC, la mort cellulaire n'est pas induite par l'injection d'une molécule chimique, ce qui explique que la mort des hépatocytes ne soit pas synchronisée et qu'à un temps donné, la détection de la mort cellulaire soit faible.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de la protéine Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) dans la progression de la maladie hépatique. Alors que l'activité kinase de RIPK1 contrôle la mort cellulaire en induisant l'apoptose ou la nécroptose, sa fonction d'échafaudage assure la survie cellulaire et l'induction d'une inflammation par l'activation du NFκB (Silke et al., 2015). De nombreuses études récentes ont démontré un rôle possible de la protéine RIPK1 et de la nécroptose dans les pathologies hépatiques et dans la mort hépatocytaire (Dara, 2018). Cette protéine joue un rôle dans l'inflammation hépatique dépendante ou indépendante de la mort cellulaire (Luedde et al., 2014). Dans le cadre du CHC, des études chez des patients atteints par ce cancer ont démontré une corrélation entre un faible taux d'expression de la protéine RIPK1 et un pronostic vital diminué (Kondylis et al., 2015; Schneider et al., 2017). De plus, dans un modèle murin d'induction de CHC par l'injection de DEN, *Schneider et al.* ont mis en évidence que la protéine RIPK1, associée à TRAF2, protégeait le tissu hépatique et limitait l'apparition de tumeurs hépatiques induite par le DEN (Schneider et al., 2017). Une autre étude a mis en évidence que l'absence de la protéine RIPK1 ou de la protéine RelA (sous-unité du facteur NFκB) dans les cellules parenchymateuses hépatiques (LPC) n'induisait pas le développement de pathologies hépatiques. Cependant, l'absence de ces deux protéines dans les cellules du parenchyme hépatique augmente l'apoptose des hépatocytes et conduit au développement spontané de tumeurs hépatiques (Van et al., 2017). Dans un modèle d'induction de CHC par le DEN, l'absence de RIPK1 dans les LPC diminue l'apparition de tumeurs hépatiques. L'absence de la fonction kinase de RIPK1 (*via* l'utilisation d'une lignée transgénique de souris dont l'activité kinase de RIPK1 est non fonctionnelle, *Ripk1^{fl/D138N}*) ne permet pas d'inhiber l'apparition de tumeurs hépatiques induites par le DEN, démontrant que la fonction kinase de RIPK1 n'est pas indispensable au développement du cancer hépatique (Van et al., 2017).

Les connaissances scientifiques sur le rôle de RIPK1 dans la progression de la NAFLD à la NASH au carcinome hépatocellulaire restent limitées. Nos travaux ont mis en évidence que l'absence de cette protéine dans les cellules du parenchyme hépatique, dont les hépatocytes, n'impactait pas le développement de la stéatose. De plus, l'absence de RIPK1 ne protège pas les hépatocytes de la mort cellulaire mais favoriserait la fibrose hépatique.

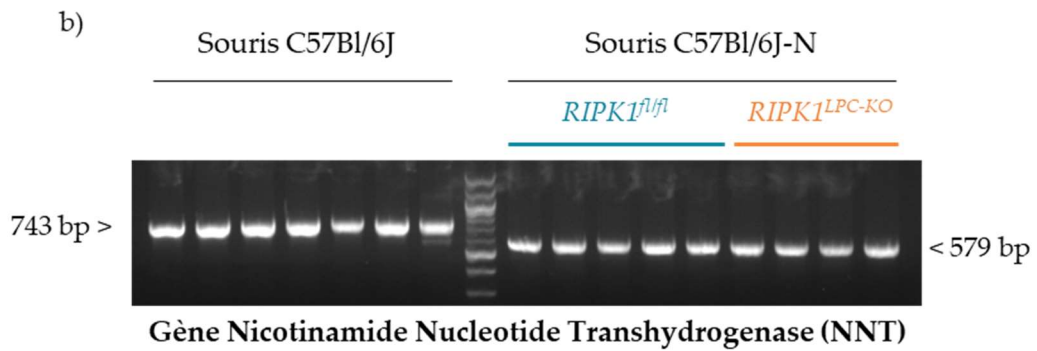
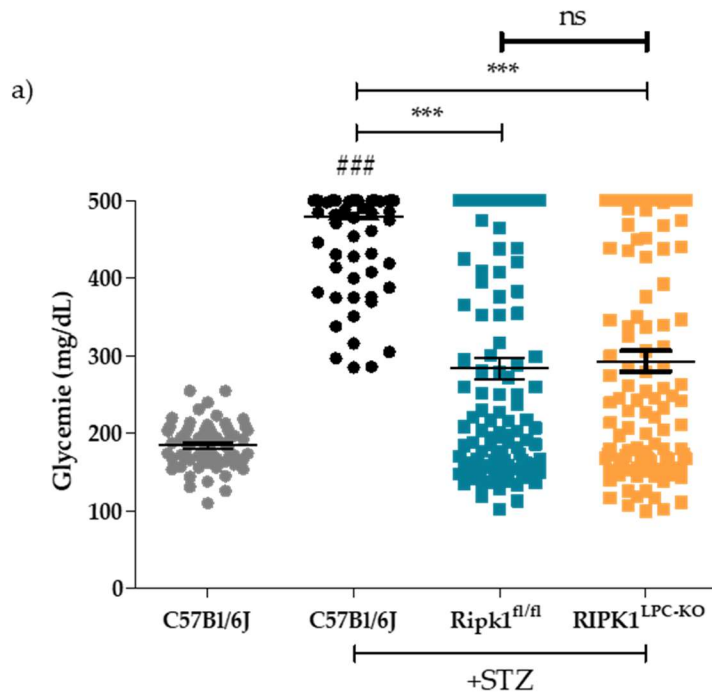


Schéma 21 : Effet du fond génétique sur l'induction du diabète. a) Glycémie des souris C57Bl/6J et souris de la lignée RIPK1 (C57Bl/6J-N) ; b) Gel d'agarose après PCR du gène Nicotinamide Nucléotide Transhydrogénase sur les souris C57Bl/6J et souris de la lignée RIPK1 (C57Bl/6J-N). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ and ###, $P < 0.001$ compare les souris diabétiques sous SD aux souris non-diabétiques sous SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$ compare les souris diabétiques sous HFHCD aux souris diabétiques sous HFHSD.

D'autres expérimentations seront nécessaires afin d'expliquer la fonction de la protéine RIPK1 dans les processus de fibrogenèse.

Nous avons également souhaité analyser la fonction de la protéine RIPK1 dans le développement du carcinome hépatocellulaire à l'aide du modèle murin NASH-HCC. Comme décrit précédemment, ce modèle se décompose en deux parties : premièrement, les souriceaux mâles reçoivent une injection de 200µg de streptozotocine à 2 jours de vie. Ensuite, après le sevrage et la validation du statut diabétique, ces souris sont nourries avec un régime hyperlipidique. Afin d'étudier la fonction de RIPK1 dans la progression de la maladie hépatique, nous avons à notre disposition une lignée murine transgénique dont l'expression de RIPK1 est délétée dans les cellules parenchymateuses hépatiques (RIPK1^{LPC-KO}) ainsi que leurs frères de portées dont l'expression de RIPK1 n'est pas modifiée (RIPK1^{fl/fl}). Cependant, lors des premières injections de streptozotocine et des premiers sevrages, nous nous sommes rapidement rendu compte que l'induction du diabète chez les souris de cette lignée n'était efficace que chez 30% des souris, indépendamment de leur génotype (Schéma 21). Après quelques recherches, il s'avère que ces souris ne sont pas issues d'une lignée C57Bl/6J exclusive mais qu'une erreur de croisement a causé l'introduction d'un fond génétique de lignée C57Bl/6N. Cette mixité de souche a été vérifiée par PCR sur gel d'agarose du gène *Nnt*, un gène reconnu pour être muté chez les souris de la souche C57Bl/6J et sauvage chez les souris de la souche C57Bl/6N. Cette mutation engendre une altération de la tolérance au glucose chez les souris C57Bl/6J, joue un rôle dans la régulation de la réponse à l'insuline dans les cellules bêta du pancréas et sensibilise les souris C57Bl/6J à l'induction du diabète via l'injection de streptozotocine (Fontaine and Davis, 2016). Chez les souris de la lignée RIPK1^{LPC-KO}, cette absence de mutation du gène *Nnt* diminue la sensibilité des cellules bêta de Langerhans à l'action de la streptozotocine rendant ainsi l'induction du diabète peu efficace.

Ces difficultés d'induction de diabète au sein de la lignée transgénique ont retardé l'étude du rôle de RIPK1 dans le développement du carcinome hépatocellulaire. Un rétrocroisement de cette lignée est en cours de réalisation afin de faire dériver la lignée transgénique sur un fond génétique de lignée C57Bl/6J exclusif. Une fois les rétrocroisements terminés, l'étude sera menée au sein du laboratoire.

