



HAL
open science

Rôle de l'E3-ubiquitine ligase TRIM21 dans la nécroptose induite par TRAIL et dans la progression du carcinome hépatocellulaire

Ghania Hounana Kara-Ali

► **To cite this version:**

Ghania Hounana Kara-Ali. Rôle de l'E3-ubiquitine ligase TRIM21 dans la nécroptose induite par TRAIL et dans la progression du carcinome hépatocellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B043 . tel-04224024

HAL Id: tel-04224024

<https://theses.hal.science/tel-04224024>

Submitted on 1 Oct 2023

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

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par

Ghania Hounana KARA-ALI

Rôle de l'E3-ubiquitine ligase TRIM21 dans la nécroptose induite par TRAIL et dans la progression du carcinome hépatocellulaire

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 30 septembre 2022

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

Rapporteurs avant soutenance :

Maya Saleh PU, Université de Bordeaux
Jérémie Gautheron CR, Sorbonne Université

Composition du Jury :

Président : Anne Corlu
Examineurs : Béatrice Bailly-Maître

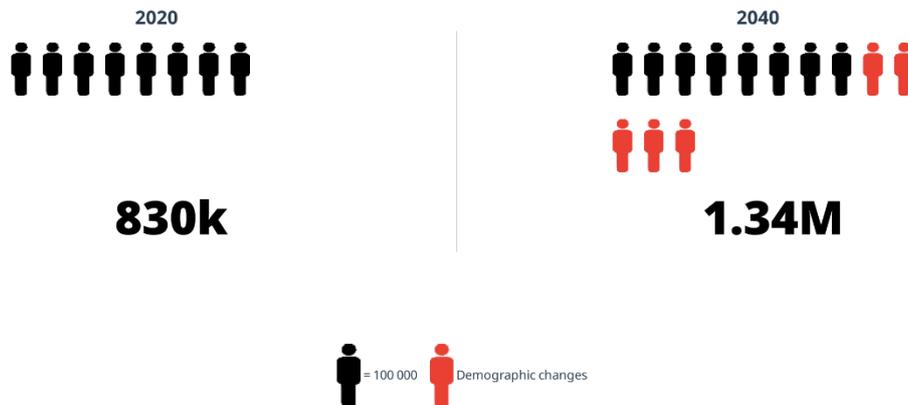
DR, Université de Rennes 1
CR, Université Nice Sophia-Antipolis

Dir. de thèse : Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel
Co-dir. de thèse : Jacques Le Seyec

DR, Université de Rennes 1
CR, Université de Rennes 1

AVANT-PROPOS

Le carcinome hépatocellulaire représente encore un défi majeur de santé publique, touchant à la fois les pays en développement et les pays développés, mais avec des épidémiologies différentes.



Jusqu'à récemment, les hépatites virales étaient les principaux facteurs de risque d'évolution vers un cancer du foie, mais les nouvelles thérapies antivirales et l'évolution naturelle de l'épidémie, notamment par la prévention de l'infection, font diminuer l'implication de cette cause. Aujourd'hui, avec les épidémies émergentes d'obésité et de diabète, les pathologies du foie gras deviennent les facteurs majeurs menant au cancer du foie, en particulier dans les pays occidentaux. Comprendre la pathologie pour mieux la traiter, telle est la motivation des recherches en cancérologie.

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une E3 ubiquitine ligase nommée TRIM21, décrite comme jouant un rôle dans différents processus biologiques tels que la prolifération, l'immunité, l'inflammation ou encore la mort cellulaire. Ces différents processus sont souvent dérégulés dans les cancers, c'est donc sans surprise que TRIM21 suscite un vif intérêt auprès de la communauté scientifique. En effet, une faible expression de TRIM21 est synonyme de mauvais pronostic dans différents cancers, notamment le carcinome hépatocellulaire. Au travers de ce manuscrit, vous comprendrez le rôle complexe que peut avoir cette protéine selon le contexte pathologique. Le rôle de TRIM21 est peu connu dans un contexte différent de l'immunité innée, pourtant certaines données soulignent la fonction majeure que peut avoir TRIM21 dans la mort cellulaire ou l'immunité adaptative.

Nous avons par conséquent étudié le rôle de l'E3 ubiquitine ligase TRIM21 dans deux contextes spécifiques non explorés encore : 1- La nécroptose induite par TRAIL et 2- la progression du carcinome hépatocellulaire dans le contexte de la stéatohépatite non alcoolique.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mes deux rapporteurs Dr Maya Saleh et Dr Jérémie Gautheron d'avoir accepté d'évaluer ce travail. J'espère que ce manuscrit vous apportera un intérêt scientifique notable et amènera à des échanges tout aussi intéressants.

Je remercie également Dr Béatrice Bailly-Maître d'examiner ce travail, ainsi que Dr Anne Corlu de présider ce jury. J'espère pouvoir partager avec vous une discussion intéressante également.

Je voudrais remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation ainsi que la Fondation de la recherche contre le cancer ARC d'avoir financé cette thèse.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse : Dr Sandrine Ruchaud, Dr Gwenaël Rabut et Dr Orlando Musso. Nos échanges lors de ces 4 dernières années m'ont permis de faire avancer ce projet.

Au cours de ces 3 années, qui sont très rapidement devenues 4 à cause de la Covid19, j'ai croisé beaucoup de personnes. Certaines sont arrivées en cours de route, d'autres ont été là du début à la fin, je souhaite donc dédier ces quelques lignes à ces personnes qui m'ont accompagnée lors de cette thèse.

Tout d'abord, je remercie Michel Samson de m'avoir accueillie au sein de l'Irset, mais également au sein de ton équipe ! Nos échanges ont toujours été très appréciés pour ma part. Plus de questions que de réponses, mais ça m'a toujours poussée à aller chercher la réponse à la question. Au-delà de mes travaux, tu as toujours été de bon conseil notamment pour mon projet professionnel. Je te remercie donc de ta disponibilité, ta curiosité scientifique et ta bienveillance.

Je ne peux pas remercier Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel sans remercier Jacques Le Seyec ! Vous vous complétez très bien, et travailler avec vous a été un réel plaisir. Je vous remercie de m'avoir laissée prendre ce projet en main. Merci, Marie-Thérèse, de m'avoir laissée tester mes différentes hypothèses (certaines positives d'autres négatives) et merci, Jacques, de m'obliger à être aussi rigoureuse que possible. Ce qui est devenu un avantage aujourd'hui. En tout cas merci de m'avoir fait confiance pendant 4 ans, de m'avoir laissée développer des idées et de mener ce projet au plus loin. Mais merci également d'avoir fait des manip avec moi. J'ai souvent passé un bon moment pendant les euthanasies de souris à la chaîne ! Jacques, tu t'ennuieras sans moi !

Je me dois également de remercier l'équipe 2. On commence par la team de choc, maintenant composée de Mélanie Simoes Eugénio, Ghiles Imerzoukène et moi-même... Mélanie, au final tu auras fait toute la thèse avec moi ! Et heureusement ! J'ai pu profiter de ton savoir au max ! Je te remercie de m'avoir formée à mes débuts, et d'avoir continué à répondre à mes questions incessantes, mais également de m'avoir encouragée ! Je ne peux que te souhaiter une bonne continuation ! Ghiles, le petit

dernier qui rentre tout juste dans le monde rude de la thèse ! Je te remercie pour ta gentillesse et ta volonté d'aider ! Le seul conseil que je peux te donner est de ne jamais se laisser abattre par sa thèse. Il faut juste changer d'angle de vue pour trouver une réponse à ton problème ! Je suis sûre, sans aucun doute, que tout ira bien pour toi. Surtout avec l'équipe de choc MTDB et JLS !

Il fut un temps, on était un peu plus nombreux dans cette équipe de choc, Annaig Hamon et Christelle Devisme... Je passe l'éponge sur le fait que vous soyez parties avant la fin de ma thèse. Je ne peux pas ne pas vous remercier. Christelle, tu m'as beaucoup aidée, notamment dans différentes techniques où tu m'as formée. Mais tu m'as également souvent aidée dans mes manips ! Nos moments de discussion et de ragot au bureau étaient les meilleurs... tu savais tout sur tout 😊. Je te souhaite une très bonne continuation et une réussite pour ton futur. Tu as toutes les cartes en main et tu en es capable ! J'espère que l'on se recroisera ! Ah, ma petite Annaig... je me suis sentie bien seule sans mon binôme de bureau pour bavarder... J'ai néanmoins pu avancer plus vite dans mon travail sans toi... Je te remercie pour ta disponibilité et ton aide sans faille. Merci pour les plus de 100 souris eutha grâce à toi ! Nos discussions scientifiques (pas que des ragots au final), m'ont souvent aidée. Autres abandons avant la fin de ma thèse, Steven Lohard et Céline Vuillier. Vos conseils pour mon projet pro et nos rigolades ont été grandement appréciés en cette fin de thèse ! J'espère que votre nouveau départ sera à votre goût et je vous souhaite une très bonne continuation !!

Je me dois également de remercier Sarah Dion ! Je te dois toutes mes manips au cytomètre !!! Et finalement, quand tu m'expliques la cytométrie, ça n'a pas l'air d'être si sorcier ! Ton aide a été précieuse et nos discussions vivement appréciées. Au final, on ne s'est pas fait ce restau avec l'équipe de choc ! Je te remercie également Claire Piquet-Pellorce pour ton aide sur le côté immunité et sur les souris !

Je remercie également tous les autres membres de l'équipe 2 : Céline Raguene-Nicol, Jérémy Bomo, Nicolas Vu, Laurence Amiot, Brice Autier, Hélène Guégan, Christelle Manuelle, Charlotte Pronier, Humaa Hameed, Muzafar Akmal ainsi que tous les autres.

J'ai également partagé beaucoup de bons moments avec différentes personnes de l'Institut ! J'ai beaucoup ri avec nos fameux défis du meilleur gâteau ou nos enquêtes criminelles. En plus de cette thèse, je suis fière d'avoir reçu le prix du meilleur gâteau original !! Merci à Marie Kerhoas, Valentin Tastet, Tom Voisin, Anna Zerdoug (merci pour les tips cheveux !), Jérémy Amosse, Laura Morin, Rima Souki, Charbel Touma, Hélène Le Mentec, Célia Thomas, Sophie Rose, Jennifer Carteret, Stéphanie Molez, Florian Barathon. Les moments de repas/pause-café ne seraient pas pareils sans vous !

Merci également à Marc Le Vée, Elodie Jouan, Eric Le Ferrec, Claudie Morzadec, Frédéric Erzan, Vincent Legagneux, Dominique Lagadic, Valérie Lecureur, Alain Lescoat, Valentine Brouard, Sophie Langouet, Lydie Sparfel.

Merci à Luis Cano pour ton aide précieuse apportée à ce projet. Tes conseils, ainsi que nos discussions m'ont beaucoup aidés. Je ne peux que te souhaiter une très bonne continuation, et j'espère que l'on aura l'occasion de retravailler ensemble.

Je vous remercie également Nathalie Théret et Badia Mssassi d'avoir toujours été disponibles et toujours essayé de trouver des solutions à mes problèmes ! Rares sont les ED qui se donnent autant pour leurs étudiants ! Merci !

Marie Cuvellier, je ne sais plus si je te l'ai dit, mais tu es l'une des premières personnes à m'avoir adressé la parole et fait rentrer dans le groupe ! Plus tard tu m'as dit que tu n'aimes pas quand les « petits nouveaux » restent tout seul. Franchement, merci. Tu es facilement l'une des personnes les plus sympas, toujours prête à aider que ça soit niveau manip ou autre ! Pendant 4 ans tu as été mon binôme de sortie : soirée, restau, brunch, ciné et autres ! Je pense bien que grâce à toi j'ai eu un semblant de vie sociale !! À l'époque j'étais triste de savoir que tu allais partir avant la fin de ma thèse, mais au final c'est moi qui pars avant toi... Je suis un peu triste, mais on gardera contact c'est obligé !! Qu'on se retrouve dans la même ville, quelque part ça ne serait pas si mal.

Marie Febvre-James et Noémie Tournadre ! Avec Marie C., c'était le trio de choc toujours prêt pour un brunch un dimanche matin ! Avec Marie Lelong, bien évidemment ! Je ne parle pas de nos conneries, nos ragots et encore. Nos moments partagés sont toujours des moments de rigolades et pour moi c'était des bouffées d'air frais ! Je vous souhaite à toute une très bonne continuation et toute la réussite (sur différents plans bien évidemment). À très vite, je l'espère.

Certains étés, j'ai été adoptée par le H2P2 et vu tout le temps que j'y ai passé avec tous mes blocs de foie, c'est tout comme si je faisais partie du décor de la plateforme ! Alors, soyons francs, couper des blocs, ce n'était pas très fun pour moi, mais j'aimais beaucoup trainer avec vous ! Nicolas Mouchet, Marine Seffals, Pascale Bellaud, Roselyne Viel et bien évidemment Gevorg Ghukasyan (a.k.a GG). Franchement sans vous je ne pense pas que j'aurais passé autant de temps sur mes coupes ni mes marquages ! Non seulement j'ai été formée à faire des coupes impec (malgré ce que dit GG), mais vous avez toujours été là pour trouver des solutions avec moi. Franchement merci, j'ai beaucoup ri ! Je vous souhaite une très bonne continuation !

Chose promise, chose due : merci à la meilleure stagiaire de tous les temps, Charleen Plaisse ! Sincèrement tu es une étudiante brillante, et je ne doute pas un seul instant que tu iras loin dans ta carrière. Je te le souhaite en tout cas ! Non seulement intelligente, mais très sympathique également ! Finalement, former des stagiaires comme toi, ce n'est pas trop une corvée... 😊 J'espère en tout cas que l'on continuera de rester en contact !

Je voudrais également remercier Gilles Lalmanach et Ahlame Saidi, pour non seulement m'avoir formée pendant mes stages de M2, mais aussi pour avoir continué de prendre de mes nouvelles et de m'apporter vos conseils avisés ! Je dois remercier également les personnes du CEPR qui continuent de me suivre : Mylène Wartenberg, Seda Seren et tous les autres ! J'espère que l'on se recroisera bientôt !

Merci également à Nessrine Bellamri d'avoir été là quand il l'a fallu. Au final on est resté ensemble toute ma thèse et je me suis bien marrée. On a eu de bons moments,

avec Zou également ! Je vous remercie donc tous les deux et je vous souhaite une très bonne continuation et j'espère que l'on se recroisera également.

Ma petite Karima Alim, que te dire... Ta personnalité est indéfinissable ! Tu as cette joie de vivre qui est très contagieuse ! Nos fous rires avec Nessrine ont marqué à jamais l'irset... On peut encore entendre les échos la nuit tombée. Finalement, je t'appréciais bien vers la fin... Tu vois il me faut juste un peu de temps ☺ sincèrement merci pour beaucoup de choses. Tu as toujours été là. Je ne peux que te souhaiter une très belle réussite dans ce que tu entreprendras. Sinon, on se revoit très vite !

Ma très chère Chahrazed Habes, quand on y pense, on s'est rencontré par hasard grâce au petit Tiroille, et au final on est resté en contact 6 ans ! Je te remercie d'être toujours disponible et toujours à l'écoute. Tu m'as beaucoup encouragée et aujourd'hui je finis enfin la thèse !

Mon petit Victor Tiroille... J'ai trop de choses à te dire. 8 ans c'est fou quand même ! On a quasiment tout fait ensemble, mais tu gardes toujours une petite longueur d'avance sur moi... J'adore cette curiosité scientifique que tu as et souvent, à t'entendre parler j'avais envie d'être comme toi. Tu ne te rends peut-être pas compte, mais j'ai beaucoup appris avec toi. Tu m'as également beaucoup soutenue et parfois même poussée à faire des choses que je n'osais pas. Je te remercie, mais tellement d'avoir toujours été là et de continuer à l'être ! Je n'ai pas besoin de souhaiter une bonne réussite, car te connaissant, tu l'atteindras sans aucun doute. À plus tard !

Et enfin je remercie mon frère et mes parents. Merci pour votre soutien indéfectible, pour votre confiance, votre amour. Vous m'avez toujours poussée à aller plus loin, vous avez toujours tout fait pour que je puisse le faire. Donc sans vous je n'aurais sûrement jamais entamé une thèse. Je suis très fière de pouvoir vous montrer ce que j'ai pu faire grâce à vous. Merci, merci pour tout. Je ne peux que souhaiter que vous restiez avec moi. À très vite !

Je m'excuse vis-à-vis tous ceux que j'ai pu oublier de citer, il y en a certainement, 4 ans c'est long et j'ai croisé beaucoup de personnes qui m'ont toutes aidée. Je vous remercie donc tous infiniment.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	2
REMERCIEMENTS.....	4
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
RÉSUMÉ.....	14
INTRODUCTION	18
I. La famille des protéines à motif « tripartite »	20
A. Structures et diversités	20
B. L'importance de l'ubiquitination dans la signalisation cellulaire.....	22
II. L'E3 ubiquitine ligase TRIM21	24
A. TRIM21 dans le système immunitaire.....	24
1. TRIM21 : un récepteur cytosolique d'immunoglobulines	24
2. TRIM21 : régulateur positif de la réponse aux pathogènes.....	25
3. TRIM21 : induction et expression	26
4. TRIM21 : rétrocontrôle et régulation négative de l'inflammation	27
B. TRIM21 dans les morts cellulaires programmées	28
1. Apoptose.....	29
2. Nécroptose	31
3. Pyroptose.....	31
4. Ferroptose	32
5. TRIM21 : un modulateur positif des morts programmées	32
C. La dualité de TRIM21 dans les cancers	33
1. TRIM21 : un rôle favorisant la progression du cancer	33
2. TRIM21 : un rôle suppresseur de tumeur.....	34
III. Carcinome hépatocellulaire (CHC)	37
A. CHC : les facteurs de risques	37
1. Les hépatites virales	38
2. Les hépatites alcooliques.....	38
3. Les hépatites métaboliques	38
B. CHC : un environnement hépatique immunosuppresseur propice	40
C. CHC : les traitements disponibles selon le stade du cancer	43
1. Les thérapies systémiques	44
2. Les immunothérapies	45

a)	Principe des immunothérapies	45
b)	Cas paradoxal des patients à étiologie NASH.....	46
IV.	Le CHC se développant dans un contexte NASH (NASH-CHC)	48
A.	La pathogenèse de la NASH	48
B.	Altération de l'environnement immunitaire dans la transition NASH-CHC.....	49
1.	Immunité innée	49
2.	Immunité adaptative.....	51
V.	Modèles murins de NASH-CHC	54
A.	Intervention des régimes dans les modèles murins de NASH et NASH-CHC.....	55
B.	Modèles NASH-CHC chimiquement induits plus régimes.....	56
C.	Modèles murins NASH-CHC génétiquement modifiés plus régimes	56
D.	Souris versus Humain : quel est le meilleur modèle ?	57
	CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE :	60
	RÉSULTATS	64
	Résultat 1 : TRIM21 et nécroptose	66
	Résultat 2 : TRIM21 et NASH-CHC.....	82
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	126
	BIBLIOGRAPHIE	136
	ANNEXE	154

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Nombre de morts d'ici 2040 à la suite d'un cancer du foie	2
Figure 2: Structures et domaines des protéines TRIM	20
Figure 3: Les protéines TRIM-Like	21
Figure 4: Les différents types d'ubiquitination	22
Figure 5: Fonction Fc récepteur de TRIM21	24
Figure 6: Schéma de la réponse antivirale de TRIM21	26
Figure 7: Schémas des voies IFN permettant l'expression de TRIM21	27
Figure 8: Répression des IFN I par TRIM21	27
Figure 9: Schéma des voies de mort programmée	29
Figure 10: Les différents facteurs de risque de développement du CHC	37
Figure 11: Les pathologies NAFLD et leurs évolutions vers un CHC	39
Figure 12: Organisation anatomique du foie	40
Figure 13: Image de l'immunité hépatique	41
Figure 14: Rôle des cellules immunitaires dans la progression du CHC	42
Figure 15: L'algorithme du "Barcelona Clinic for Liver Cancer" (BCLC)	44
Figure 16: Les thérapies systémiques aux stades avancés du CHC	44
Figure 17: Les cibles moléculaires des traitements systémiques	45
Figure 18: Les immunothérapies ciblant les points de contrôle immunitaire	46
Figure 19: Pathogenèse de la NASH-CHC	48
Figure 20: Interaction entre l'immunité innée et adaptative dans la NASH	50
Figure 21: Immunité adaptative dans la NASH-CHC	51
Figure 22: Les différents modèles murins de CHC	54
Figure 23: Comparaison des altérations génomiques des différents modèles murins de CHC	58
Figure 24: Ubiquitination de RIPK1 durant la nécroptose induite par TRAIL ...	130
Figure 25: Expression des ARNm des différents marqueurs de morts	131
Figure 26: Expression des ARNm des différentes voies du métabolisme	132
Figure 27: Expression des ARNm de cytokines pro-inflammatoires	133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Comparaison des effets des traitements sur les CHC à étiologie NAFLD et non NAFLD	46
Tableau 2: Comparaison des différents modèles murins NASH-CHC	55

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADIN:** antibody dependent intracellular neutralization
APC: antigen presenting cell
- B** : B-Box domain
BAK: BCL-2 homologous antagonist killer
BAX: BCL-2 associated X
BCL-2: B-cell lymphoma 2
BID: BH3 interacting domain death agonist
BOK: BCL-2 related ovarian killer
- C-FLIP:** cellular FLICE-like inhibitor protein
C/EPB: CCAAT/enhancer binding protein
CASP: caspase
CC: Coiled-coil domain
cGAS: cGAMP synthetase
CHC: carcinome hépatocellulaire
- Dcs:** Dendritic cells
DDX41: DEAD/H BOX41
DISC: death inducing signaling complex
- FADD:** fas-associated protein with death domain
FAS-L: fas ligand
FASN: fatty acid synthetase
- GNPAT:** Glyceronephosphate O-acyltransferase
GSDM: gasdermin
- HFD:** high-fat-diet
HuR: human antigen R
- IFN:** interférons
- K:** lysine
KCs: kupffer cells
Keap1: kelch-like ECH associated protein 1
- LED:** lupus érythémateux disséminé
LT: lymphocytes T
- MDSCs:** myeloid-derived suppressor cells
MHC: major histocompatibility complex
MLKL: mixed lineage kinase domain like
MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization
- NAFLD:** non-alcoholic fatty liver diseases
NASH: non-alcoholic steatohepatitis
NEMO: NF- κ B essential modulator
NK: Natural Killer
NRF2: nuclear E2-related factor 2
- PAMP** : pathogen associated molecular pattern
Par-4: prostate apoptosis response 4
PRR: pathogen recognition receptor
PUFA: polyunsaturated fatty acids
- R** : Ring domain
RIPK: receptor-interacting serine/threonine protein kinase
ROS: reactive oxygen species
- SALL4:** sal-like 4
SMAC: second mitochondrial-derived activator of caspases
- TACE:** transarterial chemoembolization
TAMs: Tumor associated macrophages
TEM: transition épithélio-mésenchymateuse
TGF: transforming growth factor
TNF: tumor necrosis factor
TRAIL: TNF related apoptosis inducing ligand
T_{reg}: Lymphocytes T regulator
TRIF : toll/interleukin1 receptor domain containing adapter-inducing IFN β
TRIM : Tripartite motif protein
- VEGF** : vascular endothelial growth factor
VHA : virus de l'hépatite A
VHB : virus de l'hépatite B
VHC : virus de l'hépatite C
VHD : virus de l'hépatite D
VHE : virus de l'hépatite E
- ZBP1:** Z-DNA binding protein 1

RÉSUMÉ

L'E3 ubiquine ligase TRIM21 est une protéine impliquée dans différents processus biologiques tels que l'inflammation, le cycle cellulaire, la mort cellulaire ou encore l'immunité. Or ces différentes voies sont souvent dérégulées dans le cancer. La communauté scientifique s'est alors intéressée de plus près au rôle de TRIM21 dans certains cancers et montre qu'une faible expression de TRIM21 corrèle avec un mauvais pronostic de survie, notamment dans le carcinome hépatocellulaire. Ce dernier est aujourd'hui la 3^e cause de mortalité à la suite d'un cancer et son incidence ne cesse de progresser. Différents facteurs contribuent à la pathogenèse, notamment la stéatohépatite non alcoolique, un facteur majeur aujourd'hui de progression vers le cancer du foie, souvent lié à une obésité et une hypoinsulinémie. Ces syndromes métaboliques peuvent mener à l'accumulation de lipides dans le foie, une lipotoxicité et la mort des hépatocytes. Parmi les morts cellulaires, on peut citer la nécroptose, dépendante du recrutement des acteurs moléculaires principaux : RIPK1 ; RIPK3 et MLKL. Des études montrent que cette nécrose programmée, dans le carcinome hépatocellulaire et dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique, induit une inflammation qui exacerbe les lésions hépatiques et favorise la progression vers un hépatocarcinome.

Lors de ces travaux de thèse, nous avons découvert pour la première fois le recrutement de la protéine TRIM21 au sein du nécrosome suite à un traitement par le ligand de mort TRAIL. Ainsi, sur différents modèles cellulaires et en modulant l'expression de l'E3 ubiquitine ligase, nous avons démontré le rôle de modulateur positif de cette protéine dans la nécroptose induite par TRAIL.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle de TRIM21 dans la progression du carcinome hépatocellulaire dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique. Pour ce faire, nous avons induit une hypoinsulinémie chez dessouriceaux mâles exprimant ou non la protéine TRIM21. Puis au sevrage, ils ont été soumis à un régime hyperlipidique et riche en cholestérol pendant 4, 8 ou 12 semaines. Les données montrent que les souris n'exprimant pas TRIM21 développent des lésions hépatiques plus sévères, conduisant au développement d'un plus grand nombre de nodules cancéreux. Cette progression tumorale semble être liée à une diminution de l'immunité anti-tumorale. En effet, ces souris surexpriment les points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1, notamment dans le foie, ce qui favoriserait donc la progression du carcinome hépatocellulaire.

En résumé, nous avons démontré d'une part, le rôle de modulateur positif de TRIM21 au cours de la nécroptose induite par TRAIL. D'autre part, nous avons montré le rôle de TRIM21 dans le maintien d'un microenvironnement avec une immunité anti-tumorale active dans le carcinome hépatocellulaire se développant dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique.

ABSTRACT

The E3 ubiquitin ligase TRIM21 is implicated in a wide range of biological processes such as inflammation, cell cycle, cell death or immunity. These pathways are often found dysregulated in cancer, thus it prompted the interest of cancer research community. Studies have shown a low expression of TRIM21 in different cancers, including hepatocellular carcinoma. Today, liver cancer is the 3rd cause of death by cancer, and different factors contribute to the pathology. Non-alcoholic steatohepatitis, the main factor of liver cancer progression nowadays, is mainly induced by obesity and hypoinsulinemia. These metabolic dysregulations favor lipid accumulation in hepatocytes, lipotoxicity and thus cell death. Among the cell death pathway, necroptosis is dependent on RIPK1, RIPK3 and MLKL recruitment into the necrosome. Some researches show the involvement of this pathway in non-alcoholic steatohepatitis-induced hepatocellular carcinoma by exacerbating liver inflammation.

During this thesis, we described for the 1st time the recruitment of the E3 ubiquitin ligase TRIM21 in the necrosome during TRAIL-induced necroptosis. Using different cell lines and by modulating TRIM21 expression, we showed the positive modulator role of TRIM21 in this death pathway. Following these results, we investigated the role of TRIM21 in nonalcoholic steatohepatitis leading to hepatocellular carcinoma using a mouse model. We used diabetic male mice expressing or no TRIM21, and fed them a high-fat high-cholesterol diet for 4, 8 or 12 weeks. Our data show that TRIM21-knockout mice developed more liver lesions and showed higher tumor emergence. This tumor progression seems to be due to the decrease of the antitumor immunity. The TRIM21-knockout mice showed an upregulation of immune checkpoints PD-1 and PD-L1 in the liver, thus promoting hepatocellular carcinoma progression.

To sum up, we showed in one hand, the positive modulator role of TRIM21 in TRAIL-induced necroptosis, and on the other hand, we showed how TRIM21 sustains a microenvironment with active anti-tumor immunity to slowdown liver cancer progression developed in a nonalcoholic steatohepatitis context.

INTRODUCTION

I. La famille des protéines à motif « tripartite »

La famille des protéines à motif « tripartite » (*TRIPartite Motif protein*, TRIM) exerce une multitude de fonctions dans différents processus cellulaires grâce à leurs diversités structurales, tout en gardant quelques fonctions structurellement conservées telles que l'activité E3 ubiquitine ligase.

A. Structures et diversités

La famille des protéines à motif « tripartite » (TRIM) est composée chez l'homme de plus de 80 membres distincts classés dans onze sous-familles (de C-I à C-XI) ¹. Le motif « tripartite » est un arrangement structural de trois domaines très conservés : RING (R), B-box (B) et coiled-coil (CC) ; de ce fait, on parle aussi de protéines du groupe RBCC ²⁻⁴. Depuis la première caractérisation de la famille des protéines TRIM telles que connues aujourd'hui ⁵, plusieurs protéines à motif « tripartite » ont été identifiées chez différentes espèces. Chez les mammifères, les protéines à motif « tripartite » sont exprimées de façon constitutive et ubiquitaire pendant le développement embryonnaire et dans les tissus adultes. La conservation d'une architecture protéique souligne des propriétés bien définies telles que des interactions homodimères ou encore la fonction de E3 ubiquitine ligase. Ces propriétés régulent différents processus biologiques comme le cycle cellulaire, la signalisation cellulaire, la mort cellulaire et l'immunité pour n'en citer que quelques-uns, impliquant ainsi les protéines TRIM dans un large éventail de processus biologiques ⁶.

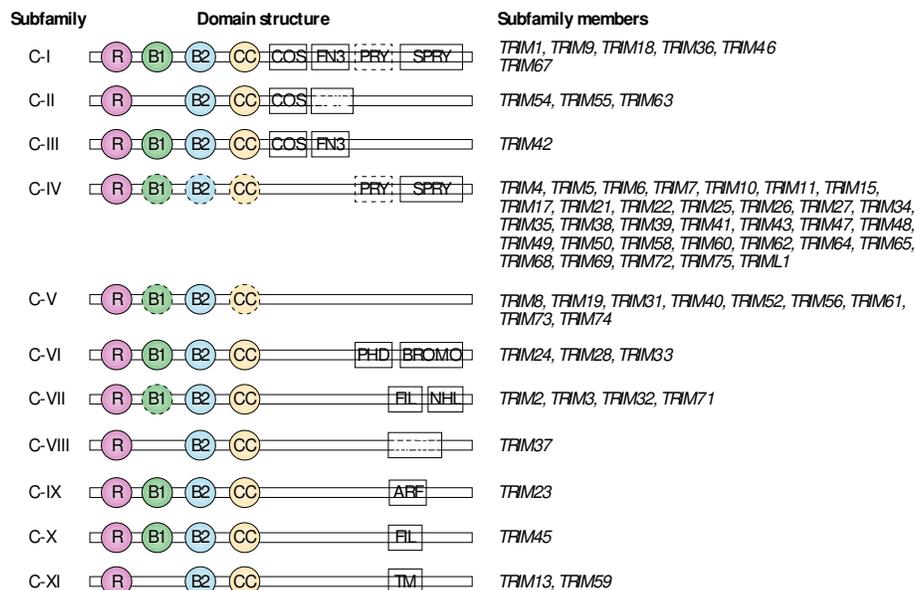


Figure 2: **Structures et domaines des protéines TRIM** ⁷ - Les protéines TRIM sont classées en 11 sous-groupes (C-I à C-XI) selon leurs domaines C-terminales.

En région N-terminale des protéines se situe le motif « tripartite » composé dans l'ordre d'un domaine R, d'un ou deux domaines B (B1 ; B2) et d'une région CC. Les

domaines situés plus loin, en région C-terminale, sont associés à différentes fonctions (Figure 2). Alors que la région tripartite sera principalement impliquée dans les interactions homo- ou hétéro- dimères entre les protéines TRIM et dans les mécanismes d'ubiquitination, la région C-terminale permettra de recruter des partenaires spécifiques et jouera un rôle dans sa localisation subcellulaire. À partir de cette structure de base, il a été dénombré différentes variations au sein des protéines TRIM.

Le domaine RING est une région en doigt de zinc riche en cystéines, impliqué dans le mécanisme d'ubiquitination grâce à son activité E3-ubiquitine ligase ^{8,9}. De ce fait, les protéines TRIM sont capables de conduire à différents types de polyubiquitinylation, déterminant le devenir de la protéine ainsi modifiée. Outre l'ajout d'ubiquitine à leurs cibles, certaines protéines à motif « tripartite » sont capables de conjuguer des protéines ubiquitine-like (UBL) telles que SUMO ^{10,11}, démontrant une flexibilité du domaine R. Le domaine B-box est aussi composé de motifs en doigt de zinc, et a deux sous-types différents : type 1 (B1) et type 2 (B2). Ils peuvent être en tandem où B1 précédera toujours B2, ou seulement un sous-type est présent. Dans ce cas-là, ce sera toujours B2. Alors que leurs rôles fonctionnels restent à être déchiffrés, il a été montré qu'ils peuvent moduler l'activité E3-ligase, et/ou l'interaction avec certains TRIM ¹². À la suite du domaine B-box se trouve une région CC en hélices α impliquée dans les interactions homo- ou hétéro-dimères. Certaines TRIM possèdent une région en hélices α supplémentaire nommée COS, jouant un rôle dans l'interaction avec le cytosquelette ¹.

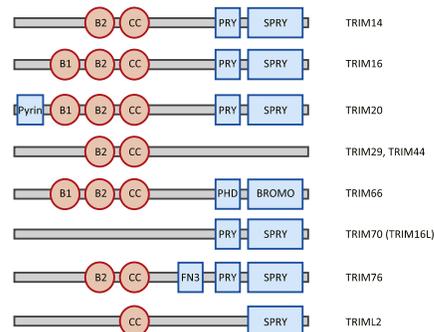


Figure 3: **Les protéines TRIM-Like** ⁶- Cette classe présente des protéines avec des domaines manquants, ne permettant pas de les classer dans l'un des 11 sous-groupes.

La région la plus variable dans la famille de protéines à motif tripartite est la région C-terminale. Outre les 11 sous-groupes des protéines TRIM, il est intéressant de noter qu'il existe une classe supplémentaire nommée UC, de protéines *TRIM-like* inclassables qui présentent des domaines soit manquants, soit tronqués (Figure 3). Les domaines les plus retrouvés sont les régions PRY et SPRY individuellement ou en combinaison (*PRY-SPRY*). Le domaine SPRY est hautement conservé et peut être retrouvé chez les mammifères, les plantes et les champignons. À l'opposé, la combinaison des domaines PRY-SPRY (aussi nommé B30.2) n'est retrouvée que chez les vertébrés ¹³. SPRY et PRY-SPRY servent usuellement de plateforme d'interaction protéine-protéine. De plus, le domaine PRY-SPRY peut présenter des propriétés semblables au récepteur Fc (Fc-like) tel qu'au sein de TRIM21 ¹⁴, ou peut même médier l'interaction avec des ARNs, comme pour TRIM25 ¹⁵.

B. L'importance de l'ubiquitination dans la signalisation cellulaire

Différents processus biologiques sont finement régulés au travers de modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination. Cette dernière est possible, entre autres, grâce aux E3 ubiquitine ligases qui déterminent les protéines cibles. L'importance du processus d'ubiquitination dans la régulation de signalisation cellulaire peut être soulignée par exemple, par le fait que différents virus acquièrent des stratégies d'inhibition de ce mécanisme pour échapper à l'immunité innée. Or, l'une des plus grandes classes d'E3 ligase est la famille des protéines à motifs « tripartite ». Différentes études soulignent le rôle émergent des protéines TRIM en tant que régulateurs de l'immunité. L'étude de ces mécanismes de régulation sous-jacents démontre l'importance des chaînes polyubiquitinées (covalentes ou non ancrées).

L'Ubiquitine est une protéine de 8 kDa environ qui peut être fixée de façon covalente à la lysine d'une protéine cible ¹⁶. L'une des caractéristiques de l'ubiquitination par rapport aux autres modifications post-traductionnelles est que l'ubiquitine peut elle-même être ubiquitinée et ainsi former une chaîne de polyubiquitines ¹⁷. Ces chaînes peuvent être homotypiques, mixtes ou hétérologues (Figure 4).

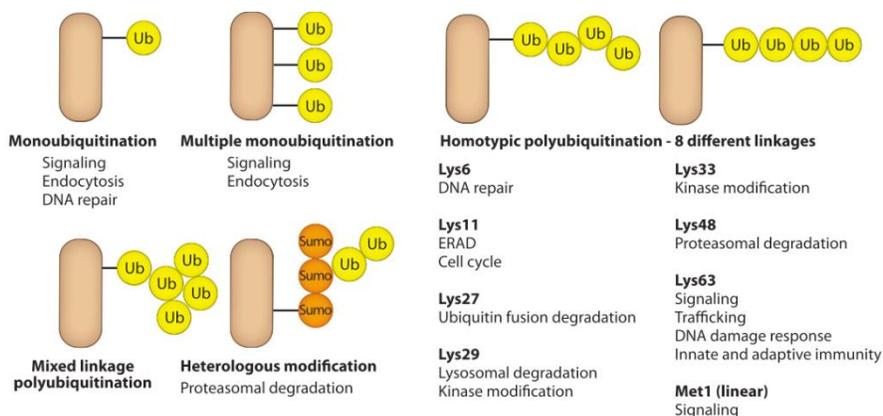


Figure 4: **Les différents types d'ubiquitination** ¹⁶ – Ces modifications post-traductionnelles permettent de moduler certaines voies de signalisation.

L'ubiquitine peut se fixer sur différentes lysine internes (K6 ; K11 ; K23 ; K27 ; K29, K33 ; K48 ; K63) sur laquelle différentes chaînes peuvent être formées. Fonctionnellement, les chaînes de polyubiquitines K48 et K63 sont les mieux caractérisées. Les protéines polyubiquitinées sur la lysine 63 (K63) sont ciblées pour devenir fonctionnellement actives, alors qu'une polyubiquitination sur la lysine 48 (K48) entraîne la dégradation de la protéine par le protéasome ¹⁸. Cependant, une même chaîne peut aussi jouer un rôle autre que la dégradation. Par exemple, la K11 intervient dans la régulation de l'activation de NF- κ B médié par NEMO (NF- κ B essential modulator) ¹⁹.

En somme, la famille des protéines « tripartite » représente l'un des plus larges sous-groupes d'E3 ubiquitine ligases. Le motif « tripartite » a été structurellement conservé au cours de l'évolution, soulignant le rôle important que ces domaines peuvent avoir, notamment le domaine RING qui assure la fonction ubiquitine ligase. Au-delà de cette conservation, les TRIM se sont également diversifiées au cours du temps, de par leurs régions c-terminales, permettant aujourd'hui l'implication de ces protéines dans une multitude de processus biologiques ²⁰. Parmi ces derniers, on peut citer l'implication des TRIM dans la régulation de la transcription ^{21,22}, la régulation du cycle et la division cellulaire ^{23,24}, la modulation des voies de mort ²⁵⁻³⁰, et d'autres cascades de signalisations. De ce fait, les protéines TRIM peuvent être très importantes en médecine tant pour leurs implications dans les pathologies auto-immunes ou dans les immunités innée et adaptative ^{31,32}, que l'initiation et la progression du cancer ^{7,33,34}.