Perspectives d'études du rôle de RIPK1 dans la progression de la maladie hépatique :

- Des expérimentations complémentaires seront nécessaires afin de définir la fonction de la protéine RIPK1 dans la NASH et plus particulièrement son rôle dans la fibrose hépatique ;
- L'étude de la fonction de RIPK1 dans le développement du carcinome hépatocellulaire sera également réalisée à l'aide du modèle murin NASH-HCC et de la lignée transgénique RIPK1^{LPC-KO} (une fois que la lignée sera dérivée sur un fond C57Bl/6J exclusif ;
- L'impact de la fonction kinase de RIPK1 sur la progression de la maladie hépatique et l'apparition du CHC sera également étudié à l'aide du modèle murin NASH-HCC et d'une lignée transgénique dont la fonction kinase de RIPK1 (Lignée RIPK1^{K45AKI}) n'est pas fonctionnelle.

II. Conclusion

Ces travaux de thèse portaient sur l'étude de la mort cellulaire dans le développement du carcinome hépatocellulaire (CHC). La mort des cellules hépatiques est un processus central dans la progression de la maladie. Plusieurs types de mort cellulaire peuvent être impliqués comme l'apoptose, la nécrose, mais également la nécroptose ou la pyroptose et peuvent être induits par l'activation de récepteurs de la superfamille du TNF. Ici, nous nous sommes intéressés à la nécroptose induite par l'un des ligands de cette superfamille, le ligand TRAIL. Une analyse protéomique par spectrométrie de masse des composants du nécrosome, complexe inducteur de la nécroptose, a mis en évidence la présence d'un nouveau partenaire de RIPK1, RIPK3 et MLKL au cours de la nécroptose induite par TRAIL : la E3-ubiquitine ligase TRIM21. Notre étude a démontré le rôle de modulateur positif de la nécroptose de cette protéine à l'aide de modèles cellulaires. Nous avons également découvert que l'absence de cette protéine au sein des cellules n'inhibait pas totalement la nécroptose induite par le ligand TRAIL mais en ralentissait sa réalisation. Une analyse de la fonction E3-ubiquitine ligase de TRIM21 est en cours afin de comprendre son rôle régulateur de la nécroptose.

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la progression de la NAFLD à la NASH jusqu'au développement du CHC. Pour cela, nous avons mis au point un modèle murin de NASH-CHC. Sur ce modèle, deux régimes hyperlipidiques ont été étudiés : le premier régime (HFHCD) induit une NASH sévère associée à une atteinte hépatique, une inflammation du tissu et une fibrose sévère. L'environnement pro-inflammatoire induit le recrutement d'un infiltrat immunitaire anti-tumoral qui permet de contrôler en partie l'apparition et l'expansion tumorale. Le second régime induit une NASH modérée avec une faible inflammation du tissu hépatique et peu de fibrose. Ce microenvironnement, en absence d'infiltrat immunitaire, permet le développement plus rapide et d'un plus grand nombre de tumeurs hépatique. L'enjeu, maintenant, est de comprendre cette absence de réponse immunitaire.

Nous avons également étudié l'impact de l'absence d'expression de la protéine RIPK1 dans le développement et la progression de la NASH chez des souris dont l'expression de cette protéine est délétée dans les cellules du parenchyme hépatique. Si l'absence de cette protéine ne limite pas le développement d'une NASH sévère, elle favoriserait la progression de la fibrose hépatique. D'autres études supplémentaires seront nécessaires afin de définir la fonction de RIPK1 dans le développement du carcinome hépatocellulaire dans le modèle murin de NASH-HCC.

III. Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente plus de 85% des cancers primitifs du foie. Il s'agit de la 4^{ème} cause de décès par cancer dans le monde avec plus de 750 000 décès par an. Son incidence est en perpétuelle progression et est principalement liée aux modifications des modes de vie et à l'augmentation de la population atteinte d'obésité, de diabète ainsi que de stéatohépatite non-alcoolique (NASH) qui représentent des facteurs de risques du développement du CHC. Il a été démontré que l'excès de mort cellulaire dans les hépatocytes pouvait accélérer les processus de carcinogenèse.

Une première partie de nos travaux portait sur l'étude d'une voie de signalisation liée à la mort cellulaire, la nécroptose induite par le ligand TRAIL. Nous avons mis en évidence la présence d'une nouvelle protéine impliquée dans la nécroptose, TRIM21, et démontré que cette protéine participait à l'induction de la nécroptose induite par le ligand TRAIL et que son absence entraînait un ralentissement de la signalisation.

Afin d'étudier la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC, un modèle murin de NASH-HCC a été développé. L'influence du régime hyperlipidique sur la progression de la maladie hépatique a été étudiée : pour cela des souris diabétiques ont été nourries avec deux régimes hyperlipidiques de composition différente en lipides, glucides et protéines. Nos résultats ont démontré que la présence d'une NASH sévère associée à la présence d'un infiltrat immunitaire limitait l'apparition et l'expansion tumorale. Au contraire, une NASH modérée sans infiltrat immunitaire aboutit au développement plus rapide et d'un plus grand nombre de tumeurs hépatiques. Enfin, le rôle de la protéine RIPK1, qui possède un double rôle dans la survie mais également dans l'induction de la mort cellulaire, a été étudié dans la progression de la NASH. A l'aide d'une lignée transgénique de souris dont l'expression de RIPK1 est délétée dans les cellules parenchymateuses hépatiques, nous avons mis en évidence que la protéine RIPK1 n'impactait pas le développement de la NASH mais limiterait la fibrogenèse.

Ce modèle murin de NASH-HCC pourrait permettre à l'avenir d'étudier les mécanismes physiopathologiques du développement de la NASH et son évolution vers le CHC afin de découvrir et de tester de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients mais également de comprendre l'absence de réponse immunitaire lorsque le régime est enrichi en lipides et glucides.

IV. Abstract

Representing more than 85% of the cases, hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of primary liver cancer and, with over 750,000 deaths per year, is the 4th leading cause of cancer-related death. In the past few years, an important increase in HCC incidence has been observed worldwide. This increase is mainly related to lifestyle changes and the rise of people suffering from obesity, diabetes and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which all are risk factors for HCC development. Altogether, these disorders induce excess of cell death in hepatocytes, promoting carcinogenesis.

The first part of our work focused on cell death related signalling pathway. Specifically, we concentrated on necroptosis induced by the TRAIL ligand. We highlighted the presence of a new protein involved in necroptosis, TRIM21 and showed that this protein promoted TRAIL-induced necroptosis. We also demonstrate that TRIM21 inhibition led to a decrease in necroptotic signal.

In order to study the progression of liver disease and the development of HCC, a murine model of NASH-HCC was developed by our team. In the second part of our work, we focused on the impact of the High-Fat diet (HFD) on the progression of liver disease. Diabetic mice were fed with two HFDs with different composition in lipids, carbohydrates and proteins. Our results showed that the presence of a severe form of NASH associated with immune cells infiltrate, limited HCC onset and expansion. In contrast, moderate NASH without immune infiltrate, led to a faster development and a greater number of liver tumors. Furthermore, we studied the role of RIPK1, a protein involved in survival and in cell death induction, during the progression of NASH. Using a transgenic mouse model whose RIPK1 expression is deleted in liver parenchymal cells (RIPK1^{LPC-KO}), we showed that RIPK1 deletion did not affect NASH development, but could take part in fibrogenesis.

This murine model of NASH-HCC could allow, in the future, to study the pathophysiological mechanisms of NASH progression and HCC development, in order to discover and test new therapeutic targets for patients with HCC. It could also be used to understand the lack of immune response when the High-Fat diet is supplemented with carbohydrates.

V. Références

- A -

- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* 90, 643–653.
<https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Adams, L.A., Ratzliff, V., 2015. Non-alcoholic fatty liver – Perhaps not so benign. *J. Hepatol.* 62, 1002–1004. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.005>
- Afonso, M.B., Rodrigues, P.M., Carvalho, T., Caridade, M., Borralho, P., Cortez-Pinto, H., Castro, R.E., Rodrigues, C.M.P., 2015. Necroptosis is a key pathogenic event in human and experimental murine models of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 129, 721–739.
<https://doi.org/10.1042/CS20140732>
- Aizarani, N., Saviano, A., Sagar, M., Maily, L., Durand, S., Herman, J.S., Pessaux, P., Baumert, T.F., Grün, D., 2019. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* 572, 199–204. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1373-2>
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alkhouri, N., Alisi, A., Okwu, V., Matloob, A., Ferrari, F., Crudele, A., De Vito, R., Lopez, R., Feldstein, A.E., Nobili, V., 2015. Circulating Soluble Fas and Fas Ligand Levels Are Elevated in Children with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 60, 2353–2359.
<https://doi.org/10.1007/s10620-015-3614-z>
- Almagro, M.C. de, Goncharov, T., Izrael-Tomasevic, A., Duttler, S., Kist, M., Varfolomeev, E., Wu, X., Lee, W.P., Murray, J., Webster, J.D., Yu, K., Kirkpatrick, D.S., Newton, K., Vucic, D., 2017. Coordinated ubiquitination and phosphorylation of RIP1 regulates necroptotic cell death. *Cell Death Differ.* 24, 26–37. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.78>
- An, J., Mehrhof, F., Harms, C., Lättig-Tünnemann, G., Lee, S.L.L., Endres, M., Li, M., Sellge, G., Mandić, A.D., Trautwein, C., Donath, S., 2013. ARC is a novel therapeutic approach against acetaminophen-induced hepatocellular necrosis. *J. Hepatol.* 58, 297–305.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.10.002>
- Annibaldi, A., Wicky John, S., Vanden Berghe, T., Swatek, K.N., Ruan, J., Liccardi, G., Bianchi, K., Elliott, P.R., Choi, S.M., Van Coillie, S., Bertin, J., Wu, H., Komander, D., Vandenabeele, P., Silke, J., Meier, P., 2018. Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2. *Mol. Cell* 69, 566-580.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.027>
- Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Baud, V., Chereau, F., Gougelet, A., Terris, B., Yamagoe, S., Colnot, S., Viguier, M., Perret, C., Couty, J.-P., 2012. Oncogenic β -catenin triggers an

inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 586–599. <https://doi.org/10.1172/JCI43937>

Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Filliol, A., L’Helgoualc’h, A., Lucas-Clerc, C., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel, M.-T., Samson, M., 2015. The chemical inhibitors of cellular death, PJ34 and Necrostatin-1, down-regulate IL-33 expression in liver. *J. Mol. Med.* 93, 867–878. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1270-6>

- B -

Belizário, J., Vieira-Cordeiro, L., Enns, S., 2015. Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice. *Mediators Inflamm.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/128076>

Bellail, A.C., Olson, J.J., Yang, X., Chen, Z.J., Hao, C., 2012. A20 Ubiquitin Ligase-Mediated Polyubiquitination of RIP1 Inhibits Caspase-8 Cleavage and TRAIL-Induced Apoptosis in Glioblastoma. *Cancer Discov.* 2, 140–155. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0172>

Benedict, M., Zhang, X., 2017. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J. Hepatol.* 9, 715–732. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i16.715>

Bengtsson, B., Stål, P., Wahlin, S., Björkström, N.K., Hagström, H., 2019. Characteristics and outcome of hepatocellular carcinoma in patients with NAFLD without cirrhosis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 39, 1098–1108. <https://doi.org/10.1111/liv.14087>

Bennett, M.W., O’Connell, J., O’Sullivan, G.C., Brady, C., Roche, D., Collins, J.K., Shanahan, F., 1998. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 5669–5675.

Binato, M., Kruegel Schmidt, M., Silveira Volkweis, B., Behrend Silva Ribeiro, G., Isabel Edelweiss, M., Ricachenevsky Gurski, R., 2008. Mouse Model of Diethylnitrosamine-Induced Gastric Cancer. *J. Surg. Res.* 148, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.12.748>

Brissot, P., Cavey, T., Ropert, M., Guggenbuhl, P., Loréal, O., 2017. Genetic hemochromatosis: Pathophysiology, diagnostic and therapeutic management. *Presse Médicale, Iron overload disorders (QMR)* 46, e288–e295. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.05.037>

Browning, J.D., Horton, J.D., 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114, 147–152. <https://doi.org/10.1172/JCI200422422>

Byun, J.-S., Yi, H.-S., 2017. Hepatic Immune Microenvironment in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease. *BioMed Res. Int.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6862439>

- C -

- Cai, J., Zhang, X.-J., Li, H., 2019. The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* 70, 1026–1037. <https://doi.org/10.1002/hep.30506>
- Cantley, L.C., 2013. Cancer, metabolism, fructose, artificial sweeteners, and going cold turkey on sugar. *BMC Biol.* 12, 8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-8>
- Capece, D., Fischietti, M., Verzella, D., Gaggiano, A., Ciccirelli, G., Tessitore, A., Zazzeroni, F., Alesse, E., 2013. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages. *BioMed Res. Int.* 2013, 187204. <https://doi.org/10.1155/2013/187204>
- Chayanupatkul, M., Liangpunsakul, S., 2014. Alcoholic hepatitis: A comprehensive review of pathogenesis and treatment. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 6279–6286. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i20.6279>
- Chen, X., Li, Wenjuan, Ren, J., Huang, D., He, W., Song, Y., Yang, C., Li, Wanyun, Zheng, X., Chen, P., Han, J., 2014. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res.* 24, 105–121. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.171>
- Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., Chan, F.K.-M., 2009. Phosphorylation-Driven Assembly of RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* 137, 1112–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037>
- Confer, D.B., Stenger, R.J., 1966. Nodules in the Livers of C3H Mice after Long-Term Carbon Tetrachloride Administration: A Light and Electron Microscopic Study. *Cancer Res.* 26, 834–843.
- Crispe, I.N., 2014. Immune Tolerance in Liver Disease. *Hepatology* 60, 2109–2117. <https://doi.org/10.1002/hep.27254>
- Cuchet-Lourenço, D., Eletto, D., Wu, C., Plagnol, V., Papapietro, O., Curtis, J., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., Hackett, S., Alsaleem, B., Maes, M., Gaspar, M., Alisaac, A., Goss, E., Alldrissi, E., Siegmund, D., Wajant, H., Kumararatne, D., AlZahrani, M.S., Arkwright, P.D., Abinun, M., Doffinger, R., Nejentsev, S., 2018. Biallelic RIPK1 mutations in humans cause severe immunodeficiency, arthritis, and intestinal inflammation. *Science* 361, 810–813. <https://doi.org/10.1126/science.aar2641>

- D -

- Daniels, R.A., Turley, H., Kimberley, F.C., Liu, X.S., Mongkolsapaya, J., Ch'en, P., Xu, X.N., Jin, B., Pezzella, F., Screaton, G.R., 2005. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Res.* 15, 430–438. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290311>

- Dara, L., 2018. The Receptor Interacting Protein Kinases in the Liver. *Semin. Liver Dis.* 38, 73–86. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1629924>
- Dara, L., Johnson, H., Suda, J., Win, S., Gaarde, W., Han, D., Kaplowitz, N., 2015. Receptor interacting protein kinase 1 mediates murine acetaminophen toxicity independent of the necrosome and not through necroptosis. *Hepatology* 62, 1847–1857. <https://doi.org/10.1002/hep.27939>
- Dara, L., Liu, Z.-X., Kaplowitz, N., 2016. Questions and controversies: the role of necroptosis in liver disease. *Cell Death Discov.* 2, 16089. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.89>
- Davis, G.L., Dempster, J., Meler, J.D., Orr, D.W., Walberg, M.W., Brown, B., Berger, B.D., O'Connor, J.K., Goldstein, R.M., 2008. Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* 21, 266–280.
- Day, C.P., James, O.F.W., 1998. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114, 842–845. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2)
- de Conti, A., Ortega, J.F., Tryndyak, V., Dreval, K., Moreno, F.S., Rusyn, I., Beland, F.A., Pogribny, I.P., 2017. MicroRNA deregulation in nonalcoholic steatohepatitis-associated liver carcinogenesis. *Oncotarget* 8, 88517–88528. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19774>
- de Jong, A.J., Kloppenburg, M., Toes, R.E.M., Ioan-Facsinay, A., 2014. Fatty Acids, Lipid Mediators, and T-Cell Function. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00483>
- Deeds, M., Anderson, J., Armstrong, A., Gastineau, D., Hiddinga, H., Jahangir, A., Eberhardt, N., Kudva, Y., 2011. Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. *Lab. Anim.* 45, 131–140. <https://doi.org/10.1258/la.2010.010090>
- Deutsch, M., Graffeo, C.S., Rokosh, R., Pansari, M., Ochi, A., Levie, E.M., Van Heerden, E., Tippens, D.M., Greco, S., Barilla, R., Tomkötter, L., Zambirinis, C.P., Avanzi, N., Gulati, R., Pachter, H.L., Torres-Hernandez, A., Eisenthal, A., Daley, D., Miller, G., 2015. Divergent effects of RIP1 or RIP3 blockade in murine models of acute liver injury. *Cell Death Dis.* 6, e1759. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.126>
- Dillon, C.P., Weinlich, R., Rodriguez, D.A., Cripps, J.G., Quarato, G., Gurung, P., Verbist, K.C., Brewer, T.L., Llambi, F., Gong, Y.-N., Janke, L.J., Kelliher, M.A., Kanneganti, T.-D., Green, D.R., 2014. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell* 157, 1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.018>
- Ding, Q., He, D., He, K., Zhang, Q., Tang, M., Dai, J., Lv, H., Wang, X., Xiang, G., Yu, H., 2015. Downregulation of TRIM21 contributes to hepatocellular carcinoma carcinogenesis and indicates poor prognosis of cancers. *Tumor Biol.* 36, 8761–8772. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3572-2>
- Doherty, D.G., O'Farrelly, C., 2001. Dendritic cells: regulators of hepatic immunity or tolerance? *J. Hepatol.* 34, 156–160. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)00020-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)00020-9)