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une E3 ubiquitine ligase spécifique, TRIM21, et la suite de ce manuscrit aura pour but de démontrer son rôle majoritaire dans différentes voies de signalisation, souvent dérégulées dans le cancer.

II. L'E3 ubiquitine ligase TRIM21

A. TRIM21 dans le système immunitaire

TRIM21, aussi connu sous le nom de Ro52, a été décrite pour la première fois comme auto-antigène dans les maladies auto-immunes telles que le syndrome de Sjogren et le lupus érythémateux disséminé (LED)^{35,36}. Puis une dizaine d'années plus tard, l'interaction entre TRIM21 et une partie de la chaîne lourde d'immunoglobuline (Fc) a été mentionnée, mais en tant que « faux positif » sur des expériences d'immunoprécipitation à partir de levures³⁷. Depuis, l'interaction TRIM21 et anticorps a été démontré et les mécanismes étudiés.

1. TRIM21 : un récepteur cytosolique d'immunoglobulines

Le système immunitaire a évolué de telle manière à pouvoir faire face aux différentes agressions par des virus et pathogènes. Dans ce but, les anticorps jouent un rôle pivot dans la réponse immunitaire contre ces derniers. Pendant longtemps, la neutralisation médiée par la reconnaissance d'anticorps était considérée comme ayant lieu uniquement en extracellulaire. Cette neutralisation a été décrite comme étant assurée par différents types d'effecteurs, les récepteurs $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$)³⁸. La fonction de ces derniers est induite lorsque le complexe anticorps-virus se lie aux récepteurs $Fc\gamma$ exprimés sur les cellules hématopoïétiques telles que les Natural Killer (NK) ; les macrophages et les cellules dendritiques³⁹. Il existe aussi des récepteurs $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$) non classiques tels que les récepteurs Fc néonataux (FcRn) ou les récepteurs des immunoglobulines polymériques Ig (pIgR)⁴⁰. Cependant, l'identification de la protéine à motif tripartite 21 (TRIM21) comme étant un récepteur cytosolique d'anticorps à grande affinité et aux propriétés antivirales⁴¹, a permis de définir un nouveau mécanisme de défense de la cellule face aux virus. Si les effecteurs extracellulaires échouent et le virus pénètre au sein de la cellule, des récepteurs d'anticorps intracellulaires prennent la relève. Ainsi, la cellule utilise TRIM21 à son profit et met en place une dernière ligne de défense.

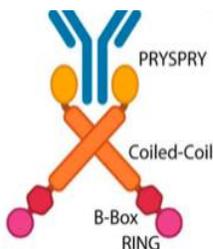


Figure 5: **Fonction Fc récepteur de TRIM21.** En bleu un anticorps (IgG, IgM ou IgA) ; en orange, rouge et rose la protéine TRIM21 dimérisée.¹²

TRIM21 fait partie de la plus grande sous-classe des protéines à motif « tripartite » : C-IV, et est caractérisée par la présence du domaine PRY-SPRY (B30.2) en C-terminale. Comme décrit plus haut, ce domaine a une architecture conservée au sein de la famille des TRIM, et c'est sur ce dernier que l'on retrouve le site de liaison aux anticorps, dictant ainsi la fonction de la protéine⁴². En solution, TRIM21 forme un complexe homodimère

stable avec un anticorps, à partir duquel les deux domaines PRY-SPRY se lient de part et d'autre de la portion Fc des anticorps (Figure 5) ⁴¹.

TRIM21 se différencie des autres récepteurs Fc γ . Premièrement, par son interaction avec différents isotypes d'anticorps : des IgG, des IgM et même des IgA, alors que les autres Fc γ R reconnaissent seulement un sous-type d'isotype spécifique ⁴². À ce jour, TRIM21 est le seul Fc γ R capable d'interagir avec trois isotypes d'anticorps distincts. Deuxièmement, TRIM21 est exprimée de façon ubiquitaire sur différents types cellulaires, alors que les Fc γ R classiques sont principalement exprimés dans les cellules hématopoïétiques. Ceci laisse penser qu'un pathogène peut être ciblé par TRIM21 en dépit de la localisation du site d'infection et de la distribution locale des isotypes d'anticorps.

2. TRIM21 : régulateur positif de la réponse aux pathogènes

Des études sur un modèle murin d'infection par un adénovirus, ont montré que les souris TRIM21 mutées génétiquement (*Trim21*^{-/-}) étaient plus sensibles à l'infection et présentaient une charge virale élevée. À l'inverse, les souris *Trim21* sauvages (*Trim21*^{+/+}) surexprimaient cette E3 ubiquitine ligase, permettant ainsi le contrôle de l'infection virale. Les souris hétérozygotes (*Trim21*^{+/-}) quant à elles, présentaient un phénotype intermédiaire, avec une charge virale augmentée, mais restant plus faible comparée aux souris *Trim21*^{-/-}. Ceci laisse donc penser que l'expression de TRIM21 influence directement l'efficacité de l'activité antivirale ⁴³. Une autre étude différentielle à haut débit de l'expression de gènes utilisant des séquençages à ARN (RNA-seq), montre que cette signalisation immunitaire antivirale est dépendante de l'interaction entre TRIM21 et l'anticorps ⁴⁴. En effet, l'invalidation génétique de TRIM21 (*Trim21*^{-/-}) ou la perturbation de l'interaction protéique entre TRIM21 et les IgG, abolissent l'activation immunitaire. Ainsi TRIM21 est un régulateur immunitaire positif dans la réponse antivirale intrinsèque.

Lors d'une infection cellulaire par des pathogènes (virus, bactéries et parasites), TRIM21 se lie au complexe pathogène-anticorps via son domaine PRY-SPRY et active ainsi une signalisation séquentielle et coordonnée. Ceci implique, d'une part, la dégradation du pathogène par le protéasome et d'autre part, l'induction d'une réponse antivirale par l'activation de la signalisation de l'immunité innée. Le processus de dégradation du pathogène par TRIM21 est nommé neutralisation intracellulaire anticorps-dépendante (*antibody dependent intracellular neutralization ; ADIN*) ⁴⁵. Ce double effet est dépendant de l'activité E3 ubiquitine ligase médiée par le domaine RING de TRIM21 ⁴⁶. L'auto-ubiquitination de TRIM21, par l'intermédiaire de l'enzyme E2 Ube2N/Ube2V2, permet l'acheminement du complexe TRIM21-anticorps-pathogènes au protéasome. Ensuite, la deubiquitination de TRIM21 par la protéine Poh1 active la signalisation NF- κ B et IFN via IRF3,5 et 7, induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires ⁴⁶ (Figure 6).

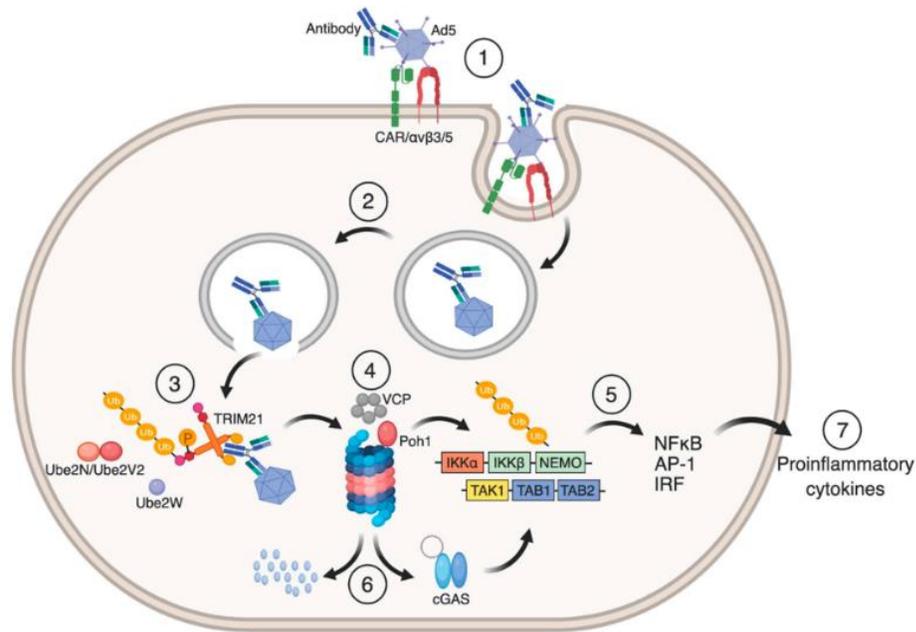


Figure 6: **Schéma de la réponse antivirale de TRIM21.** Lorsque TRIM21 reconnaît un complexe anticorps-virus, elle active un enchaînement de cascade permettant d'un côté de dégrader le virus et de l'autre, d'activer la réponse inflammatoire¹²

TRIM21 permet également d'exposer aux récepteurs d'ADN cytosolique tels que cGAMP synthétase (*cGAS*) et DEAD/H BOX41 (*DDX41*) l'ADN viral caché par le virus. Ainsi, TRIM21 reconnaît le complexe virus-anticorps et induit, d'une part, la dégradation de la capside et d'autre part, la reconnaissance de l'ADN viral exposé par le récepteur *cGAS*. Ceci active une réponse cytokinique pro-inflammatoire permettant la résolution de l'infection⁴⁷.

De façon intéressante, certaines études ont démontré la dégradation médiée par TRIM21, du récepteur à ADN cytosolique *DDX41*⁴⁸. Ce mécanisme opposé suggère donc différents rôles de TRIM21 dans la réponse antivirale selon sa cible et laisse entrevoir un rôle plus complexe de cette protéine dans le système immunitaire.

3. TRIM21 : induction et expression

Les interférons de type I (IFN I) comme IFN- α et IFN- β ; ou de type II (IFN II) comme IFN- γ induisent une cascade de signalisation activant la transcription de gènes impliqués dans l'immunité innée et l'immunité adaptative. Une étude a montré qu'à la suite d'une stimulation par l'IFN de type I des cellules HeLa, l'expression de TRIM21 était induite³⁷. Cette régulation positive de l'E3 ubiquitine ligase par les IFNs est confirmée dans d'autres types cellulaires tels que les macrophages et les cellules dendritiques⁴⁹. Par ailleurs, l'étude montre également que les cellules n'exprimant plus de récepteurs aux IFN I, ont une expression de TRIM21 diminuée⁴⁹.

La liaison des IFNs de type I et II à leurs récepteurs initie une cascade de signalisation JAK/STAT induisant dans un premier temps l'expression des facteurs de transcription IRF1 et IRF2. Ces derniers transloquent ensuite au noyau et se lient à l'élément de

réponse sensible à l'interféron (ISRE) sur le gène de TRIM21, induisant ainsi son expression (Figure 7) ^{50,51}.

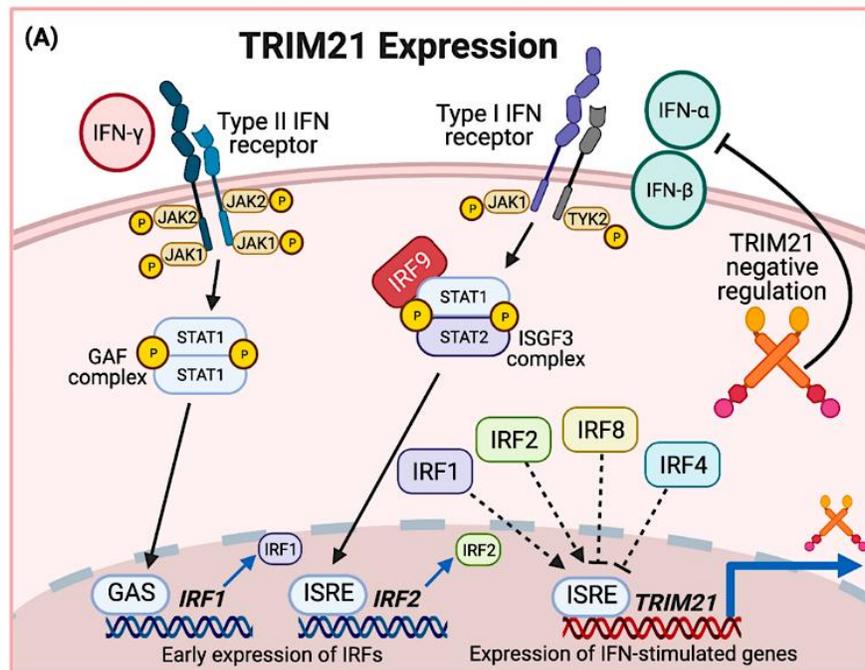


Figure 7: Schémas des voies IFN permettant l'expression de TRIM21. IFN de type I et II activent une cascade de signalisation permettant l'expression des IRF1, 2. Ces derniers activent l'expression de TRIM21.⁵²

4. TRIM21 : rétrocontrôle et régulation négative de l'inflammation

Cependant, une inflammation prolongée peut mener à de graves lésions tissulaires et à des pathologies auto-immunes. Ainsi, afin de protéger l'hôte d'une inflammation IFN-dépendante prolongée, TRIM21 participe à un rétrocontrôle négatif des IFN de type I (Figure 7). En effet, TRIM21 peut ubiquitiner IRF5/IRF7 et induire leurs dégradations par le protéasome, réprimant ainsi l'expression des IFN I (Figure 8) ^{53,54}.

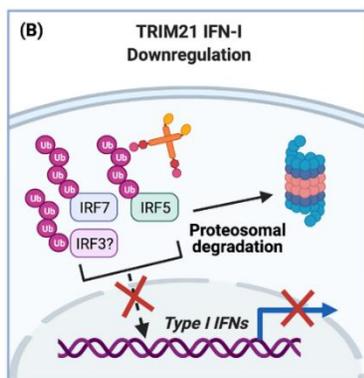


Figure 8: Répression des IFN I par TRIM21. TRIM21 ubiquitine et dégrade les IRF7, 3 et 5, induisant ainsi l'inhibition d'expression des IFN de type I ⁵²

Des études décrivent TRIM21 comme un régulateur négatif de l'inflammation. Par exemple, cette E3 ubiquitine ligase régule la mono-ubiquitination et la translocation de la

sous-unité IKK β active dans l'autophagosome, inhibant ainsi la signalisation NF- κ B⁵⁵. D'autres études montrent également une répression de la signalisation pro-inflammatoire et de la production de cytokines dans les fibroblastes embryonnaires⁵⁶. Un autre groupe démontre également que TRIM21 inhibe l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α ; IL-6 ; IFN α ; IFN β et IL12/IL-23p40 en dérégulant l'axe de différenciation Th17⁵⁷. Mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent toutefois inconnus.

En résumé, l'E3 ubiquitine ligase joue un rôle important dans l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Lors d'une infection, TRIM21 reconnaît le complexe pathogène-anticorps induisant, d'une part, la dégradation du pathogène et, d'autre part, l'activation de gènes pro-inflammatoires tels que NF- κ B ou IFN. Cependant, une activation pro-inflammatoire prolongée peut provoquer de graves lésions chez l'hôte. De ce fait, l'organisme a mis en place un rétrocontrôle négatif, où TRIM21 joue alors un rôle de frein à l'inflammation. Une étude suppose qu'en phase initiale de la pathologie, cette protéine peut jouer un rôle pro-inflammatoire. Puis, lorsqu'un certain seuil est atteint, TRIM21 change de fonction et devient alors un modulateur négatif de l'inflammation^{48,58-60}. Toutefois, les mécanismes sous-jacents permettant de caractériser le rôle de TRIM21 de façon spatio-temporelle restent encore à définir.

Des études montrent également l'implication de TRIM21 dans la prolifération de certaines cellules immunitaires telles que les lymphocytes B⁶¹, ou dans la différenciation des lymphocytes Th17⁵⁷. Bien qu'exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus, TRIM21 est plus fortement exprimée au niveau des cellules immunitaires. Plus spécifiquement, TRIM21 est majoritairement exprimée au niveau des lymphocytes T, des macrophages et des cellules dendritiques. La forte présence de cette protéine au niveau de ces cellules suggère alors un rôle important, par exemple dans la production de cytokines par les macrophages ou encore l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques^{56,62}. Bien qu'étudiée majoritairement pour son activité antivirale, il serait intéressant d'étudier et de mieux caractériser l'implication de cette E3 ligase dans le système immunitaire adaptatif.

B. TRIM21 dans les morts cellulaires programmées

La mort cellulaire est un mécanisme inhérent à l'activation de l'immunité. Lors d'une infection, la cellule rentre dans un processus de « suicide cellulaire » ou mort programmée afin d'alerter le système immunitaire. Cependant, les pathogènes ont évolué de façon à pouvoir déjouer ces mécanismes et ainsi échapper à la surveillance immunitaire. L'organisme a alors diversifié les voies de morts cellulaires afin de pouvoir y faire face. Parmi les voies de morts programmées les plus communes, on peut citer l'apoptose, la nécroptose, la ferroptose et la pyroptose. De façon assez surprenante, des études ont montré l'implication de TRIM21 dans ces différentes voies de mort. En effet, l'absence de TRIM21 semble conférer aux cellules une résistance aux différentes voies de mort programmée^{25-27,29,30}.

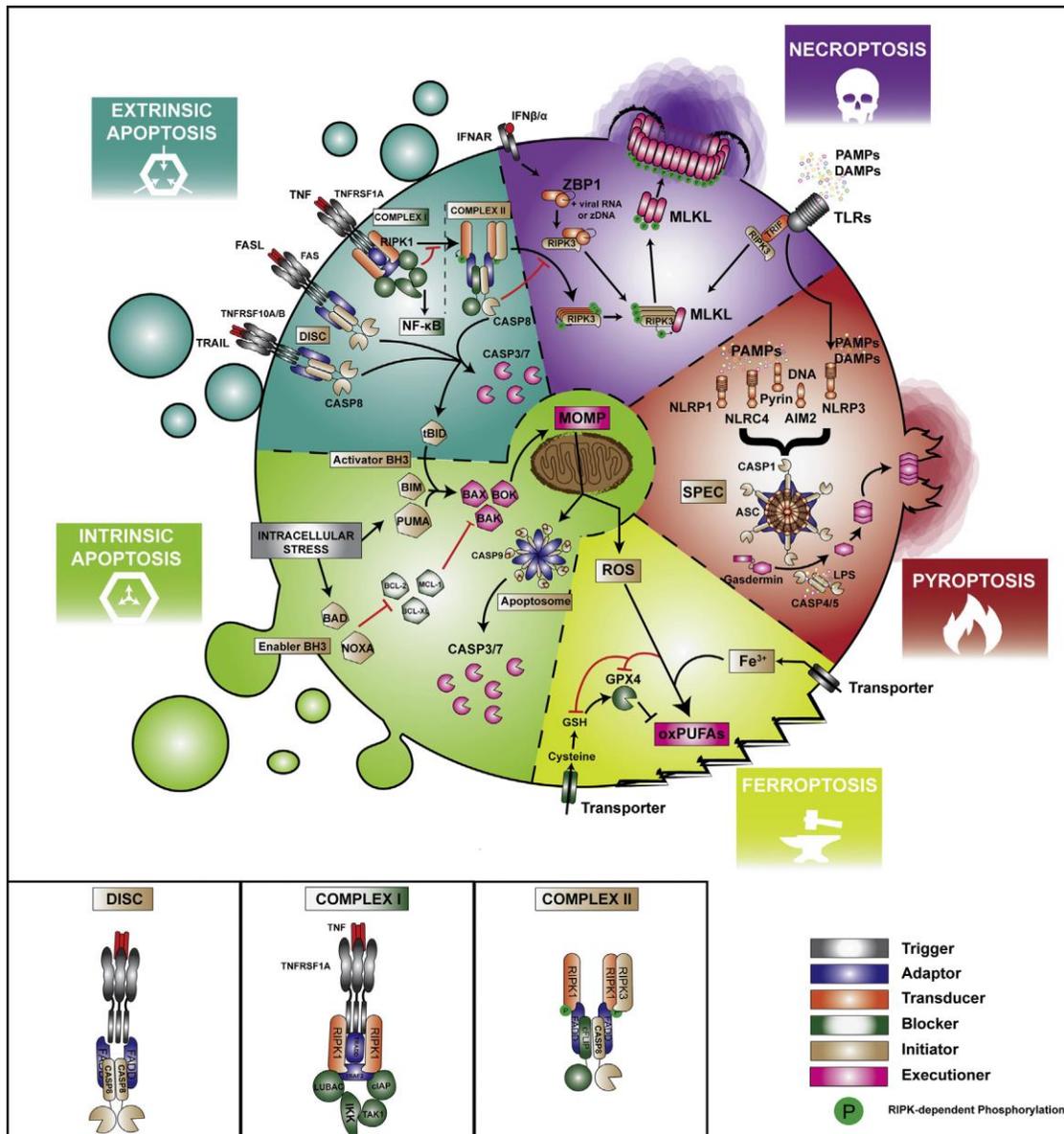


Figure 9: **Schéma des voies de mort programmée.** Présentation des 5 voies principales, en partant des inducteurs jusqu'aux molécules exécutrices.⁶³

1. Apoptose

L'apoptose est l'une des premières voies de mort programmée décrite ⁶⁴. Caractérisée alors comme un mécanisme en deux étapes, la formation de corps apoptotiques et la fragmentation de l'ADN ; l'apoptose était considérée comme une mort non inflammatoire. Il existe deux modalités d'induction de cette mort : voie intrinsèque ou voie extrinsèque ⁶⁵. Ces deux modalités sont finement régulées par les caspases. Dans la voie intrinsèque, les caspases permettent d'amplifier et d'accélérer le signal de mort, tout en la rendant silencieuse vis-à-vis du système immunitaire ^{66,67}.

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (*mitochondrial outer membrane permeabilization ; MOMP*) est nécessaire pour l'engagement vers la voie intrinsèque de l'apoptose (Figure 9) ^{65,68}. Cette perméabilisation est régulée par les protéines de la famille des BCL-2 (*B cell lymphoma-2*) ⁶⁹, à savoir les protéines pro-apoptotiques BAX (*BCL-2 associated X*), BAK (*BCL-2 homologous antagonist killer*) et BOK (*BCL-2-related ovarian killer*). Ces dernières forment des pores au sein de la membrane externe de la mitochondrie, induisant ainsi le relargage de molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome C ou SMACs (*second mitochondria-derived activator of caspases*) au niveau du cytoplasme.

Cette activité pro-apoptotique peut être inhibée par la protéine anti-apoptotique BCL-2. Ainsi, le devenir de la cellule et son engagement ou non vers l'apoptose intrinsèque dépend de la balance entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. Comme précisé plus haut, une activation des caspases dans cette voie intrinsèque rend la mort cellulaire silencieuse vis-à-vis du système immunitaire. Si ces caspases sont inhibées, alors l'induction de mort sera accompagnée d'une réponse IFN de type I et NF- κ B, qui alertent le système immunitaire ^{67,70,71}.

La voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 9) dépend, quant à elle, de l'interaction entre des ligands de mort tels que TNF (*Tumor necrosis factor*), Fas-L (*Fas ligand*) ou TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) avec leurs récepteurs respectifs (TNFSF1A, TNFRSF6, TNFSF10A et TNFSF10B). Selon le récepteur activé, une plateforme de signalisation se met alors en place.

La fixation des ligands sur leurs récepteurs respectifs TNFRSF6, TNFRSF10A et TNFR10B conduit la formation du complexe DISC (*death inducing signaling complex*), composé des protéines FADD (*Fas-associated protein with death domain*), de la caspase 8 (CASP8) et de la protéine c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*) ⁶⁵. L'activation de la CASP8, permet alors l'activation des caspases exécutrices 3 et 7 (CASP3 et CASP7), et l'induction de la mort cellulaire.

Lorsque le TNF se lie à son récepteur, TNFRSF1A n'induit pas la mort de la cellule, mais conduit à la formation du complexe (I), avec le recrutement de la protéine kinase RIPK1 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) ⁷². À l'inverse des récepteurs de Fas-L et TRAIL, TNF induit dans un premier temps la voie de survie et pro-inflammatoire NF- κ B ⁷². Si cette dernière est inhibée, alors RIPK1 forme un nouveau complexe (II), composé des protéines FADD, CASP8 et c-FLIP. Suite à l'activation de la CASP8, les caspases exécutrices CASP3 et CASP 7, sont alors activées à leur tour.

Dans certaines cellules telles que les hépatocytes, la voie extrinsèque n'est pas suffisante pour induire la mort cellulaire. Une amplification avec l'induction d'une MOMP est nécessaire, soulignant ainsi l'importance du croisement des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose ⁷³. De ce fait, la CASP8 clive dans un premier temps BID (*BH3 interacting domain death agonist*), un membre de la famille BCL-2. Ensuite, cette forme tronquée active BAX et BAK, et induit ainsi la MOMP ^{74,75}.

2. Nécroptose

Comme précisé plus haut, lors d'une infection par un pathogène, l'inhibition de la voie NF- κ B induit le recrutement de RIPK1 et la formation du complexe pro-apoptotique (II). Cependant, certains pathogènes inhibent également l'activité de la CASP8. La cellule active alors une voie de secours : la nécroptose. En 1988, des chercheurs décrivent pour la première fois une mort ressemblante phénotypiquement à la nécrose. Cependant, cette dernière n'était pas « une mort accidentelle », mais induite par une signalisation via le TNF ⁷⁶. Quelques années plus tard, un autre groupe découvre que l'inhibition des caspases induisait une mort cellulaire ressemblant à la nécrose ⁷⁷. Ce n'est qu'en 2003, que l'on a commencé à parler d'une mort programmée distincte de l'apoptose : la nécrose programmée ⁷⁸, et en 2005 qu'a été évoquée la nécroptose⁷⁹.

Ainsi, lorsque les caspases sont inhibées, la cellule forme un nouveau complexe nommé nécrosome (Figure 9). Ce dernier est constitué, entre autres, de RIPK1 permettant le recrutement d'une autre protéine kinase : RIPK3 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) ^{80,81}. Cette dernière recrute et induit la phosphorylation de la pseudokinase MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like*) ^{82,83}. Cette pseudo-kinase s'oligomérisse et transloque au niveau de la membrane cellulaire, où elle formera des pores et induira alors une perméabilisation de la cellule ⁸⁴.

Mis à part une signalisation par TNF, Fas-L ou TRAIL, la nécroptose peut également être induite par la voie des IFN I et II, et plus spécifiquement lorsque RIPK1 est clivée par la CASP8, et ne peut pas être recrutée (Figure 9) ⁸⁵⁻⁸⁷. En effet, l'IFN induit la protéine ZBP1 (*Z-DNA-binding protein 1*) capable de recruter RIPK3 et d'activer la mort cellulaire par nécroptose ^{87,88}. De la même façon, la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes par les récepteurs PRR (*Pattern recognition receptor*) peut induire cette voie de mort en recrutant la protéine TRIF (*Toll/interleukin1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN- β*) capable également d'activer RIPK3.

3. Pyroptose

Tout comme la nécroptose, la pyroptose est une forme de mort programmée lytique, induisant la libération du contenu intracellulaire ⁶⁵. La première observation de cette mort a été réalisée en 1992, lorsque A. Zychlinsky *et al*, infectent des macrophages avec la bactérie *Shigella flexneri* et observent alors une mort des cellules par lyse ⁸⁹. Cependant, à ce moment-là, les auteurs parlent encore d'apoptose. Ce n'est qu'en 2001, que des chercheurs nomment cette mort cellulaire la pyroptose ⁹⁰.

Cette mort a principalement été observée au niveau des macrophages et des monocytes, mais également dans certaines cellules épithéliales ⁹¹. Jusqu'à récemment, l'induction de la pyroptose était encore méconnue. Un groupe a montré que le clivage par la CASP1 de la protéine gasdermine D (GSDMD) est nécessaire à sa réalisation ⁹². Lorsque la cellule répond à un stress externe ou endogène, une plateforme de signalisation nommée inflammasome se forme (Figure 9). Ainsi ce complexe, composé de molécules senseurs tels que NLRP1b, NLRP3, NLRC4, AIM2 et Pyrin, active à son tour la CASP1. Une fois clivée, la GSDMD forme des pores au niveau de la membrane plasmique, induisant une mort nécrotique.

Des études ont également montré que d'autres GSDM peuvent être clivées et induire la pyroptose. Ainsi, alors que la GSDMD peut être clivée par les CASP1, CASP4/5 ou CASP8^{92,93}, la GSDME peut être clivée par les CASP3 et 8⁹⁴.

4. Ferroptose

Mort cellulaire encore mal comprise, la ferroptose est caractérisée comme une forme de « sabotage » cellulaire causé par une forte accumulation de fer et la peroxydation des lipides membranaires. Elle n'est caractérisée qu'en 2012, lorsqu'un groupe propose le concept d'une mort dépendante du fer⁹⁵. Il est assez difficile de définir les éléments déclencheurs de la ferroptose, cependant deux événements sont nécessaires : 1) une modification oxydative des acides gras polyinsaturés (*Polyunsaturated fatty acids* ; PUFA) et 2) l'inhibition de la glutathion peroxydase 4, la seule enzyme capable de détoxifier les PUFA (Figure 9).

En effet, la ferroptose est caractérisée par la production d'un excès de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* ; ROS) et d'un métabolisme ferrique suractivé. De plus, une diminution du pool de glutathion est aussi observée. Les mécanismes sous-jacents sont encore mal compris. Cette mort est intéressante, car décrite dans différentes pathologies, notamment les cancers.

5. TRIM21 : un modulateur positif des morts programmées

Comme défini plus haut, TRIM21 joue un rôle important dans la protection des cellules hôtes contre d'éventuels pathogènes. Ce n'est donc pas étonnant que TRIM21 soit également décrite dans la littérature comme étant un modulateur des voies de mort, mécanismes souvent enclenchés suite à une infection.

Ainsi TRIM21 a été décrite comme un modulateur positif dans différentes voies de mort programmée. Des études *in vitro* décrivent par exemple, que lors d'une apoptose induite par le ligand TRAIL, TRIM21 est surexprimée, induisant alors une diminution d'expression de la protéine c-FLIP, un anti-apoptotique impliqué dans la voie extrinsèque de l'apoptose. À l'inverse, l'inhibition de cette E3 ubiquitine ligase induit une surexpression de c-FLIP²⁶. La répression de cette dernière a lieu au niveau transcriptionnel, médiée par la voie NF- κ B. En parallèle, une autre équipe de recherche montre également que TRIM21 inhibe l'expression d'un autre anti-apoptotique, BCL-2, dans des cellules HeLa traitées avec de l'H₂O₂²⁵. Ainsi, l'absence de TRIM21 semble conférer à la cellule une certaine résistance à l'apoptose.

Plus récemment, une étude démontre l'implication de TRIM21 dans une autre voie de mort programmée : la pyroptose. En effet, TRIM21 a été identifiée comme un nouveau régulateur de la GSDMD, un des effecteurs principaux de cette voie de mort cellulaire²⁹. Ainsi, la répression génique de TRIM21 dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM^{TRIM21-/-}), protège ces derniers de la pyroptose. Des études *in vivo* complémentaires confirment également cette résistance. Il semblerait que TRIM21 se lie à la GSDMD via son domaine PRY-SPRY, pour former un complexe stable, et favoriser l'activation rapide de la pyroptose²⁹.

Bien qu'encore mal défini, TRIM21 serait également impliquée dans la ferroptose. Des données *in vivo* montrent que les souris *Trim21*^{-/-} sont protégées de la cardiotoxicité induite par un traitement de chimiothérapie utilisant la doxorubicine. En effet, le traitement semble induire une élévation des ROS et une induction de la ferroptose, menant donc à une cardiotoxicité³⁰. Or chez les souris *Trim21*^{-/-}, la voie NRF2 anti-oxydante est activée, permettant ainsi de réduire les dommages oxydatifs induits par les ROS et donc d'inhiber le mécanisme de ferroptose. Une étude antérieure du même groupe avait, en effet, démontré l'implication de TRIM21 dans l'inhibition de la voie anti-oxydante⁹⁶. Ce mécanisme sera présenté plus bas.

De façon intéressante, au cours de cette thèse, nous avons également démontré pour la première fois, le rôle de TRIM21 en tant que modulateur positif de la nécroptose induite par TRAIL par des approches *in vitro*²⁷. Ces données sont présentées dans la section *Résultats (1)* de ce manuscrit.

C. La dualité de TRIM21 dans les cancers

Outre le rôle de TRIM21 dans la réponse antivirale, l'inflammation et la mort cellulaire, différents indices semblent souligner l'implication de cette E3 ubiquitine ligase dans d'autres voies, souvent dérégulées dans le cancer. Tout comme pour l'inflammation, les données montrent un rôle parfois opposé selon les acteurs moléculaires impliqués.

1. TRIM21 : un rôle favorisant la progression du cancer

Le rôle oncogène de TRIM21 dans la progression du cancer a été observé dans différentes études^{7,97}.

En effet, TRIM21 peut interagir avec certaines protéines « suppresseurs » de tumeur et favoriser ainsi la progression tumorale. Par exemple, dans le cancer du poumon, il a été montré que l'E3 ubiquitine ligase est recrutée au sein d'un complexe afin d'inhiber C/EBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein*)⁹⁸, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation et le développement des cellules cancéreuses pulmonaires^{98,99}. Ainsi, C/EBP α est dégradée par une ubiquitination médiée par l'E3 ubiquitine ligase TRIM21, induisant un état indifférencié et initiateur de tumeur. D'autres études, dans le cancer du pancréas, ont également décrit l'interaction entre TRIM21 et un autre suppresseur de tumeur, Par-4 (*Prostate apoptosis response 4*). De la même façon, cette interaction semble induire une dégradation de Par-4 via le protéasome. De plus, les résultats démontrent que la surexpression de TRIM21 induit, en réprimant Par-4, une résistance au traitement de chimiothérapie par le cisplatine. Ainsi les patients atteints d'un cancer de pancréas exprimant faiblement TRIM21 présentent un meilleur pronostic de survie¹⁰⁰. Le même mécanisme de résistance au traitement peut être retrouvé dans le cancer du nasopharynx¹⁰¹, après radiation. En effet, TRIM21 s'associe à un complexe de dégradation et facilite la répression d'un suppresseur de tumeur p53. Par ailleurs, un autre groupe de recherche montre que, suite à des dommages à l'ADN induits par des radiations aux UV, TRIM21 ubiquitine et entraîne la dégradation de la protéine HuR

(*Human antigen R*)^{102,103}. Or cette dernière induit l'expression de la protéine suppresseur de tumeur, p53. Ainsi, en plus de conférer une résistance à certains traitements, TRIM21 semble réguler négativement l'expression de p53 à différents niveaux, et jouer un rôle pro-oncogénique dans différents types de cancers.

Bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas définis, un groupe décrit également le rôle de TRIM21 dans la régulation positive de la prolifération des cellules d'ostéosarcome, et, de façon étonnante, dans la résistance cellulaire à différents stress tels que le traitement par le ligand de mort TRAIL¹⁰⁴.

Comme précisé plus haut, un groupe décrit l'implication de TRIM21 dans une autre voie souvent dérégulée dans le cancer : la voie anti-oxydante NRF2¹⁰⁵. En condition physiologique, NRF2 (*Nuclear E2-related facteur 2*) est séquestrée au niveau du cytoplasme par Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Lors d'un stress oxydatif, la protéine p62 se dimérise et séquestre Keap1, libérant ainsi la protéine NRF2. Cette dernière joue le rôle d'un facteur de transcription qui active alors l'expression de gènes anti-oxydants. Une étude montre que TRIM21 est capable d'ubiquitiner p62, empêchant sa dimérisation, prévenant ainsi l'expression des gènes anti-oxydants⁹⁶. Dans une deuxième étude, ce même groupe démontre alors sur un modèle *in vivo* d'induction du carcinome hépatocellulaire par la diéthylnitrosamine (DEN) et le phénobarbital (PB), que les souris *Trim21*^{-/-} sont protégées de la carcinogénèse, via la modulation de cette voie anti-oxydante¹⁰⁶.

Cette modulation négative de la voie NRF2 au travers de l'expression de TRIM21 a également été retrouvée dans le cancer de la vessie¹⁰⁷.

2. TRIM21 : un rôle suppresseur de tumeur

D'autres données montrent cependant TRIM21 comme un frein à la progression tumorale⁹⁷.

Ce rôle de suppresseur de tumeur est le mieux défini au niveau du cancer du sein, où TRIM21 module négativement les voies de prolifération et migration cellulaire. En effet, une étude montre que les patientes atteintes de cancer du sein exprimant faiblement TRIM21 ont un plus mauvais pronostic de survie¹⁰⁸. Ainsi, un groupe démontre que TRIM21 dégrade SALL4 (*Sal-like 4*), un facteur de transcription favorisant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein¹⁰⁹. De plus, une autre étude démontre également que TRIM21, en dégradant le facteur de transcription Snail (*SNAI1*), abolit la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un autre mécanisme impliqué également dans la carcinogénèse et la prolifération des cellules tumorales¹¹⁰. Par la suite, ils décrivent une mutation de TRIM21 retrouvée dans le cancer du sein, inhibant l'interaction entre l'E3-ubiquitine ligase et la protéine Snail, et donc la dégradation de cette dernière¹¹¹. En somme, l'absence de TRIM21 favorise la progression tumorale en modulant positivement les voies de prolifération, de migration et la TEM dans le cancer de sein.

Ces mécanismes sont également retrouvés dans d'autres cancers, comme dans la carcinogénèse épithéliale colique par exemple, où l'E3 ubiquitine ligase module

négativement non seulement la prolifération cellulaire, mais également l'adhésion, le remodelage tissulaire et la réponse pro-inflammatoire ¹¹². Ou encore dans le lymphome diffus à grandes cellules B ^{61,113}, où il est observé qu'une faible expression de TRIM21 chez les patients atteints d'un lymphome à cellules B est associée à un mauvais pronostic ¹¹³. En effet, en utilisant un modèle murin *Trim21*^{-/-} développant une pathologie auto-immune, un groupe montre le rôle de TRIM21 dans la prolifération des cellules B et la résistance à l'apoptose ⁶¹.

Outre la prolifération et la résistance à la mort des cellules, des données semblent indiquer l'implication de TRIM21 dans la régulation de certaines voies métaboliques également. En effet, une équipe montre que TRIM21 dégrade FASN (*Fatty acid synthetase*), une enzyme impliquée dans la lipogenèse *de novo* ¹¹⁴. Plus récemment, des travaux montrent plus spécifiquement que la modulation par TRIM21 de la voie de métabolisation des lipides dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), passe par la dégradation des enzymes FASN et GNPAT (*Glyceronephosphate O-acyltransferase*) ¹¹⁵. Ainsi, les patients atteints de CHC présentent au sein de leurs tumeurs une expression protéique de TRIM21 diminuée. Cette donnée rejoint les travaux de Ding *et al* ¹¹⁶, qui décrivent un cancer plus agressif et un plus mauvais pronostic de survie chez les patients CHC exprimant faiblement les ARN messagers de TRIM21 dans leurs tumeurs. Cependant, les auteurs supposent que ces observations sont plutôt dues à une modulation par TRIM21 des voies de mort et de l'immunité ¹¹⁶.