- Dondelinger, Y., Darding, M., Bertrand, M.J.M., Walczak, H., 2016. Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2165–2176. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2191-4>
- Dragani, T.A., Manenti, G., Della Porta, G., 1986. Enhancing effects of carbon tetrachloride in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 31, 171–179. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(86\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0304-3835(86)90008-X)
- El-Serag, H.B., 2012. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology, Viral Hepatitis: A Changing Field* 142, 1264-1273.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061>

- E -

- Espinosa, A., Zhou, W., Ek, M., Hedlund, M., Brauner, S., Popovic, K., Horvath, L., Wallerskog, T., Oukka, M., Nyberg, F., Kuchroo, V.K., Wahren-Herlenius, M., 2006. The Sjogren's syndrome-associated autoantigen Ro52 is an E3 ligase that regulates proliferation and cell death. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 6277–6285. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.6277>
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., Mignotte, B., 2012. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 157–183. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_7

- F -

- Fabregat, I., 2009. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* WJG 15, 513–520. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.513>
- Feldstein, A.E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L.J., Lindor, K.D., Gores, G.J., 2003. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437–443. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00907-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00907-7)
- Feldstein, A.E., Wieckowska, A., Lopez, A.R., Liu, Y.-C., Zein, N.N., McCullough, A.J., 2009. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology* 50, 1072–1078. <https://doi.org/10.1002/hep.23050>
- Feoktistova, M., Leverkus, M., 2015. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.* 282, 19–31. <https://doi.org/10.1111/febs.13120>
- Filliol, A., Farooq, M., Piquet-Pellorce, C., Genet, V., Dimanche-Boitrel, M.-T., Vandenabeele, P., Bertrand, M.J.M., Samson, M., Seyec, J.L., 2017a. RIPK1 protects hepatocytes from death in Fas-induced hepatitis. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09789-8>
- Filliol, A., Piquet-Pellorce, C., Le Seyec, J., Farooq, M., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Bertin, J., Gough, P.J., Dimanche-Boitrel, M.-T., Vandenabeele, P., Bertrand, M.J., Samson, M., 2016. RIPK1

- protects from TNF- α -mediated liver damage during hepatitis. *Cell Death Dis.* 7, e2462. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.362>
- Filliol, A., Piquet-Pellorce, C., Raguénès-Nicol, C., Dion, S., Farooq, M., Lucas-Clerc, C., Vandenaabeele, P., Bertrand, M.J.M., Le Seyec, J., Samson, M., 2017b. RIPK1 protects hepatocytes from Kupffer cells-mediated TNF-induced apoptosis in mouse models of PAMP-induced hepatitis. *J. Hepatol.* 66, 1205–1213. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.005>
- Fischer, R., Baumert, T., Blum, H.E., 2007. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 4865–4872. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i36.4865>
- Fontaine, D.A., Davis, D.B., 2016. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes* 65, 25–33. <https://doi.org/10.2337/db15-0982>
- Friedman, S.L., 2008. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.* 88, 125–172. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
- Fu, Y., Liu, S., Zeng, S., Shen, H., 2019. From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 396. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1396-4>
- Fujii, M., Shibazaki, Y., Wakamatsu, K., Honda, Y., Kawauchi, Y., Suzuki, K., Arumugam, S., Watanabe, K., Ichida, T., Asakura, H., Yoneyama, H., 2013. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med. Mol. Morphol.* 46, 141–152. <https://doi.org/10.1007/s00795-013-0016-1>
- Furman, B.L., 2015. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70, 5.47.1-20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>

- G -

- Ganz, M., Szabo, G., 2013. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol. Int.* 7, 771–781. <https://doi.org/10.1007/s12072-013-9468-6>
- Gao, B., Wang, H., Lafdil, F., Feng, D., 2012. STAT proteins - key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. *J. Hepatol.* 57, 430–441. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.01.029>
- Gautheron, J., Vucur, M., Reisinger, F., Cardenas, D.V., Roderburg, C., Koppe, C., Kreggenwinkel, K., Schneider, A.T., Bartneck, M., Neumann, U.P., Canbay, A., Reeves, H.L., Luedde, M., Tacke, F., Trautwein, C., Heikenwalder, M., Luedde, T., 2014. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO Mol. Med.* 6, 1062–1074. <https://doi.org/10.15252/emmm.201403856>
- Gerven, N.M. van, Boer, Y.S. de, Mulder, C.J., Nieuwkerk, C.M. van, Bouma, G., 2016. Auto immune hepatitis. *World J. Gastroenterol.* 22, 4651–4661. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i19.4651>

- Gomez-Santos, L., Luka, Z., Wagner, C., Fernandez-Alvarez, S., Lu, S.C., Mato, J.M., Martinez-Chantar, M.L., Beraza, N., 2012. INHIBITION OF NK CELLS PROTECTS THE LIVER AGAINST ACUTE INJURY IN THE ABSENCE OF GNMT. *Hepatology*. Baltimore, Md 56, 747–759. <https://doi.org/10.1002/hep.25694>
- Gonzalvez, F., Lawrence, D., Yang, B., Yee, S., Pitti, R., Marsters, S., Pham, V.C., Stephan, J.-P., Lill, J., Ashkenazi, A., 2012. TRAF2 Sets a Threshold for Extrinsic Apoptosis by Tagging Caspase-8 with a Ubiquitin Shutoff Timer. *Molecular Cell* 48, 888–899. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.031>
- Gozuacik, D., Kimchi, A., 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891–2906. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207521>
- Green, D.R., Llambi, F., 2015. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Grunhut, J., Wang, W., Aykut, B., Gakhal, I., Torres-Hernandez, A., Miller, G., 2018. Macrophages in Nonalcoholic Steatohepatitis: Friend or Foe? *European Medical Journal of Hepatology* 6, 100–109.
- Günther, C., He, G.-W., Kremer, A.E., Murphy, J.M., Petrie, E.J., Amann, K., Vandenabeele, P., Linkermann, A., Poremba, C., Schleicher, U., Dewitz, C., Krautwald, S., Neurath, M.F., Becker, C., Wirtz, S., 2018. The pseudokinase MLKL mediates programmed hepatocellular necrosis independently of RIPK3 during hepatitis. *Journal of Clinical Investigation* 126, 4346–4360. <https://doi.org/10.1172/JCI87545>
- Günther, C., He, G.-W., Kremer, A.E., Murphy, J.M., Petrie, E.J., Amann, K., Vandenabeele, P., Linkermann, A., Poremba, C., Schleicher, U., Dewitz, C., Krautwald, S., Neurath, M.F., Becker, C., Wirtz, S., 2016. The pseudokinase MLKL mediates programmed hepatocellular necrosis independently of RIPK3 during hepatitis. *Journal of Clinical Investigation* 126, 4346–4360. <https://doi.org/10.1172/JCI87545>
- Gurley, S.B., Clare, S.E., Snow, K.P., Hu, A., Meyer, T.W., Coffman, T.M., 2006. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 290, F214–F222. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00204.2005>

- H -

- Hanigan, M.H., Kemp, C.J., Ginsler, J.J., Drinkwater, N.R., 1988. Rapid growth of preneoplastic lesions in hepatocarcinogen-sensitive C3H/HeJ male mice relative to C57BL/6J male mice. *Carcinogenesis* 9, 885–890. <https://doi.org/10.1093/carcin/9.6.885>
- Hato, T., Goyal, L., Greten, T.F., Duda, D.G., Zhu, A.X., 2014. Immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma: Current progress and future directions. *Hepatology*. Baltimore, Md 60, 1776–1782. <https://doi.org/10.1002/hep.27246>
- Hatting, M., Zhao, G., Schumacher, F., Sellge, G., Masaoudi, M.A., Gaßler, N., Boekschoten, M., Müller, M., Liedtke, C., Cubero, F.J., Trautwein, C., 2013. Hepatocyte caspase-8 is an essential

- modulator of steatohepatitis in rodents. *Hepatology* 57, 2189–2201. <https://doi.org/10.1002/hep.26271>
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., Wang, X., 2009. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell* 137, 1100–1111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>
- Heindryckx, F., Colle, I., Van Vlierberghe, H., 2009. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int. J. Exp. Pathol.* 90, 367–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00656.x>
- Henderson, J.M., Zhang, H.E., Polak, N., Gorrell, M.D., 2017. Hepatocellular carcinoma: Mouse models and the potential roles of proteases. *Cancer Lett., New developments on Targeted Cancer Therapy* 387, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.047>
- Heydemann, A., 2016. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2902351>
- Hirsova, P., Ibrabim, S.H., Gores, G.J., Malhi, H., 2016. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J. Lipid Res.* 57, 1758–1770. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066357>
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J., 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 489–495. <https://doi.org/10.1038/82732>
- Houben, T., Oligschlaeger, Y., Bitorina, A.V., Hendriks, T., Walenbergh, S.M.A., Lenders, M.-H., Gijbels, M.J.J., Verheyen, F., Lütjohann, D., Hofker, M.H., Binder, C.J., Shiri-Sverdlov, R., 2017. Blood-derived macrophages prone to accumulate lysosomal lipids trigger oxLDL-dependent murine hepatic inflammation. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13058-z>
- Houston, A., O’Connell, J., 2004. The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.03.008>
- Hubler, M.J., Kennedy, A.J., 2016. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. *J. Nutr. Biochem.* 34, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.11.002>
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Malhi, H., Gores, G.J., 2016. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig. Dis. Sci.* 61, 1325–1336. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>
- Ichai, P., Samuel, D., 2011. Epidemiology of liver failure. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 35, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2011.03.010>