Plus récemment, des études montrent l'interaction entre TRIM21 et des points de contrôle immunitaire appelé également « *immune checkpoints* » ^{117,118}. Ces derniers jouent un rôle important dans l'inhibition d'une réponse inflammatoire aberrante. Cependant dans certains cancers, ces immune checkpoints sont utilisés au profit des cellules tumorales, et l'immunité anti-tumorale se retrouve ainsi inhibée. Une étude sur la résistance des cellules pulmonaires cancéreuses aux radiations avait démontré l'existence, par une technique d'immunoprécipitation, d'une interaction entre TRIM21 et l'immune checkpoint PD-L1 ¹¹⁸. Plus tard, un autre groupe reproduit ce même résultat sur des lignées cellulaires du poumon, et démontre que cette interaction induit une ubiquitination et une dégradation de PD-L1 via le protéasome ¹¹⁷. Ceci laisse supposer que TRIM21 pourrait jouer un rôle dans l'immunité anti-tumorale, mécanisme souvent dérégulé dans les cancers. Aucune donnée n'existe encore sur la modulation des immune checkpoints par TRIM21 dans d'autres cancers.

En résumé, de par son implication dans différentes voies de signalisation, souvent dérégulées dans les cancers ¹¹⁹, TRIM21 suscite aujourd'hui l'intérêt de la communauté scientifique. Certaines études proposent TRIM21 comme étant un biomarqueur et une cible thérapeutique prometteuse ^{97,116}. Cependant, les données sont disparates et les mécanismes, autres qu'antiviraux, restent très peu décrits.

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de cette E3 ubiquitine ligase dans le développement du carcinome hépatocellulaire dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique, une pathologie à très mauvais pronostic et aux traitements limités.

III. Carcinome hépatocellulaire (CHC)

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente plus de 80% des cancers primitifs du foie et est l'une des causes principales de décès par cancer. L'incidence et la mortalité liées au CHC varient fortement dans le monde, allant de <3 à >8/100 000 personnes/an, notamment dues aux différences d'expositions à des facteurs de risque environnementaux et infectieux, selon l'accès aux soins ainsi qu'à la possibilité de détection précoce pour prodiguer en phase initiale de la pathologie des traitements curatifs ¹²⁰. Malgré la baisse de l'incidence de différents cancers majeurs, l'incidence du cancer du foie ne cesse d'augmenter dans le monde ¹²¹. À ce jour, si le CHC est détecté précocement, il est possible de le traiter par une ablation locale, par chimio-embolisation ou encore par une transplantation hépatique. Les traitements prodigués varient selon les caractéristiques et la sévérité de la tumeur, ainsi que selon d'autres facteurs tels que les comorbidités associées ou encore les dysfonctionnements hépatiques sous-jacents. Des traitements locaux de chimio- et/ou de radio-thérapies sont utilisés pour les patients en phase intermédiaire, alors que des inhibiteurs de kinases ou des inhibiteurs d'« immune checkpoints » seront choisis pour les patients à des stades plus avancés du CHC. Cependant, la survie après traitement reste disparate et faible (3 mois dans certains pays africains, 24 mois en Europe ou encore 60 mois de survie après traitement dans certains pays d'Asie tels que le Japon), d'où la nécessité grandissante d'une meilleure compréhension de la progression des maladies aboutissant au CHC ¹²⁰. Il existe différentes étiologies de mieux en mieux caractérisées et pour la plupart associées à une inflammation hépatique chronique (Figure 10).

A. CHC : les facteurs de risques

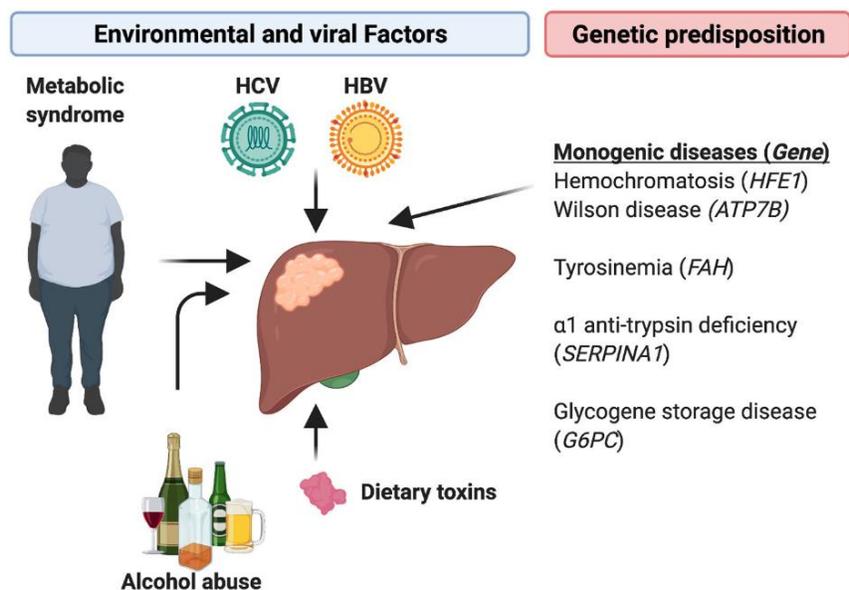


Figure 10: Les différents facteurs de risque de développement du CHC ¹²² – Il existe des facteurs environnementaux ou génétiques

Le CHC est caractérisé par une forte hétérogénéité phénotypique et moléculaire. Dans 80 à 90% des cas, le CHC se développe dans un microenvironnement inflammatoire dû étiologiquement à l'exposition à différents agents, tels que des toxines, des virus, de l'alcool. Un environnement inflammatoire peut aussi être associé à des pathologies métaboliques qui favorisent le CHC comme le diabète, l'obésité ou la stéatose hépatique non alcoolique (Figure 10). Dans ces contextes physiopathologiques, le cancer du foie évolue à partir d'une stéatose puis d'un processus de fibrose en présence ou non de cirrhose (10 à 30% selon l'étiologie) ¹²⁰. Dans plus de 90% des cas, le diagnostic est associé à la présence préalable d'une cirrhose. Cependant, on parle aussi de CHC « *de novo* » qui a lieu dans un petit pourcentage de patients (10 à 20%) sans fibrose ou cirrhose. Ici, nous ne présenterons que les principaux facteurs de risque de développer un CHC.

1. Les hépatites virales

Il existe différentes hépatites virales dues à des infections par des virus hépatotropes. À ce jour, 5 virus sont décrits : virus de l'hépatite A (VHA), B (VHB), C (VHC), D (VHD) et E (VHE). Les infections chroniques au VHB ou au VHC sont les causes majeures de CHC et représentent 80% des cas. Le VHB est la cause principale des CHC dans les pays d'Asie de l'Est et dans la plupart des pays africains (en dehors des pays du Maghreb). Dans le monde, 257 millions d'individus sont atteints d'une infection par le VHB et il est estimé qu'entre 2015 et 2030, 20 millions de décès seront dus à une hépatite aiguë ou chronique, ou à une cirrhose ou un CHC causés par le VHB, avec 5 millions de cas liés à un CHC. Alors que dans les pays d'Amérique du Nord, d'Europe, du Maghreb et dans certains pays d'Asie, le VHC est la cause principale des CHC. Il est estimé que 57 millions de personnes sont touchées par le VHC, dont 10 à 20% vont développer des pathologies hépatiques, dont une cirrhose et un CHC.

2. Les hépatites alcooliques

Une consommation excessive et chronique d'alcool peut induire des pathologies alcooliques du foie, dont une cirrhose. Cette dernière peut progresser vers un CHC. Selon la région géographique, 15 à 30% des développements de CHC surviennent suite à une cirrhose alcoolique ¹²³. Certaines études ont montré qu'une consommation chronique d'alcool associée à des hépatites virales augmente le risque de développement d'un CHC ¹²⁴.

3. Les hépatites métaboliques

Des données récentes, incluant en tout 8,5 millions de patients dans 22 pays différents, montrent que 25,24% des patients présentaient une stéatohépatite non-alcoolique (*Non-alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD*). Ainsi, les pathologies hépatiques les plus fréquentes dans le monde sont aujourd'hui les NAFLD ¹²⁵. Ces dernières représentent un spectre de pathologies hépatiques chroniques caractérisées par une rétention cytoplasmique excessive de triglycérides. Ces conditions varient de cellules

hépatiques accumulant des triglycérides et induisant une stéatose (*Non-alcoholic Fatty Liver*, NAFL) à une accumulation de triglycérides hépatiques accompagnée d'une inflammation et de lésions au niveau des hépatocytes (*Non-alcoholic steatohepatitis*, NASH). La pathologie peut ensuite évoluer en une fibrose, une cirrhose et enfin progresser vers un CHC (Figure 11). En effet, une étude montre que le risque de CHC est 2,6 fois plus important chez les patients atteints d'une NASH ¹²⁶(Figure 11). De plus, le diabète et l'obésité, facteurs de risques majeurs des NAFLD, sont également associés à 2 voire 3 fois plus de risques de développement du CHC (Figure 11). La physiopathologie des NAFLD sera détaillée plus bas.

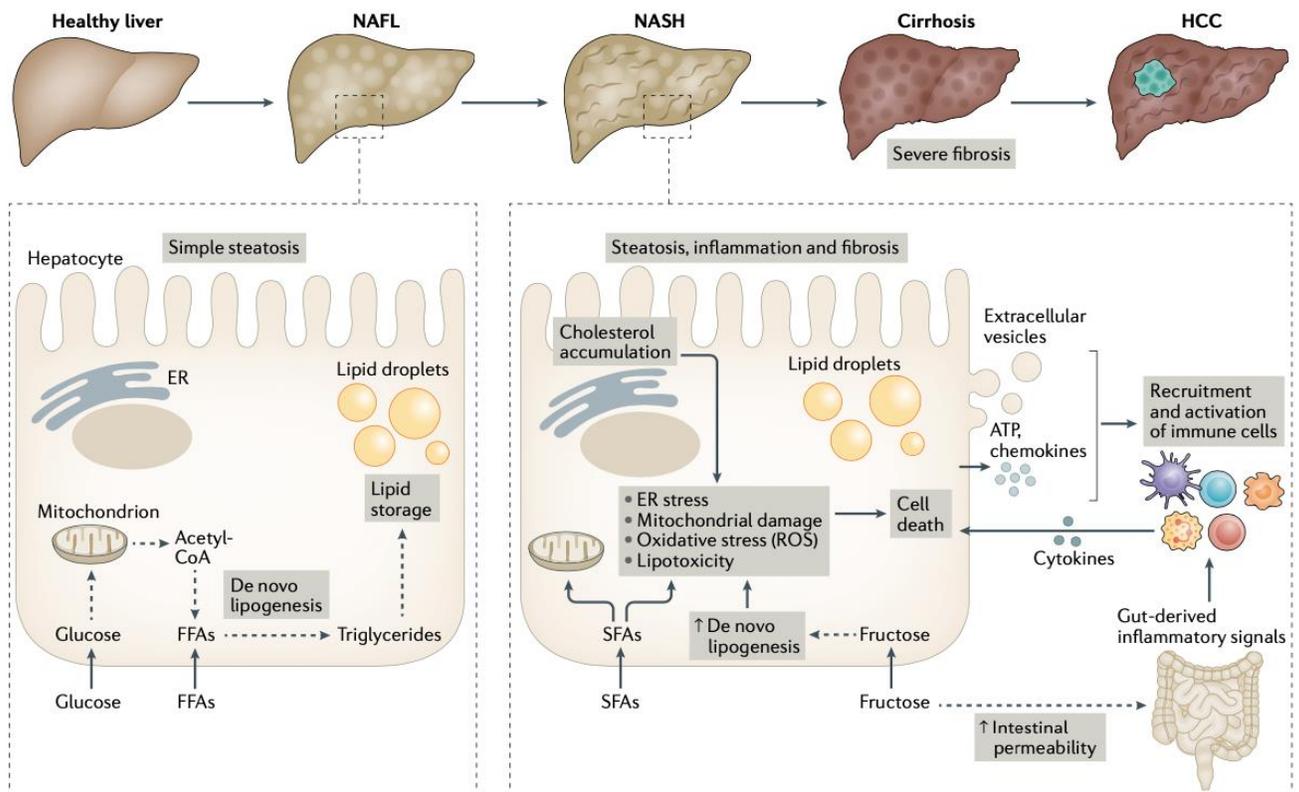


Figure 11: **Les pathologies NAFLD et leurs évolutions vers un CHC** ¹²⁷ – L'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes induit différents mécanismes menant de la stéatose à la NASH.

Les différentes lésions chroniques induites par les hépatites virales, la surconsommation d'alcool ou l'accumulation de triglycérides favorisent un état inflammatoire persistant dans le foie. Cette chronicité dérégule le système immunitaire et induit l'« épuisement fonctionnel » des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T. Ce mécanisme est d'autant plus favorisé par l'environnement hépatique physiologiquement immunosuppresseur, qui affaiblit l'immunité ¹²⁸.

B. CHC : un environnement hépatique immunosuppresseur propice

Bien que ce ne soit pas un organe lymphoïde secondaire classique, le foie présente un environnement unique pour le développement et la fonction de la réponse immunitaire adaptative. Malgré la richesse de cellules présentatrices d'antigène (*Antigen presenting cells, APC*), et l'habilité à recruter des cellules immunitaires différentes de façon rapide, la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative dans le foie peut prendre du temps. Ceci est dû notamment à la localisation et la fonction de l'organe. Jouant le rôle de filtre et sentinelle contre les pathogènes et motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen associated molecular pattern, PAMP*) pénétrant dans l'organisme via l'intestin par la veine porte, le foie est aussi le premier point de contact avec d'autres molécules physiologiques telles que celles dérivées de l'alimentation ou du microbiote (Figure 12). De ce fait, la réponse immunitaire dans le foie est finement régulée afin d'éviter l'activation d'une réponse inflammatoire contre des molécules exogènes non pathogènes ¹²⁸.

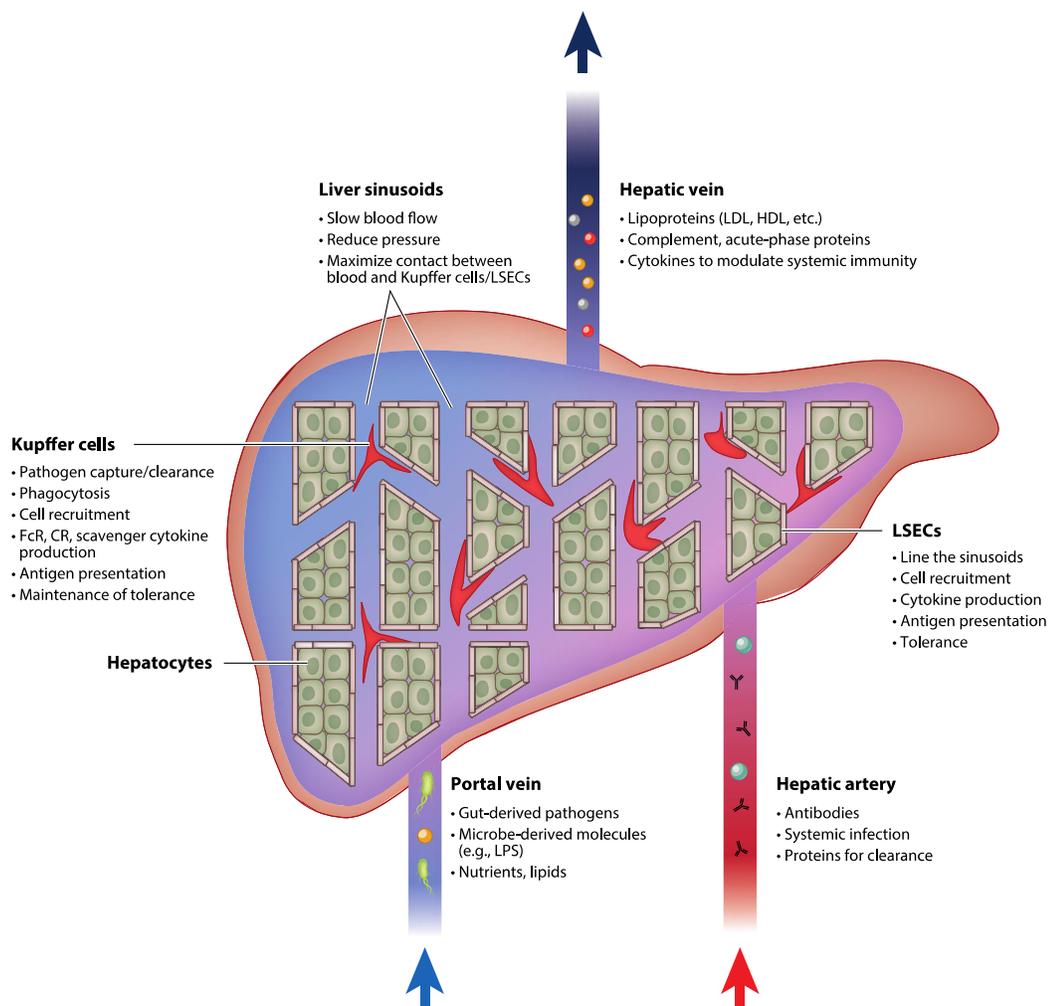


Figure 12: **Organisation anatomique du foie**¹²⁹ – La veine porte et l'artère passent toutes deux par le foie amenant molécules exogènes non pathogènes ainsi que non pathogène. Le foie présente donc un environnement tolérogène pour éviter une activation de l'inflammation sur les molécules non pathogènes.

Bien que capable d'activer les cellules effectrices lymphocytes T (LT), les APC, en conditions basales, présentent un profil immunosuppresseur ¹²⁸. Cet environnement immunosuppresseur est le mieux exemplifié par le succès des transplantations hépatiques ou l'exploitation de l'environnement hépatique par certains virus (Figure 13). Cette immunosuppression dans le foie peut être attribuée à l'interaction complexe entre les cellules hépatiques résidentes et la population de leucocytes périphériques. La plupart des cellules résidentes sont immunosuppresseuses en conditions basales de par l'absence d'expression de molécules co-stimulatrices, la faible expression du complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex, MHC*) et l'expression constitutive de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Figure 14). Il existe d'autres mécanismes d'inactivation tels que l'expression de PD-L1 par les APC (Figure 14). Alors que l'activation des LT dépend simultanément de la reconnaissance du MHC et de molécules co-stimulatrices comme BH7.1 ou BH7.2, l'inactivation ne dépendra que de la fixation du ligand PD-L1 au récepteur PD-1 sur les LT.

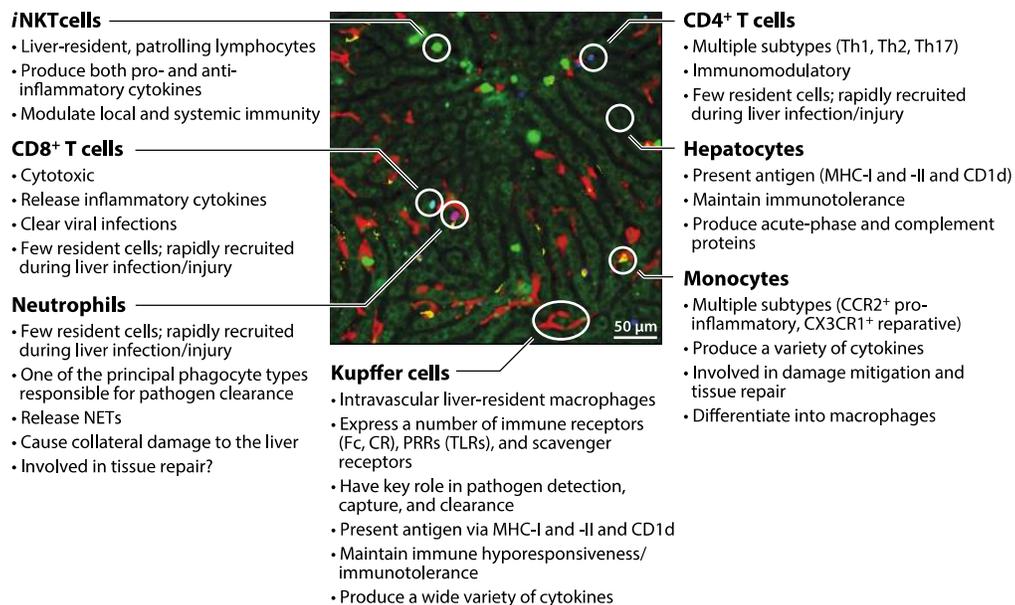


Figure 13: **Image de l'immunité hépatique.**¹²⁹ – Image de microscopie. On peut visualiser les différentes populations immunitaires du foie telles que LT CD8⁺ et CD4⁺, NK, neutrophiles, KCs, et monocytes.

Ainsi, de par cet état de faible immunité (Figure 13), le foie est un site commun de développement de cancer. Une fois le processus de tumorigenèse initié, l'environnement tolérogène et immunosuppresseur favorise la progression tumorale.

Parmi les principales cellules impliquées dans l'évasion tumorale du CHC, on peut citer les macrophages résidents (Kupffer cells, KCs)¹³⁰ ainsi que les macrophages dérivés de monocytes, les lymphocytes T et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (*myeloid-derived suppressor cells, MDSCs*)¹²⁸. Des analyses *multi-omics* dans le cancer du foie confirment la présence de ces cellules immunosuppresseuses, notamment les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}), mais également la présence de macrophages associés aux tumeurs (*Tumor-associated macrophages, TAM*) qui contribuent à la dérégulation immunitaire^{131–133}. Les cellules dendritiques (*dendritic cells, DCs*) et les lymphocytes T

CD8⁺, notamment dans le contexte de NASH¹³⁴, sont également retrouvés dérégulés. D'autres études montrent de la même façon l'implication des neutrophiles et les lymphocytes B parmi tant d'autres dans la progression du CHC.

Ces différentes cellules participent à l'inhibition de l'immunité innée et adaptative dirigée contre le CHC. Nous ne présenterons ici que le rôle des cellules immunitaires favorisant la progression du CHC (Figure 13).

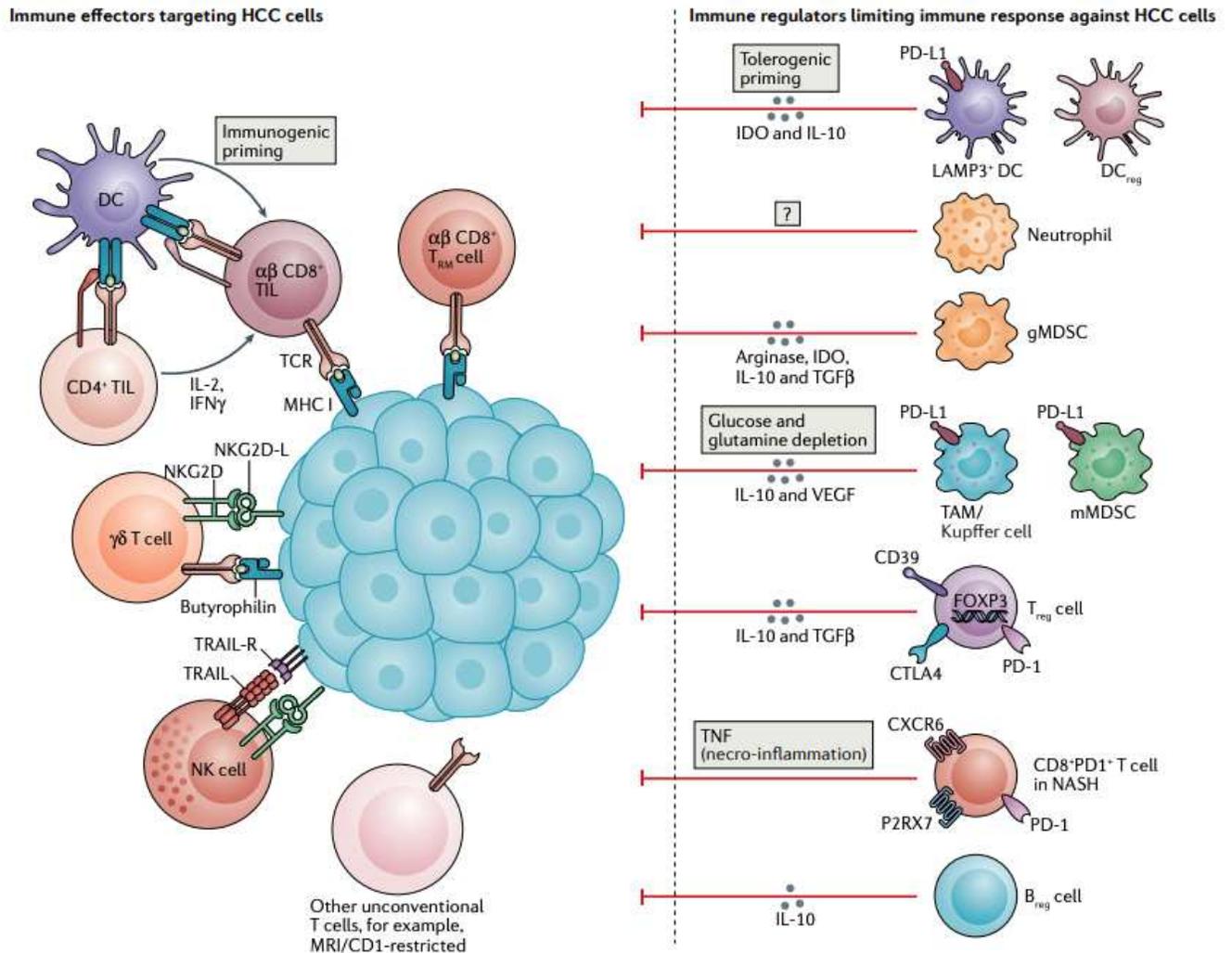


Figure 14: Rôle des cellules immunitaires dans la progression du CHC¹³⁵. À gauche, les cellules immunitaires activées contre le CHC et à droite, les cellules immunitaires inhibant la réponse immunitaire contre le CHC.

Les cellules de Kupffer (KCs) constituent 90% des macrophages hépatiques. Ces dernières et d'autres TAMs contribuent à la carcinogénèse hépatique et à l'évasion immunitaire par différents mécanismes comme l'expression du point de contrôle immunitaire ou immune checkpoint PD-L1 et par le recrutement des lymphocytes T_{reg} CD4⁺FOXP3⁺ entre autres^{128,130,136}. De plus, des études montrent une corrélation entre la présence des TAMs et un mauvais pronostic de survie chez les patients avec un CHC¹³².

En temps normal, les cellules MDSCs se différencient soit en macrophages, en DC ou granulocytes. Cependant durant la carcinogenèse, les MDSCs prolifèrent et jouent un rôle d'inhibiteur des lymphocytes T, en surexprimant PD-L1 ou en produisant le facteur de croissance de vascularisation endothéliale (*Vascular endothelial growth factor, VEGF*) ou le facteur de croissance transformant β (*Transforming growth factor β , TGF β*)¹²⁸.

Les DCs, qui représentent 15% des cellules mononuclées circulantes, contribuent également à l'immunosuppression en produisant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10¹³⁷. Il existe un large spectre de sous-types de DCs, permettant une modulation fine des LT. Par exemple, certains DCs expriment de façon constitutive le marqueur PD-L1 dans le foie, contribuant également à l'inactivation des LT.

En ce qui concerne les lymphocytes B, des rôles opposés ont été décrits. D'une part, ces cellules créent un environnement immunosuppresseur en produisant des cytokines anti-inflammatoires et d'autre part, produisent des anticorps anti-tumoraux capables d'activer les lymphocytes T¹³⁷⁻¹³⁹.

Cet environnement immunosuppresseur est contrebalancé par la présence de cellules activant la réponse antitumorale^{140,141} (Figure 13). Parmi ces derniers, les lymphocytes T CD8+ sont les effecteurs principaux de cette immunité. En effet, les cellules CD8+ résidentes ainsi que les CD8+ circulantes sont importantes dans le contrôle de la progression du CHC^{142,143}. De plus, les cellules *Natural Killer* (NK), effectrices de l'immunité innée, ont également un rôle dans l'immunosurveillance du CHC. Cependant, leur activité anti-tumorale est souvent abolie par une dérégulation fonctionnelle et métabolique impactant leur motilité dans le CHC¹⁴⁴.

Ces dernières années, les avancées technologiques telles que le *Single-Cell*, a permis une meilleure caractérisation du microenvironnement immunitaire dans le CHC et mis en avant des pistes prometteuses pour les traitements¹²².

C. CHC : les traitements disponibles selon le stade du cancer

Le stade tumoral, les dysfonctionnements hépatiques sous-jacents et la condition physique du patient conditionnent les lignes directrices des décisions cliniques dans le traitement du carcinome hépatocellulaire¹⁴⁵. La classification clinique de Barcelone pour le cancer du foie (*Barcelone Clinic For Liver Cancer, BCLC*) définit 5 stades d'évolution de la pathologie (BCLC 0, A, B, C et D) et détermine ainsi les traitements respectifs associés¹⁴⁵ (Figure 15). De façon générale, des traitements dits curatifs tels que la résection, l'ablation ou la transplantation sont préconisés chez les patients à des stades précoces du CHC (BCLC 0 ou A). Les patients au stade BCLC B et dont les fonctions hépatiques sont conservées et seront traitées par la chimioembolisation transartérielle (TACE). Les patients au stade BCLC C recevront un traitement systémique. Pour le stade le plus avancé (BCLC D), il ne pourra être proposé que des traitements dits palliatifs.

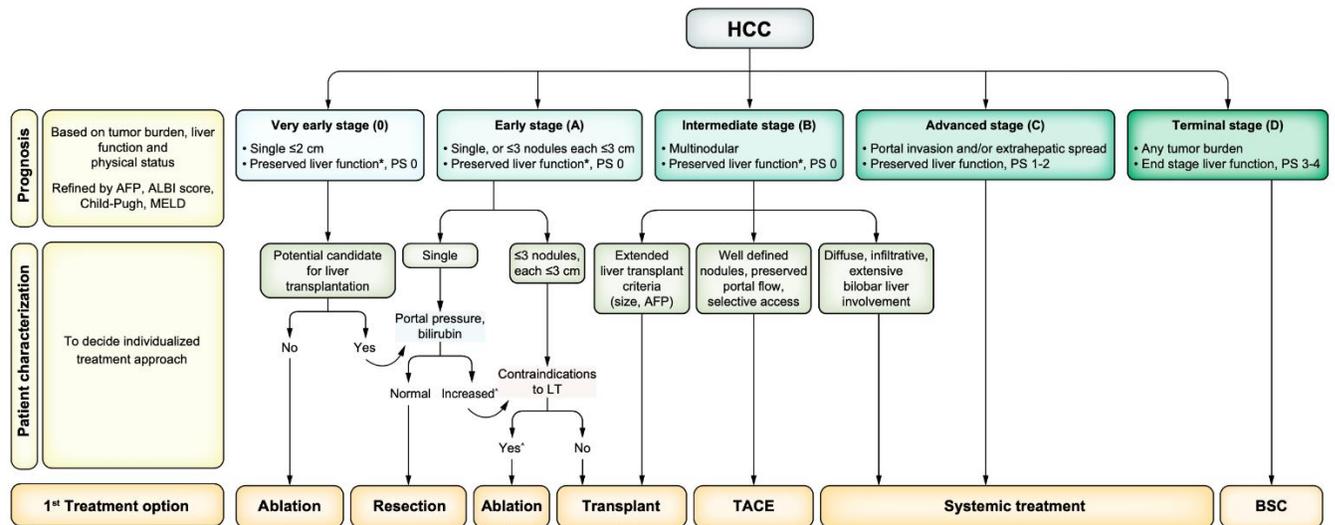


Figure 15: L'algorithme du "Barcelona Clinic for Liver Cancer" (BCLC)¹⁴⁵ - Protocole décrivant les traitements à prodiguer aux patients selon le stade du CHC.

1. Les thérapies systémiques

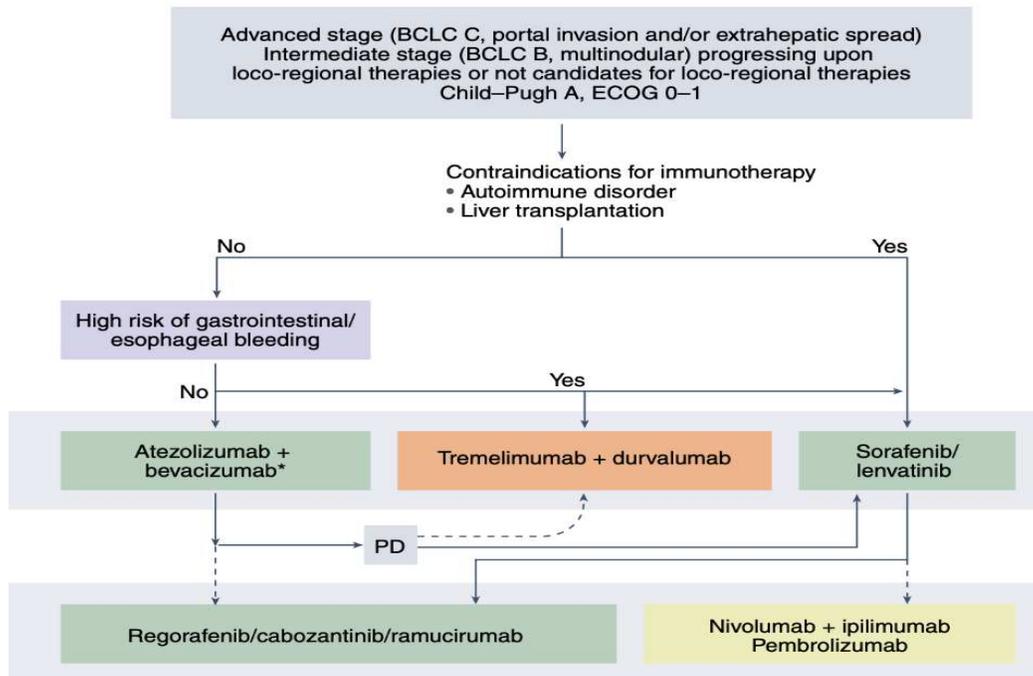


Figure 16: Les thérapies systémiques aux stades avancés du CHC¹⁴⁶

Avec les différentes avancées et une meilleure caractérisation des CHC, les thérapies proposées ne cessent d'évoluer. Le sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase (TK), est le premier traitement systémique validé¹⁴⁷. Depuis, 6 nouveaux traitements, dont des inhibiteurs de TK ou des inhibiteurs de facteurs de croissance, ont été approuvés

par les autorités compétentes (*bevacizumab, sorafenib, lenvatinib, regorafenib, cabozantinib et ramucirumab*) (Figure 16 et 17). Ces thérapies sont utilisées en première ou deuxième ligne de traitement, en monothérapie ou en combinaison avec différents agents, notamment les immunothérapies ¹⁴⁶.

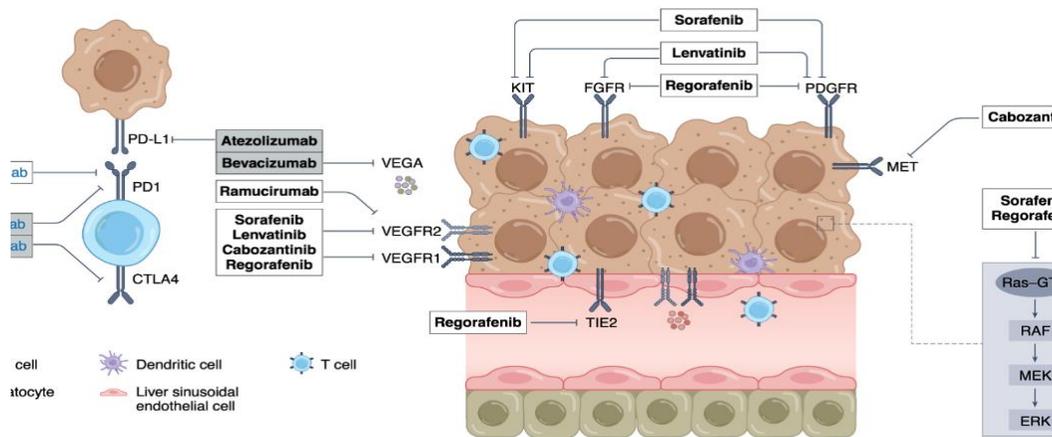


Figure 17: Les cibles moléculaires des traitements systémiques ¹⁴⁶

2. Les immunothérapies

Les traitements par immunothérapie sont les plus étudiés et représentent l'une des pistes prometteuses pour traiter le CHC (Figure 18). Il est devenu clair que l'efficacité de ces stratégies de modulation du système immunitaire dépend de la présence d'une réponse immunitaire basale et de l'activation d'une immunité préexistante. ¹⁴⁸

a) Principe des immunothérapies

Il existe différents mécanismes permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à l'immunité anti-tumorale. L'un de ces mécanismes est l'acquisition de l'expression du ligand immune checkpoint PD-L1 à la surface des cellules tumorales, ces dernières sont alors capables d'inhiber les lymphocytes T exprimant le récepteur immune checkpoint associé PD-1, et d'échapper ainsi à la surveillance immunitaire. Les immunothérapies consistent à augmenter et/ou rétablir un système immunitaire capable d'éliminer les cellules cancéreuses ¹⁴⁹.

Des études montrent que les patients avec un CHC surexpriment les marqueurs PD-1/PD-L1, favorisant un environnement immunosuppresseur et donc la progression du cancer. De plus ces patients présentent à la surface de leurs cellules T, une augmentation d'expression d'autres marqueurs d'immune checkpoint tels que TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*) et CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) ¹⁴⁹. L'expression de ces marqueurs et l'inactivation des LT constitue « l'épuisement fonctionnel ».

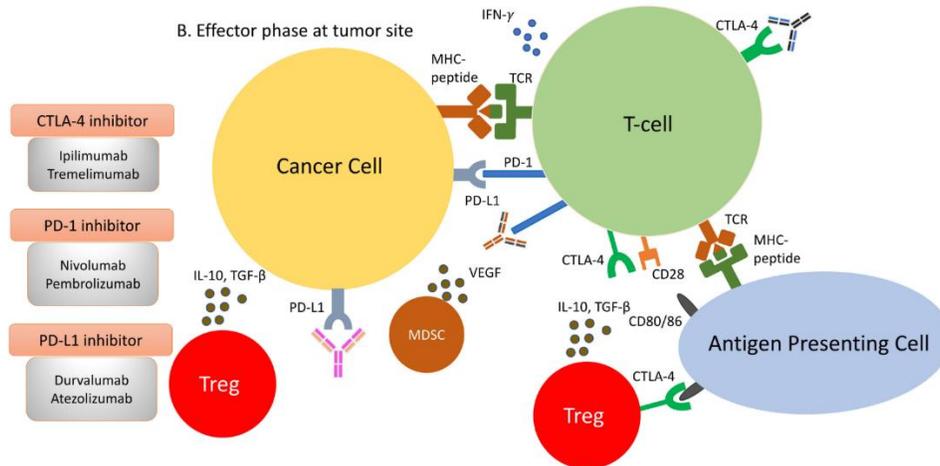


Figure 18: Les immunothérapies ciblant les points de contrôle immunitaire¹⁵⁰

b) Cas paradoxal des patients à étiologie NASH

De façon assez surprenante, une étude récente montre que le cancer évoluant dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique (NASH-CHC) ne semble pas répondre aux immunothérapies¹⁵¹. En utilisant un modèle murin sous régime gras développant un CHC, Pfister *et al*, montrent que les souris présentent une augmentation de lymphocytes CD8⁺ et CD4⁺ exprimant le marqueur PD-1. À première vue, ces données laissent penser qu'un traitement anti-PD-1 sera bénéfique, pourtant les résultats obtenus suite au traitement démontrent l'inverse¹⁵¹. Par la suite, les auteurs ont mené une méta-analyse sur les effets des immunothérapies sur les patients développant un CHC, en différenciant les étiologies. Ainsi, les patients NAFLD recevant une immunothérapie présentent un taux de survie plus bas par rapport aux autres patients. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues sur les souris¹⁵¹. Cette étude souligne donc l'inefficacité des traitements anti-PD-L1 /PD-1 chez les patients présentant un CHC d'étiologie NASH (Tableau 1).