- I -

Ion, G.N.D., Nitulescu, G.M., Popescu, C.I., 2019. Targeting TRAIL. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29, 2527–2534. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.07.053>

- J -

Jauharoh, S.N.A., Saegusa, J., Sugimoto, T., Ardianto, B., Kasagi, S., Sugiyama, D., Kurimoto, C., Tokuno, O., Nakamachi, Y., Kumagai, S., Kawano, S., 2012. SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 582–587. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.010>

Jefferies, M., Rauff, B., Rashid, H., Lam, T., Rafiq, S., 2018. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J. Clin. Cases* 6, 589–599. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v6.i13.589>

Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., Ashkenazi, A., 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137, 721–735. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.015>

Johnston, M.P., Khakoo, S.I., 2019. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: Current and future. *World J. Gastroenterol.* 25, 2977–2989. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i24.2977>

Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M.I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., Takahashi, N., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Vandenberghe, P., Samson, M., Dimanche-Boitreil, M.-T., 2012. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ.* 19, 2003–2014. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.90>

Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E., Renold, A.E., 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 126, 201–205. <https://doi.org/10.3181/00379727-126-32401>

- K -

Kamar, N., Dalton, H.R., Abravanel, F., Izopet, J., 2014. Hepatitis E Virus Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 116–138. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>

Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., Matsumoto, N., Yamagami, H., Ogawa, M., Imazu, H., Kuroda, K., Moriyama, M., 2018. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 24, 2661–2672. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2661>

Kang, Y.J., Bang, B.-R., Han, K.H., Hong, L., Shim, E.-J., Ma, J., Lerner, R.A., Otsuka, M., 2015. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumours and liver inflammation by

- mitochondrial PGAM5-Drp1 signalling. *Nat. Commun.* 6, 8371. <https://doi.org/10.1038/ncomms9371>
- Kawano, Y., Cohen, D.E., 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 48, 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Okumura, K., Yagita, H., 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 1906–1913.
- Kelland, L.R., 2004. “Of mice and men”: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur. J. Cancer* 40, 827–836. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.11.028>
- Khambu, B., Yan, S., Huda, N., Liu, G., Yin, X.-M., 2018. Homeostatic Role of Autophagy in Hepatocytes. *Semin. Liver Dis.* 38, 308–319. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1669939>
- Kim, Y.-S., Morgan, M.J., Choksi, S., Liu, Z., 2007. TNF-Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death. *Mol. Cell* 26, 675–687. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.021>
- Kishida, N., Matsuda, S., Itano, O., Shinoda, M., Kitago, M., Yagi, H., Abe, Y., Hibi, T., Masugi, Y., Aiura, K., Sakamoto, M., Kitagawa, Y., 2016. Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine. *BMC Gastroenterol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0477-5>
- Kmieć, Z., 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 161, III–XIII, 1–151.
- Knolle, P.A., Wohlleber, D., 2016. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell. Mol. Immunol.* 13, 347–353. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.5>
- Kondylis, V., Polykratis, A., Ehlken, H., Ochoa-Callejero, L., Straub, B.K., Krishna-Subramanian, S., Van, T.-M., Curth, H.-M., Heise, N., Weih, F., Klein, U., Schirmacher, P., Kelliher, M., Pasparakis, M., 2015. NEMO Prevents Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting RIPK1 Kinase Activity-Mediated Hepatocyte Apoptosis. *Cancer Cell* 28, 582–598. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.001>
- Koppe, C., Verheugd, P., Gautheron, J., Reisinger, F., Kreggenwinkel, K., Roderburg, C., Quagliata, L., Terracciano, L., Gassler, N., Tolba, R.H., Boege, Y., Weber, A., Karin, M., Luedde, M., Neumann, U.P., Weiskirchen, R., Tacke, F., Vucur, M., Trautwein, C., Lüscher, B., Preisinger, C., Heikenwalder, M., Luedde, T., 2016. IκB kinase α/β control biliary homeostasis and hepatocarcinogenesis in mice by phosphorylating the cell-death mediator receptor-interacting protein kinase 1. *Hepatology. Baltim. Md* 64, 1217–1231. <https://doi.org/10.1002/hep.28723>

- Kotsafti, A., Farinati, F., Cardin, R., Cillo, U., Nitti, D., Bortolami, M., 2012. Autophagy and apoptosis-related genes in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma, in: *BMC Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-118>
- Kucukoglu, O., Guldiken, N., Chen, Y., Usachov, V., El-Heliebi, A., Haybaeck, J., Denk, H., Trautwein, C., Strnad, P., 2014. High-fat diet triggers Mallory-Denk body formation through misfolding and crosslinking of excess keratin 8. *Hepatology* 60, 169–178. <https://doi.org/10.1002/hep.27068>
- Kulik, L., El-Serag, H.B., 2019. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology, Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma* 156, 477-491.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.065>
- Kumari, R., Sahu, M.K., Tripathy, A., Uthansingh, K., Behera, M., 2018. Hepatocellular carcinoma treatment: hurdles, advances and prospects. *Hepatic Oncol.* 5. <https://doi.org/10.2217/hep-2018-0002>
- Kutlu, O., Kaleli, H.N., Ozer, E., 2018. Molecular Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis-(NASH-) Related Hepatocellular Carcinoma. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8543763>

- L -

- Lafont, E., Hartwig, T., Walczak, H., 2018. Paving TRAIL's Path with Ubiquitin. *Trends Biochem. Sci.* 43, 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.002>
- Lafont, E., Kantari-Mimoun, C., Draber, P., De Miguel, D., Hartwig, T., Reichert, M., Kupka, S., Shimizu, Y., Taraborrelli, L., Spit, M., Sprick, M.R., Walczak, H., 2017. The linear ubiquitin chain assembly complex regulates TRAIL-induced gene activation and cell death. *EMBO J.* 36, 1147–1166. <https://doi.org/10.15252/embj.201695699>
- Laguna, J.C., Alegret, M., Roglans, N., 2014. Simple Sugar Intake and Hepatocellular Carcinoma: Epidemiological and Mechanistic Insight. *Nutrients* 6, 5933–5954. <https://doi.org/10.3390/nu6125933>
- Lau, A.H., Thomson, A.W., 2003. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 52, 307–314.
- Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C.S., Simpson, E.R., Korach, K.S., Tsai, M.-J., Mauvais-Jarvis, F., 2006. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9232–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602956103>
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- Leroux, A., Ferrere, G., Godie, V., Cailleux, F., Renoud, M.-L., Gaudin, F., Naveau, S., Prévot, S., Makhzami, S., Perlemuter, G., Cassard-Doulcier, A.-M., 2012. Toxic lipids stored by Kupffer

- cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J. Hepatol.* 57, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.028>
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>
- Li, J.-X., Feng, J.-M., Wang, Y., Li, X.-H., Chen, X.-X., Su, Y., Shen, Y.-Y., Chen, Y., Xiong, B., Yang, C.-H., Ding, J., Miao, Z.-H., 2014. The B-Raf(V600E) inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell Death Dis.* 5, e1278. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.241>
- Li, X., Liu, J., Lu, R., Xu, Q., Zhu, Z., Wang, L., Zhou, C., Jia, J., Fu, Z., Yao, Z., 2008. Evaluation of the therapeutic efficacy of tripeptide tyrosyleutide (YSL) for human hepatocarcinoma by in vivo hollow fiber assay. *Invest. New Drugs* 26, 525–529. <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9121-8>
- Liedtke, C., Bangen, J., Freimuth, J., Beraza, N., Lambertz, D., Cubero, F.J., Hatting, M., Karlmark, K.R., Streetz, K.L., Krombach, G.A., Tacke, F., Gassler, N., Riethmacher, D., Trautwein, C., 2011. Loss of Caspase-8 Protects Mice Against Inflammation-Related Hepatocarcinogenesis but Induces Non-Apoptotic Liver Injury. *Gastroenterology* 141, 2176–2187. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.08.037>
- Linder, K.A., Malani, P.N., 2017. Hepatitis A. *JAMA* 318, 2393–2393. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17244>
- Liu, L., Liao, J.-Z., He, X.-X., Li, P.-Y., 2017. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. *Oncotarget* 8, 57707–57722. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17202>
- Llovet, J.M., Montal, R., Villanueva, A., 2019. Randomized trials and endpoints in advanced HCC: Role of PFS as a surrogate of survival. *J. Hepatol.* 70, 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.028>
- Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P., Loria, P., 2015. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 47, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.09.020>
- Long, J., Wang, H., Lang, Z., Wang, T., Long, M., Wang, B., 2010. Expression level of glutamine synthetase is increased in hepatocellular carcinoma and liver tissue with cirrhosis and chronic hepatitis B. *Hepatol. Int.* 5, 698–706. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9230-2>
- Lotze, M.T., Tracey, K.J., 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 331–342. <https://doi.org/10.1038/nri1594>
- Luedde, T., Kaplowitz, N., Schwabe, R.F., 2014. Cell Death and Cell Death Responses in Liver Disease: Mechanisms and Clinical Relevance. *Gastroenterology* 147, 765–783.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.018>