Tableau 1: Comparaison des effets des traitements sur les CHC à étiologie NAFLD et non NAFLD (inspiré de¹⁵²)

Traitements	Effet du traitement chez les patients NAFLD-CHC comparé aux non NAFLD-CHC	Le type d'analyse
Résection du foie	Meilleur	Analyse rétrospective et méta-analyses
Transplantation hépatique	Probablement similaire	Analyse rétrospective et méta-analyses
Ablation	Probablement similaire	Analyse rétrospective
TACE	Probablement similaire	Analyse rétrospective
Irradiation sélective	Probablement similaire	Analyse rétrospective
Inhibiteur à Tyrosine kinases	Probablement similaire	Étude de cohorte
Immunothérapies	Probablement pire	Analyse rétrospective et méta-analyses

Ces données poussent la communauté scientifique à mieux différencier les étiologies et à essayer de comprendre les mécanismes sous-jacents, afin de définir des biomarqueurs capables de prédire les patients qui répondront à l'immunothérapie. Malgré les différentes avancées thérapeutiques dans le domaine du CHC ayant permis, entre autres, de développer une vaccination et une thérapie antivirale dans le contexte des hépatites virales, l'incidence du CHC dans un contexte de NASH augmente de façon surprenante et les traitements aux stades avancés de la pathologie sont très limités.

IV. Le CHC se développant dans un contexte NASH (NASH-CHC)

A. La pathogenèse de la NASH

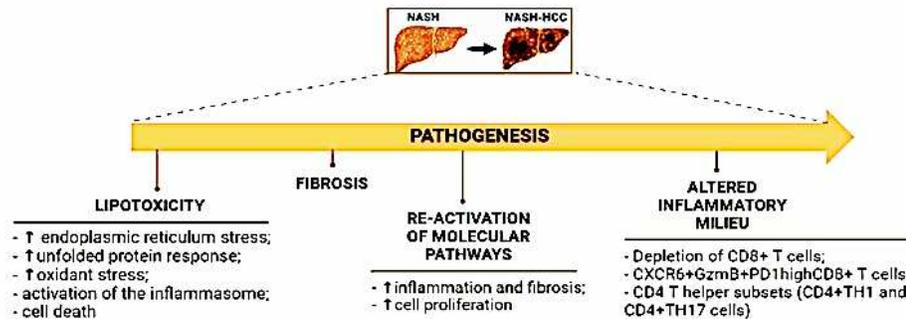


Figure 19: Pathogenèse de la NASH-CHC (Figure adaptée de Llovet et al. 2022)

La NASH est une pathologie multifactorielle complexe et son étiologie spécifique n'est pas encore bien comprise. De façon générale, différents facteurs favorisent le développement caractéristique d'une stéatose, de lésions hépatiques et de l'inflammation (Figure 19). Ces derniers, combinés, mènent au développement de la fibrose puis parfois du CHC. La stéatose, dans la plupart des cas, est un évènement précurseur des NAFLD, mais n'évolue pas forcément vers une NASH. Des stress additionnels sont nécessaires, tels que la lipotoxicité, le stress oxydant et l'inflammation. Ensemble, ces derniers favorisent la mort des hépatocytes, l'inflammation et le développement de la fibrose (Figure 19).

La stéatose, caractérisée par l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, peut provenir des acides gras libres libérés lors de la lipolyse ou de la lipogenèse *de novo* au niveau du foie¹⁵³. De plus, des études récentes montrent que l'alimentation riche en cholestérol accélère le développement de la NASH et la progression vers un CHC dans des modèles murins^{154,155}.

Le stress induit par les lipides peut mener à des lésions hépatiques en sensibilisant les hépatocytes à la mort cellulaire telle que l'apoptose, la nécroptose, la pyroptose ou encore la ferroptose^{156,157}. Par exemple, une stéatose induite chez des souris par une alimentation riche en gras (*High-fat-diet, HFD*), sensibilise les hépatocytes à la mort induite par les cytokines relarguées dans l'environnement. Ce mécanisme est retrouvé naturellement dans la NASH, lorsque des cellules immunitaires telles que les macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires¹⁵⁸. De plus, chez l'homme, l'apoptose au niveau des hépatocytes est retrouvée de façon plus importante chez les patients NASH comparés à ceux ayant une simple stéatose¹⁵⁹. Une autre étude montre sur un modèle murin, que le mécanisme d'induction de mort, au niveau des hépatocytes, peut mener au développement d'une NASH. En effet, la répression au niveau des hépatocytes du gène *Ikbkg* (*Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Regulatory Subunit Gamma*) (*Hep^{Ikbkg}*), impliqué dans la voie de survie NF-κB, induit une mort et

des lésions hépatiques spontanées chez les souris. Ces dernières développent alors une hépatite chronique ressemblant à une NASH puis éventuellement un CHC¹⁶⁰.

Au-delà du stress induit par les lipides et par la mort des hépatocytes, l'environnement NASH peut aussi mener à un stress oxydatif^{161,162}. En effet, les souris n'exprimant plus le facteur de transcription NRF2 sont susceptibles au développement de la NASH induit par un régime HFD¹⁶³. Par ailleurs, les souris *Hep^{lkbkg}* présentent une augmentation du stress oxydant et un traitement antioxydant freine la progression vers la NASH¹⁶⁰.

De ce fait, lors de la NASH, l'accumulation de lipides, le stress oxydant et l'inflammation favorisent les lésions hépatiques, une activation aberrante de l'inflammation et une fibrose tissulaire. Le rôle central de l'inflammation dans ce processus suggère que l'environnement immunitaire peut moduler l'avènement de la NASH et sa sévérité^{164,165}.

B. Altération de l'environnement immunitaire dans la transition NASH-CHC

Comme précisé plus haut, le CHC se développe communément dans un contexte d'inflammation chronique induit par l'immunité innée, cependant, chaque étiologie est associée avec une dérégulation immunitaire spécifique. Alors que pour les hépatites virales, on retrouvera majoritairement une activation de l'immunité innée, les données semblent montrer que pour la NASH, l'immunité adaptative joue un rôle central¹⁶⁶ (Figure 20).

1. Immunité innée

Les cellules de Kupffers sont les premières lignes de défense du foie. Dans la pathogénèse des NAFLD, ces dernières peuvent être activées par les lipides et produire des ROS ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (ex : IL-1 β ; TNF α) (Figure 20). Cette signalisation peut alors activer d'autres cellules immunitaires et induire la mort des hépatocytes sensibilisés par les lipides, ou induire leur régénération.

Dans les modèles murins de NASH, les KCs semblent être sensibles à la lipotoxicité et sont très vite remplacées par les monocytes circulant Ly6C⁺ (*lymphocyte antigen 6 complex*)¹⁵⁸.

Dans le contexte de NASH-CHC, ces KCs participent à la modulation des LT CD8⁺¹⁶⁷, cependant les mécanismes impliqués sont encore peu connus. Une équipe propose un mécanisme d'activation indirect impliquant l'interaction des KCs avec les plaquettes activées¹⁶⁸. Cette interaction active la production de cytokines et chimiokines par les macrophages résidents, induisant l'infiltration des LT CD8⁺ et NK dans le foie, favorisant la progression vers la NASH¹⁶⁸. Bien que les rôles des KCs dans la NASH aient été étudiés, leurs interactions avec les lymphocytes dans la progression du CHC semblent dépendre de l'étiologie et de la polarisation des macrophages¹⁶⁹. Par exemple, dans les CHC induits par le VHB, les TAM polarisés M2 favorisent un microenvironnement immunosuppresseur, caractérisé par l'augmentation des marqueurs PD-1 et TIGIT (*T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain*) à la surface des LT CD8⁺ et NK¹⁷⁰. Un

mécanisme similaire a été décrit dans un modèle de NASH-CHC, où des macrophages polarisés M2 favorisent l'hépatocarcinogenèse par la production de molécules immunosuppressives (ex : VEGF) ¹⁷¹.

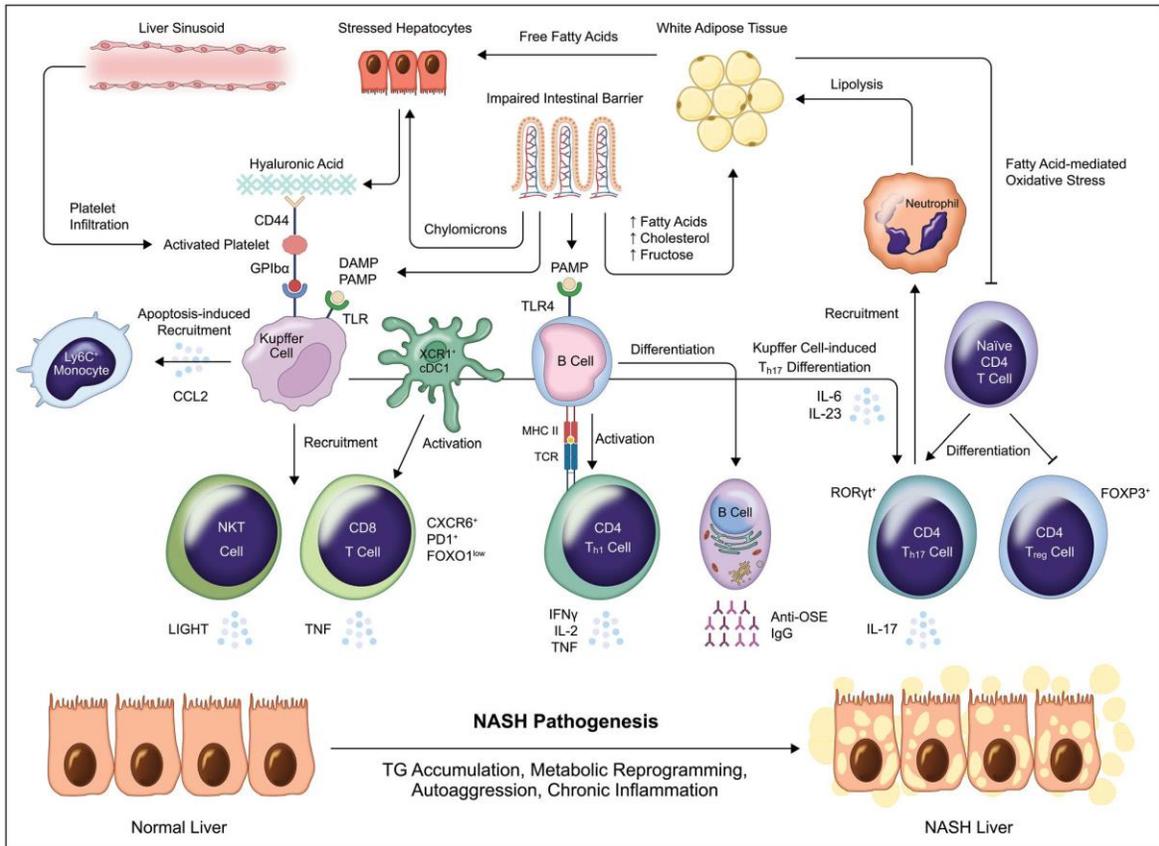


Figure 20: Interaction entre l'immunité innée et adaptative dans la NASH¹⁷²

Une autre population de cellules myéloïdes intéressantes est les DCs (Figure 20). Certaines études montrent leurs implications dans la pathogenèse de la NASH. Par exemple, une étude montre qu'un sous-type de DCs (XCR1⁺) joue un rôle important dans l'initiation de la pathogenèse, en interagissant avec les lymphocytes T CD8⁺ et en induisant leur reprogrammation, un mécanisme souvent décrit comme étant délétère pour le foie ¹⁷³. Une autre étude montre cependant que les DCs peuvent avoir un rôle différent selon le contenu lipidique. En effet, les DCs faibles en lipides ont un rôle immunosuppressif, alors que celles riches en lipides ont un rôle opposé et sont immunogènes¹⁷⁴. De plus, Haas *et al*, montrent que les DC circulants (cDC) de type 1 (cDC1) corrént inversement avec la progression de la NASH, alors que les cDC2 sont positivement corrélés aux différents marqueurs de la NASH¹³⁴.

Les neutrophiles sont aussi une classe de cellules myéloïdes, décrite comme jouant un rôle dans la pathologie NASH-CHC¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ (Figure 20). Par exemple, la déplétion des neutrophiles semble atténuer la pathogenèse de la NASH¹⁷⁸. Une autre étude montre sur un modèle murin que l'inhibition des neutrophiles CXCR2⁺ diminue le nombre de tumeurs dans le foie et améliore le pronostic de survie. De plus, un traitement anti-PD-1

associé à un anti-CXCR2 reprogramme les neutrophiles pour lutter contre la progression du CHC ¹⁷⁷.

2. Immunité adaptative

Chez les patients NASH et dans les différents modèles murins, il a été décrit des clusters d'infiltrat de lymphocytes B (LB) et T (LT) ¹⁷⁹. Le rôle des lymphocytes B est peu étudié. Pourtant, le facteur d'activation des cellules B (*B-cell activating factor, BAFF*) est surexprimé chez les patients NASH et corrèle avec le grade histologique ¹⁸⁰. Une autre étude montre que les LB co-localisent avec les LT dans la NASH, et corrélient positivement avec le stress oxydant produit par les hépatocytes ¹⁸¹. Shalapour *et al*, montrent que les LB exprimant des IgA (*Immunoglobulin A*) semblent affecter l'immunosurveillance dans la NASH-CHC, en inhibant les LT CD8⁺ via l'expression de PD-L1 et de la cytokine IL-10 ¹⁸² (Figure 21).

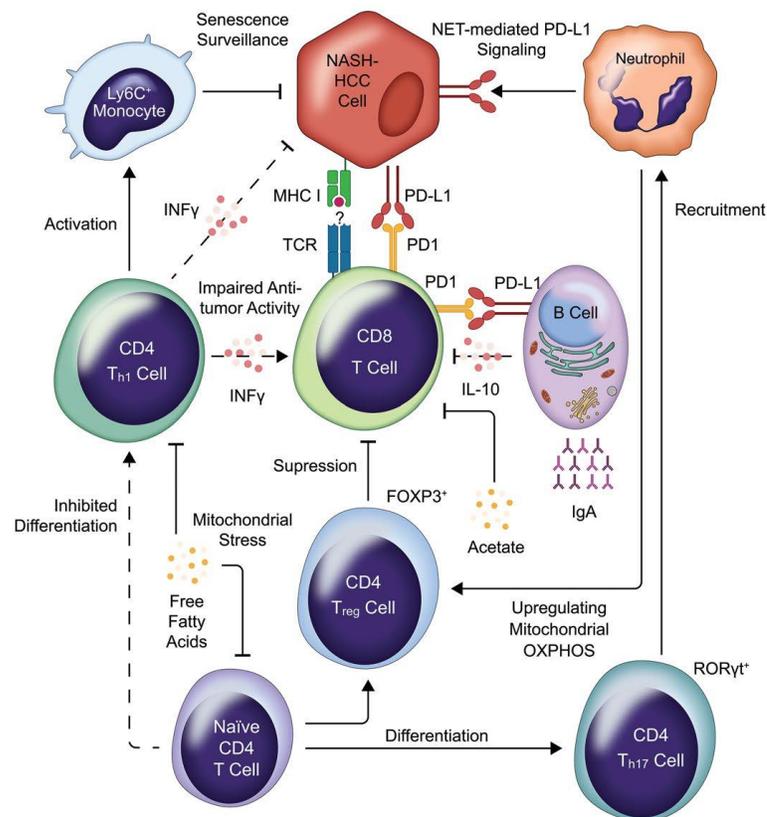


Figure 21: Immunité adaptative dans la NASH-CHC¹⁸³

Ces dernières décennies, les rôles des LT CD4⁺ et CD8⁺ ont été étudiés dans des modèles expérimentaux NASH, mais aussi dans le contexte clinique de progression vers la NASH.

Dans le contexte de stéatohépatite, les cellules T s'organisent de façon dispersées dans le foie¹⁷⁹. Chez les souris, un régime à long terme déficient en choline permet de retrouver cette dispersion. De plus, la déplétion des cellules CD8⁺ et NK empêche la progression

vers la NASH et donc vers le CHC¹⁶⁶. D'autres études semblent montrer, de la même façon, un rôle protecteur des LT CD8⁺ ^{184,185} (Figure 21). Mais de façon surprenante, les LT CD8⁺ ne semblent pas jouer de rôle dans la pathogenèse NASH dans des modèles murins dit « maigres » ¹⁸⁴, c'est-à-dire sans obésité.

Les études récentes soulignent le rôle que ces cellules CD8⁺ peuvent avoir dans l'efficacité des immunothérapies. En effet, un groupe montre une augmentation des cellules CD8⁺PD1⁺ dans les modèles murins mais également chez les patients atteints de CHC^{151,186,187}. Ces lymphocytes CD8⁺PD-1⁺ exprimant le marqueur CXCR6, développent un état hyperactif suite à une reprogrammation métabolique, induisant une cytotoxicité dans le foie ¹⁸⁶. De plus, ils démontrent que la reprogrammation métabolique du microenvironnement hépatique, suite au régime déficient en choline ou riche en fructose, contribue également à l'augmentation d'expression de TNF α . Cette population spécifique de LT semble capable d'induire la mort apoptotique des hépatocytes via le ligand Fas-L ¹⁸⁶. Ces résultats démontrent que le microenvironnement dépendant de l'étiologie influe sur le système immunitaire et la progression de la pathologie. Pfister *et al*, montrent alors que les traitements anti-PD-1 ne freinent pas la progression de la pathologie ni dans les modèles murins de NASH-CHC, ni chez les patients ¹⁵¹. Il s'avère qu'au-delà de l'agressivité de ces cellules CD8⁺, cette reprogrammation métabolique induit une dérégulation des voies mitochondriales impactant la motilité de ces lymphocytes ¹⁸⁷. Ainsi, même si les LT CD8⁺ sont fonctionnellement activés, ils ne peuvent plus infiltrer les tumeurs et avoir une action anti-tumorale ¹⁸⁷. Un traitement anti-PD-1 associé avec un traitement metformine (un traitement pour le diabète de type 2) semble améliorer le pronostic dans un modèle murin de NASH-CHC ¹⁸⁷.

Il est intéressant de noter qu'une étude antérieure avait démontré l'efficacité d'un traitement anti-PD-L1 sur différents modèles murins NASH-CHC¹⁸². Nous supposons que ces résultats opposés sont dus aux différents modèles utilisés. Il est nécessaire de caractériser les LT afin de mieux comprendre leur rôle dans la pathogenèse de la NASH-CHC.

Les lymphocytes CD4⁺ ont également été décrits dans la pathogenèse du CHC ¹⁸⁸, cependant leur rôle est moins caractérisé que pour les LT CD8⁺ (Figure 21).

Une étude montre que les acides gras induisent la mort des cellules CD4⁺ suite à une surproduction de ROS par leur mitochondrie¹⁸⁸. Une baisse de ces ROS limite la diminution des CD4⁺ et donc freine la progression du cancer. Cependant, l'effet opposé a également été décrit par un autre groupe¹⁸⁹. En effet, les cellules CD4⁺IL-17A⁺TH₁₇ contribuent au développement de la NASH et à la progression vers le carcinome hépatocellulaire en recrutant les neutrophiles. Or ces derniers ont été décrits comme jouant un rôle pro-tumoral¹⁷⁷.

Les lymphocytes T_{reg} (CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺) ont, quant à eux, un rôle régulateur prononcé et induisent une immunotolérance par la production de la cytokine IL-10. De ce fait, ils peuvent favoriser l'échappement des cellules tumorales, cependant leur rôle dans la NASH n'est pas connu et leur implication reste controversée^{172,179,190,191}.

Un réseau de communications entre différentes cellules immunitaires se met en place dès le développement d'une stéatose. Cependant, il semble que selon le microenvironnement métabolique hépatique, les cellules immunitaires, dont les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, ne soient pas activées de la même façon, et peuvent donc jouer des rôles opposés dans la carcinogenèse du foie dans un contexte NASH. Cette disparité provient très certainement des différents modèles utilisés (souche de la souris, régimes, injection de produit, etc.), qui n'induit pas toujours le même type d'inflammation et de réponse immunitaire.

V. Modèles murins de NASH-CHC

Comme souligné plus haut, il est devenu important de développer des modèles murins capables de mimer l'évolution de la pathologie chez l'homme, tout en prenant en compte l'étiologie. En effet, différentes études mettent en avant de plus en plus que les mécanismes sous-jacents peuvent différer selon les modèles d'études^{192,193}. Les différents modèles murins de développement de CHC peuvent être classifiés comme suit : les modèles chimiquement induits, les modèles génétiquement modifiés, les modèles de xéno greffe (lignée cellulaire humaine ou cellule de patient), les modèles humanisés et les modèles murins de xéno greffe dit isogénique (utilisation de lignée cellulaire murine) (Figure 22).

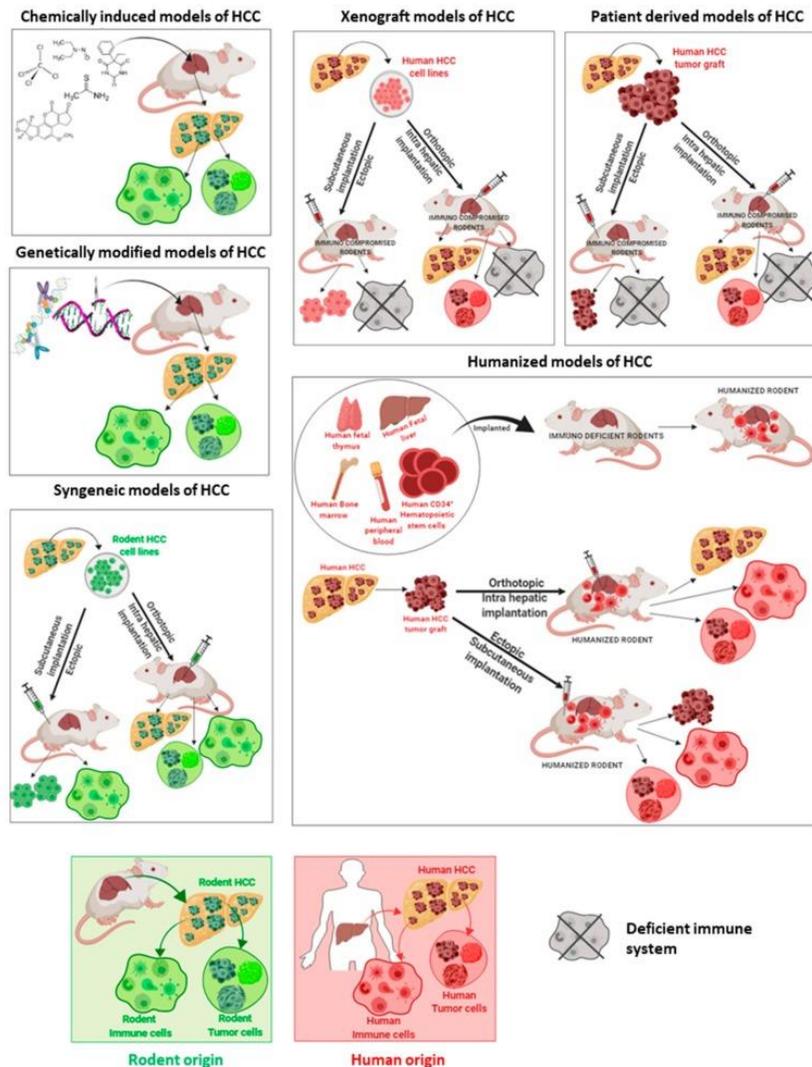


Figure 22: Les différents modèles murins de CHC¹⁹⁴

Afin d'étudier les carcinomes se développant dans un contexte NASH, souvent ces modèles sont associés à un régime alimentaire riche en lipides (high-fat diet ; HFD) (Tableau 2). Cependant, selon le modèle murin utilisé et le type de régime, la réponse

immunitaire n'est pas la même^{193,195}. Un bon modèle murin de NASH-CHC doit pouvoir reproduire les critères principaux à savoir : une insulino-résistance, un développement d'une stéatose et d'une inflammation, une fibrose et enfin une évolution vers un CHC.

Tableau 2: **Comparaison des différents modèles murins NASH-CHC**¹⁹⁶

	Obesity	Insulin Resistance	Steatosis	Inflammation/ ER Stress	NASH	Fibrosis	p62 Accumulation	HCC
Diet Models								
HFD	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	×	×
WD	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	×	×
MCD	×	×	✓✓	✓	✓✓	✓✓	?	×
CD	×	×	✓✓	✓	✓✓	✓✓	?	×
HFD/fructose	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓✓
CD HFD	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	?	✓
Toxins/Diet-Based Models								
STAM	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	?	✓✓
HFD/DEN	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	×	×	✓✓	✓✓
CD HFD/DEN	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	×	×	?	✓✓
Genetic/Diet Models								
<i>ob/ob</i>	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	?	×
<i>db/db</i>	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	?	×
<i>SREBP1c</i> Tg	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓
Agouti	✓✓	✓✓	✓✓	✓	×	×	?	×
PTEN ko	×	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓
PPARα ko	×	×	×	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓
AOX ko	×	×	×	✓✓	✓✓	×	?	✓
MAT1A ko	×	×	×	✓✓	✓✓	×	?	✓
<i>MUP-uPA</i> Tg	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓
DIAMOND	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	?	✓✓

A. Intervention des régimes dans les modèles murins de NASH et NASH-CHC

Les régimes riches en lipides (HFD) induisent de façon générale une simple stéatose et très peu de lésions hépatiques ou d'inflammation¹⁹⁷ (Tableau 2). A l'inverse, le régime dit « western-diet » (WD) composé notamment de cholestérol, sucrose et acides gras saturés, induit plus de lésions au niveau hépatique avec une stéatose, une fibrose et de l'inflammation¹⁹⁸. Mais les souris sous ce régime ne développent pas de tumeurs hépatiques. Une physiopathologie NASH plus sévère est observée chez les souris sous un régime déficient en méthionine et choline (*Methionin and cholin deficient-diet, MCD*) ou seulement en choline (*Cholin-deficient-diet, CD*)¹⁹⁹. Cependant, des caractéristiques de la NASH telles que l'insulino-résistance et l'obésité ne sont pas retrouvées avec ces deux régimes (Tableau 2). De plus les souris ne développent pas de tumeurs non plus. Des études ont montré qu'une combinaison du régime CD + HFD induisait des tumeurs chez certaines souris mais que le taux d'induction était faible¹⁶⁶.

D'autres études montrent que la consommation de fructose est un inducteur important de la NASH. Ainsi, des souris sous un régime riche en acides gras et en fructose développent les différentes caractéristiques pathologiques de la NASH et évoluent vers un CHC²⁰⁰. Néanmoins aucune étude ne démontre encore la pertinence de ce modèle pour la physiopathologie humaine.

B. Modèles NASH-CHC chimiquement induits plus régimes

Un nouveau modèle de NASH-CHC a été développé, induisant un CHC dans un contexte de NASH suite à une administration de streptozotocine (STZ), un produit chimique toxique vis-à-vis des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Dans ce modèle nommé STAMTM (*Stelic Animal Model*), une dose de STZ est injectée à des souriceaux mâles, induisant un état hypoinsulinémique. Puis, ces souris diabétiques sont mises sous un régime HFD au moment du sevrage. Après 5 semaines, une stéatose se développe et après 7 semaines, une NASH apparaît. Ensuite, à 9 semaines, une fibrose se met en place et des adénomes se développent. Et à partir de 12 semaines de régime, des CHC apparaissent chez 100% des souris²⁰¹ (Tableau 2). Cependant, la limite du modèle réside dans l'absence de développement d'une obésité et dans l'apparition d'une fibrose moyenne. Néanmoins, une étude a récemment montré que le modèle STAMTM est celui qui se rapproche le plus de la physiopathologie humaine¹⁹³. En effet, les tumeurs CHC développées chez les souris STAMTM présentaient un taux élevé de mutations et étaient similaires à celles retrouvées dans les tumeurs CHC chez l'homme²⁰².

Simoes Eugenio *et al*¹⁹⁵, ont montré que le type de régime administré aux souris STAMTM influe sur l'environnement inflammatoire. En effet, un régime hyperlipidémique riche en cholestérol (*High-fat high-cholesterol diet, HFHCD*) induit une inflammation et donc une meilleure surveillance anti-tumorale chez les souris, comparée au régime hyperlipidémique riche en sucre (*High-fat-high-sugar diet, HFHSD*)¹⁹⁵, soulignant à nouveau l'importance des différents paramètres définissant le modèle choisi sur les mécanismes physiopathologiques de la progression du CHC dans un contexte de NASH.

L'administration de la diéthylnitrosamine (DEN) + HFD ou DEN+CD-HFD sont deux autres modèles murins utilisés, cependant ils ne reproduisent pas la physiopathologie de la NASH-CHC (Tableau 2). Des études récentes ont montré que les modèles DEN ne permettent pas de mimer la pathologie humaine^{133,192}. En effet, ce modèle induit des tumeurs homogènes, ne présentant qu'un seul type de mutation^{133,192}, or par définition les mutations dans le CHC sont très hétérogènes. Le modèle DEN présenterait une signature génétique se rapprochant plus de l'étiologie liée à la surconsommation d'alcool (*Alcohol liver disease, ALD*)¹⁹².

C. Modèles murins NASH-CHC génétiquement modifiés plus régimes

Certaines souris génétiquement modifiées telles que les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) ou déficientes au récepteur de la leptine (*db/db*) développent une obésité, une insulino-résistance et une stéatose. Cependant, la pathologie n'évolue pas vers la

NASH ou le CHC. Par contre, ces souris deviennent plus susceptibles à la carcinogénèse induite par le DEN, démontrant le rôle de l'obésité comme facteur de progression de la pathologie²⁰³. Il existe d'autres modèles génétiquement modifiés sensibles à la NASH tels que les souris SREBP-1c, les souris agouti (*KK-Ay/a*) ou encore les souris déficientes en PTEN, PPAR- α , AOX et MAT1A²⁰⁴. Toutefois, ces différents modèles ne reproduisent pas toutes les caractéristiques pathologiques et certains ne développent pas spontanément des tumeurs (Tableau 2).

Un autre modèle transgénique MUP-uPA associé à un régime HFD ne présente pas la plupart des limites détaillées plus haut. Ce modèle exprime de façon aberrante un activateur urokinase plasminogène (*urokinase plasminogen activator, uPA*)¹⁹⁷, induisant un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Ces souris développent une NASH puis 85% évoluent de façon spontanée vers un CHC.

Un autre modèle également progressant d'une NASH vers un CHC de façon spontanée a été développé. Ces souris nommées DIAMOND, sont des souris C57B6/S129J hybrides isogéniques, et soumises à un régime WD riche en fructose²⁰⁵ (Tableau 2). Pourtant, la principale limite de ce modèle est cette souche hybride de souris utilisée (B6/129), rendant les croisements avec des lignées spécifiques (souvent de souche B6) difficiles. De plus, une étude montre que le fond génétique peut influencer sur la pathogénèse mais également sur le microenvironnement immunitaire¹⁹³.

D. Souris versus Humain : quel est le meilleur modèle ?

Aujourd'hui, il est assez rare de trouver deux études indépendantes utilisant le même modèle murin de CHC. Ceci en partie dû à l'hétérogénéité du carcinome hépatique que la communauté scientifique tente de reproduire au mieux²⁰⁶. Or l'une des limites à la découverte de biomarqueurs ou de cibles thérapeutiques probantes dans le cancer du foie notamment dans le contexte de stéatohépatite non alcoolique est le manque de modèle reproduisant les étapes clés de la pathogénèse telles qu'observées chez l'homme. Différents modèles sont développés chaque année. Par exemple, récemment des études proposent l'introduction d'une eau sucrée associée à un régime HFD comme nouveau modèle de NASH-CHC²⁰⁷. Cependant, il existe peu d'études comparant les mutations survenant sur le modèle murin à celles retrouvées chez l'homme^{192,193,208}.

Dow *et al.*, proposent une étude génomique comparative entre 4 modèles murins de développement de CHC à 4 cohortes de patients CHC¹⁹³ (Figure 23). Cette équipe démontre ainsi que comparé au CHC humain, présentant différentes signatures, certains modèles comme le DEN n'en présente qu'une, suggérant des différences dans les dommages à l'ADN et les mutations¹⁹³. En effet, il semblerait que le modèle DEN induit des tumeurs dites « homogènes » ne présentant qu'un type de mutations¹⁹². Ces tumeurs sont donc différentes de ce qui est observé chez l'homme¹⁹³. Ces résultats suggèrent alors que les modèles basés sur l'injection de produits chimiques mutagènes ne sont pas adéquats pour étudier l'initiation et le processus de mutagenèse du CHC. À l'inverse, un modèle de lésions chroniques basé sur le développement spontané de tumeurs récapitule mieux la physiopathologie humaine. Par exemple, dans cette étude, le modèle STAM™ est le seul modèle à présenter des tumeurs hétérogènes et une signature moléculaire similaire au CHC humain¹⁹³ (Figure 23). De plus, un autre groupe démontre que les

tumeurs développées dans ce modèle surexpriment certains microARN comme *mir93-5p*, *mir221-3p* ou *mir222-3p*, également augmentés chez les patient développant un CHC²⁰⁹. De plus, il a été montré que ce modèle développe les même caractéristiques physiopathologiques telles que celles observées chez l'homme, à savoir une augmentation de transaminases, de triglycérides, de cholestérols ou encore du marqueur cytokératine 18²¹⁰⁻²¹³.

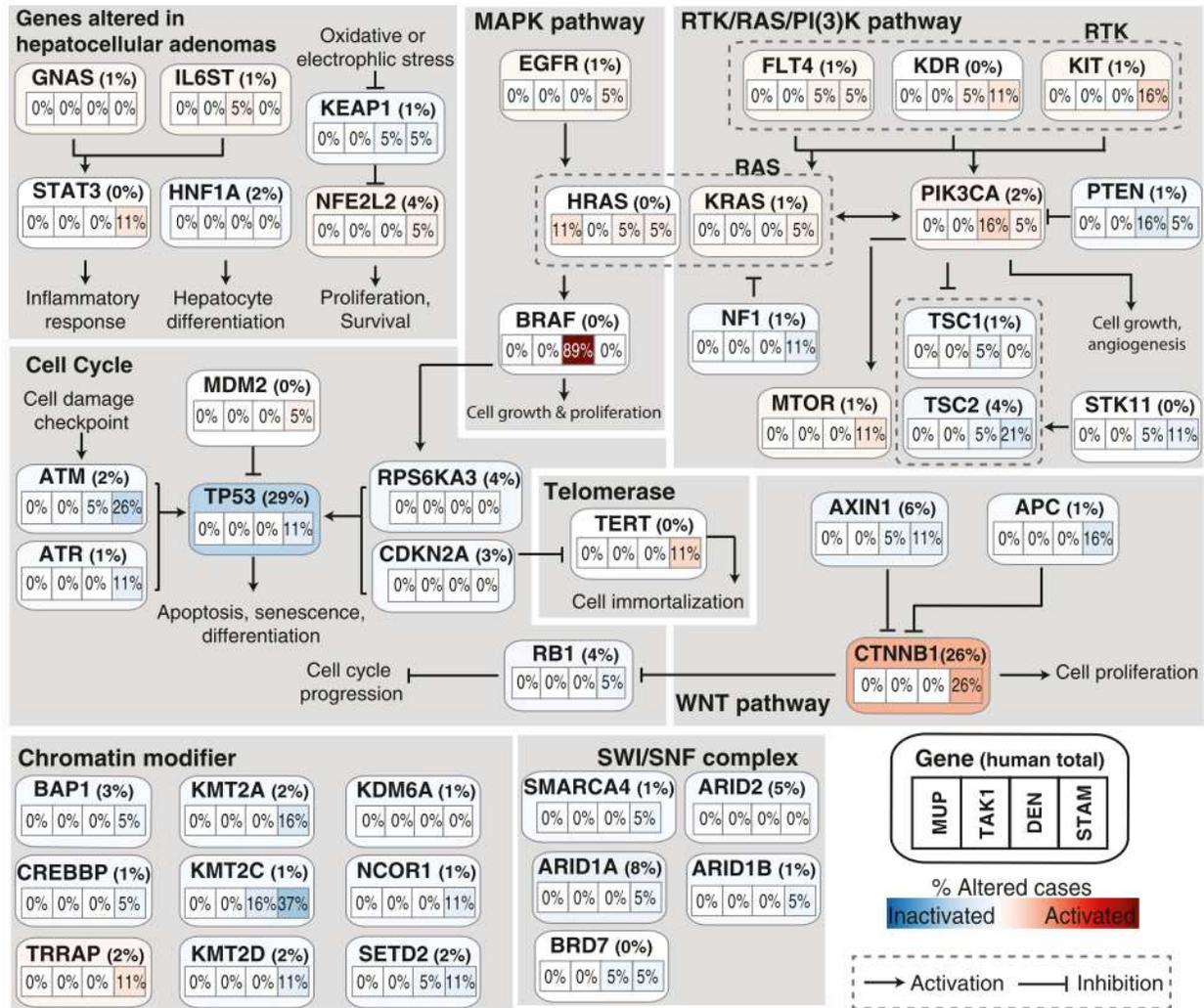


Figure 23: Comparaison des altérations génomiques des différents modèles murins de CHC¹⁹³

L'immunité étant au centre de la pathogenèse du CHC, Dow *et al*, ont étudié également le microenvironnement immunitaire. Bien que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et T_{reg} soient similaires, les souris présentent moins de lymphocytes CD8⁺, B et NK comparé à l'homme. Toutefois, il est intéressant de noter qu'aucune différence de population immunitaire n'est observée entre les différents modèles murins comparés, suggérant probablement que les mutations (développées dans chaque modèle) ne corrélaient pas systématiquement avec les populations immunitaires¹⁹³. Cependant, Simoes Eugenio *et al*, montrent dans le modèle STAMTM que le régime alimentaire fait

varier les populations immunitaires et module leur activation ¹⁹⁵, un point important donc à prendre en compte.

Aujourd'hui, il est devenu clair que pour répondre au défi de santé majeur que représente le CHC, les modèles murins sont nécessaires. Cependant, la disparité de certains résultats et la meilleure compréhension de certains mécanismes liés à l'étiologie de la pathologie poussent la communauté scientifique à mieux caractériser étiologiquement les différents modèles¹⁹².

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE :

De par son domaine RING, la protéine TRIM21 module différentes voies de signalisation par ubiquitination. Cette E3 ubiquitine ligase joue un rôle important, non seulement dans l'immunité antivirale, mais également dans la régulation de l'inflammation, la prolifération, l'immunité ou encore la mort cellulaire. Ce n'est donc pas étonnant de retrouver un rôle important de cette protéine dans différentes pathologies. Une faible expression de TRIM21 peut être associée à un mauvais pronostic dans différents cancers comme le cancer du sein, le cancer colorectal ou encore le carcinome hépatocellulaire (CHC). Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés spécifiquement au CHC, la 3^e cause de mort par cancer dans le monde.