- M -

- Ma, Y., Yang, M., He, Z., Wei, Q., Li, J., 2017. The Biological Function of Kupffer Cells in Liver Disease. *Biol. Myelomonocytic Cells*. <https://doi.org/10.5772/67673>
- Macek Jilkova, Z., Kurma, K., Decaens, T., 2019. Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: The Role of Immune System and Tumor Microenvironment. *Cancers* 11, 1487. <https://doi.org/10.3390/cancers11101487>
- Machado, M.V., Michelotti, G.A., Xie, G., de Almeida, T.P., Boursier, J., Bohnic, B., Guy, C.D., Diehl, A.M., 2015. Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127991>
- Maher, M.M., Ibrahim, W.A., Saleh, S.A., Shash, L., Abou Gabal, H., Tarif, M., Gamal, M., 2015. Cytokeratin 18 as a non invasive marker in diagnosis of NASH and its usefulness in correlation with disease severity in Egyptian patients. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 16, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2014.11.003>
- Malhi, H., Barreyro, F.J., Isomoto, H., Bronk, S.F., Gores, G.J., 2007. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 56, 1124–1131. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.118059>
- Maronpot, R.R., 2009. Biological Basis of Differential Susceptibility to Hepatocarcinogenesis among Mouse Strains. *J. Toxicol. Pathol.* 22, 11–33. <https://doi.org/10.1293/tox.22.11>
- Marrero, J.A., Kulik, L.M., Sirlin, C.B., Zhu, A.X., Finn, R.S., Abecassis, M.M., Roberts, L.R., Heimbach, J.K., 2018. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. Baltim. Md 68, 723–750. <https://doi.org/10.1002/hep.29913>
- McEwan, W., Tam, J.C., Watkinson, R., Bidgood, S., Mallery, D., James, L., 2013. Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via Fc-receptor TRIM21. *Nat. Immunol.* 14, 327–336. <https://doi.org/10.1038/ni.2548>
- Mégarbane, B., 2017. Intoxication par le paracétamol : quoi de neuf? 13.
- Mells, J.E., Fu, P.P., Sharma, S., Olson, D., Cheng, L., Handy, J.A., Saxena, N.K., Sorescu, D., Anania, F.A., 2012. Glp-1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G225-235. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00274.2011>
- Meroni, G., Diez-Roux, G., 2005. TRIM/RBCC, a novel class of ‘single protein RING finger’ E3 ubiquitin ligases. *BioEssays* 27, 1147–1157. <https://doi.org/10.1002/bies.20304>
- Meurette, O., Rebillard, A., Huc, L., Le Moigne, G., Merino, D., Micheau, O., Lagadic-Gossmann, D., Dimanche-Boitrel, M.-T., 2007. TRAIL induces receptor-interacting protein 1-dependent and

- caspase-dependent necrosis-like cell death under acidic extracellular conditions. *Cancer Res.* 67, 218–226. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1610>
- Michaeli, J., Shaul, M.E., Mishalian, I., Hovav, A.-H., Levy, L., Zolotriov, L., Granot, Z., Fridlender, Z.G., 2017. Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNF α and NO-dependent mechanism, promoting a tumor-supportive environment. *Oncoimmunology* 6, e1356965. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356965>
- Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Mohamed, J., Nazratun Nafizah, A.H., Zariyantey, A.H., Budin, S.B., 2016. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 16, e132-141. <https://doi.org/10.18295/squmj.2016.16.02.002>
- Moriwaki, K., Chan, F.K.-M., 2017. The inflammatory signal adaptor RIPK3: functions beyond necroptosis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 328, 253–275. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.08.007>

- N -

- Nakagawa, H., 2015. Recent advances in mouse models of obesity- and nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocarcinogenesis. *World J. Hepatol.* 7, 2110–2118. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i17.2110>
- Nati, M., Haddad, D., Birkenfeld, A.L., Koch, C.A., Chavakis, T., Chatzigeorgiou, A., 2016. The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 17, 29–39. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9339-2>
- Negro, F., 2014. Facts and fictions of HCV and comorbidities: Steatosis, diabetes mellitus, and cardiovascular diseases. *J. Hepatol.* 61, S69–S78. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.003>
- Nelson, J.E., Wilson, L., Brunt, E.M., Yeh, M.M., Kleiner, D.E., Unalp-Arida, A., Kowdley, K.V., 2011. RELATIONSHIP BETWEEN PATTERN OF HEPATIC IRON DEPOSITION AND HISTOLOGIC SEVERITY IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Hepatol. Baltim. Md* 53, 448–457. <https://doi.org/10.1002/hep.24038>
- Newton, K., Dugger, D.L., Wickliffe, K.E., Kapoor, N., de Almagro, M.C., Vucic, D., Komuves, L., Ferrando, R.E., French, D.M., Webster, J., Roose-Girma, M., Warming, S., Dixit, V.M., 2014. Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* 343, 1357–1360. <https://doi.org/10.1126/science.1249361>

- O -

- O' Reilly, E., Tirinci, A., Logue, S.E., Szegezdi, E., 2016. The Janus Face of Death Receptor Signaling during Tumor Immunoediting. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00446>

- Okada, K., Komuta, K., Hashimoto, S., Matsuzaki, S., Kanematsu, T., Koji, T., 2000. Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 3560–3564.
- Okuno, T., Kakehashi, A., Ishii, N., Fujioka, M., Gi, M., Wanibuchi, H., 2018. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. *Cancers* 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10120465>
- O’Leary, L., van der Sloot, A.M., Reis, C.R., Deegan, S., Ryan, A.E., Dhimi, S.P.S., Murillo, L.S., Cool, R.H., Correa de Sampaio, P., Thompson, K., Murphy, G., Quax, W.J., Serrano, L., Samali, A., Szegezdi, E., 2016. Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: the role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene* 35, 1261–1270. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.180>

- P -

- Pan, J.-A., Sun, Y., Jiang, Y.-P., Bott, A.J., Jaber, N., Dou, Z., Yang, B., Chen, J.-S., Catanzaro, J.M., Du, C., Ding, W.-X., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Ozato, K., Lin, R.Z., Zong, W.-X., 2016. TRIM21 ubiquitylates SQSTM1/p62 and suppresses protein sequestration to regulate redox homeostasis. *Mol. Cell* 61, 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.007>
- Perugorria, M.J., Olaizola, P., Labiano, I., Esparza-Baquer, A., Marzioni, M., Marin, J.J.G., Bujanda, L., Banales, J.M., 2019. Wnt– β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 121. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0075-9>
- Pham, B.N., Bemua, J., Durand, F., Sauvanet, A., Degott, C., Prin, L., Janin, A., 2001. Eotaxin expression and eosinophil infiltrate in the liver of patients with drug-induced liver disease. *J. Hepatol.* 34, 537–547. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)00057-x](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)00057-x)
- Pitot, H.C., Dragan, Y.P., 1991. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 2280–2286.
- Polykratis, A., Hermance, N., Zelic, M., Roderick, J., Kim, C., Van, T.-M., Lee, T.H., Chan, F.K.M., Pasparakis, M., Kelliher, M.A., 2014. Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1539–1543. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400590>
- Portolani, N., Coniglio, A., Ghidoni, S., Giovanelli, M., Benetti, A., Tiberio, G.A.M., Giulini, S.M., 2006. Early and Late Recurrence After Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma. *Ann. Surg.* 243, 229–235. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000197706.21803.a1>

- R -

- Ramachandran, A., McGill, M.R., Xie, Y., Ni, H.-M., Ding, W.-X., Jaeschke, H., 2013. The Receptor Interacting Protein Kinase 3 is a Critical Early Mediator of Acetaminophen-induced Hepatocyte Necrosis in Mice. *Hepatology*. Baltimore, Md 58. <https://doi.org/10.1002/hep.26547>
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G., Ballabio, A., 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20, 2140–2151. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2140>
- Rhee, E.-J., 2019. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Diabetes: An Epidemiological Perspective. *Endocrinol. Metab.* 34, 226–233. <https://doi.org/10.3803/EnM.2019.34.3.226>
- RIPK1 protects hepatocytes from death in Fas-induced hepatitis [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC5569041/> (accessed 10.8.19).
- Rizzetto, M., 2015. Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a021576. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021576>
- Roth, E., Pircher, H., 2004. IFN- γ Promotes Fas Ligand- and Perforin-Mediated Liver Cell Destruction by Cytotoxic CD8 T Cells. *J. Immunol.* 172, 1588–1594. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1588>
- Roychowdhury, S., McCullough, R.L., Sanz-Garcia, C., Saikia, P., Alkhoury, N., Matloob, A., Pollard, K., McMullen, M.R., Croniger, C.M., Nagy, L.E., 2016. Receptor Interacting Protein 3 Protects Mice from High Fat Diet-Induced Liver Injury. *Hepatology*. Baltimore, Md 64, 1518–1533. <https://doi.org/10.1002/hep.28676>
- Roychowdhury, S., McMullen, M.R., Pisano, S.G., Liu, X., Nagy, L.E., 2013. Absence of receptor interacting protein kinase 3 prevents ethanol-induced liver injury. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 1773–1783. <https://doi.org/10.1002/hep.26200>