Aujourd'hui, l'épidémie d'obésité et de diabète augmente de façon fulgurante le développement d'une stéatohépatite non alcoolique (NASH). Sans intervention, cette dernière peut évoluer vers un carcinome hépatocellulaire. L'accumulation de lipides dans le foie induit une accumulation de ROS, une mort des hépatocytes et une inflammation. La chronicité de ces lésions mène alors au développement d'une fibrose et à long terme d'un CHC. La communauté scientifique s'accorde à dire que le système immunitaire joue un rôle important dans l'initiation et la progression du cancer hépatique ; notamment dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique.

Les traitements sont limités et tous les patients ne répondent pas positivement, notamment pour ce qui concerne les immunothérapies. Il est donc important de pouvoir mieux comprendre les mécanismes de progression du CHC afin de mieux traiter les patients. Dans ce contexte, différents modèles murins de CHC ont été développés, seulement ces modèles diffèrent parfois de la physiopathologie humaine. Le modèle choisi joue donc un rôle important dans la caractérisation des mécanismes de la pathogenèse et la découverte de biomarqueurs.

Au cours de cette thèse, nous avons dans un premier temps, caractérisé le rôle de TRIM21 dans la nécroptose induite par TRAIL dans des modèles *in vitro*. L'implication de cette E3 ubiquitine ligase a déjà été décrite dans différents types de mort cellulaire, mais jusqu'à présent aucune étude ne décrit son rôle dans la nécroptose. Dans un second temps, de par son implication dans les morts cellulaires, mais également dans l'inflammation, nous nous sommes intéressés au rôle de TRIM21 dans la progression du carcinome hépatocellulaire sur un modèle murin STAM™ dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique, un modèle se rapprochant le plus de la physiopathologie humaine.

RÉSULTATS

Résultat 1 : TRIM21 et nécroptose

TRIM21, un nouveau partenaire du nécrosome endogène induit par TRAIL

TRIM21, a new Component of the TRAIL-induced endogenous necrosome complex

Mélanie Simoes Eugénio^{1‡}, Florence Faurez^{1‡}, **Ghania H. Kara-Ali¹**, Mélanie Lagarrigue^{2,3}, Perrine Uhart¹, Marion C. Bonnet¹, Isabelle Gallais¹, Emmanuelle Com^{2,3}, Charles Pineau^{2,3}, Michel Samson¹, Jacques Le Seyec^{1*} and Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{1*}

¹Univ-Rennes1, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S1085, Rennes, France,

²Protim, Inserm, Irset - UMR_S1085, Campus de Beaulieu, Rennes, France,

³Biogenouest, Core Facility Network in Western, France

‡ ou *: Co-auteurs

Contexte de l'étude :

La nécroptose est une mort cellulaire programmée lytique qui peut être activée par les ligands de mort de la famille du TNF ou certains récepteurs de type Toll reconnaissant les motifs moléculaires associés aux pathogènes par exemple. Cette mort est initiée lorsque, d'une part, les caspases sont inhibées, et d'autre part, la kinase RIPK3 et la pseudo-kinase MLKL sont recrutées. Lors de cette étude, notre équipe s'est intéressée à la nécroptose induite par le ligand de mort TRAIL décrit comme pouvant induire l'apoptose de cellules tumorales sans induire de cytotoxicité sur des cellules saines.

Ainsi, en induisant la nécroptose via TRAIL, notre équipe a découvert le recrutement dans le nécrosome, d'une E3 ubiquitine ligase au côté des acteurs principaux de cette mort à savoir RIPK1, RIPK3 et MLKL. Jusque-là, l'E3 ubiquitine ligase TRIM21 n'avait jamais été impliquée dans le mécanisme de la nécroptose.

Modèle utilisé :

Pour étudier cette nécroptose *in vitro*, peu de possibilités se présentaient à nous afin d'induire cette mort par TRAIL : nous avons choisi l'inhibition pharmacologique des caspases de l'apoptose (par exemple : *z-VAD-fmk*, *carbobenzoxy-valyl-alanyl-asparty-(o-methyl)-fluoromethylketone*) associée à l'inhibition des IAPs (*Inhibitor of Apoptosis*) (par exemple le *Bp* : *Birinapant*). Il est important de noter que la plupart des cellules cancéreuses n'expriment plus la RIPK3 et sont donc résistantes à la nécroptose. De ce fait, peu de modèles cellulaires sont disponibles. Cependant les lignées cellulaires humaines du cancer du côlon (*HT-29*) ou de kératinocytes humains transformés (*HaCat*) expriment encore la kinase RIPK3 nécessaire à l'activation de la nécroptose. Nous pouvons également citer les lignées de fibroblastes murins (*L929*, *L929AsFas*) ou encore la lignée cellulaire immortalisée de lymphocyte T CD4 humain déficient en FADD (*Jurkat FADD-deficient*).

Pour cette étude nous avons choisi d'utiliser les deux lignées cellulaires HaCat et HT-29 en induisant la nécroptose par un traitement par la cytokine TRAIL associée au *z-VAD-fmk* et au *Birinapant* (*Bp*).

Résultats principaux :

Suite aux expériences d'immunoprécipitation réalisées au sein de l'équipe et à l'analyse par spectrométrie de masse des protéines par la plateforme Protim (Rennes), la protéine TRIM21 a été retrouvée associée au nécrosome dans la lignée cancéreuse colique humaine, HT29, traitée par TRAIL en association avec un inhibiteur pan-caspase (zVAD-fmk) et un inhibiteur pan-IAP (le Birinapant, Bp) (TzB) (*Figures 1 et 2*). Différentes démarches expérimentales ont été entreprises pour comparer la susceptibilité à la nécroptose induite par TRAIL des cellules HT-29 ou HaCat en modulant l'expression de la protéine TRIM21.

Ainsi, la répression de l'expression de TRIM21 par ARN interférence dans les cellules HT-29 et HaCat, montrent une baisse de la mortalité cellulaire. À l'inverse, une surexpression de TRIM21 en utilisant un plasmide GST-TRIM21, augmente la mortalité cellulaire comparée au contrôle (*Figure 3*). Par la suite, une lignée HT-29 dépourvue de la protéine TRIM21 a été établie par la technologie CRISPR/CAS9. Nous avons comparé la susceptibilité à la nécroptose induite par TRAIL des cellules HT-29 TRIM21-KO par rapport aux cellules HT-29 d'origine (WT). Dans un premier temps, nous avons induit la nécroptose par un traitement TRAIL/zVAD-fmk/Bp dans les cellules HT29 WT ou TRIM21-KO en présence de sondes fluorescentes interagissant avec l'ADN et imperméables aux cellules vivantes (SytoxGreen ou Iodure de propidium). Nous avons analysé la mort cellulaire au cours du temps en suivant le marquage fluorescent émis par ces sondes à l'aide d'un système d'acquisitions et d'analyses d'images en temps réel (*IncuCyte®*). Les cinétiques d'apparition de la mort cellulaire montrent que TRAIL/zVAD/Bp induit une nécroptose dans les cellules HT-29 WT (augmentation du signal SytoxGreen ou Iodure de propidium), et que ce mécanisme de mort est retardé dans les cellules HT-29 TRIM21-KO (*Figure 4*). En parallèle, nous avons suivi le niveau de phosphorylation des protéines du nécrosome au cours du temps. Des lysats cellulaires ont été préparés à partir de cellules HT29 WT ou TRIM21-KO à 0h, 1h, 2h, 3h, 4h et 5h post-traitement par TRAIL/zVAD/Bp. Ces cinétiques montrent un taux de protéines phosphorylées p-RIPK1 et p-MLKL moins important dans les cellules HT-29 TRIM21-KO par rapport aux cellules HT-29 WT. Ces données confirment l'hypothèse selon laquelle il existe un retard dans la mise en place du signal nécroptotique dans les cellules TRIM21-KO (*Figure 4*).

Afin de confirmer le rôle de TRIM21 dans la nécroptose induite par TRAIL, nous avons également réalisé une expérience de « sauvetage » en transfectant les cellules HT-29 TRIM21-KO avec un plasmide d'expression EGFP-TRIM21. Un traitement par TRAIL/zVAD/Bp des cellules HT-29 TRIM21-KO réexprimant TRIM21 induit une sensibilisation à la nécroptose comparée aux cellules contrôles (*Figure 4*).

J'ai contribué à ce travail, publié dans Frontiers in Molecular Bioscience en 2021, en réalisant les différentes mises au point et expériences sur les cellules HT-29 TRIM21-KO et HT-29 WT, notamment le suivi de la mort cellulaire par le système d'acquisition d'images fluorescentes en temps réel et la transfection des cellules HT-29 KO avec le plasmide EGFP-TRIM21.

Conclusion :

TRIM21 s'associe au nécrosome pour jouer un rôle de modulateur positif de la nécroptose induite par TRAIL



TRIM21, a New Component of the TRAIL-Induced Endogenous Necrosome Complex

Mélanie Simoes Eugénio^{1‡}, Florence Faurez^{1‡}, Ghania H. Kara-Ali¹, Mélanie Lagarrigue^{2,3}, Perrine Uhart¹, Marion C. Bonnet^{1†}, Isabelle Gallais¹, Emmanuelle Com^{2,3}, Charles Pineau^{2,3}, Michel Samson¹, Jacques Le Seyec^{1*} and Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Mauro Salvi,
University of Padua, Italy

Reviewed by:

W. Wei-Lynn Wong,
University of Zurich, Switzerland
Joshua Webster,
Genentech, Inc., San Francisco, CA,
United States

*Correspondence:

Jacques Le Seyec
jacques.le-seyec@univ-rennes1.fr
Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel
marie-therese.boitrel@univ-
rennes1.fr

†Present address:

Division of Infection and Immunity,
College of Biomedical and Life
Sciences, Cardiff University, Henry
Wellcome Building, CARDIFF

‡These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Biochemistry,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 22 December 2020

Accepted: 17 February 2021

Published: 15 April 2021

Citation:

Simoes Eugénio M, Faurez F,
Kara-Ali GH, Lagarrigue M, Uhart P,
Bonnet MC, Gallais I, Com E, Pineau C,
Samson M, Le Seyec J and
Dimanche-Boitrel M-T (2021) TRIM21,
a New Component of the TRAIL-
Induced Endogenous
Necrosome Complex.
Front. Mol. Biosci. 8:645134.
doi: 10.3389/fmolb.2021.645134

¹Univ-Rennes1, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S1085, Rennes, France, ²Protim, Inserm, Irset - UMR_S1085, Campus de Beaulieu, Rennes, France, ³Biogenouest, Core Facility Network in Western, France

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a well-known apoptosis inducer and a potential anticancer agent. When caspases and inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) are inhibited, TRAIL induces necroptosis. Molecular mechanisms of necroptosis rely on kinase activation, and on the formation of a necrosome complex, bringing together the receptor-interacting protein kinases 1 and 3 (RIPK1, RIPK3), and the mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL). In this study, mass spectrometry approach allowed to identify the tripartite motif containing 21 (TRIM21), an E3 ubiquitin-protein ligase as a new partner of the endogenous TRAIL-induced necrosome. Alteration of TRIM21 expression level, obtained by transient transfection of HT29 or HaCat cells with TRIM21-targeted siRNAs or cDNA plasmids coding for TRIM21 demonstrated that TRIM21 is a positive regulator of TRAIL-induced necroptosis. Furthermore, the invalidation of TRIM21 expression in HT29 cells by CRISPR-Cas9 technology also decreased cell sensitivity to TRAIL-induced necroptosis, a shortcoming associated with a reduction in MLKL phosphorylation, the necroptosis executioner. Thus, TRIM21 emerged as a new partner of the TRAIL-induced necrosome that positively regulates the necroptosis process.

Keywords: TRIM21, necroptosis, TRAIL, necrosome, proteomics

INTRODUCTION

The tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) belongs to the TNF superfamily ligands. TRAIL binds to death receptors DR4 and DR5, resulting in the formation of a death inducing signaling complex leading to caspase-8 or -10 activation and apoptosis (Zamaraev et al., 2014). Apart from apoptosis induction, TRAIL can trigger necroptosis, a caspase-independent cell death program (Holler et al., 2000; Jouan-Lanhouet et al., 2012). In a comparable way to TNF-induced necroptosis signaling (Vanden Berghe et al., 2014), necroptosis initiated by TRAIL is characterized by the formation of a stable cytosolic complex termed necrosome, which includes at least receptor-interacting serine/threonine-protein kinases 1 and 3 (RIPK1 and RIPK3), mixed lineage kinase domain-like pseudokinase (MLKL), Fas-associated with death domain protein (FADD) and caspase-8.

TRAIL emerged as an interesting tool for cancer therapy since it selectively induces apoptosis in cancer cells, while sparing normal cells (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). However, an important number of cancer cells remains resistant to TRAIL-induced death, due to high expression of anti-apoptotic factors (Newsom-Davis et al., 2009), such as inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) (Vasilikos et al., 2017).

Several second mitochondrial-derived activator of caspases (SMAC) mimetics (SMs) have been developed to sensitize resistant cancer cells to apoptosis by inhibiting IAPs. SMs alone sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis (Fulda et al., 2002) whereas a combination of TRAIL with SMs and z-VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor, activates necroptosis (He et al., 2009). In this study, the combination of TRAIL/z-VAD-fmk/Birinapant (TzB) was used to better characterize the necroptotic death signal induced by TRAIL. Affinity purification combined with mass spectrometry (AP-MS) analysis of the TRAIL-induced endogenous RIPK3-containing necrosome protein complex showed the presence of the known interactors RIPK3, RIPK1, MLKL, FADD, and caspase-8, but highlighted a new partner, TRIM21 (Tripartite Motif Containing 21), an E3-ubiquitin ligase. Furthermore, by using RNA interference or CRISPR-Cas9 technology, TRIM21 expression was, respectively, decreased or abolished, and conferred some resistance to TRAIL-induced necroptosis. On the contrary, overexpression of TRIM21 led to a sensitization of cells to TRAIL-induced death. Altogether, these data highlighted TRIM21 as a new partner and positive modulator of the TRAIL-induced necrosome.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

HT29 and HaCat cell lines were obtained from ATCC. HT29 cell lines were cultured in MEM (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Eurobio), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco), 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and MEM Non Essential Amino Acids 1X (Gibco). HaCat cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), supplemented with 10% of FBS (Hyclone), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine.

Reagents and Antibodies

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

Used antibodies were antibodies to caspase-8 clone C15 (ALX-804-429) (Alexis Biochemicals), FADD (556402) (Becton Dickinson), TRIM21 E-11 (sc-48430), Hsc70 (sc-7298) (Santa-Cruz), β-actin (A5316) (Sigma), RIPK3 (48-909), DR4 (1167), and DR5 (2019) (ProSci Incorporated), RIPK1 (D94C12) XP (3493S) (Cell Signaling), phospho-MLKL (ab187091) (Abcam), RIPK3 (PA1-41533) (Pierce), phospho-RIP1 (Ser166) (D1L3S), and phospho-RIP3 (Ser227) (D6W2T) (Cell Signaling) (this rabbit monoclonal antibody to P-RIPK3 recognizes two bands on western blot), 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.

Small Interfering RNA Transfection

Cells cultured in 96-well plates were transfected by reverse transfection with double-stranded ON TARGETplus SMARTpool siRNAs targeting mRNAs of hTRIM21 (EG:6737) (GE Healthcare). A non-specific targeting siRNA (siNT1, control siRNA, GE Healthcare) was used as a negative control for all experiments. Eighty nM of siRNA was transfected per well using DharmaFECT-4 transfection reagent (ThermoFisher Scientific).

Plasmid Transfection With Amaxa

HT29 and HaCat cells were transfected using 4D-Nucleofector™ or 3D-Nucleofector™ (Lonza), respectively, as per the manufacturer's instructions with control plasmid (pcDNA3.1+/N-GST-[Thrombin], GeneScript) or TRIM21 plasmid (pcDNA3.1+/N-GST-[Thrombin-hTRIM21], GeneScript). Briefly, 10 µg of plasmids were added to a suspension of 1,000,000 cells diluted in the Lonza SF transfection buffer and submitted to the FF137 transfection program (HT29 cells) or in the Lonza Nucleofector Solution and submitted to the U-020 transfection program (HaCat cells). Cells were then seeded in 9.6 cm² well containing fresh supplemented medium as described in the cell culture section. Necroptosis was induced 48 h later by TzB treatment for 24 h and analyzed by the MTS assay.

Calcium Phosphate Mediated Plasmid Transfection to Rescue TRIM21 Expression

TRIM21-KO HT29 cells were seeded at 2,000,000 cells per well in a 6-well plate, and allowed to plate for 4–6 h. Three µg of DNA (pEGFP-N1-Ro52, a gift from Dr. Mary Wahren-Herlenius, Division of Rheumatology, Department of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) or pEGFP-N1 vector (Clontech Laboratories) diluted in 125 µl of 2M CaCl₂ were added to 125 µl of HBS 2X (280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1.5 mM Na₂HPO₄; 12 mM dextrose; 50 mM HEPES; pH between 7.05 and 7.12). After 16 h of incubation with the mixture, cells were washed for 1 min with PBS supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and then incubated at 37°C with fresh supplemented medium. Necroptosis was induced 24 h later by TzB treatment in MEM containing 2 µg/ml of PI. Cell

death was monitored by immunofluorescence live imaging as described below.

CRISPR-Mediated TRIM21 Knockout in HT29 Cell Line

Two gRNA targeting human TRIM21 sequences (AGCACGCCTTGACAA/TGATGTGGG and TGGCTAGCTGTGCGA/TTGGCCGG) 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. One million of HT29 cells were transfected with 5 µg of both plasmids by electroporation using the 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 dilutions in a 96-well plate.

Cell Viability

Cell survival was determined using CellTiter 96[®] AQueous one solution cell proliferation assay kit (MTS assay, Promega) as previously described (Jouan-Lanhouet et al., 2012).

Detection of Necrotic Cells

Microscopic detection of apoptosis or necroptosis was carried out in both floating and adherent cells using Hoechst 33342 (1 µg/ml) and PI (1 µg/ml) staining dyes as previously described (Jouan-Lanhouet et al., 2012). Flow cytometry analysis (FL-2) (FACScalibur, Becton Dickinson) was also used to detect necroptotic cells using PI staining dye (0.5 µg/ml).

Real-Time Analysis of Necroptosis by Immunofluorescence Live Imaging

WT or TRIM21-KO HT29 cells were seeded at 30,000 cells per well in a 96-well plate and allowed to adhere for 24 h. The following day, cells were treated with TRAIL-SK (100 ng/ml) in the presence of z-VAD-fmk (25 µM), Birinapant (1 µM) (TzB), and SYTOX[™] Green reagent (5 µM) diluted in MEM. Cell death kinetic was monitored with the IncuCyte S3[®] live-cell imaging system. Fluorescent and phase contrast images were taken every hours until 8 h post-treatment. Data of total integrated fluorescent signal intensity were generated by the IncuCyte[®] S3 Software and expressed as relative fluorescence units (RFU).

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 inhibitors (PhosSTOP[™], Roche). After lysis and sonication, samples were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min, at 4°C. For RIPK3 immunoprecipitation, 50,000,000 of cells were stimulated with 500 ng/ml TRAIL-SK for the indicated times at

37°C. Anti-RIP3 antibody (Pierce, PA1-41533) or IgG control were 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 recovered 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 or lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane. Membranes were then blocked with 4% Bovine Serum Albumine (BSA) in TBS 1X (20 mM Tris; 137 mM NaCl), 0.1% (v/v) Tween 20 (TBS-Tween) during 1 h and then incubated overnight at 4°C with indicated primary antibodies. Membranes were then washed twice with TBS-Tween and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated secondary antibody. 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.

Mass Spectrometry: Identification of Immunoprecipitated Proteins

This experiment was realized in duplicate. For each time point treatment with TzB, 0 and 3 h, eight RIPK3 immunoprecipitates were pooled (240 µL) and subjected to enzymatic digestion: proteins were reduced with 25 µL of 65 mM DTT (15 min at 37°C) then alkylated with 25 µL of 135 mM iodoacetamide (15 min at room temperature in the dark). The sample was completed with 170 µL of 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) and finally digested with 2 µg 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 µL of 0.1% acid formic and injected in a nanoflow high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Dionex, LC Packings Ultimate 3,000) 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 3,000 nanoflow LC system (Dionex, LC Packings). The sample (10 µL) was loaded onto a trapping precolumn (5 mm × 300 µm i. d., 300 Å pore size, Pepmap C18, 5 µm) during 3 min with 2% buffer B at a flow rate of 25 µL/min. Reverse-phase separation was then performed at a flow rate of 0.250 µL/min using an analytical column (15 × 300 µm i. d., 300 Å pore size, Pepmap C18, 5 µm, 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 60,000 at m/z 400 in the mass range 400–2,000; ion injection times were calculated to allow the accumulation of 10^6 ions in the Orbitrap for each spectrum. The ten most intense ions (with an intensity $\geq 2,000$ counts and a charge state ≥ 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 ± 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, 23,655,377 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 sample [<http://proline.profi-proteomics.fr/>] (Carapito et al., 2015). 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 (Fermin et al., 2011), 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 (Pham et al., 2010).

Statistical Analysis

Three independent experiments, each consisting of three replicates, were performed for each assay. 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).

RESULTS

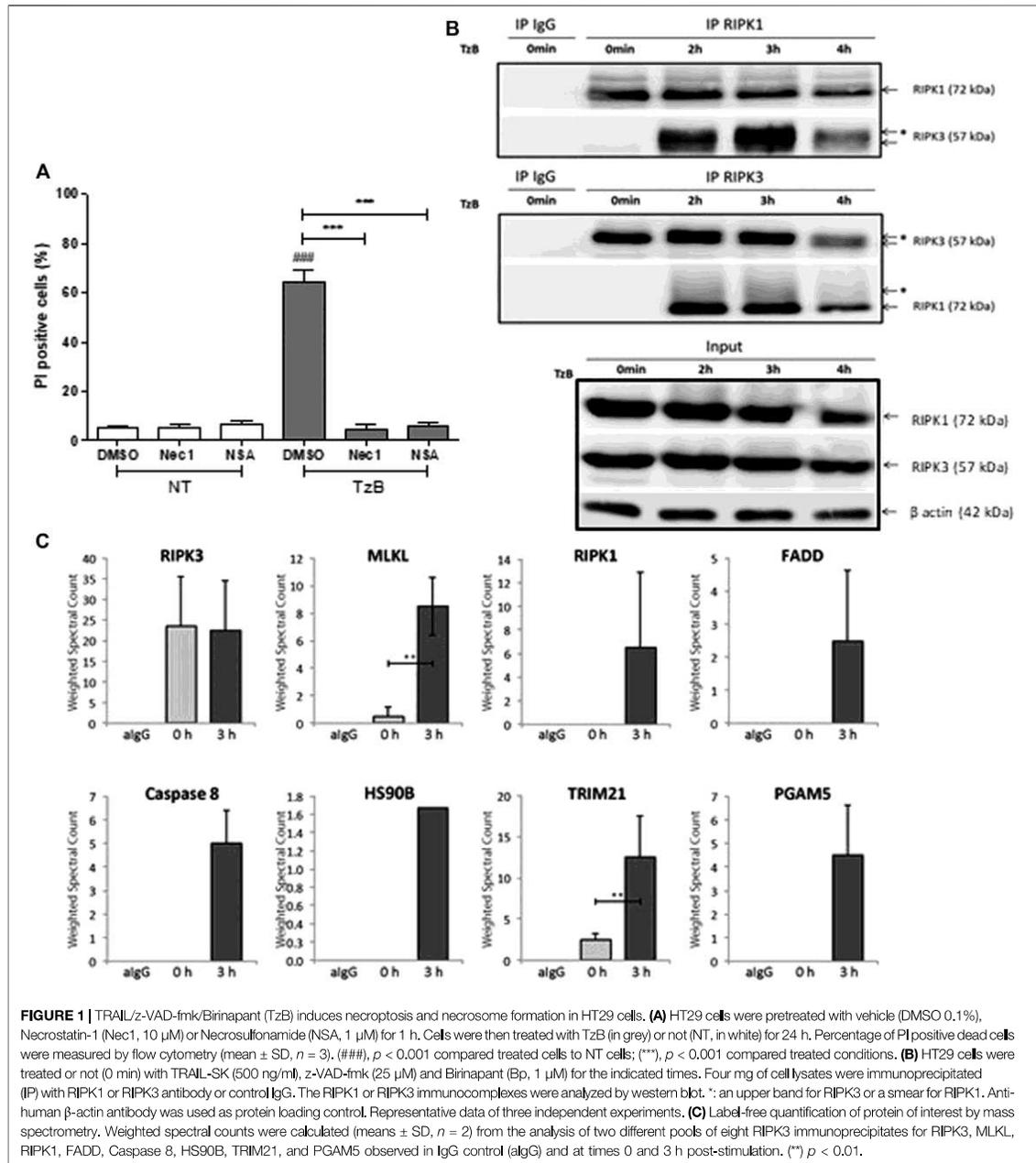
Treatment With TRAIL/z-VAD-fmk/Birinapant (TzB) Induces Necroptosis and RIPK1/RIPK3 Interaction in Human HT29 Colon Carcinoma Cells

TRAIL/zVAD/Birinapant (TzB) treatment induced a significant increase in propidium iodide positive cells (60%) at 24 h in HT29 cells. TzB-dependent death was inhibited by both necrostatin-1 (Nec1), a RIPK1 inhibitor (Degterev et al., 2008), and necrosulfosamide (NSA), an inhibitor of RIPK3-MLKL interaction (Sun et al., 2012) (Figure 1A), confirming that TzB-treatment induced necroptosis. Treatment with z-VAD-fmk and Birinapant only was checked not to induce cell death (Supplementary Figure S1A).

In order to investigate TRAIL-induced necrosome timing, cytoplasmic extracts from HT29 cells were subjected to immunoprecipitation using an anti-RIPK1 antibody at different time points after TzB stimulation. Western Blot analysis showed interaction of endogenous RIPK3 with RIPK1 upon TzB-induced necroptosis (Figure 1B). This was confirmed by immunoprecipitation using an anti-RIPK3 antibody, which showed a strong interaction of RIPK1 with RIPK3 at 3 h (Figure 1B). An up-shift of RIPK3 and a smear for RIPK1 were also observed in RIPK1 and RIPK3 immunoprecipitates at 3 h (Figure 1B) suggesting RIPK3 phosphorylation and post-translational modifications of RIPK1 upon TzB-induced necroptosis.

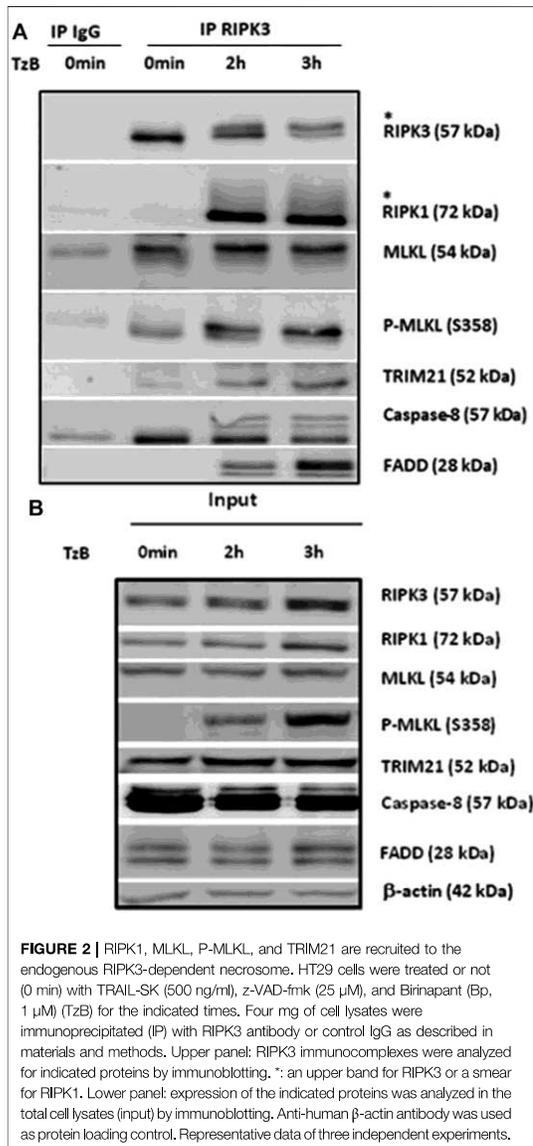
Mass Spectrometry Analysis of Endogenous TRAIL-Induced RIPK3-Dependent Necrosome Identifies TRIM21 as a new Partner

Immunoprecipitation using anti-RIPK3 antibody was performed to characterize, by mass spectrometry, protein interactors of endogenous RIPK3 at 0 and 3 h post-stimulation with TzB treatment. Based on the model of RIPK3 oligomerization by



RIPK1 in response to receptor signaling (Orozco et al., 2014), RIPK3 immunoprecipitates were analyzed by LC-MS/MS for each time point. 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 1C). RIPK1, FADD and caspase 8 were observed at time 3 h and suggested a RIPK3-dependent necrosome formation upon TzB treatment in HT29 cells. Peptides from two other proteins, HS90B and PGAM5, were also detected in the RIPK3-precipitated complex at time point 3 h



(Figure 1C; Supplementary Table S1). These proteins have already been found recruited to the necrosome upon treatment with TNF/Smac mimetic/z-VAD-fmk (Wang et al., 2012; Li et al., 2015). Interestingly, our data identified for the first time the presence of TRIM21 peptides in RIPK3 immunoprecipitate. Spectral count quantification revealed a significant increase of TRIM21 at time point 3 h in comparison with time 0 h (Figure 1C), suggesting increased TRIM21 recruitment in RIPK3-dependent necrosome upon TzB stimulation. None of

the identified proteins has been found in the IgG control immunoprecipitate (Figure 1C; Supplementary Table S1, Supplemental Information).

TRIM21 is Recruited to the Endogenous RIPK3-dependent Necrosome Upon TzB Treatment

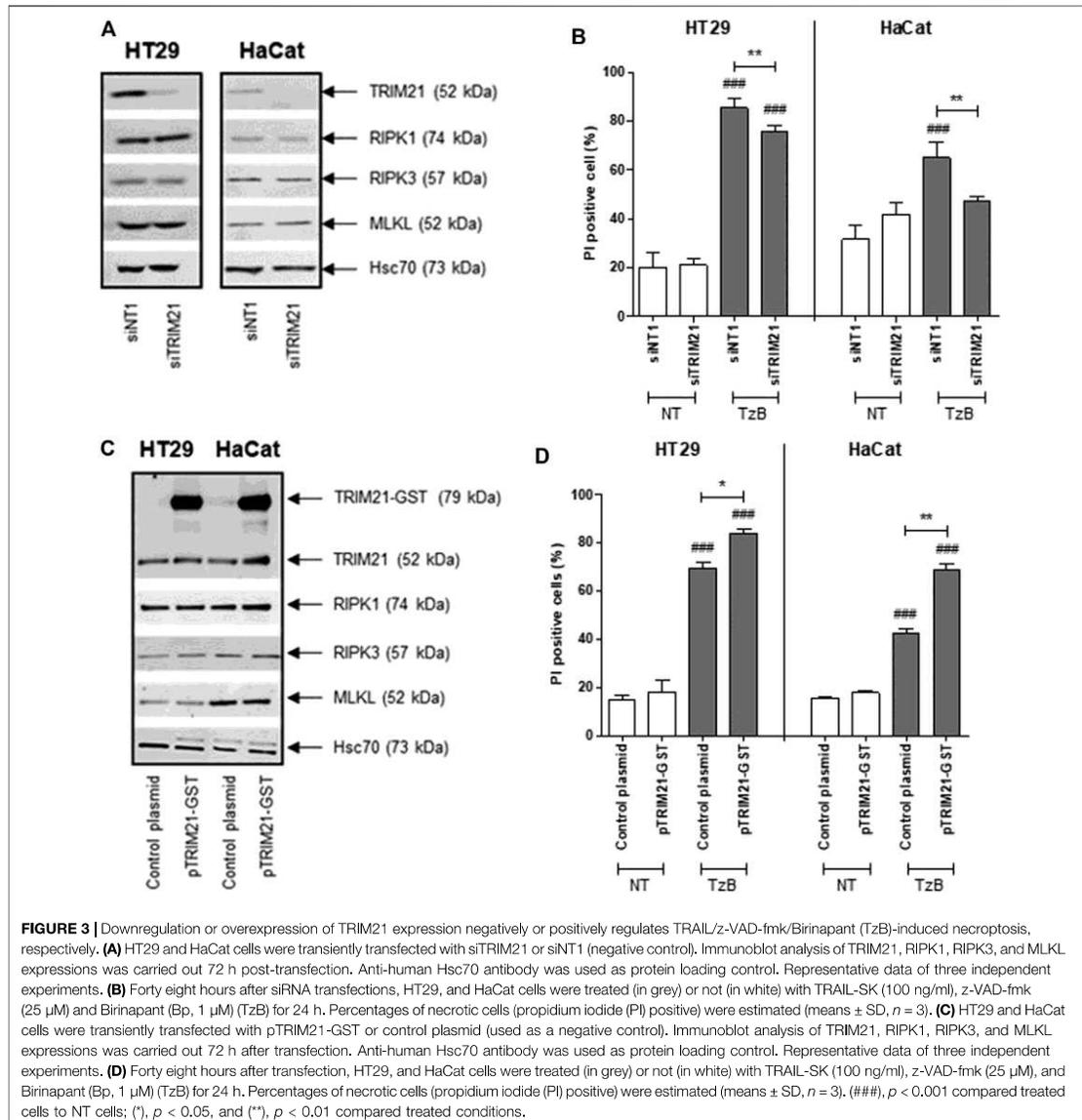
To corroborate the recruitment of TRIM21 into the RIPK3-dependent necrosome, HT29 cells were treated with TzB. After 0, 2 or 3 h of treatment, immunoprecipitation using an anti-RIPK3 antibody were conducted. As shown in Figure 2A, low level of TRIM21 was detected at time point 0 h and the amount of TRIM21 increased in a time-dependent manner in the RIPK3-dependent complex upon TzB treatment. This confirmed that TRIM21 is a new partner of the RIPK3-dependent necrosome complex and supported proteomic data (Figure 1C). We also observed an up-shift of RIPK3 after 2 h of treatment (Figure 2A), suggesting RIPK3 phosphorylation as previously shown after TNF/z-VAD-fmk/SM stimulation in HT29 cells (He et al., 2009). In parallel, the phosphorylation of MLKL was evidenced from 2 h to 3 h after TzB treatment as showed by anti-P-MLKL antibody, which was also confirmed in the corresponding total lysates (Figure 2B). Altogether, these data showed for the first time the formation of RIPK3-dependent endogenous necrosome complex upon TzB treatment in HT29 cells containing RIPK1, MLKL, FADD, caspase-8, and TRIM21.

TRIM21 is a Positive Regulator of TzB-Induced Necroptosis in HT29 and HaCat Cells

First, transient transfection with TRIM21 targeted small interference RNA (siRNA), reduced TRIM21 protein expression, but did not alter RIPK1, RIPK3 or MLKL protein expression in HT29 and HaCat cells (Figure 3A). The reduced TRIM21 expression significantly decreased the percentage of necrotic cells induced by treatment with TzB in both HT29 and HaCat cells (Figure 3B). On the other hand, transient transfection with a plasmid coding for TRIM21 tagged with GST (pTRIM21-GST) was used to overexpress TRIM21-GST in both HT29 and HaCat cells without modifying the expressions of endogenous TRIM21, RIPK1, RIPK3 or MLKL (Figure 3C). TRIM21 overexpression significantly sensitized both HT29 and HaCat cells to TzB treatment by increasing the percentage of necrotic cells (Figure 3D). These data showed that TRIM21 is a new positive modulator of TRAIL-induced necroptosis.

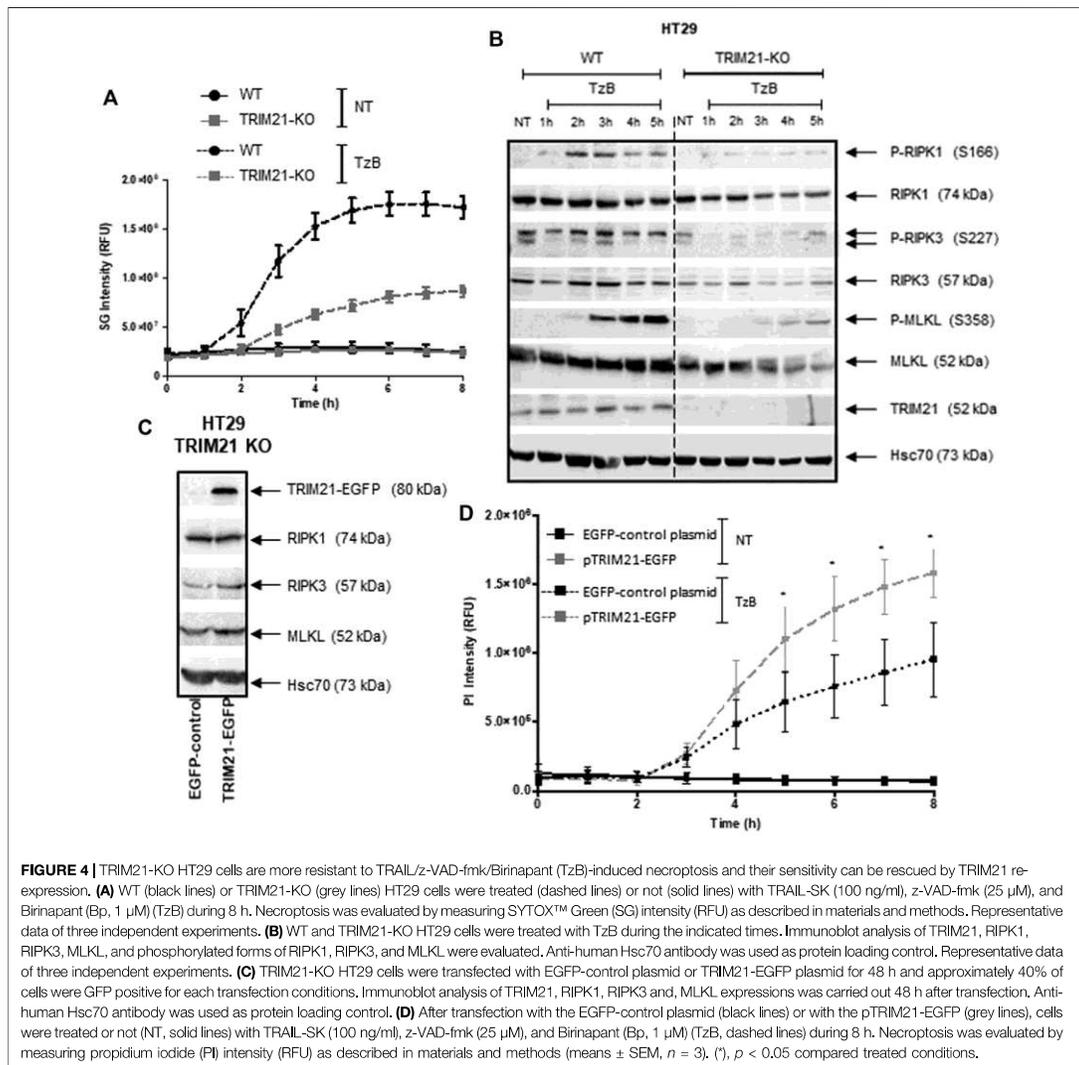
CRISPR/Cas9-Mediated TRIM21 Knockout in HT29 Cells Confirms that TRIM21 is a Positive and Specific Modulator of TzB-Induced Necroptosis.

Furthermore, human HT29 cells were transfected with two distinct CRISPR-Cas9 gRNA-plasmids to abrogate TRIM21



expression. Western blot analysis validated the complete loss of TRIM21 expression in TRIM21-KO HT29 cells compared to wild-type (WT) HT29 cells. No change in expression of RIPK1, RIPK3 or MLKL was observed in TRIM21-KO HT29 cells (Supplementary Figure S1B, Supplemental Information). To further characterize the impact of TRIM21 loss in HT29 cells, cell death by TzB-induced necroptosis was followed over time in both WT and TRIM21-KO HT29 cells using SYTOXTM Green reagent staining (Figure 4A). While WT HT29 cells began to die by necroptosis at 2 h after TzB treatment, cell death signal was

delayed for TRIM21-KO HT29 cells and started to increase at 3 h to reach a maximum intensity 3 times lower. In parallel, Western blot analysis showed that, after TzB treatment, not only a lower phosphorylation state of RIPK1 and MLKL, but also a delay in the onset of MLKL phosphorylation took place in TRIM21-KO HT29 cells when compared to what happened in WT HT29 cells (Figure 4B). In fact, after TzB treatment, phosphorylation of MLKL was detected from 2 to 5 h in WT HT29 cells, whereas only low level of P-MLKL was observed from 3 to 5 h in TRIM21-KO HT29 cells. Moreover, RIPK3 levels were upregulated in WT



HT29 cells in the first 3 h after TzB treatment. Such an increase in the expression of RIPK3 has already been described upon TNF-induced necroptosis (Afonso et al., 2015). In contrast, upon TzB treatment, RIPK3 levels varied only slightly in TRIM21-KO HT29 cells that probably contributed to limit cell death (Figure 4B). To verify that this loss of sensitivity to TzB-induced necroptosis observed in TRIM21-KO HT29 cells was specifically related to the absence of TRIM21, rescue experiments were conducted. Thus, transient transfection of TRIM21-KO HT29 cells with the pTRIM21-EGFP expression vector induced TRIM21-EGFP expression (Figure 4C) and a greater sensitivity to TzB-induced necroptosis followed over-time

(Figure 4D). These investigations reinforced the data obtained above with the siRNA-based approach (Figures 3A,B), further validating TRIM21 as a positive modulator of this cell death pathway. Moreover, the loss of TRIM21 expression only affected the sensitivity of TRIM21-KO HT29 cells to TzB-induced necroptosis (Supplementary Figure S1E, Supplemental Information) but did not affect the sensitivity of TRIM21-KO HT29 cells to apoptosis induced by the combination of Birinapant (Bp) with TRAIL, TNF or Ig-FasL (Supplementary Figure S1D, Supplemental Information), nor to necroptosis induced by z-VAD-fmk/Bp with TNF or Ig-FasL (Supplementary Figure S1E, Supplemental Information).

Altogether, these data suggest that TRIM21 is a positive and specific regulator of TzB necroptotic cell death pathway.

DISCUSSION

TRAIL is a potential anticancer drug that induces apoptosis or necroptosis depending on cell conditions (Vasilikos et al., 2017). 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 (Newsom-Davis et al., 2009). A strategy to overcome apoptosis resistance is to induce necroptosis, a backup cell death pathway (Han et al., 2011).

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. in 2009. It is important to note that RIPK3 is not expressed in most cancer cell lines due to methylation-dependent regulations, however HaCat cells were described to be sensitive to TzB-induced necroptosis (Karl et al., 2014). This necroptotic death pathway 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 in HT29 cells 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 anti-RIPK3 antibody (Orozco et al., 2014). 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) (Bouwmeester et al. 2004; Zhang et al., 2009; Chen et al., 2015). Here, we characterized for the first time, by mass spectrometry, a novel protein in the endogenous necrosome complex immunoprecipitated with an anti-RIPK3 antibody upon TzB treatment. Three hours post-stimulation with TzB, known components of necrosome complex such as RIPK1, FADD, caspase-8, and MLKL were found in the anti-RIPK3 immunoprecipitate. More interestingly, a new protein, TRIM21, was also put in evidence in the RIPK3-dependent necrosome. TRIM21 (also known as Ro52) belongs to the RING E3 ligases family of tripartite motif (TRIM) proteins (Tomar and Singh, 2015) involved in ubiquitination processes of various proteins implied either in the cell cycle (Sabile et al., 2006), in the antiviral immune response (Young et al., 2011) or in apoptosis (Jauharoh et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Among others interactors found in the endogenous RIPK3-dependent necrosome, phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5) and HS90B (Heat shock protein 90-beta) peptides were detected in RIPK3 immunoprecipitate at time point 3 h. A study showed that PGAM5 may play a role in TNF/Smac mimetic/z-VAD-fmk-induced necroptosis via its recruitment to the necrosome by RIPK3, leading to mitochondrial fragmentation and ROS production (Wang et al., 2012). HSP90 and its co-chaperone

CDC37 were characterized in HA-Flag-tagged RIPK3 after TNF/Smac mimetic/z-VAD-fmk in HT29 cells and were required for RIPK3 activation and necroptosis induction (Li et al., 2015). Nonetheless, further studies are needed for a better understanding of the role of PGAM5 and HS90B in TRAIL/z-VAD-fmk/Birinapant-induced necroptosis.

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 in basal conditions (without stimulation) and increased from 2 to 3 h post-treatment with TzB, confirming the recruitment of TRIM21 into the necrosome.

To further characterize the role of TRIM21 in TzB-induced necroptosis, downregulation by RNA interference and overexpression experiments of this E3 ubiquitin-protein ligase 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 necroptotic stimulus, such as TzB, could induce cell death. Downregulation or overexpression of TRIM21 in both cell lines showed a decrease or an increase in necroptosis induction, 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 WT HT29 cells. It has to be noticed that the inactivation of TRIM21 expression by CRISPR-Cas9 or alteration of TRIM21 by RNA interference did not modify the expression of death receptors (DR4 and DR5) in HT29 cells (Supplementary Figure S1C, Supplemental Information). 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 WT HT29 cells.

Finally, in a time course experiment, the expression of TRIM21 was positively correlated to the phosphorylation state of two key proteins RIPK1 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 (Gao et al., 2016), 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/z-VAD-fmk/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* (Brauner et al., 2015; Ding et al., 2015; Zhou et al., 2018). 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.

In conclusion, our works describe for the first time the characterization by mass spectrometry of proteins that are co-immunoprecipitated with endogenous RIPK3 upon TRAIL/zVAD/Birinapant-induced necroptosis. Among known proteins to be associated with TRAIL-induced necrosome such as RIPK1, MLKL, FADD, and caspase-8, a new partner was discovered, the E3 ubiquitin ligase TRIM21 which positively and specifically modulates TRAIL-induced necroptosis. Taken together, these results provide a new insight in the TRAIL necroptotic pathway which could be useful to treat apoptosis resistant cancer.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <http://www.proteomexchange.org/>, PXD003383.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have made a substantial, direct and intellectual contribution to this manuscript, and approved it for publication.

FUNDING

This research was funded by, the National Institute for Cancer (INCa), the Ligue Contre le Cancer (Ile et Vilaine, Loire-Atlantique and Maine et Loire Committees), the National

REFERENCES

- Afonso, M. B., Rodrigues, P. M., Carvalho, T., Caridade, M., Borralho, P., Cortez-Pinto, H., et al. (2015). Necroptosis is a key pathogenic event in human and experimental murine models of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Sci.* 129, 721–39. doi:10.1042/CS20140732
- 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. doi:10.1172/JCI6926
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.-O., Bergamini, G., Crougton, K., et al. (2004). A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol.* 6, 97–105. doi:10.1038/ncb1086
- 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. doi:10.1111/joim.12375
- Carapito, C., Lane, L., Benama, M., Opsomer, A., Mouton-Barbosa, E., Garrigues, L., et al. (2015). Computational and ass-pectrometry-based orkflow for the iscovery and alidation of issing uman roteins: pplication to hromosomes 2 and 14. *J. Proteome Res.* 14, 3621–3634. doi:10.1021/pr5010345

Institute of Health and Medical Research (Inserm), the University of Rennes 1 and the Région Bretagne, the Contrat de Plan Etat-Région (CPER) grant named “Infectio”, the Fondation pour la Recherche Médicale (funding n°DEQ20180339216). This work was also supported by grants from Biogenouest, Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA) and Conseil Régional de Bretagne awarded to FF was supported by INCa (post-doctoral fellow). MB was supported by the European University of Brittany (Excellence Research Chair). MSE was supported by a PhD studentship cofunding by the Région Bretagne and the Ligue Contre le Cancer (committee Ile et Vilaine), and by the UFR Pharmacy of University of Rennes 1. GK-A was supported by a PhD studentship from the Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the flow cytometry platform of Biosit UMS3080, Université de Rennes 1 and the SyNanoVect platform, Université de Bretagne Occidentale. We would like to thank Christophe Bruley for the critical reading of the Proline Studio Materiel and Method part, MW-H for the gifted human TRIM21-EGFP plasmid and PL for the gifted Ig-FasL. We also thank FZ for the gift of pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmid.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.645134/full#supplementary-material>.

- Chen, W., Wu, J., Li, L., ZhangRen, Z. J., Liang, Y., Ren, J., et al. (2015). Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. *Nat. Cell Biol.* 17, 434–444. doi:10.1038/ncb3120
- Degterev, A., Hitomi, J., Germscheid, 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. doi:10.1038/nchembio.83
- 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. doi:10.1007/s13277-015-3572-2
- Fermin, D., Basrur, V., Yocum, A. K., and 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. doi:10.1002/pmic.201000650
- Fulda, S., Wick, W., Weller, M., and 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. doi:10.1038/nm735
- 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. Biol.* 94, 256–264. doi:10.1139/bcb-2016-0009

- Han, J., Zhong, C.-Q., and Zhang, D.-W. (2011). Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat. Immunol.* 12, 1143–1149. doi:10.1038/ni.2159
- 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, 1100–1111. doi:10.1016/j.cell.2009.05.021
- 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. doi:10.1038/82732
- Jauharoh, S. N. A., 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.* 417, 582–587. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.010
- 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. doi:10.1038/cdd.2012.90
- 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.* 5, e1444. doi:10.1038/cddis.2014.404
- 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. doi:10.1073/pnas.1505244112
- Newsom-Davis, T., Prieske, S., and Walczak, H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? 14, 607–623. doi:10.1007/s10495-009-0321-2
- Orozco, S., Yatin, 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. *Death Differ.* 21, 1511–1521. doi:10.1038/cdd.2014.76
- Pham, T. V., Piersma, S. R., Warmoes, M., and 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. doi:10.1093/bioinformatics/btp677
- 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. Biol.* 26, 5994–6004. doi:10.1128/MCB.01630-05
- 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. doi:10.1016/j.cell.2011.11.031
- 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. doi:10.1111/boc.201400046
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Biol.* 15, 135–147. doi:10.1038/nrm3737
- Vasilikos, L., Spilgies, L. M., Knop, J., and Wong, W. W. (2017). Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins. *Immunol. Biol.* 95, 160–165. doi:10.1038/icb.2016.118
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., et al. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat. Med.* 5, 157–163. doi:10.1038/5517
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., and Wang, X. (2012). The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necroptotic death pathways. *Cell* 148, 228–243. doi:10.1016/j.cell.2011.11.030
- 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. doi:10.1074/jbc.M110.172288
- Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Zhivotovsky, B., and Lavrik, I. N. (2014). Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role. *Cell Mol. Life Sci.* 72, 505–517. doi:10.1007/s00018-014-1757-2
- 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. doi:10.1126/science.1172308
- 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. doi:10.1042/CBI20110322
- 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. doi:10.2147/CMAR.S175470

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Simoes Eugénio, Faurez, Kara-Ali, Lagarrigue, Uhart, Bonnet, Gallais, Com, Pineau, Samson, Le Seyec and Dimanche-Boitrel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résultat 2 : TRIM21 et NASH-CHC

L'absence d'expression de l'E3 ubiquitine ligase TRIM21 chez les souris, augmente la carcinogenèse hépatique dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique et est associée à une augmentation d'expression des points de contrôle immunitaire.

Trim21 deficiency in mice increases HCC carcinogenesis in a NASH context and is associated with immune checkpoint upregulation

Ghania H. Kara-Ali¹, Luis Cano², Sarah Dion¹, Ghiles Imerzoukene¹, Annaig Hamon¹, Mélanie Simoes Eugénio¹, Claire Piquet-Pellorce¹, Gevorg Ghukasyan³, Michel Samson¹, Jacques Le Seyec¹ and Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel¹

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

² INSERM, INRAE, CHU Pontchaillou, UMR 1241 NUMECAN, Univ. Rennes, Rennes, France

³ Plateforme d'Histopathologie de Haute Précision (H2P2), Université de Rennes, 35000 Rennes, France.

Manuscrit soumis

Contexte de l'étude :

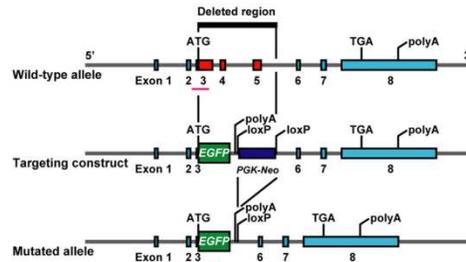
TRIM21 est une E3 ubiquitine ligase décrite comme étant impliquée dans différents processus biologiques importants tels que le cycle cellulaire, la mort cellulaire, l'autophagie et l'immunité. De par son rôle dans ces différentes voies de signalisations, nous nous sommes intéressés à l'implication de TRIM21 dans le cancer. Certaines études montrent qu'une faible expression de TRIM21 peut être associée à un mauvais pronostic dans certains cancers comme le cancer du sein, le cancer colorectal ou encore le carcinome hépatocellulaire (CHC). Cependant les mécanismes impliquant cette E3 ubiquitine ligase au cours de la carcinogenèse restent méconnus. Afin de comprendre son rôle, spécifiquement au cours de la progression du CHC, nous avons utilisé un modèle *in vivo* de carcinogenèse hépatique dans un contexte de stéatohépatite non-alcoolique (NASH) chez des souris hypo-insulinémiques.

Modèle utilisé :

Pour cette étude, nous avons utilisé un modèle murin de CHC se développant dans un contexte NASH (*le modèle STAMTM*)²⁰¹. Pour ce faire, des souriceaux mâles sont injectés avec de la streptozotocine (STZ) détruisant les cellules β du pancréas et induisant donc un état hypo-insulinémique. Les souris diabétiques sont ensuite mises sous un régime hyperlipidémique et riche en cholestérol (*High-fat -high-cholesterol diet, HFHCD*) pendant 4, 8 ou 12 semaines.

Nous avons utilisé des souris exprimant ou non le gène *Trim21* (*Trim21^{+/+}* ou *Trim21^{-/-}*) commercialisé par Jackson. Les souris *Trim21^{-/-}* ont été décrites pour la première fois en 2009 par *Yoshimi et al*⁶⁶. Une recombinaison homologue a permis de tronquer les exons

3 à 5 du gène Trim21 et de les remplacer par une séquence EGFP (Enhanced green fluorescent protein). Les souris fournies par Jackson étaient des souris hétérozygotes exprimant un allèle sauvage et un allèle muté (*Trim21*^{+/-}). À partir de ces dernières nous avons généré les souris *Trim21*^{+/+} ou *Trim21*^{-/-}, et nous les avons mises sous protocole STZ+HFHCD.



Résultats principaux :

En utilisant des souris diabétiques exprimant ou non Trim21 sous régime HFHCD, nous montrons qu'après 12 semaines, les souris *Trim21*^{-/-} développent plus de lésions hépatiques et présentent un taux sérique de transaminases élevé (*Figure 1*). De plus, cette augmentation est associée à une émergence de tumeurs hépatiques plus importantes en nombre comparée à leurs congénères sauvages *Trim21*^{+/+} (*Figures 2 et 3*).

La variation du ratio du poids de la rate sur le poids corporel entre nos deux génotypes, nous a amené à nous intéresser au micro-environnement splénique à 12 semaines de régime chez les souris *Trim21*^{-/-} et *Trim21*^{+/+} (*Figure 5*). De façon intéressante, nous avons pu déceler par immunofluorescence une augmentation de la population lymphocytaire T dans la rate des souris *Trim21*^{-/-} après 12 semaines de régime, et plus précisément de lymphocytes T CD4⁺ (*Figure 5*). Par ailleurs, nous observons par cytométrie en flux, chez ces souris *Trim21*^{-/-} une augmentation des proportions de lymphocytes CD8⁺PD-1⁺ et CD4⁺PD-1⁺ (*Figure 6*).

Ce phénomène est également retrouvé par une approche en immunofluorescence multiplexe dans le foie des souris *Trim21*^{-/-} après 12 semaines de régime HFHCD (*Figure 7*). En parallèle de cette augmentation de cellules T exprimant le récepteur PD-1, nous avons également mesuré une augmentation du ligand PD-L1 dans le foie des souris *Trim21*^{-/-} à 12 semaines de régime (*Figure 7*). Parmi ces cellules PD-L1⁺, on retrouve une plus forte proportion de macrophages (CD68⁺PD-L1⁺) chez les souris *Trim21*^{-/-} comparé aux souris sauvages (*Figure 7*).

Une analyse au niveau des tumeurs des souris *Trim21*^{-/-} montre une augmentation du pourcentage de cellules PD-L1⁺ et en particulier de macrophages CD68⁺PD-L1⁺ (*Figure 8*). Nous retrouvons également une augmentation du nombre de lymphocytes T, plus spécifiquement des CD4⁺ et des CD4⁺PD-1⁺, plus importante chez les souris *Trim21*^{-/-}. Mais de façon assez surprenante, on observe une tendance inversée pour les lymphocytes CD8⁺ chez les souris *Trim21*^{-/-} à 12 semaines de régime HFHCD et pas de différence entre les deux génotypes pour les lymphocytes CD8⁺PD-1⁺ (*Figure 9*).

Conclusion :

L'absence d'expression de TRIM21 augmente le nombre de tumeurs CHC dans un contexte d'une NASH et corrèlerait avec l'expression augmentée des points de contrôle immunitaire PD-1 /PD-L1 dans le foie, ce qui limiterait la réponse immunitaire anti-tumorale.

1 **LACK OF THE E3 UBIQUITIN LIGASE TRIM21 IN MICE INCREASES HEPATOCELLULAR**
2 **CARCINOGENESIS IN A NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS CONTEXT AND IS ASSOCIATED**
3 **WITH IMMUNE CHECKPOINT UP REGULATION**

4
5 **SHORT TITLE (96):** Lack of TRIM21 increases HCC in NASH context and correlates with immune
6 checkpoint up regulation

7
8 Ghania Hounana Kara-Ali¹, Luis Cano², Sarah Dion¹, Ghiles Imerzoukene¹, Annaig Hamon¹, Mélanie
9 Simoes Eugénio¹, Claire Piquet-Pellorce¹, Gevorg Ghukasyan³, Michel Samson¹, Jacques Le Seyec¹
10 and Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel¹

11
12 ¹Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S
13 1085, F-35000 Rennes, France

14 ²INSERM, INRAE, CHU Pontchaillou, UMR 1241 NUMECAN, Univ. Rennes, Rennes, France

15 ³Plateforme d'Histopathologie de Haute Précision (H2P2), Université de Rennes, 35000 Rennes,
16 France.

17
18 **FINANCIAL SUPPORT:**

19 This work was supported by the INSERM; the University of Rennes 1; the “Ligue Contre le Cancer,
20 Comités du Grand Ouest”; the Biology and Health Federative Research Structure of Rennes (Biosit,
21 UMS CNRS 3480/US INSERM 018); the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM #
22 DEQ20180339216). GHKA was supported by a PhD fellowship from “Ministère de l'Enseignement
23 Supérieur de la Recherche et de l'Innovation” and by ARC Fondation de la recherche contre le cancer.
24 AH was supported by a postdoctoral fellowship from « Fondation pour la Recherche Médicale”.

25
26 **LIST OF ABBREVIATIONS :** HCC, Hepatocellular carcinoma; HBV, Hepatitis B virus; HCV, Hepatitis
27 C virus; NAFLD, Nonalcoholic fatty liver disease; NASH, Nonalcoholic steatohepatitis; TRIM21,
28 Tripartite motif-containing protein 21; IFN, Interferon; HFD, High fat diet; HFHCD, High fat high
29 cholesterol diet; HFHSD, High fat high sugar diet; STZ, Streptozotocin; SD, Standart diet; ALT, Alanine
30 aminotransferase; HES, Hematoxilin and eosin staining; NT, peri-tumoral; T, tumor; GS, glutamine
31 synthetase; DEN, diethylnitrosamine; ROS, Reactive oxygen species; Nrf2, Nuclear factor Erythroid 2-
32 related factor 2; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; TIL, Tumor-infiltrating lymphocyte;

33
34 **CORRESPONDING AUTHOR :**

35 Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel

36 marie-therese.boitrel@univ-rennes1.fr

37
38 Jacques Le Seyec

39 jacques.le-seyec@univ-rennes1.fr

40
41 Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S
42 1085, F-35000 Rennes, France

43

44 **CONFLICT OF INTEREST :**

45 the authors declare no conflict of interest

46

47

48 **WORD COUNT :** 3,444 words

49

50

51 **SYNOPSIS:**

52 Diabetic mice under high fat high cholesterol diet, lacking the E3 ubiquitin ligase TRIM21 showed higher
53 hepatocellular carcinogenesis in a NASH context. This was associated with an upregulation of PD-1
54 and PD-L1 immune checkpoints.

55

56

57 **ABSTRACT (260 mots):**

58

59 **Background:** The downregulation of the E3 ubiquitin ligase TRIM21, a protein involved in different
60 physiological processes such as cell cycle, cell death or immune response, can have serious
61 pathophysiological consequences. Thus, a low TRIM21 expression has been linked to poor survival rate
62 in different cancers such as diffuse large B-cell lymphoma, breast cancer and hepatocellular carcinoma
63 (HCC) without knowing the involved mechanisms.

64 **Methods:** Male mice of *Trim21^{+/+}* or *Trim21^{-/-}* genotypes were injected at a neonatal stage with
65 streptozotocin. In a hypoinsulinemic state, these mice were fed with a high-fat high-cholesterol diet
66 (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks. Mice included in this protocol progressively developed a non-alcoholic
67 steatohepatitis (NASH) which systematically resulted in HCC development.

68 **Results:** Liver damage was more severe in *Trim21^{-/-}* mice after 12 weeks on HFHCD, as attested by
69 elevated serum transaminase levels. These mice also developed higher number of HCC nodules at 12
70 weeks. Analysis of the immune population in spleen and liver, showed a higher proportion of CD4⁺PD-
71 1⁺ and CD8⁺PD-1⁺ T cells in *Trim21^{-/-}* mice. PD-1 expression was accompanied with PD-L1 up regulation
72 in the liver. CD4⁺PD-1⁺ T cells and PD-L1⁺ cells up regulations were also found in *Trim21^{-/-}* mice tumors.
73 However, CD8⁺ cells in *Trim21^{-/-}* mice tumors tended to be decreased.

74 **Conclusion:** The E3 ubiquitin ligase TRIM21 limits the emergence of HCC nodules in mouse developing
75 NASH. The establishment of an effective anti-tumor immune response may require TRIM21, potentially
76 by restricting the expression of PD-1 in lymphocytes and of PD-L1 in tumors.

77

78 **KEYWORDS:**

79

80 TRIM21, NASH, HCC, PD-1/ PD-L1 immune checkpoints

81 **INTRODUCTION**

82

83 Hepatocellular carcinoma (HCC) is the 6th most common cancer and the 3rd cause of cancer-
84 related deaths worldwide [1]. While overall cancer incidence and death-related cancer are decreasing
85 in the world, the incidence of HCC has not diminished [2]. The majority of HCC occurs in an inflammatory
86 context induced by recurrent liver insults such as alcohol overconsumption, viral hepatitis infections, or
87 metabolic syndrome [3],[4]. Globally, liver lesions induced by hepatitis B (HBV) or C (HCV) viruses
88 account for the majority of HCC cases in some countries. However, with treatments available, the
89 number of HCC cases with viral etiology has steadily decreased [4]. Today, diabetes and obesity
90 pandemics are on the rise, and with it, the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Ranging from simple
91 steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), NAFLD is becoming the main contributor to liver
92 diseases [5], and by 2030 will be the major determinant of HCC [4]. Accumulation of lipids in hepatocytes
93 has been shown to lead to lipotoxicity, metabolic reprogramming, and over time, to NASH. Moreover,
94 chronic inflammation induced by lipid overload favors tumorigenesis in the liver [6].

95 The E3 ubiquitin ligase tripartite motif-containing protein 21 (TRIM21) is a member of the structurally
96 diverse tripartite motif protein family implicated in a broad range of biological processes [7]. Also known
97 as Ro-52, TRIM21 was first identified as an important auto-antigen in auto-immune diseases such as
98 the Sjögren syndrome and the systemic lupus erythematosus [8], [9]. Previous studies reported that
99 TRIM21 is induced by type I and II interferons (IFNs). Besides, TRIM21 has been shown to negatively
100 regulate NF- κ B activation in mice embryonic fibroblasts, resulting in a reduction of pro-inflammatory
101 cytokine induction [10]. TRIM21 also down-regulates IL-23-dependent Th17 differentiation and pro-
102 inflammatory cytokines, thus suppressing IFN-mediated immune activation by a negative-feedback loop
103 [11]. These different data suggest that TRIM21 is a negative regulator of the inflammatory response.
104 Aside from its role in inflammation and immunity, a study has shown that TRIM21 mediates the
105 degradation of two metabolic enzymes, the glyceronephosphate O-acyltransferase and the fatty acid
106 synthetase, inhibiting lipid metabolism, lipid toxicity, and thus limiting HCC progression [12], [13].
107 Besides, previous studies also found that patients expressing low *Trim21* mRNA in their HCC tumors
108 had a worst survival prognosis, suggesting that TRIM21 is a tumor suppressor [14]. Authors hinted at
109 the probable implication of this protein in cell death resistance and in the inflammatory response.
110 However, another group found conflicting results. Thus, *Trim21*^{-/-} mice were protected from
111 hepatocarcinogenesis in a chemically-induced murine model [15]. It has been hypothesized that TRIM21
112 disrupts the p62-Keap1-Nrf2 pathway by blocking p62 oligomerization, leading to the downregulation of
113 the antioxidant response, a pathway implicated in carcinogenesis [16].

114 Numerous mice models have been developed to study HCC. However, not all can accurately replicate
115 human disease. Mice models developing spontaneous tumors after chronic lesions tend to mimic best
116 the human pathophysiology [17]. Thus, the model based on diabetic mice on a high-fat diet (HFD) [18]
117 [19] best recapitulates molecular characteristics of the human HCC [17]. Male mouse pups are injected
118 with streptozotocin (STZ) to induce hypoinsulinemic diabetes. After weaning, diabetic mice are fed with
119 HFD. After 8 weeks of HFD, mice developed liver adenomas and after 12 weeks, HCC [18]. Our group
120 had previously shown, using this model, how HCC emergence varies with diet composition, using a

121 high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) or a high-fat high-sugar diet (HFHSD). Thus, HFHCD triggered
122 higher immune cell recruitment in the liver, promoting inflammatory response and anti-tumor immune
123 surveillance [19].

124 Physiologically, the liver plays an important role in the immunological surveillance, as both portal vein
125 and arterial blood pass through. In this context, the liver has to harbor a tolerogenic microenvironment
126 to avoid triggering a response against exogenous non-pathogenic compounds such as gut-derived
127 products. Thus, the immune system is tightly regulated by immune-activating and suppressing cells [20].
128 In parallel, the immune system has been identified over the last decade as a major player in HCC
129 progression [21], [22]. However, the intrahepatic immune environment is affected differentially according
130 to the HCC etiology, highlighting the importance to better decipher the specific-etiological underlying
131 mechanisms [20]. Nonetheless, the intrahepatic immunosuppressive cells are often implicated in HCC
132 progression, such as the resident macrophages (Kupffer cells), the infiltrating monocyte-derived
133 macrophages [22] [23], the regulatory T cells, and the myeloid-derived suppressor cells [24].

134 In the last decade, immune checkpoint inhibitors (ICIs) are becoming a promising therapeutic solution
135 in immunosuppressive tumors, and understanding the underlying mechanisms to modulate immune
136 checkpoints are a major challenge. Due to its involvement in many cancer-specific pathways [25],
137 TRIM21 is attracting interest. As described above, its role in the immune system has been studied,
138 however, no evidence has been found yet for its implication in the anti-tumoral response in HCC
139 progression. In the present work, we compared the pathophysiological evolution of NASH leading to
140 liver cancer in a hypoinsulinaemic context in mice expressing or not TRIM21. Challenged mice were
141 monitored for up to 12 weeks to evaluate inflammation, NASH severity, and HCC progression.

142
143

144 **RESULTS**

145

146 **1) Trim21 helps to protect liver from damage during NASH**

147

148 To assess the role of TRIM21 during HCC development in a NASH background, diabetic *Trim21^{-/-}* mice
149 and their *Trim21^{+/+}* littermate controls were subjected to HFHCD for 4, 8, or 12 weeks, allowing a follow-
150 up of the disease over time. This protocol has already been described to induce steatosis and chronic
151 hepatitis leading to the subsequent development of HCC [18], [19]. The different clinical manifestations
152 were investigated. Thus, the hepatomegaly, a process expected in fatty liver disease progression [26],
153 was found from week 4 with progressive worsening over time in all mice regardless of genotype (Figure
154 1a). To monitor liver damage, the alanine aminotransferase (ALT) plasma levels, which correlate with
155 hepatic cell mortality [27], were measured (Figure 1b). While diabetic control mice (STZ+SD) showed
156 normal transaminase levels, high ALT levels were detected from 4 weeks in the plasma of both *Trim21^{+/+}*
157 and *Trim21^{-/-}* mice under HFHCD. Only a significant difference was distinguished at the late time of 12
158 weeks, which reflected greater liver damage in *Trim21^{-/-}* mice.

159 Steatosis creates a lipotoxic environment and participates in hepatocyte death. Moreover, the chronicity
160 of liver damage promotes the establishment of fibrosis [27]. These clinical parameters were therefore
161 compared between the 2 murine genotypes throughout the pathology. While no steatosis was revealed
162 in diabetic control mice, hematoxylin and eosin staining (HES) revealed the appearance of
163 macrovesicular steatosis as early as 4 weeks under HFHCD (Supplementary data 1a). To complete the
164 analysis, the NAFLD activity score (NAS) was determined on liver tissue samples. This histological
165 scoring system integrates the status of macrovesicular steatosis, hepatocellular ballooning and lobular
166 inflammation. While NAS scores were typical of NASH-affected livers in HFHCD mice, no differences
167 were detectable between *Trim21^{-/-}* mice and their *Trim21^{+/+}* littermate controls (Figure 1c). Similarly, Oil
168 red O staining of liver sections (Figure 1d and Supplementary data 1a) did not revealed differences for
169 their steatosis status. Both approaches, Sirius Red staining (Figure 1e and Supplementary data1b) and
170 mRNA quantification of *Col1a1* and *Tgfb1* (Figure 1f) showed the establishment of severe hepatic
171 fibrosis within both genotypes without detecting any significant difference between them.

172 These data indicated that TRIM21 did not influence the severity of either steatosis or fibrosis in the liver
173 of diabetic mice on HFHCD but did alter late-stage hepatocyte death.

174

175 **2) Trim21 limits HCC development during NASH**

176

177 During NASH progression, the liver microenvironment becomes prone to tumorigenesis and HCC
178 development [28]. Macroscopic analysis of livers of control diabetic mice under SD revealed no nodular
179 lesions, however mice on HFHCD unveiled multiple surface lesions (Figure 2a). Their number was
180 greater on the liver of *Trim21^{-/-}* mice whether at 4, 8 or 12 weeks (Figure 2b). Microscopic analysis on
181 HES staining revealed abnormal liver histology, focal steatosis and inflammatory foci (Figure 2c). The
182 analysis also revealed that these nodular lesions had histological characteristics of tumors such as the
183 absence of portal tracts, broad trabecular growth, as well as atypical nuclei. Their enumeration at the

184 microscopic scale on these HES-stained sections showed that more tumors dotted the livers of *Trim21*⁻
185 ⁻ mice at 12 weeks (Figure 2d) while no tumors were found in control diabetic mice under SD. Different
186 mRNA markers of HCC (*Ccnd1*, *Igf2*, *Gpc3*), oncofetal (*Afp*), and of cancer stem cells (*Klf4*, *Aldh1*,
187 *Cd133*) were firstly assessed in total liver extract. Significant increases were consistently discovered
188 when diabetic mice were fed with HFHCD, but no difference between genotypes was detectable
189 (Supplementary data2a). However, the analysis of these same markers by distinguishing the tumor
190 tissue (T) from the peri-tumoral tissue (NT) allowed to discover a significant greater overexpression of
191 *Igf2*, *Gpc3*, *Afp*, *Klf4*, and *Aldh1* in the tumor tissue exclusively in the livers from *Trim21*⁻ mice (Figure
192 3a). Furthermore, tumors in *Trim21*⁻ mice expressed higher levels of these markers compared to tumors
193 found in *Trim21*^{+/+} mice.

194 At the protein level, the labeling of the glutamine synthetase (GS) and of the reticulin helped to further
195 characterize tumors (Figure 2c). Thus, tumors were either positive or negative for GS (Figure 3b). In the
196 literature, it has been described that the tumoral upregulation of the GS marker correlates with the
197 mutation and the constitutive activation of the β -catenin gene [29], a hallmark of tumorigenesis in some
198 HCC [4]. However, in human, NASH-HCC tumors tend to be GS-negative [30], [31]. Consistently, more
199 GS-negative tumors were systematically found in the livers of mice engaged in the used NASH-HCC
200 model (Figure 3c). Interestingly, at 12 weeks under HFHCD, *Trim21*⁻ diabetic mice developed more
201 GS-negative tumors than their *Trim21*^{+/+} littermates (Figure 3c).

202 Altogether, these findings suggest that the deficiency of TRIM21 promotes the emergence of more
203 tumors in the liver of diabetic mice under HFHCD.

204

205 3) **Trim21 regulates the hepatic and splenic immune environment**

206

207 The immune response, which could be influenced by the diet, plays a pivotal role during the disease
208 course [19]. As TRIM21 plays an important role on the immune system, it prompted us to analyze the
209 effect of TRIM21 knockout on the liver immune environment during the pathology evolution.
210 Immunostaining of CD45, a marker of leucocytes, revealed a progressive infiltration in the livers of both
211 genotypes (Figure 4a and b). At 12 weeks of HFHCD, a drop of hepatic CD45⁺ cells occurred only in
212 the livers of *Trim21*⁻ mice. Similar profiles were found for CD68, a marker of macrophages (Figure 4c
213 and d). Note that the observed decrease in the hepatic immune cell population at the 12th week of
214 HFHCD in *Trim21*⁻ mice correlated with the occurrence of a greater number of liver tumors.

215 The monitoring of the spleen index (spleen to body weight ratio) revealed the gradual development of a
216 splenomegaly, that may suggest an activation of the systemic immune response in both *Trim21*^{+/+} and
217 *Trim21*⁻ mice. Nonetheless, this spleen index appeared significantly lower in *Trim21*⁻ mice even before
218 their inclusion in the HFHCD. This difference persisted throughout the protocol (Figure 5a). An
219 immunohistochemistry approach was used to study the different population of immune cells inside
220 spleens (Figure 5b and c). The analysis of the number of B (B220⁺) and T (CD3⁺) cells showed similar
221 evolutions within both *Trim21*^{+/+} and *Trim21*⁻ genotypes with nevertheless a tendency to a greater
222 increase in the number of T cells after 12 weeks of HFHCD in the spleen of *Trim21*⁻ mice (Figure 5b).
223 More in-depth investigations on the subpopulations of T lymphocytes only revealed a significant

224 upregulation of the number of T helper cells (CD4⁺) in *Trim21*^{-/-} mice at 12 weeks of HFHCD (Figure 5d).
225 Indeed, no significant difference between the tested genotypes was detected on the number of
226 regulatory T cells (CD4⁺FOXP3⁺ cells) or cytotoxic T cells (CD8⁺), (Figure 5d).

227 Recently, TRIM21 has been described to interact with PD-L1 in lung adenomas [32], [33]. Its high
228 expression level induces downregulation of PD-L1 after its ubiquitinylation [33]. This immune checkpoint
229 plays an important role in the anti-tumor immunity, and its expression highly correlates with another
230 immune checkpoint, PD-1, in different cancers [34], [35], [36]. Hence, the proportion of T cells
231 expressing PD-1 in the spleen was investigated. Actually, at 12 weeks of HFHCD, the proportion of PD-
232 1⁺ cells in the T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocyte populations were higher in the spleen of *Trim21*^{-/-} mice
233 (Figure 6a and b). These significant differences within the populations of helper and cytotoxic T
234 lymphocytes were also found in the liver (Figure 7a and b). In parallel, the study of cells expressing PD-
235 L1 (the ligand of PD-1) led to the discovery that more PD-L1⁺ cells were present in the liver of *Trim21*^{-/-}
236 mice at 12 weeks of HFHCD (Figure 7 c and d). This was confirmed in particular for intrahepatic
237 macrophages (CD68⁺PD-L1⁺ cells) (Figure 7d). By adopting the same type of analysis but this time in
238 hepatic tumors, identical increases of PD-L1⁺ and CD68⁺PD-L1⁺ macrophages were interestingly
239 observed (Figure 8a and b). Furthermore, it appeared that more infiltrated-CD3⁺ cells were present in
240 tumors found in the liver of *Trim21*^{-/-} mice, more precisely higher proportions of CD4⁺ and CD4⁺PD-1⁺
241 cells (Figure 9a). Surprisingly the number of intra-tumoral CD8⁺ cells tended to be decreased in *Trim21*^{-/-}
242 mice (Figure 9a). Furthermore, an analysis of only GS-negative tumors revealed significant infiltration
243 of CD4⁺ and CD4⁺PD-1⁺ cells in *Trim21*^{-/-} tumors (Figure 9b). In contrast, CD8⁺ cells were significantly
244 lower in *Trim21*^{-/-} GS-negative tumors (Figure 9b).

245

246 Our findings show that, in diabetic mice on HFHCD, the lack of TRIM21 would directly avoid the
247 downregulation of PD-L1 and indirectly of PD-1, explaining the higher observed levels of CD4⁺PD-1⁺
248 cells and of PD-L1⁺ cells in the liver of *Trim21*^{-/-} mice. Since cell surface expression of PD-L1 has been
249 shown to inactivate PD1⁺ T cells, the anti-tumor immune response is most likely impaired in *Trim21*^{-/-}
250 mice, thus promoting the development of more HCC tumors.