- S -

- Sachdeva, M., Chawla, Y.K., Arora, S.K., 2015. Immunology of hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatology*. 7, 2080–2090. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i17.2080>
- Saito, T., Muramatsu, M., Ishii, Y., Saigo, Y., Konuma, T., Toriniwa, Y., Miyajima, K., Ohta, T., 2017. Pathophysiological analysis of the progression of hepatic lesions in STAM mice. *Physiol. Res.* 66, 791–799.
- Santos, N.P., Colaço, A.A., Oliveira, P.A., 2017. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. *Tumor Biol.* 39, 101042831769592. <https://doi.org/10.1177/1010428317695923>

- Sato, A., Nakashima, H., Nakashima, M., Ikarashi, M., Nishiyama, K., Kinoshita, M., Seki, S., 2014. Involvement of the TNF and FasL Produced by CD11b Kupffer Cells/Macrophages in CCl4-Induced Acute Hepatic Injury. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092515>
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., Ogasawara, K., 2001. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* 31, 3138–3146. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200111\)31:11<3138::AID-IMMU3138gt;3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200111)31:11<3138::AID-IMMU3138gt;3.0.CO;2-B)
- Sattar, N., Forrest, E., Preiss, D., 2014. Non-alcoholic fatty liver disease. *The BMJ* 349. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4596>
- Schneider, A.T., Gautheron, J., Feoktistova, M., Roderburg, C., Loosen, S.H., Roy, S., Benz, F., Schemmer, P., Büchler, M.W., Nachbur, U., Neumann, U.P., Tolba, R., Luedde, M., Zucman-Rossi, J., Panayotova-Dimitrova, D., Leverkus, M., Preisinger, C., Tacke, F., Trautwein, C., Longerich, T., Vucur, M., Luedde, T., 2017. RIPK1 Suppresses a TRAF2-Dependent Pathway to Liver Cancer. *Cancer Cell* 31, 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.009>
- Schwabe, R.F., Luedde, T., 2018. APOPTOSIS AND NECROPTOSIS IN THE LIVER: A MATTER OF LIFE AND DEATH. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 738–752. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0065-y>
- Sedger, L.M., McDermott, M.F., 2014. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.*, Special Issue: Cytokines and cytokine receptors as Immunotherapeutics 25, 453–472. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- Seehawer, M., Heinzmann, F., D’Artista, L., Harbig, J., Roux, P.-F., Hoenicke, L., Dang, H., Klotz, S., Robinson, L., Doré, G., Rozenblum, N., Kang, T.-W., Chawla, R., Buch, T., Vucur, M., Roth, M., Zuber, J., Luedde, T., Sipos, B., Longerich, T., Heikenwälder, M., Wang, X.W., Bischof, O., Zender, L., 2018. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer. *Nature* 562, 69–75. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0519-y>
- Shalpour, S., Lin, X.-J., Bastian, I.N., Brain, J., Burt, A.D., Aksenov, A.A., Vrbanac, A.F., Li, W., Perkins, A., Matsutani, T., Zhong, Z., Dhar, D., Navas-Molina, J.A., Xu, J., Loomba, R., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., Dorrestein, P.C., Knight, R., Benner, C., Anstee, Q.M., Karin, M., 2017. Inflammation-induced IgA⁺ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature* 551, 340–345. <https://doi.org/10.1038/nature24302>
- Shan, C.-M., Li, J., 2002. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J. Gastroenterol.* 8, 247–252. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i2.247>
- Shen, X., Zhang, L., Li, J., Li, Y., Wang, Y., Xu, Z.-X., 2019. Recent Findings in the Regulation of Programmed Death Ligand 1 Expression. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01337>

- Sheweita, S.A., Abd El-Gabar, M., Bastawy, M., 2001. Carbon tetrachloride changes the activity of cytochrome P450 system in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology* 169, 83–92. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00473-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00473-5)
- Shi, F., Shi, M., Zeng, Z., Qi, R.-Z., Liu, Z.-W., Zhang, J.-Y., Yang, Y.-P., Tien, P., Wang, F.-S., 2011. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 128, 887–896. <https://doi.org/10.1002/ijc.25397>
- Silke, J., Rickard, J.A., Gerlic, M., 2015. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat. Immunol.* 16, 689–697. <https://doi.org/10.1038/ni.3206>
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Slauenwhite, D., Johnston, B., 2015. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. *Front. Immunol.* 6, 255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00255>
- Subleski, J.J., Hall, V.L., Back, T.C., Ortaldo, J.R., Wiltout, R.H., 2006. Enhanced antitumor response by divergent modulation of natural killer and natural killer T cells in the liver. *Cancer Res.* 66, 11005–11012. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0811>
- Suda, J., Dara, L., Yang, L., Aghajan, M., Song, Y., Kaplowitz, N., Liu, Z.-X., 2016. Knockdown of RIPK1 Markedly Exacerbates Murine Immune-Mediated Liver Injury through Massive Apoptosis of Hepatocytes, Independent of Necroptosis and Inhibition of NF- κ B. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 197, 3120–3129. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600690>
- Sumida, Y., Niki, E., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2013. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic. Res.* 47, 869–880. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.837577>
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., Wang, X., 2012. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148, 213–227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
- Swain, M.G., 2008. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 114, 457–466. <https://doi.org/10.1042/CS20070328>
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.

- T -

- Tacke, F., Zimmermann, H.W., 2014. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J. Hepatol.* 60, 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.025>
- Takahashi, M., Ikemoto, S., Ezaki, O., 1999. Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 45, 583–593.

- Tessitore, A., Mastroiaco, V., Vetusch, A., Sferra, R., Pompili, S., Ciciarelli, G., Barnabei, R., Capece, D., Zazzeroni, F., Capalbo, C., Alesse, E., 2017. Development of hepatocellular cancer induced by long term low fat-high carbohydrate diet in a NAFLD/NASH mouse model. *Oncotarget* 8, 53482–53494. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18585>
- Ting, A.T., Bertrand, M.J.M., 2016. More to Life than NF- κ B in TNFR1 Signaling. *Trends Immunol.* 37, 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.002>
- TOMIZAWA, M., KAWANABE, Y., SHINOZAKI, F., SATO, S., MOTOYOSHI, Y., SUGIYAMA, T., YAMAMOTO, S., SUEISHI, M., 2014. Triglyceride is strongly associated with nonalcoholic fatty liver disease among markers of hyperlipidemia and diabetes. *Biomed. Rep.* 2, 633–636. <https://doi.org/10.3892/br.2014.309>
- Toshimitsu, K., Matsuura, B., Ohkubo, I., Niiya, T., Furukawa, S., Hiasa, Y., Kawamura, M., Ebihara, K., Onji, M., 2007. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 23, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.004>
- Trends in incidence of primary liver cancer subtypes [WWW Document], n.d. URL http://www.ncin.org.uk/publications/data_briefings/trends_in_incidence_of_primary_liver_cancer_subtypes (accessed 7.26.19).
- Trépo, C., Chan, H.L.Y., Lok, A., 2014. Hepatitis B virus infection. *The Lancet* 384, 2053–2063. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60220-8)

- U -

- Umemura, A., He, F., Taniguchi, K., Nakagawa, H., Yamachika, S., Font-Burgada, J., Zhong, Z., Subramaniam, S., Raghunandan, S., Duran, A., Linares, J.F., Reina-Campos, M., Umemura, S., Valasek, M.A., Seki, E., Yamaguchi, K., Koike, K., Itoh, Y., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Karin, M., 2016. p62, upregulated during preneoplasia, induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells. *Cancer Cell* 29, 935–948. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.006>

- V -

- Van, T.-M., Polykratis, A., Straub, B.K., Kondylis, V., Papadopoulou, N., Pasparakis, M., 2017. Kinase-independent functions of RIPK1 regulate hepatocyte survival and liver carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 127, 2662–2677. <https://doi.org/10.1172/JCI92508>
- Vasseur, P., Dion, S., Filliol, A., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Jean-Philippe, G., Silvain, C., Lecron, J.-C., Piquet-Pellorce, C., Samson, M., 2017. Endogenous IL-33 has no effect on the progression of fibrosis during experimental steatohepatitis. *Oncotarget* 8, 48563–48574. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18335>