251

252

253 **DISCUSSION**

254

255 Through its involvement in immunity and inflammation [10], [11], [37][10], [11], [37], the E3-
256 ubiquitine ligase TRIM21 has been suggested to be a negative regulator of inflammation. Studies have
257 also shown that the loss of TRIM21 induced resistance to different programmed cell death such as
258 apoptosis [38], necroptosis [39], pyroptosis [40] and ferroptosis [41]. Furthermore, its implication in
259 metabolic pathways [12], [42] or cell proliferation [43] prompted investigations on the role of TRIM21 in
260 cancer. Thus, the downregulation of this E3-ubiquitine ligase correlates with a worse survival prognostic
261 in breast cancer [44], [45], colitis associated cancer [46], diffuse large B-cell lymphoma [47] or HCC [12],
262 [14]. However, in other studies, conflicting results have been found. For instance, TRIM21
263 overexpression has been described as pro-oncogenic in HCC [48], [49]. However, these contradictions
264 could be explained by differences in HCC etiology according to studies.

265

266 To understand the role of TRIM21 in HCC with NASH etiology, we subjected diabetic *Trim21^{-/-}* mice and
267 their *Trim21^{+/+}* littermate controls to a HFHCD for up to 12 weeks. Diabetic mice developed steatosis,
268 steatohepatitis and over time the disease progressed into HCC. This protocol, described previously [19]
269 [18], follows the pathological pattern observed in patients during NASH progression, namely from
270 steatosis to steatohepatitis, with the onset of fibrosis and finally HCC. Moreover, the inter- and intra-
271 tumoral heterogeneity is also recapitulated [17], thus making this model the one that best reproduces
272 the human pathology. Besides, liver tumors found in NASH patients has been classified as poorly
273 proliferating tumors [50]. Accordingly, Ki67 immunolabeling led to very weak or no staining inside liver
274 tumors of mice included in this experimental protocol (Supplementary data3).

275

276 In the present study, although no impact on overall survival was found in the time window of our protocol
277 (Supplementary data4), *Trim21* knockout promoted the development of more liver tumors. Conversely,
278 a previous study found that *Trim21^{-/-}* mice were protected from HCC development in an experimental
279 model based on chemical treatment using diethylnitrosamine (DEN) and phenobarbital (PB) [15]. This
280 phenotype was correlated with a limitation in the production of reactive oxygen species (ROS) due to
281 the lack of TRIM21. In basal conditions, the nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) is sequestered in
282 the cytoplasm by the Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1). During oxidative stress, the p62
283 protein dimerizes to displace KEAP1 from its complex, leading to the release of NRF2 which will
284 translocate into the nucleus to induce the expression of antioxidant genes such as *Nqo1*, *Hmox1* and
285 *Nox2*. This antioxidant response is however regulated by TRIM21 which can ubiquitinylate p62 in order
286 to prevent its dimerization and thus limit the antioxidant response [16]. Consequently, in the model of
287 chemically-induced HCC, the absence of TRIM21 promotes an antioxidant response and therefore limits
288 tumor emergence [15]. The p62-KEAP1-NRF2 pathway has been described to be implicated in many
289 cancers including HCC [51], however its specific role remains controversial [52]. Nevertheless, we
290 investigated this P62-KEAP1-NRF2 pathway in diabetic *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* mice fed a HFHCD in
291 an attempt to detect any changes that may reflect an interference. However, regardless of genotype,
292 HFHCD intake never altered tissue expression of p62 in mouse liver (Supplementary data 5a). More

293 importantly, the levels of NRF2-induced target gene transcripts (*Nqo1*, *Hmox1* and *Nox2*) was induced
294 over time but no significant difference was detected between genotypes (Supplementary data 5b. In
295 contrast with the mouse model of DEN/PB-induced hepatocarcinogenesis, the P62-KEAP1-NRF2
296 pathway did not appear to be disrupted by *Trim21* knockout in our dietary model. DEN has the
297 particularity of being metabolized by hepatic cytochrome P450 enzymes into alkylating agent that
298 causes genotoxic lesions and oxidative damages [15]. Furthermore, PB is combined with DEN to
299 promote tumorigenesis with β -catenin gene mutations [53], thus creating homogenic tumor types.
300 Therefore, this mouse model of HCC induced by DEN and PB shows more similarities with human HCC
301 of alcoholic etiology [54]. These data again clearly illustrate the divergence of mechanisms involved in
302 the onset of HCC depending on the etiology.

303

304 In patients with NASH, a higher proportion of tumors are negative for the glutamine synthetase marker
305 (GS) [30], [31]. This feature was found in diabetic mice fed the HFHCD, both in *Trim21*^{-/-} and *Trim21*^{+/+}.
306 However, while the number of GS-positive tumors remained similar between the 2 genotypes over time,
307 a greater number of GS-negative tumors emerged in the liver of *Trim21*^{-/-} mice after 12 weeks of HFHCD.
308 Besides the fact that GS-positive tumors are associated with mutations in the gene encoding β -catenin
309 [29], GS-negative tumors usually exhibit more tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) [55]. Nonetheless,
310 tumors rich in TILs have been associated, in some cancers, such as those affecting the breast, with
311 high expression levels of PD-1 and PD-L1 and a poor prognosis, but could potentially respond better to
312 immune checkpoint inhibitors (ICIs) [35]. PD-1 is mainly expressed by exhausted lymphocytes and is
313 representative of an inactive anti-tumor immunity. In fact, cancer cells acquire the ability to express PD-
314 L1 on their surface, thus inhibiting the activity of T lymphocytes. After 12 weeks on HFHCD, *Trim21*^{-/-}
315 mice displayed higher proportions of PD-1⁺ T cells in spleen and in liver than *Trim21*^{+/+} mice. This was
316 associated with a higher number of PD-L1⁺ cells and a higher proportion of PD-L1⁺ macrophages
317 (CD68⁺PD-L1⁺) in the liver. These same features were also found within the tumors themselves. Further
318 characterizations of the tumor immune infiltrate also revealed differences. Thus, in *TRIM21*^{-/-} mice, a
319 greater proportion of CD4⁺ T cells expressed PD-1, especially in GS-negative tumors. Conversely, fewer
320 CD8⁺ T lymphocytes were found, whereas the expression of PD-1 by these cells did not appear to be
321 modified. Hence, the high expression of PD-1⁺ and PDL-1⁺ and the decrease of effector CD8⁺ T cell
322 infiltration in *Trim21*^{-/-} might enhance tumors emergence.

323 The immune system can play an important role in promoting or suppressing cancer progression. In
324 recent years, various studies have shown that antitumor surveillance is impaired in NASH etiology via
325 dysfunctions affecting CD8⁺ T cells [20], [56], [57]. While some works have reported the efficacy of anti-
326 PD-L1 treatment in slowing the progression of HCC in a genetically modified MUP-uPA mouse model
327 HFD fed [58], others have claimed the ineffectiveness of immune checkpoint inhibitor (ICI)-based
328 treatments (anti-PD-1) both in NASH-HCC HFD-fed mouse model and in humans [59]. A recent report
329 confirmed the involvement of defective CD8⁺ T cells in the onset of HCC and the ineffectiveness of ICI
330 in different mice models. In fact, the authors used mice fed with different HFD type and then injected
331 tumor cells into the mice liver, to study the effect of ICI treatment in NASH-HCC. Thus, they found that

332 the defective motility of CD8⁺ T lymphocytes would render ICI ineffective in NASH-HCC due to the
333 inability of active CD8⁺ T cells to infiltrate tumors [60].

334

335 In sum, our data revealed that TRIM21 contributes to limit the occurrence of HCC during the NASH
336 disease probably by promoting antitumor surveillance via the downregulation of inhibitory immune
337 checkpoints.

338

339 **MATERIALS AND METHODS**

340

341 **Animals**

342 *Trim21*^{-/-} mice and their littermate controls (*Trim21*^{+/+}) were issued from a breeding of the C57BL/6-
343 *Trim21*^{tm1Hm}/J strain (JAX stock #010724; Jackson Laboratories, ME, USA) [10]. Male pups received a
344 single injection of 200 µg of streptozotocin (STZ) (#S0130, Sigma) to induce diabetes mellitus [61]. At
345 weaning, diabetic mice were fed *ad libitum* either with standard diet (STZ+SD) (2016, Teklad Diet,
346 Envigo) or with HFHCD (STZ+HFHCD) (#9G1, LabDiet, St Louis, MO) during 4, 8 or 12 weeks. Animals
347 were housed in cages and bred in conventional animal facility with 12h dark light cycle with controlled
348 temperature between 19 and 20°C. All mouse experiments were done in compliance with French laws
349 and the institution's guidelines for animal welfare. Authors were authorized to conduct animal
350 experimentation by "la Direction des Services Vétérinaires" (License M Samson #A3523840). The
351 project was authorized by the "Comité Rennais d'Éthique en matière d'Experimentation Animal"
352 [CREAA] and the license was given by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et
353 de l'Innovation" (#19726-2019011502095234).

354

355 **Biochemical parameters**

356 After weaning and at slaughtering, blood sugar was systematically measured using a glucometer
357 (Freestyle Optium Nep, Abbott) to confirm the diabetic status of the mice included in the experimental
358 protocol. Only mice with glucose levels higher than 300mg/dL were considered diabetic. Levels of
359 plasma alanine aminotransferase (ALT) were determined according to the International Federation of
360 Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) primary reference procedures using the Olympus
361 AU2700 Chemistry Analyser (Olympus Optical, Tokyo, Japan).

362

363 **Quantitative real-time PCR**

364 Total RNA was extracted from frozen liver tissues using the NucleoSpin® RNA kit (Macherey–Nagel,
365 #740955). First strand cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
366 (Applied Biosystems, #4368813, USA). Real-time quantitative PCR was performed using the double-
367 strand specific SYBR® Green system (Applied Biosystems, #4367659) on CFX384 Touch™ Real-Time
368 PCR Detection System (Biorad). Each measurement was performed in triplicate. The relative gene
369 expression was normalized against the *18S* gene expression. Samples from diabetic SD-fed mice were
370 used as reference for mRNA expression (control mRNA level was arbitrarily set at 1). (Supplementary
371 Table 1)

372

373 **Histology and immunochemistry**

374 Liver and spleen fragments were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h at room temperature before
375 being embedded in paraffin. For liver, 4 µm sections were used for hematoxylin-and-eosin (H&E), Sirius
376 Red (SR), Reticulin (MICROM, F/010211) or immunochemistry staining. For fresh frozen sections,
377 samples were embedded in OCT embedding Medium (M1-Embedding matrix # Epredia™ 1310, USA).
378 Seven µm frozen sections were used for Oil Red O (ORO) staining with a hematoxylin counterstain.

379 High resolution images (x20) were used to study H&E and Glutamine synthetase (GS) (Supplementary
380 Table 2) stained sections. The same pathologist blindly scored all livers for NAFLD activity score (NAS)
381 and quantified the number of nodular lesions.

382 Tissue sections from paraffin blocks were dried 1h at 58°C, followed by antigen retrieval and incubation
383 with chosen primary antibody (Supplementary Table 2) in an automated staining platform (Discovery
384 XT, Roche). Revelation of primary antibody was carried out using horseradish peroxidase (HRP)-
385 conjugated secondary antibody (Dako, USA) and DAB substrate kit (Ventana, #760-124). Hematoxylin
386 was used for counterstain. For fluorescent detection, antigen retrieval and incubation with chosen
387 primary antibody (Supplementary Table 2) was performed in a Roche automated staining platform
388 (Discovery Ultra, Roche). Tyramide signal amplification (TSA) was applied using Rhodamine (#760-233,
389 Roche), Cy5 (#760-238, Roche), FAM (#760-243, Roche) or DCC (#760-240, Roche). Then aqua
390 mounting solution containing DAPI was used (Southern Biotech: 0100-20) for nuclear counterstain. Liver
391 and spleen sections were scanned with a digital slide scanner (Nanozoomer 2.0 RS, Hamamatsu).
392 Multiplexed immune histology fluorescent (IHF) stainings were scanned using a confocal slide scanner
393 (PANORAMIC confocal, 3DHISTECH).

394 For the Foxp3/CD4/CD8/PD-1 panel, we first proceeded to CD4, CD8 and PD-1 immunofluorescent
395 staining. A first image was scanned before removing the cover slip for a second chromogenic staining
396 of Foxp3. The digitized images were then aligned and merged using Qupath software (Qupath v0.3.2)
397 [62] and ImageJ/Fiji [63]. Overlay images were created using workflow described in [64].

398 Antibodies for multiplexing IHC were in the following order: FOXP3; CD4; CD8; Ki67 for the spleen and
399 CD4; CD8; PD-1 then FOXP3; or PD-L1; CD3; CD68; Col1a1 for the liver.

400 Histology analysis was performed using the HALO software (Indica Labs, NM) (CD45; CD68; SR; ORO).
401 Multiplex IHF image analysis was performed using the open-source image analysis Qupath software
402 (Qupath v0.3.2) [62] and ImageJ/Fiji [63].

403 For image analysis we followed a specific workflow: *Positive cells quantifications on Qupath*:

- 404 1) Automatic cell segmentation using a StarDist script [65], [66]: Whole liver image nuclei were
405 recognized by an algorithm trained to recognize different type of cell nuclei. From the nuclei
406 segmentation, cell perimeter were defined for every liver image.
- 407 2) Training classifier individually for each marker: Using the “Train a classifier” function from
408 Qupath, a single channel liver images were used to train a classifier to recognize positive
409 marked cells and negative marked cells. This method was used for every single channel
410 (marker): CD4⁺, CD8⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺, FOXP3⁺, CD3⁺, CD68⁺.
- 411 3) Apply classifier on all images: The trained classifier was then used in all multichannel liver
412 images to count the number of positive cells for the different markers.

413

414 **Spleen immune cell analysis by Flow Cytometry**

415 Mouse spleens were crushed on a 40 µm cell strainer (BD Falcon). Immune cells were isolated after a
416 centrifugation at 1,200 rpm for 10 min in PBS supplemented with 2% Fetal Bovine Serum (FBS, Eurobio)
417 and 2 mM EDTA. Red blood cells were then lysed using the Easy-lyse Erythrocyte Lysis solution (Dako).
418 Cell suspensions were labeled for 30 min with the LIVE/DEAD fixable yellow stain (#L34959, Life

419 Technologies) to later exclude dead cells during analysis. Cells were also incubated with an anti-
420 CD16/CD32 antibody (2.4G2, BD Pharmingen) to block non-specific binding. Cells were then labeled
421 with the appropriate fluorochrome-conjugated antibodies/reagents (Supplementary Table 2) according
422 to manufacturer's instructions. Stained cells were analyzed on a LSR X-20 Fortessa™ flow cytometer
423 (BD Biosciences) and data were analyzed using Flowlogic™ (MACS Miltenyi Biotec). Doublets and dead
424 cells were excluded on the basis of forward/side scatter and LIVE/DEAD labeling, respectively. The
425 immuno-phenotyping used was as follows: T lymphocytes: CD3⁺/NK1.1⁻ – on which CD4⁺/PD-1⁺,
426 CD4⁺/PD-1⁻, CD8⁺/PD-1⁺ and CD8⁺/PD-1⁻ were distinguished (Supplementary data5).

427

428 **Statistical analysis**

429 Results are expressed as the means ± SEM for each group of mice. Mean differences between
430 experimental groups were assessed using the nonparametric Mann–Whitney U test, as implemented in
431 GraphPad Prism8 software. Significance is shown as follows: *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001, ####
432 p<0.0001; ### p<0.001; ## p<0.01, # p<0.05 or \$\$\$\$ p<0.0001; \$\$\$p<0.001; \$\$p<0.01 and \$ p<0.05.

433

434 **Access to data**

435 All authors had access to the study data and had reviewed and approved the final manuscript.

436

437 **Acknowledgments:**

438 We would like to thank Charleen Plaisse for her technical assistance. For immunohistochemistry
439 analysis, bead-based immunoassays, and animal house facilities, we would like to thank dedicated
440 platforms (i.e., H2P2, flow cytometry and cell sorting, and ARCHE animal house platforms) of SFR
441 Biosit–UMS 3480, US_S 018, France. We acknowledge the “Laboratoire de Biochimie-Toxicologie” from
442 the “CHU de Rennes” for transaminase measurements.

443

444 **REFERENCES**

445

- 446 [1] D. Geh, D. M. Manas, and H. L. Reeves, "Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty
 447 liver disease—a review of an emerging challenge facing clinicians," *Hepatobiliary*
 448 *Surgery and Nutrition*, vol. 10, no. 1, pp. 59–75, 2021, doi: 10.21037/hbsn.2019.08.08.
- 449 [2] F. Islami *et al.*, "Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part 1: National
 450 Cancer Statistics," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 113, no. 12, pp.
 451 1648–1669, 2021, doi: 10.1093/jnci/djab131.
- 452 [3] M. Ringelhan, D. Pfister, T. O'Connor, E. Pikarsky, and M. Heikenwalder, "The
 453 immunology of hepatocellular carcinoma," *Nature Immunology*, vol. 19, no. 3, pp. 222–
 454 232, Mar. 2018, doi: 10.1038/s41590-018-0044-z.
- 455 [4] J. M. Llovet *et al.*, "Hepatocellular carcinoma," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 7,
 456 no. 1. Nature Research, pp. 1–28, Dec. 01, 2021. doi: 10.1038/s41572-020-00240-3.
- 457 [5] Z. M. Younossi, A. B. Koenig, D. Abdelatif, Y. Fazel, L. Henry, and M. Wymer, "Global
 458 epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of
 459 prevalence, incidence, and outcomes," *Hepatology*, vol. 64, no. 1, pp. 73–84, Jul. 2016,
 460 doi: 10.1002/hep.28431.
- 461 [6] Q. M. Anstee, H. L. Reeves, E. Kotsiliti, O. Govaere, and M. Heikenwalder, "From NASH
 462 to HCC: current concepts and future challenges," *Nature Reviews Gastroenterology and*
 463 *Hepatology*, vol. 16, no. 7. pp. 411–428, 2019. doi: 10.1038/s41575-019-0145-7.
- 464 [7] S. Hatakeyama, "TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and
 465 Carcinogenesis," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 42, no. 4, pp. 297–311, Apr. 2017,
 466 doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.002.
- 467 [8] E. Ben-Chetrit, E. K. Chan, K. F. Sullivan, and E. M. Tan, "A 52-kD protein is a novel
 468 component of the SS-A/Ro antigenic particle.," *The Journal of Experimental Medicine*,
 469 vol. 167, no. 5, pp. 1560–1571, May 1988, doi: 10.1084/jem.167.5.1560.
- 470 [9] E. Ben-Chetrit, R. I. Fox, and E. M. Tan, "Dissociation of immune responses to the ss-a
 471 (ro) 52-kd and 60-kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and sjögren's
 472 syndrome," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 33, no. 3, pp. 349–355, Mar. 1990, doi:
 473 10.1002/art.1780330307.
- 474 [10] R. Yoshimi, T.-H. Chang, H. Wang, T. Atsumi, H. C. Morse, and K. Ozato, "Gene
 475 Disruption Study Reveals a Nonredundant Role for TRIM21/Ro52 in NF- κ B-Dependent
 476 Cytokine Expression in Fibroblasts," *The Journal of Immunology*, vol. 182, no. 12, pp.
 477 7527–7538, Jun. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0804121.
- 478 [11] A. Espinosa *et al.*, "Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue
 479 inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23–Th17 pathway,"
 480 *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 8, pp. 1661–1671, Aug. 2009, doi:
 481 10.1084/jem.20090585.
- 482 [12] L. Gu, Y. Zhu, X. Lin, X. Tan, B. Lu, and Y. Li, "Stabilization of FASN by ACAT1-mediated
 483 GNPAT acetylation promotes lipid metabolism and hepatocarcinogenesis," *Oncogene*,
 484 vol. 1, 2020, doi: 10.1038/s41388-020-1156-0.
- 485 [13] H. P. Lin *et al.*, "Destabilization of fatty acid synthase by acetylation inhibits de novo
 486 lipogenesis and tumor cell growth," *Cancer Research*, vol. 76, no. 23, pp. 6924–6936,
 487 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1597.
- 488 [14] Q. Ding *et al.*, "Downregulation of TRIM21 contributes to hepatocellular carcinoma
 489 carcinogenesis and indicates poor prognosis of cancers," *Tumor Biology*, vol. 36, no. 11,
 490 pp. 8761–8772, 2015, doi: 10.1007/s13277-015-3572-2.

- 491 [15] F. Wang *et al.*, “The Ubiquitin E3 Ligase TRIM21 Promotes Hepatocarcinogenesis by
492 Suppressing the p62-Keap1-Nrf2 Antioxidant Pathway,” *Cellular and Molecular*
493 *Gastroenterology and Hepatology*, vol. 11, no. 5, pp. 1369–1385, Jan. 2021, doi:
494 10.1016/j.jcmgh.2021.01.007.
- 495 [16] J. A. Pan *et al.*, “TRIM21 Ubiquitylates SQSTM1/p62 and Suppresses Protein
496 Sequestration to Regulate Redox Homeostasis,” *Molecular Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 720–
497 733, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.007.
- 498 [17] M. Dow *et al.*, “Integrative genomic analysis of mouse and human hepatocellular
499 carcinoma,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 42, pp.
500 E9879–E9888, Oct. 2018, doi: 10.1073/pnas.1811029115.
- 501 [18] M. Fujii *et al.*, “A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of
502 association between diabetes and hepatocellular carcinoma,” *Medical Molecular*
503 *Morphology*, vol. 46, no. 3, pp. 141–152, Sep. 2013, doi: 10.1007/s00795-013-0016-1.
- 504 [19] M. Simoes Eugénio *et al.*, “Hepatocellular Carcinoma Emergence in Diabetic Mice with
505 Non-Alcoholic Steatohepatitis Depends on Diet and Is Delayed in Liver Exhibiting an
506 Active Immune Response”, doi: 10.3390/cancers12061491.
- 507 [20] J. M. Llovet *et al.*, “Immunotherapies for hepatocellular carcinoma,” *Nature Reviews*
508 *Clinical Oncology* 2021 19:3, vol. 19, no. 3, pp. 151–172, Nov. 2021, doi:
509 10.1038/S41571-021-00573-2.
- 510 [21] C. Zheng *et al.*, “Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell
511 Sequencing,” *Cell*, vol. 169, no. 7, pp. 1342–1356.e16, Jun. 2017, doi:
512 10.1016/j.cell.2017.05.035.
- 513 [22] F. Heymann *et al.*, “Liver Inflammation Abrogates Immunological Tolerance Induced by
514 Kupffer Cells,” *Hepatology*, vol. 62, no. 1, pp. 279–291, Jul. 2015, doi:
515 10.1002/HEP.27793/SUPPINFO.
- 516 [23] A. Singanayagam and E. Triantafyllou, “Macrophages in Chronic Liver Failure: Diversity,
517 Plasticity and Therapeutic Targeting,” *Frontiers in Immunology*, vol. 12, p. 1086, Apr.
518 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.661182.
- 519 [24] C. N. Jenne and P. Kubes, “Immune surveillance by the liver,” *Nature Immunology*, vol.
520 14, no. 10, pp. 996–1006, Oct. 2013, doi: 10.1038/ni.2691.
- 521 [25] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol.
522 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 04, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 523 [26] A. E. Reid, “Nonalcoholic steatohepatitis,” *Gastroenterology*, vol. 121, no. 3, pp. 710–
524 723, Sep. 2001, doi: 10.1053/gast.2001.27126.
- 525 [27] T. Luedde, N. Kaplowitz, and R. F. Schwabe, “Cell Death and Cell Death Responses in
526 Liver Disease: Mechanisms and Clinical Relevance,” *Gastroenterology*, vol. 147, no. 4,
527 pp. 765–783.e4, Oct. 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.018.
- 528 [28] J. Hindson, “Molecular landscape of NASH-HCC,” *Nature Reviews Gastroenterology &*
529 *Hepatology*, vol. 18, no. 7, pp. 456–456, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41575-021-00478-6.
- 530 [29] G. Hale *et al.*, “Correlation of exon 3 β -catenin mutations with glutamine synthetase
531 staining patterns in hepatocellular adenoma and hepatocellular carcinoma,” *Modern*
532 *Pathology*, vol. 29, no. 11, pp. 1370–1380, Nov. 2016, doi:
533 10.1038/modpathol.2016.122.
- 534 [30] S. Gallage *et al.*, “The therapeutic landscape of hepatocellular carcinoma,” *Med*, vol. 0,
535 no. 0, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.medj.2021.03.002.
- 536 [31] S. Ando, J. Shibahara, A. Hayashi, and M. Fukayama, “ β -catenin alteration is rare in
537 hepatocellular carcinoma with steatohepatitic features: immunohistochemical and

- 538 mutational study," *Virchows Archiv*, vol. 467, no. 5, pp. 535–542, Nov. 2015, doi:
539 10.1007/s00428-015-1836-2.
- 540 [32] H. Zhang *et al.*, "Eliminating Radiation Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer by
541 Dihydroartemisinin Through Abrogating Immunity Escaping and Promoting Radiation
542 Sensitivity by Inhibiting PD-L1 Expression," *Article*, vol. 10, p. 1, 2020, doi:
543 10.3389/fonc.2020.595466.
- 544 [33] L. Gao, L. Xia, W. Ji, Y. Zhang, W. Xia, and S. Lu, "Knockdown of CDK5 down-regulates
545 PD-L1 via the ubiquitination-proteasome pathway and improves antitumor immunity
546 in lung adenocarcinoma," *Translational Oncology*, vol. 14, no. 9, p. 101148, Sep. 2021,
547 doi: 10.1016/j.tranon.2021.101148.
- 548 [34] Z. Mo *et al.*, "Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 is associated with differentiation
549 status and histological type of endometrial cancer," *Oncology Letters*, vol. 12, no. 2, pp.
550 944–950, Aug. 2016, doi: 10.3892/ol.2016.4744.
- 551 [35] A. Kitano *et al.*, "Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression
552 levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer," *ESMO Open*, vol. 2, no. 2, p. e000150,
553 Jun. 2017, doi: 10.1136/esmoopen-2016-000150.
- 554 [36] C. Jiang, S. Cao, N. Li, L. Jiang, and T. Sun, "PD-1 and PD-L1 correlated gene expression
555 profiles and their association with clinical outcomes of breast cancer," *Cancer Cell
556 International*, vol. 19, no. 1, p. 233, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12935-019-0955-2.
- 557 [37] R. E. Watkinson, W. A. McEwan, and L. C. James, "Intracellular antibody immunity,"
558 *Journal of Clinical Immunology*, vol. 34, no. SUPPL. 1, pp. 30–34, Apr. 2014, doi:
559 10.1007/s10875-014-0017-4.
- 560 [38] S. N. A. Jauharoh *et al.*, "SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production,"
561 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 417, no. 1, pp. 582–587,
562 Jan. 2012, doi: 10.1016/J.BBRC.2011.12.010.
- 563 [39] M. Simoes Eugénio *et al.*, "TRIM21, a New Component of the TRAIL-Induced
564 Endogenous Necrosome Complex," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 8, p. 139,
565 Apr. 2021, doi: 10.3389/fmolb.2021.645134.
- 566 [40] W. Gao *et al.*, "TRIM21 regulates pyroptotic cell death by promoting Gasdermin D
567 oligomerization.," *Cell Death Differ*, vol. 29, no. 2, pp. 439–450, 2022, doi:
568 10.1038/s41418-021-00867-z.
- 569 [41] K. Hou *et al.*, "Loss of TRIM21 alleviates cardiotoxicity by suppressing ferroptosis
570 induced by the chemotherapeutic agent doxorubicin," *eBioMedicine*, vol. 69, p. 103456,
571 Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103456.
- 572 [42] J. Cheng, Y. Huang, W. Zhang, M. Wang, J. Jiao, and F. Chi, "TRIM21 and PHLDA3
573 Negatively Regulate the Cross-Talk between the PI3K/AKT Pathway and PPP
574 Metabolism," *bioRxiv Cancer Biology*, doi: 10.1101/750976.
- 575 [43] M. Alomari, "TRIM21 - a potential novel therapeutic target in cancer," *Pharmacological
576 Research*, p. 105443, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.phrs.2021.105443.
- 577 [44] Y. Jin *et al.*, "Cancer-associated mutation abolishes the impact of TRIM21 on the
578 invasion of breast cancer cells," 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.019.
- 579 [45] W. Zhou *et al.*, "Decreased expression of TRIM21 indicates unfavorable outcome and
580 promotes cell growth in breast cancer," *Cancer Management and Research*, vol. 10, pp.
581 3687–3696, 2018, doi: 10.2147/CMAR.S175470.
- 582 [46] G. Zhou, H. Wu, J. Lin, R. Lin, B. Feng, and Z. Liu, "TRIM21 Is Decreased in Colitis-
583 associated Cancer and Negatively Regulates Epithelial Carcinogenesis," *Inflammatory
584 Bowel Diseases*, vol. XX, Aug. 2020, doi: 10.1093/ibd/izaa229.

- 585 [47] S. Brauner *et al.*, “Reduced expression of TRIM21/Ro52 predicts poor prognosis in
586 diffuse large B-cell lymphoma patients with and without rheumatic disease,” *Journal of*
587 *Internal Medicine*, vol. 278, no. 3, pp. 323–332, Sep. 2015, doi: 10.1111/joim.12375.
- 588 [48] Z. Qi *et al.*, “Identification of prognostic biomarkers and correlations with immune
589 infiltrates among cGAS-STING in hepatocellular carcinoma.,” *Biosci Rep*, vol. 40, no. 10,
590 pp. 1–17, 2020, doi: 10.1042/BSR20202603.
- 591 [49] W. Dai *et al.*, “Comprehensive Analysis of the Prognostic Values of the TRIM Family in
592 Hepatocellular Carcinoma,” *Frontiers in Oncology*, vol. 11, no. December, pp. 1–20, Dec.
593 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.767644.
- 594 [50] S. Boyault *et al.*, “Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and
595 to new therapeutic targets,” *Hepatology*, vol. 45, no. 1, pp. 42–52, Jan. 2007, doi:
596 10.1002/hep.21467.
- 597 [51] S. M. Shin, J. H. Yang, and S. H. Ki, “Role of the Nrf2-are pathway in liver diseases,”
598 *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/763257.
- 599 [52] K. Taniguchi, S. Yamachika, F. He, and M. Karin, “p62/SQSTM1—Dr. Jekyll and Mr. Hyde
600 that prevents oxidative stress but promotes liver cancer,” *FEBS Letters*, vol. 590, no. 15.
601 pp. 2375–2397, Aug. 2016. doi: 10.1002/1873-3468.12301.
- 602 [53] K. Aleksic *et al.*, “Evolution of genomic instability in diethylnitrosamine-induced
603 hepatocarcinogenesis in mice,” *Hepatology*, vol. 53, no. 3, pp. 895–904, Mar. 2011, doi:
604 10.1002/HEP.24133.
- 605 [54] J. Friemel *et al.*, “Characterization of HCC mouse models: Towards an etiology-oriented
606 subtyping approach,” *Molecular Cancer Research*, vol. 17, no. 7, pp. 1493–1502, Jul.
607 2019, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1045.
- 608 [55] J. Calderaro, M. Ziol, V. Paradis, and J. Zucman-Rossi, “Molecular and histological
609 correlations in liver cancer,” *Journal of Hepatology*, vol. 71, no. 3, pp. 616–630, 2019,
610 doi: 10.1016/j.jhep.2019.06.001.
- 611 [56] T. Huby and E. L. Gautier, “Immune cell-mediated features of non-alcoholic
612 steatohepatitis,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 22, no. 7, pp. 429–443, Jul. 2022,
613 doi: 10.1038/s41577-021-00639-3.
- 614 [57] M. Dudek *et al.*, “Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in
615 NASH,” *Nature*, vol. 592, no. 7854, pp. 444–449, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-
616 03233-8.
- 617 [58] S. Shalapour *et al.*, “Inflammation-induced IgA+ cells dismantle anti-liver cancer
618 immunity,” *Nature*, vol. 551, no. 7680, pp. 340–345, 2017, doi: 10.1038/nature24302.
- 619 [59] D. Pfister *et al.*, “NASH limits anti-tumour surveillance in immunotherapy-treated HCC,”
620 *Nature*, vol. 592, no. 7854, pp. 450–456, 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03362-0.
- 621 [60] S. Wabitsch *et al.*, “Metformin treatment rescues CD8+ T cell response to immune
622 checkpoint inhibitor therapy in mice with NAFLD,” *Journal of Hepatology*, pp. 1–13,
623 2022, doi: 10.1016/j.jhep.2022.03.010.
- 624 [61] M. Fujii *et al.*, “A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of
625 association between diabetes and hepatocellular carcinoma,” *Medical Molecular*
626 *Morphology*, vol. 46, no. 3, pp. 141–152, Sep. 2013, doi: 10.1007/s00795-013-0016-1.
- 627 [62] P. Bankhead *et al.*, “QuPath: Open source software for digital pathology image
628 analysis,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/S41598-017-17204-
629 5.

- 630 [63] J. Schindelin *et al.*, “Fiji: An open-source platform for biological-image analysis,” *Nature*
631 *Methods*, vol. 9, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 676–682, Jun. 28, 2012. doi:
632 10.1038/nmeth.2019.
- 633 [64] N. Chiaruttini, O. Burri, P. Haub, R. Guet, J. Sordet-Dessimoz, and A. Seitz, “An Open-
634 Source Whole Slide Image Registration Workflow at Cellular Precision Using Fiji, QuPath
635 and Elastix,” *Frontiers in Computer Science*, vol. 3, p. 130, Jan. 2022, doi:
636 10.3389/FCOMP.2021.780026/BIBTEX.
- 637 [65] U. Schmidt, M. Weigert, C. Broaddus, and G. Myers, “Cell Detection with Star-Convex
638 Polygons,” in *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in*
639 *Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, vol. 11071 LNCS, Springer
640 Verlag, 2018, pp. 265–273. doi: 10.1007/978-3-030-00934-2_30.
- 641 [66] T. Pécot, A. Alekseyenko, and K. Wallace, “A deep learning segmentation strategy that
642 minimizes the amount of manually annotated images,” *F1000Res*, vol. 10, 2022, doi:
643 10.12688/F1000RESEARCH.52026.2/DOI.
- 644
- 645

646 **FIGURE LEGENDS**

647

648 **Figure 1:**

649 *Trim21^{-/-}* and *Trim21^{+/+}* diabetic mice under high-fat high-cholesterol diet developed the same levels of
650 steatosis or fibrosis. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice were fed either a standard diet (SD) or a
651 high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) during 4, 8 or 12 weeks. (a) liver to body weight ratio (b) plasma
652 alanine transaminase (ALT) concentrations (IU/L) (c) NAS score (evaluation of hepatocyte ballooning,
653 inflammation and steatosis (d) Signal quantification of Oil-Red O-stained liver tissues (e) quantification
654 of fibrosis as determined by the percentage of Sirius red positive area. (f) hepatic mRNA expression
655 levels of *Col1a1* and *Tgfb1* genes. For all graph, each black and red dots represent *Trim21^{+/+}* and
656 *Trim21^{-/-}* individuals, respectively. For (a) and (b), diabetic control mice *Trim21^{+/+}* n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at
657 4w; *Trim21^{+/+}* n=36, *Trim21^{-/-}* n= 27; at 8w *Trim21^{+/+}* n=17, *Trim21^{-/-}* n= 26; at 12w *Trim21^{+/+}* n=25,
658 *Trim21^{-/-}* n= 12. For (c),(d) and (e), diabetic control mice *Trim21^{+/+}* n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at 4w; *Trim21^{+/+}*
659 n=8, *Trim21^{-/-}* n= 10; at 8w *Trim21^{+/+}* n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9; at 12w *Trim21^{+/+}* n=6, *Trim21^{-/-}* n= 8. For (f)
660 diabetic control mice *Trim21^{+/+}* n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at 4w; *Trim21^{+/+}* n=11, *Trim21^{-/-}* n= 10; at 8w *Trim21^{+/+}*
661 n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9; at 12w *Trim21^{+/+}* n=12, *Trim21^{-/-}* n= 13. ##### p<0.0001; ### p<0.001; ## p<0.01
662 and # p<0.05 compared *Trim21^{-/-}* diabetic mice under SD to mice under HFHCD; \$\$\$\$ p<0.0001;
663 \$\$\$p<0.001; \$\$p<0.01 and \$p<0.05 compared *Trim21^{+/+}* diabetic mice under SD to diabetic mice under
664 HFHCD. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point
665 but different genotype.

666

667 **Figure 2:**

668 More hepatic tumors emerged in *Trim21^{-/-}* diabetic mice under high-fat high-cholesterol diet. Diabetic
669 (streptozotocin, STZ) male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat high-cholesterol diet
670 (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks. (a) Representative macroscopic liver pictures. Arrows show visible
671 tumors. (b) visible-tumor density counted from liver pictures. (c) Hematoxylin and eosin (H&E),
672 glutamine synthetase (GS) and reticulin staining of liver sections. Dashed lines delimit tumors (T). Scale
673 bars: 250 μ m, original magnification \times 20. (d) Tumor quantification counted from H&E staining. For all
674 graph, each black and red dots represent *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* individuals, respectively. For (b) and
675 (d), at 4w; *Trim21^{+/+}* n=11, *Trim21^{-/-}* n= 10; at 8w *Trim21^{+/+}* n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9; at 12w *Trim21^{+/+}* n=12,
676 *Trim21^{-/-}* n= 13. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time
677 point but different genotype.

678

679 **Figure 3:**

680 Over induction of hepatocellular carcinoma markers in tumors found in *Trim21^{-/-}* diabetic mice under
681 high-fat high-cholesterol diet. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice were fed either a standard diet
682 (SD) or a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks. (a) hepatic tumor (T) and peri-
683 tumoral (NT) mRNA expression levels of *Ccnd1*, *Igf2*, *Gpc3*, *Afp*, *Klf4*, *Aldh1* and *Cd133* in tumor (T)
684 and peri-tumoral (NT) liver tissue. (b) Hematoxylin and eosin (top picture) and glutamine synthetase
685 (GS) (bottom picture) staining of liver sections. Dashed lines delimit GS-positive (GS+) and GS-negative

686 (GS-) tumors. Scale bars: 250 μm , original magnification $\times 20$. (c) GS-positive and GS-negative tumor
687 quantification measured from GS staining. For all graph, each black and red dots represent *Trim21^{+/+}*
688 and *Trim21^{-/-}* individuals, respectively. For (a), NT tissue: *Trim21^{+/+}* n=6, *Trim21^{-/-}* n= 7; T tissue *Trim21^{+/+}*
689 n=6, *Trim21^{-/-}* n= 7. For (c) at 4w; *Trim21^{+/+}* n=11, *Trim21^{-/-}* n= 10; at 8w *Trim21^{+/+}* n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9;
690 at 12w *Trim21^{+/+}* n=12, *Trim21^{-/-}* n= 13. ##### p<0.0001; ### p<0.001; ## p<0.01 and # p<0.05 compared
691 *Trim21^{-/-}* diabetic mice under SD to mice under HFHCD; \$\$\$\$ p<0.0001; \$\$\$p<0.001; \$\$p<0.01 and \$
692 p<0.05 compared *Trim21^{+/+}* diabetic mice under SD to diabetic mice under HFHCD. *p<0.05; **p<0.01
693 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point but different genotype.