Vergnes, L., Phan, J., Strauss, M., Tafuri, S., Reue, K., 2003. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 42774–42784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306022200>

von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., Montinaro, A., Hartwig, T., Lemke, J., Legler, K., Annewanter, F., Campbell, A.D., Taraborrelli, L., Grosse-Wilde, A., Coy, J.F., El-Bahrawy, M.A., Bergmann, F., Koschny, R., Werner, J., Ganten, T.M., Schweiger, T., Hoetzenecker, K., Kenessey, I., Hegedüs, B., Bergmann, M., Hauser, C., Egberts, J.-H., Becker, T., Röcken, C., Kalthoff, H., Trauzold, A., Anderson, K.I., Sansom, O.J., Walczak, H., 2015. Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-driven cancer progression, invasion, and metastasis. *Cancer Cell* 27, 561–573. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.014>

- W -

Wang, K., 2015. Autophagy and apoptosis in liver injury. *Cell Cycle* 14, 1631–1642. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1038685>

Wang, L., Ou, J.-H.J., 2018. Regulation of Autophagy by Hepatitis C Virus for Its Replication. *DNA Cell Biol.* 37, 287–290. <https://doi.org/10.1089/dna.2017.4115>

Wang, Z.Y., Agarwal, R., Khan, W.A., Mukhtar, H., 1992. Protection against benzo[α]pyrene- and N-nitrosodiethylamine-induced lung and forestomach tumorigenesis in A/J mice by water extracts of green tea and licorice. *Carcinogenesis* 13, 1491–1494. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.8.1491>

Weinlich, R., Oberst, A., Dillon, C.P., Janke, L.J., Milasta, S., Lukens, J.R., Rodriguez, D.A., Gurung, P., Savage, C., Kanneganti, T.D., Green, D.R., 2013. Protective roles for caspase-8 and cFLIP in adult homeostasis. *Cell Rep.* 5, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.045>

Welsh, K., Milutinovic, S., Ardecky, R.J., Gonzalez-Lopez, M., Ganji, S.R., Teriete, P., Finlay, D., Riedl, S., Matsuzawa, S., Pinilla, C., Houghten, R., Vuori, K., Reed, J.C., Cosford, N.D.P., 2016. Characterization of Potent SMAC Mimetics that Sensitize Cancer Cells to TNF Family-Induced Apoptosis. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161952>

Wen, C.-P., Lin, J., Yang, Y.C., Tsai, M.K., Tsao, C.K., Etzel, C., Huang, M., Hsu, C.Y., Ye, Y., Mishra, L., Hawk, E., Wu, X., 2012. Hepatocellular carcinoma risk prediction model for the general population: the predictive power of transaminases. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1599–1611. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs372>

Westbrook, R.H., Dusheiko, G., 2014. Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.* 61, S58–S68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012>

Wong, C.R., Nguyen, M.H., Lim, J.K., 2016. Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 22, 8294–8303. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i37.8294>

Wu, G.S., Burns, T.F., Zhan, Y., Alnemri, E.S., El-Deiry, W.S., 1999. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res.* 59, 2770–2775.

- Y -

Yan, T., Wang, H., Zhao, M., Yagai, T., Chai, Y., Krausz, K.W., Xie, C., Cheng, X., Zhang, J., Che, Y., Li, F., Wu, Y., Brocker, C.N., Gonzalez, F.J., Wang, G., Hao, H., 2016. Glycyrrhizin Protects against Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury via Alleviating Tumor Necrosis Factor α -Mediated Apoptosis. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 44, 720–731. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.069419>

- Z -

Zhang, D., Lin, J., Han, J., 2010. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 243–249. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.10>

Zhang, Y.-F., He, W., Zhang, C., Liu, X.-J., Lu, Y., Wang, H., Zhang, Z.-H., Chen, X., Xu, D.-X., 2014. Role of receptor interacting protein (RIP)1 on apoptosis-inducing factor-mediated necroptosis during acetaminophen-evoked acute liver failure in mice. *Toxicol. Lett.* 225, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.005>

Zheng, H.-C., Sun, J.-M., Wei, Z.-L., Yang, X.-F., Zhang, Y.-C., Xin, Y., 2003. Expression of Fas ligand and Caspase-3 contributes to formation of immune escape in gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 9, 1415–1420. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i7.1415>

Zhou, T., Hu, Z., Yang, S., Sun, L., Yu, Z., Wang, G., 2018. Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7457269>

Zhou, W., Yuan, J., 2014. Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 35, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.013>

Zoller, H., Tilg, H., 2016. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *Metabolism, Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Epidemiology to Emerging Treatment(s)* 65, 1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.01.010>

Titre : Mise en place et étude de modèles de progression de la NASH jusqu'au développement du CHC : effet du régime hyperlipidique sur l'environnement hépatique

Mots clés : NASH, CHC, RIPK1, mort cellulaire

Résumé : Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente plus de 85% des cancers primitifs du foie. Il s'agit de la 4ème cause de décès par cancer dans le monde avec plus de 750 000 décès par an. Son incidence est en perpétuelle progression et est principalement liée aux modifications des modes de vie et à l'augmentation de la population atteinte d'obésité, de diabète ainsi que de stéatohépatite non-alcoolique (NASH) qui représentent des facteurs de risques du développement du CHC. Il a été démontré que l'excès de mort cellulaire dans les hépatocytes pouvait accélérer les processus de carcinogénèse.

Une première partie de nos travaux portait sur l'étude d'une voie de signalisation liée à la mort cellulaire, la nécroptose induite par le ligand TRAIL. Nous avons mis en évidence la présence d'une nouvelle protéine impliquée dans la nécroptose, TRIM21, et démontré que cette protéine participait à l'induction de la nécroptose induite par le ligand TRAIL et que son absence entraînait un ralentissement de la signalisation.

Afin d'étudier la progression de la maladie hépatique et le développement du CHC, un modèle murin de NASH-HCC a été développé. L'influence du régime hyperlipidique sur la progression de la maladie hépatique a été étudiée : pour cela des souris diabétiques ont été nourries avec deux régimes hyperlipidiques de composition différente en lipides, glucides et protéines.

Nos résultats ont démontré que la présence d'une NASH sévère associée à la présence d'un infiltrat immunitaire limitait l'apparition et l'expansion tumorale. Au contraire, une NASH modérée sans infiltrat immunitaire aboutit au développement plus rapide et d'un plus grand nombre de tumeurs hépatiques. Enfin, le rôle de la protéine RIPK1, qui possède un double rôle dans la survie mais également dans l'induction de la mort cellulaire, a été étudié dans la progression de la NASH. A l'aide d'une lignée transgénique de souris dont l'expression de RIPK1 est délétée dans les cellules parenchymateuses hépatiques, nous avons mis en évidence que la protéine RIPK1 n'impactait pas le développement de la NASH mais participerait à limiter la fibrogenèse.

Ce modèle murin de NASH-HCC pourrait permettre à l'avenir d'étudier les mécanismes physiopathologiques du développement de la NASH et son évolution vers le CHC afin de découvrir et de tester de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients mais également de comprendre l'absence de réponse immunitaire lorsque le régime est enrichi en lipides et glucides.

Title : Study of models of progression from NASH to HCC development: effect of HFD on hepatic environment

Keywords : NASH, CHC, RIPK1, cell death

Abstract : Representing more than 85% of the cases, hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of primary liver cancer and, with over 750,000 deaths per year, is the 4th leading cause of cancer-related death. In the past few years, an important increase in HCC incidence has been observed worldwide. This increase is mainly related to lifestyle changes and the rise of people suffering from obesity, diabetes and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which all are risk factors for HCC development. Altogether, these disorders induce excess of cell death in hepatocytes, promoting carcinogenesis.

The first part of our work focused on cell death related signalling pathway. Specifically, we concentrated on necroptosis induced by the TRAIL ligand. We highlighted the presence of a new protein involved in necroptosis, TRIM21 and showed that this protein promoted TRAIL-induced necroptosis. We also demonstrate that TRIM21 inhibition led to a decrease in necroptotic signal.

In order to study the progression of liver disease and the development of HCC, a murine model of NASH-HCC was developed by our team.

In the second part of our work, we focused on the impact of the High-Fat diet (HFD) on the progression of liver disease. Diabetic mice were fed with two HFDs with different composition in lipids, carbohydrates and proteins. Our results showed that the presence of a severe form of NASH associated with immune cells infiltrate, limited HCC onset and expansion. In contrast, moderate NASH without immune infiltrate, led to a faster development and a greater number of liver tumors. Furthermore, we studied the role of RIPK1, a protein involved in survival and in cell death induction, during the progression of NASH. Using a transgenic mouse model whose RIPK1 expression is deleted in liver parenchymal cells (RIPK1LPC-KO), we showed that RIPK1 deletion did not affect NASH development, but could take part in fibrogenesis.

This murine model of NASH-HCC could allow, in the future, to study the pathophysiological mechanisms of NASH progression and HCC development, in order to discover and test new therapeutic targets for patients with HCC. It could also be used to understand the lack of immune response when the High-Fat diet is supplemented with carbohydrates.