694

695 **Figure 4:**

696 Immune infiltrate presence in the liver of *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* diabetic mice during hepatocellular
697 carcinoma development on NASH background. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice were fed either
698 a standard diet (SD) or a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks. (a) CD45 staining
699 of liver sections. Scale bars: 50 μm , original magnification $\times 40$; (b) quantification of immune infiltrates
700 measured from CD45 positive area. (c) CD68 staining of liver sections. Scale bars: 50 μm , original
701 magnification $\times 40$; (d) quantification of immune infiltrates measured from CD68 positive area. For all
702 graph, each black and red dots represent *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* individuals, respectively. For (b) and
703 (d), diabetic control mice *Trim21^{+/+}* n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at 4w; *Trim21^{+/+}* n=11, *Trim21^{-/-}* n= 10; at 8w
704 *Trim21^{+/+}* n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9; at 12w *Trim21^{+/+}* n=12, *Trim21^{-/-}* n= 13. ##### p<0.0001; ### p<0.001; ##
705 p<0.01 and # p<0.05 compared *Trim21^{-/-}* diabetic mice under SD to mice under HFHCD; \$\$\$\$ p<0.0001;
706 \$\$\$p<0.001; \$\$p<0.01 and \$ p<0.05 compared *Trim21^{+/+}* diabetic mice under SD to diabetic mice under
707 HFHCD. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point
708 but different genotype.

709

710 **Figure 5:**

711 Distribution of immune cells in the spleen of *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* diabetic mice during hepatocellular
712 carcinoma development on NASH background. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice were fed either
713 a standard diet (SD) or a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks. (a) Spleen to body
714 weight ratio. (b) Quantification of B (B220⁺ cells) and T (CD3⁺ cells) lymphocytes in spleen. (c) B220,
715 CD3 and dapi staining of spleen sections. Scale bars: 100 μm , original magnification $\times 20$. (d)
716 Quantification of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺ FOXP3⁺ and Ki67⁺ cells in spleen. (e) CD8, CD4, FOXP3, Ki67 and
717 dapi staining of spleen sections. Scale bar: 50 μm , original magnification $\times 40$. For all graph, each black
718 and red dots represent *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* individuals, respectively. For (a), diabetic control mice
719 *Trim21^{+/+}* n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at 4w; *Trim21^{+/+}* n=36, *Trim21^{-/-}* n= 27; at 8w *Trim21^{+/+}* n=17, *Trim21^{-/-}* n=
720 26; at 12w *Trim21^{+/+}* n=25, *Trim21^{-/-}* n= 12. For (b), at 4w; *Trim21^{+/+}* n=8, *Trim21^{-/-}* n= 10; at 8w *Trim21^{+/+}*
721 n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9; at 12w *Trim21^{+/+}* n=6, *Trim21^{-/-}* n= 13. For (e) at 12w *Trim21^{+/+}* n=6, *Trim21^{-/-}* n= 13.
722 *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point but
723 different genotype.

724

725

726 **Figure 6:**

727 Immune cell composition in the spleen of *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* diabetic mice during hepatocellular
728 carcinoma development on NASH background. Healthy or diabetic (streptozotocin, STZ) male mice
729 were fed either a standard diet (SD) or a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks.
730 Percentages of (a) CD4⁺PD-1⁺ and (b) CD8⁺PD-1⁺ cells in the different experimental conditions within
731 the total CD4 and CD8 immune cell populations, respectively. For all graph, each red and black dots
732 represent individuals from the different groups: *Trim21^{-/-}* and *Trim21^{+/+}* respectively. Diabetic control
733 mice *Trim21^{+/+}* n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at 12w; *Trim21^{+/+}* n=9, *Trim21^{-/-}* n= 9. *p<0.05; **p<0.01 and
734 ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point but different genotype.

735

736 **Figure 7:**

737 Overexpression of the PD-1 and PD-L1 immune checkpoints in the liver of *Trim21^{-/-}* diabetic mice during
738 hepatocellular carcinoma development on NASH background. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice
739 were fed a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 12 weeks. (a) FOXP3, PD-1, CD4, CD8 (left
740 pictures), PD-L1, CD3, CD68, Col1a1 (right pictures) staining of liver sections. Scale bar: 100 μ m,
741 original magnification $\times 20$; (b) Percentage of CD4⁺PD-1⁺ and of CD8⁺PD-1⁺ cells within the total CD4
742 and CD8 immune cell populations, respectively. (c) PD-L1⁺ cell density in liver sections; visualization on
743 Qupath. (d) Quantification of PD-L1⁺ cell density and of the percentage of CD68⁺PD-L1⁺ cells within the
744 total CD8 immune cell population. For all graph, each black and red dots represent *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}*
745 ^{-/-} individuals, respectively. For (b) and (d), at 12w *Trim21^{+/+}* n=9, *Trim21^{-/-}* n= 9. *p<0.05; **p<0.01 and
746 ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point but different genotype.

747

748 **Figure 8:**

749 Intratumoral overexpression of the PD-L1 immune checkpoint in *Trim21^{-/-}* diabetic mice during
750 hepatocellular carcinoma development on NASH background. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice
751 were fed a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 12 weeks. (a) PD-L1, CD3, CD68, Col1a1 and
752 dapi staining of tumor sections. Scale bar: 200 μ m, original magnification $\times 20$ (left panel); and PDL-1⁺
753 cell density in tumor sections; visualization on Qupath (right panel) (b) Quantification of intratumoral
754 PD-L1⁺ cell density and of the percentage of CD68⁺PD-L1⁺ cells within the intratumoral total CD68
755 immune cell population. For all graph, each red and black dots represent individuals from the different
756 groups: *Trim21^{-/-}* and *Trim21^{+/+}* respectively. For (b) and (d), at 12w *Trim21^{+/+}* n=9, *Trim21^{-/-}* n= 9.
757 *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point but
758 different genotype.

759

760 **Figure 9:**

761 Analysis of T cell infiltrates in the liver tumors of *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* diabetic mice during
762 hepatocellular carcinoma development on NASH background. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice
763 were fed a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 12 weeks. (a) Quantification of CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺;
764 CD4⁺PD-1⁺; CD8⁺PD-1⁺ cells in tumors. (b) Quantification on only GS-negative tumors of CD3⁺; CD4⁺;
765 CD8⁺; CD4⁺PD-1⁺; CD8⁺PD-1⁺ cell infiltrates. For all graph, each red and black dots represent

766 individuals from the different groups: *Trim21^{-/-}* and *Trim21^{+/+}* respectively. For (a) at 12w *Trim21^{+/+}* n=9,
767 *Trim21^{-/-}* n= 9. For (b) For (a) at 12w *Trim21^{+/+}* n=9, *Trim21^{-/-}* n= 8. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001
768 compared diabetic mice under HFHCD the same time point but different genotype.

769

770 **Supplementary data 1 :**

771 Steatosis and fibrosis grades in diabetic mice under high-fat high-cholesterol diet. Diabetic
772 (streptozotocin, STZ) male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat high-cholesterol diet
773 (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks. (a) Hematoxylin and eosin (H&E) and Oil Red O (ORO) staining of liver
774 sections. Scale bars: 50 μ m, original magnification \times 40. (b) Sirius Red (SR) staining of liver sections.
775 Scale bars: 250 μ m, original magnification \times 40.

776

777 **Supplementary data 2 :**

778 Diabetic mice under high-fat high-cholesterol diet showed an increase in hepatocellular carcinoma
779 (HCC) markers. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice were fed either a standard diet (SD) or a high-
780 fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 4, 8 or 12 weeks. (a) hepatic mRNA expression levels of *Ccnd1*;
781 *Igf2*; *Gpc3*; *Afp*; *Klf4*; *Aldh1* and *Cd133*. For all graph, each black and red dots represent individuals
782 from the different groups: *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* respectively. For (a) diabetic control mice *Trim21^{+/+}*
783 n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at 4w; *Trim21^{+/+}* n=11, *Trim21^{-/-}* n= 10; at 8w *Trim21^{+/+}* n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9; at 12w
784 *Trim21^{+/+}* n=12, *Trim21^{-/-}* n= 13.. #### p<0.0001; ### p<0.001; ## p<0.01 and # p<0.05 compared
785 *Trim21^{-/-}* diabetic mice under SD to mice under HFHCD; \$\$\$\$ p<0.0001; \$\$\$p<0.001; \$\$p<0.01 and \$
786 p<0.05 compared *Trim21^{+/+}* diabetic mice under SD to diabetic mice under HFHCD. *p<0.05; **p<0.01
787 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point but different genotype.

788

789 **Supplementary data 3 :**

790 Cell proliferation in the liver tissue of *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* diabetic mice during hepatocellular
791 carcinoma development on NASH background. Diabetic (streptozotocin, STZ) male mice were fed either
792 a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 4 or 12 weeks. (a) Ki67 staining of liver sections. Dashed
793 lines delimit tumors (T). Scale bars: 250 μ m, original magnification \times 20; (b) Quantification of the
794 percentage of Ki67 positive area. For the graph, each black and red dots represent *Trim21^{+/+}* and
795 *Trim21^{-/-}* individuals, respectively. For (b) at 4w; *Trim21^{+/+}* n=9, *Trim21^{-/-}* n= 4; at 12w *Trim21^{+/+}* n=9,
796 *Trim21^{-/-}* n= 9.

797

798 **Supplementary data 4 :**

799 Survival of diabetic *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* mice under high-fat high-cholesterol diet. Diabetic
800 (streptozotocin, STZ) male mice were fed a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) up to 12 weeks
801 during which their survival was monitored. Black and red lines represent *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* mice,
802 respectively. *Trim21^{+/+}* n=78, *Trim21^{-/-}* n= 74.

803

804

805

806 **Supplementary data 5 :**

807 Anti-oxidative pathway in diabetic *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* mice under high-fat high-cholesterol diet
808 during hepatocellular carcinoma progression on NASH background. Diabetic male (streptozotocin, STZ)
809 mice were fed either a standard diet (SD) or a high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) for 4, 8 or 12
810 weeks. **(a)** hepatic mRNA expression levels of *Nox2*, *Hmox1* and *Nqo1*. **(b)** p62 staining of liver
811 sections (right panel). Scale bars: 100 μ m, original magnification \times 20; Quantification of p62 positive area
812 (left panel). For all graph, each black and red dots represent *Trim21^{+/+}* and *Trim21^{-/-}* individuals,
813 respectively. For (a) diabetic control mice *Trim21^{+/+}* n=5, *Trim21^{-/-}* n= 5; at 4w; *Trim21^{+/+}* n=11, *Trim21^{-/-}*
814 n= 10; at 8w *Trim21^{+/+}* n=8, *Trim21^{-/-}* n= 9; at 12w *Trim21^{+/+}* n=12, *Trim21^{-/-}* n= 13. . For (b) at 4w;
815 *Trim21^{+/+}* n=9, *Trim21^{-/-}* n= 4; at 12w *Trim21^{+/+}* n=9, *Trim21^{-/-}* n= 9. ##### p<0.0001; ### p<0.001; ##
816 p<0.01 and # p<0.05 compared *Trim21^{-/-}* diabetic mice under SD to mice under HFHCD; \$\$\$\$ p<0.0001;
817 \$\$\$p<0.001; \$\$p<0.01 and \$ p<0.05 compared *Trim21^{+/+}* diabetic mice under SD to diabetic mice under
818 HFHCD. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001 compared diabetic mice under HFHCD the same time point
819 but different genotype.

820

821 **Supplementary data 6 :**

822 Gating strategy used to identify the different populations of splenic immune cells.

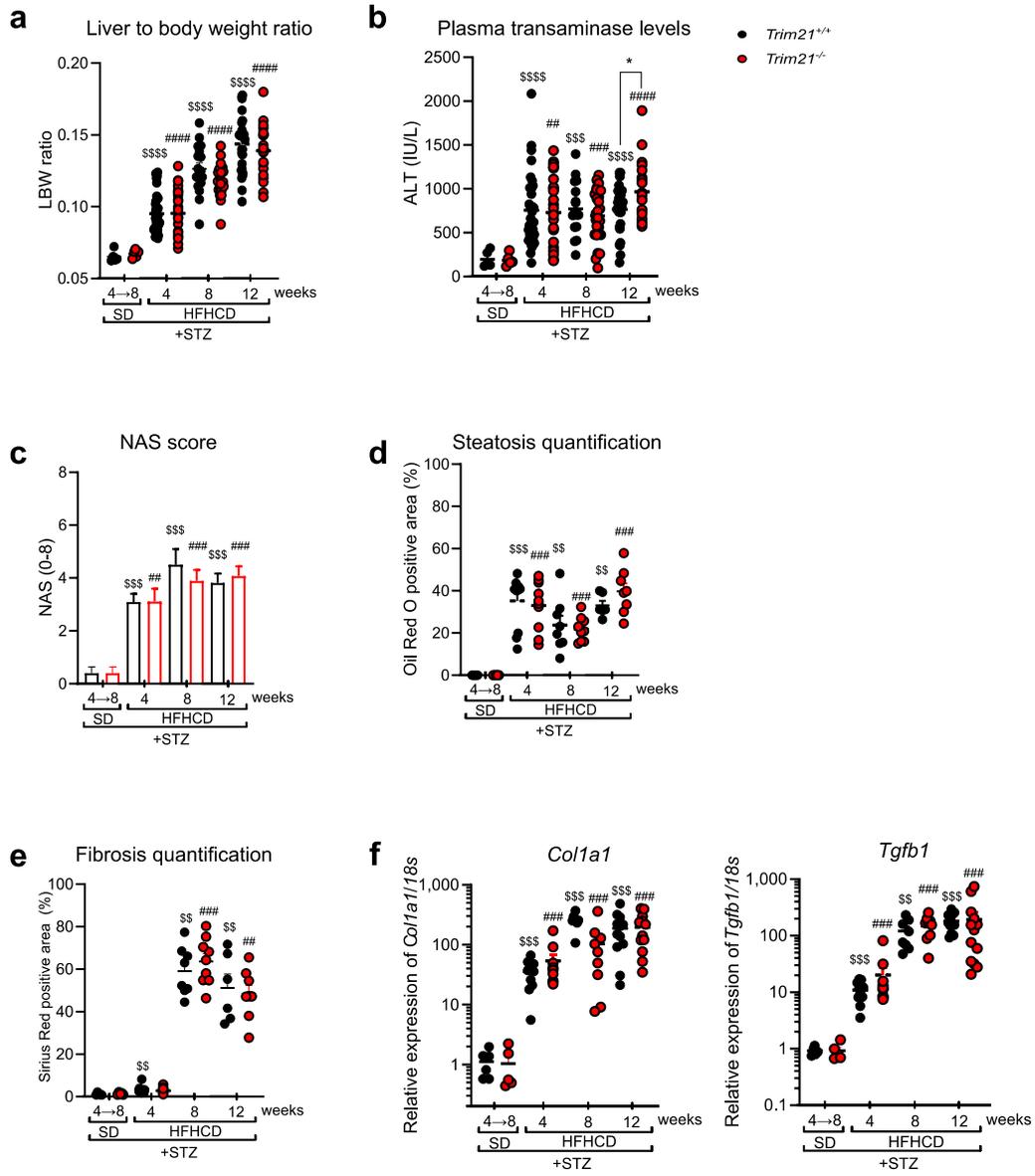


Figure 1

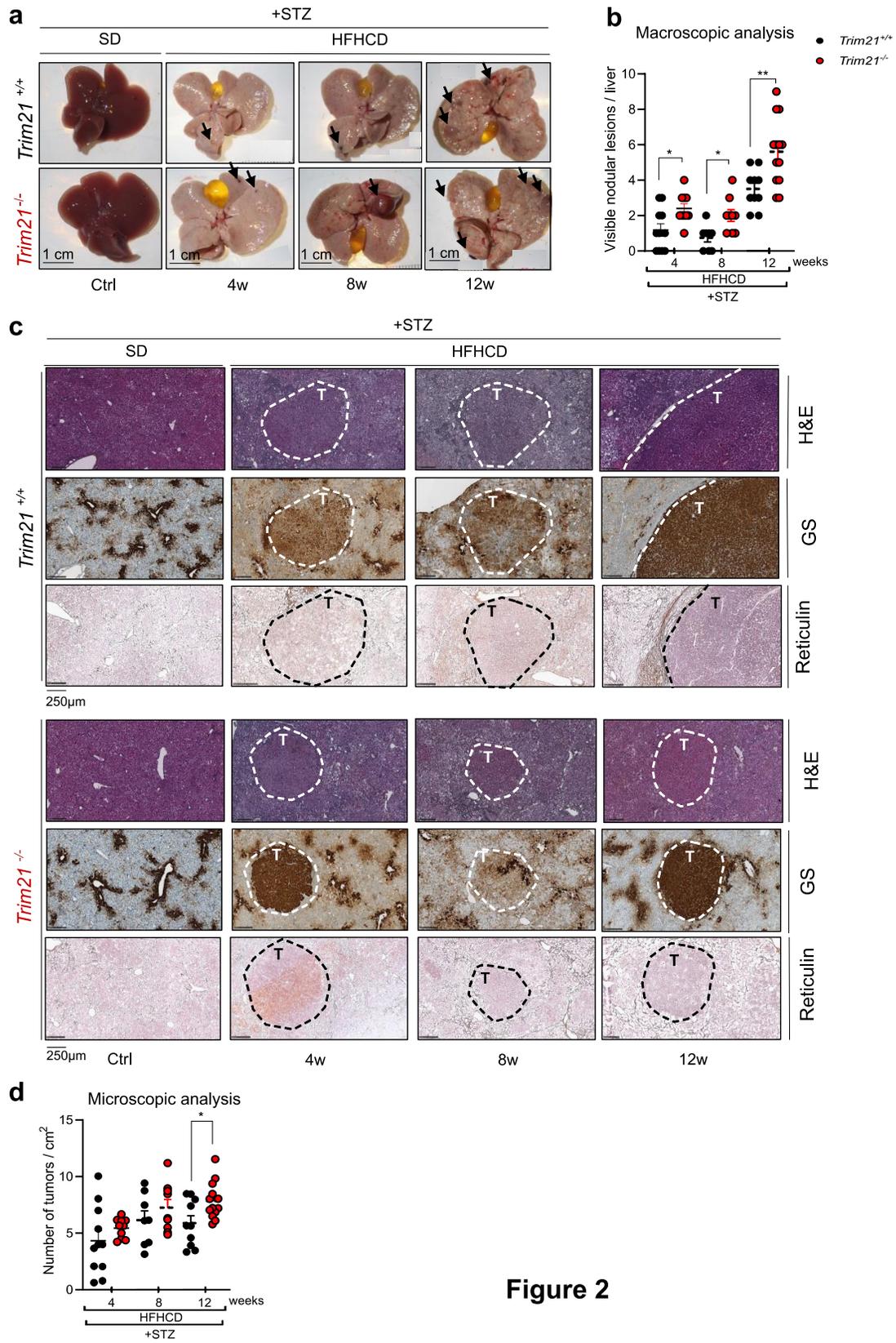


Figure 2

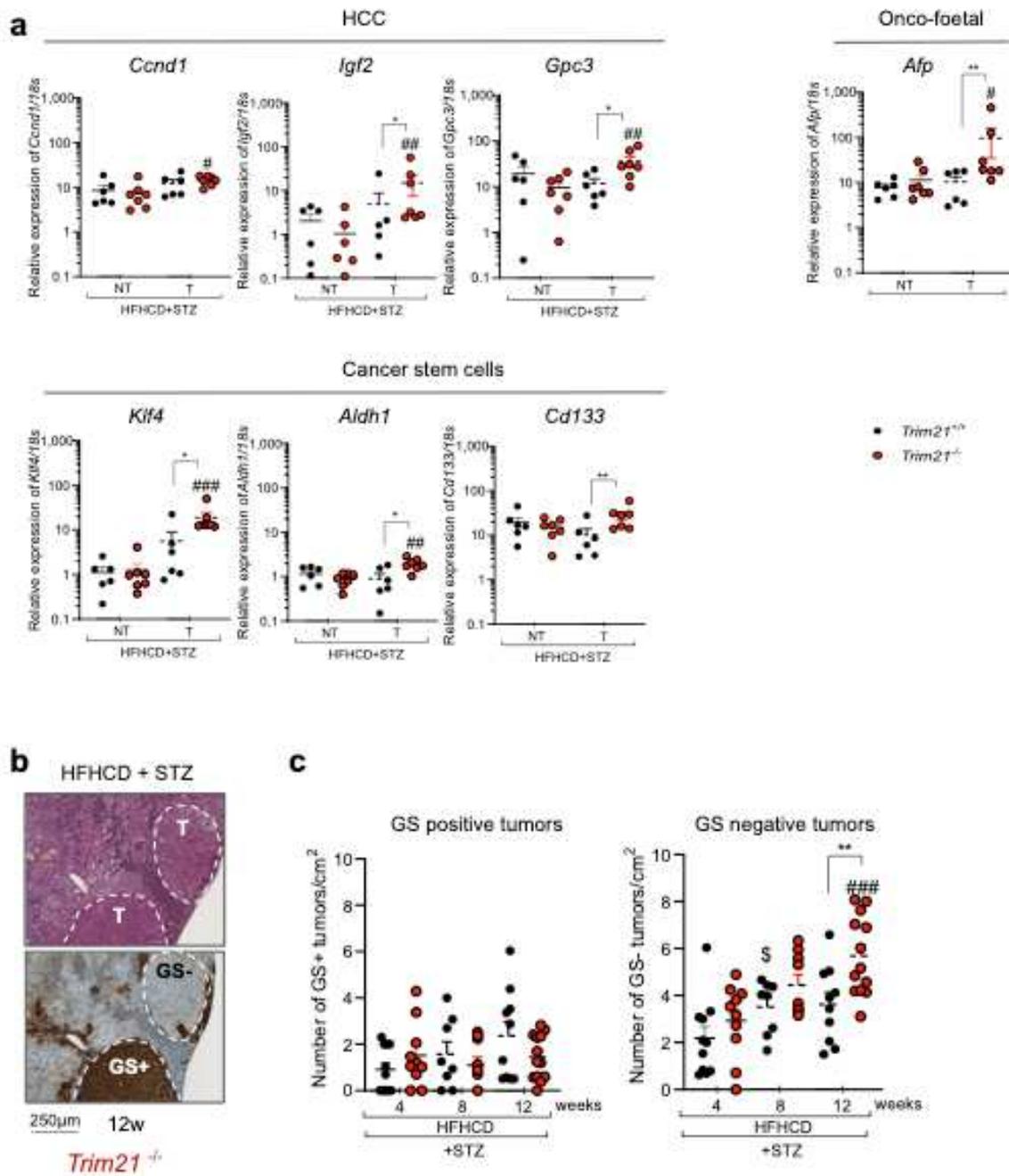


Figure 3

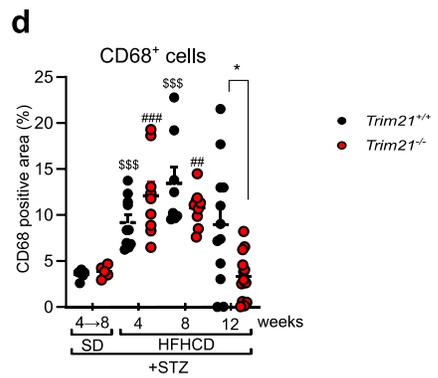
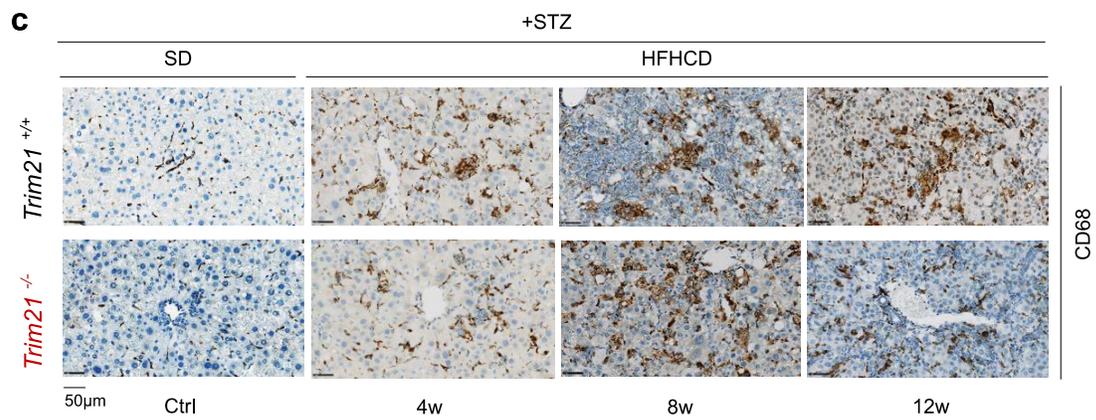
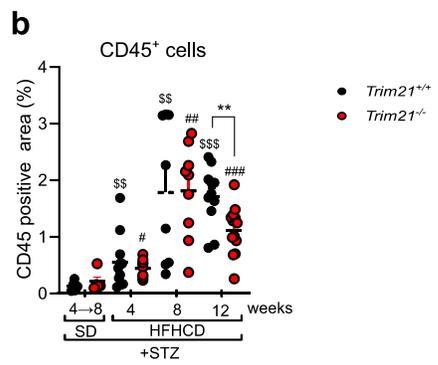
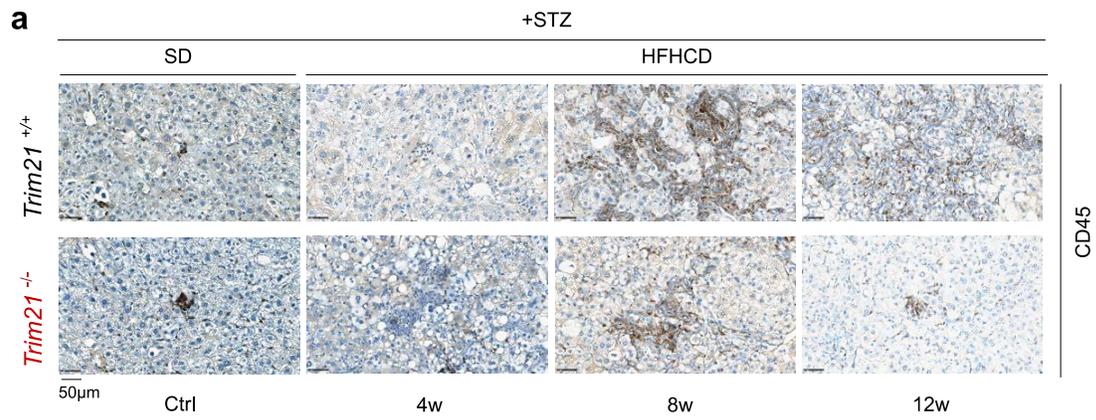


Figure 4

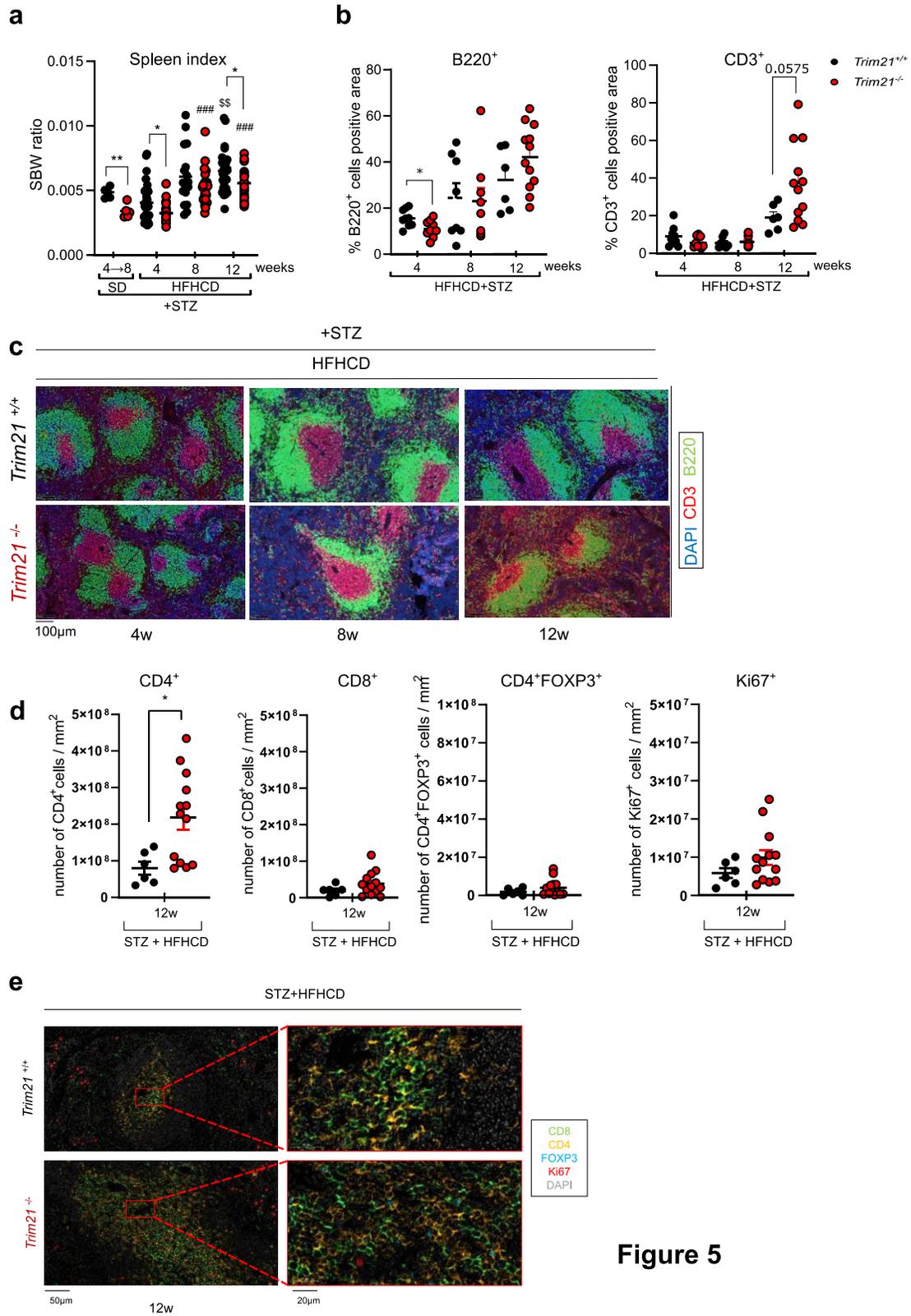


Figure 5

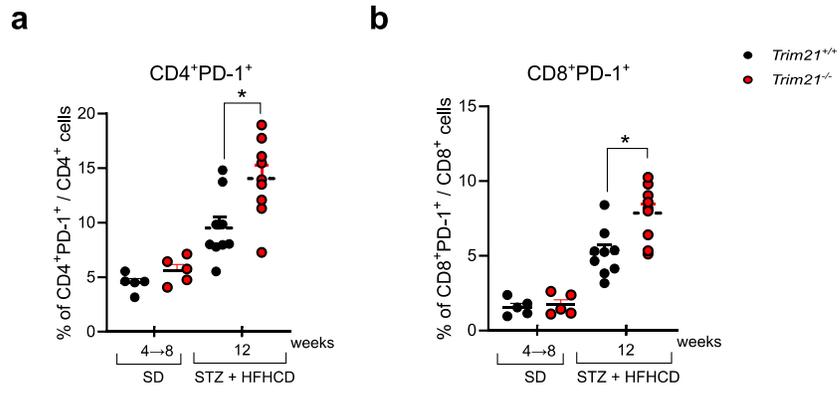


Figure 6

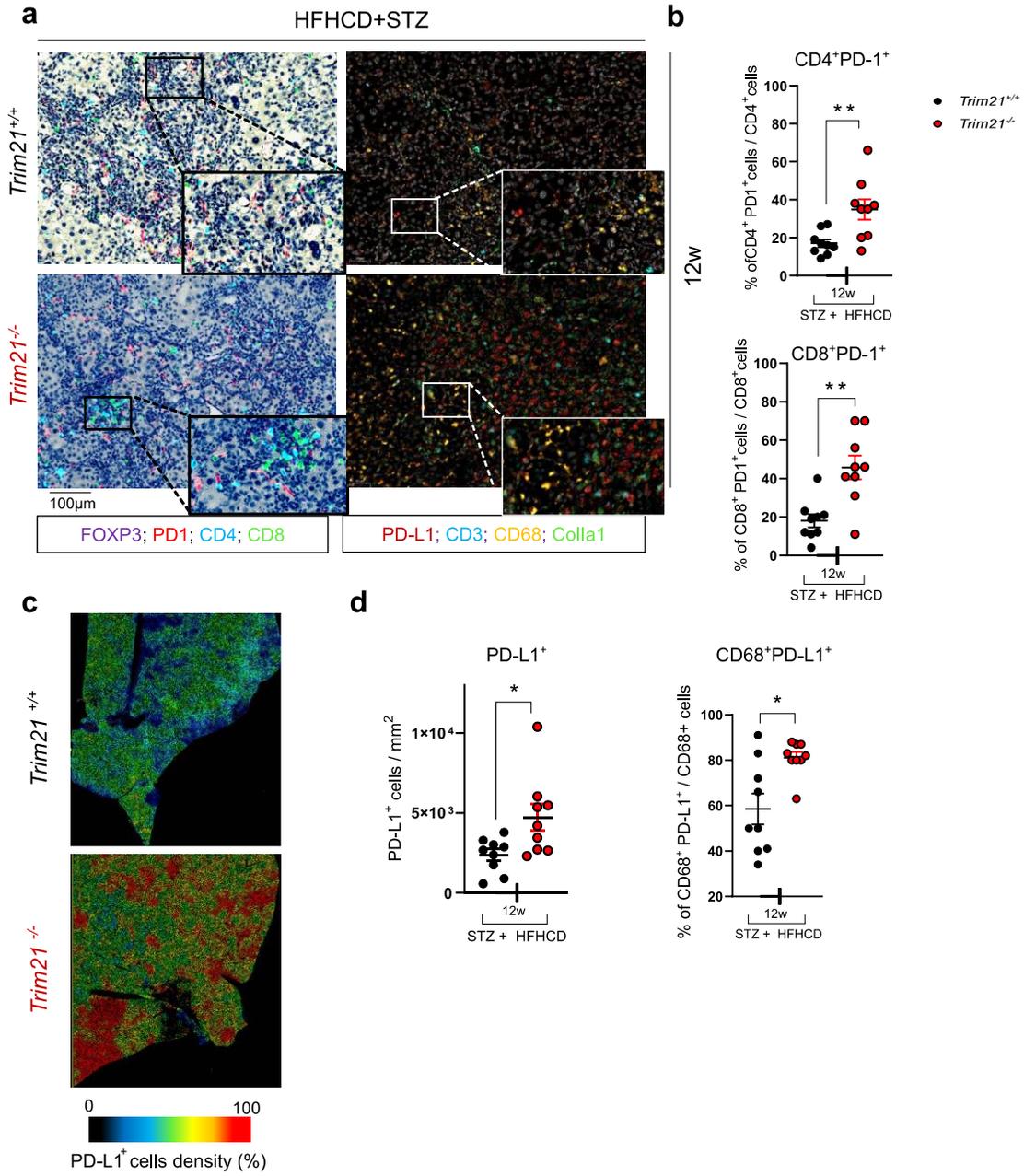


Figure 7

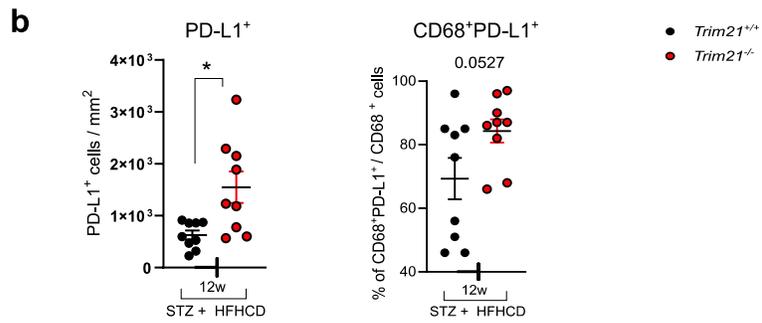
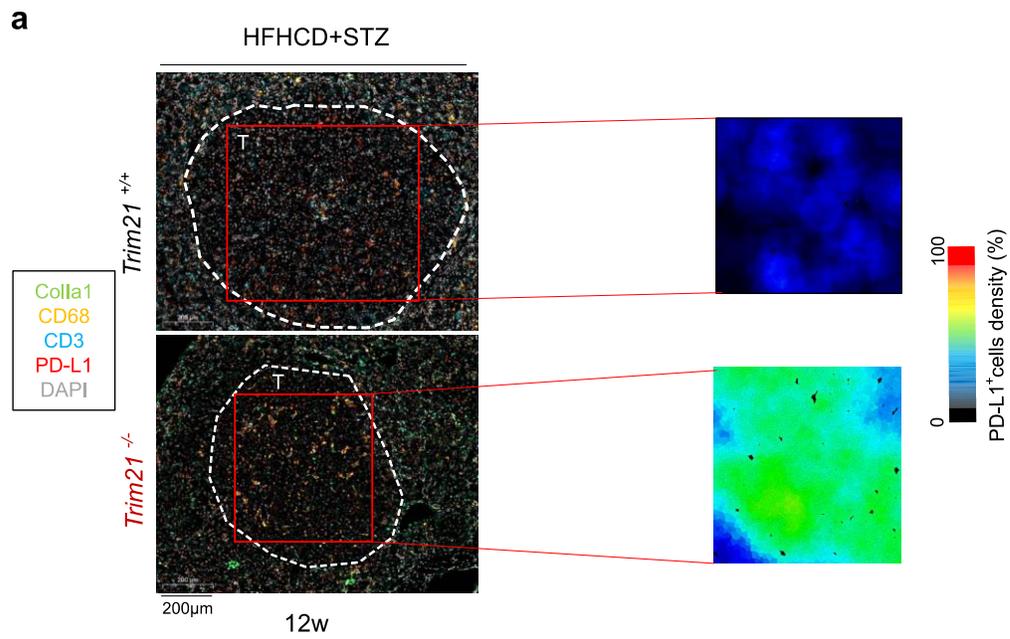
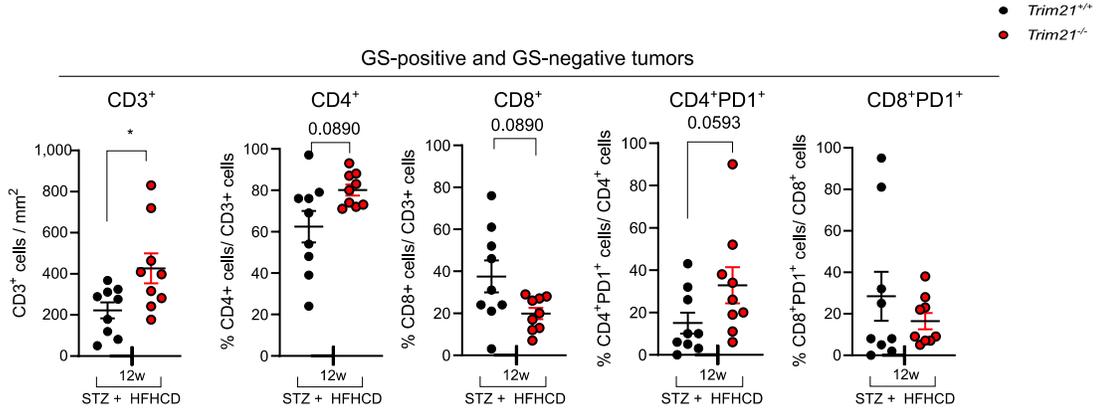
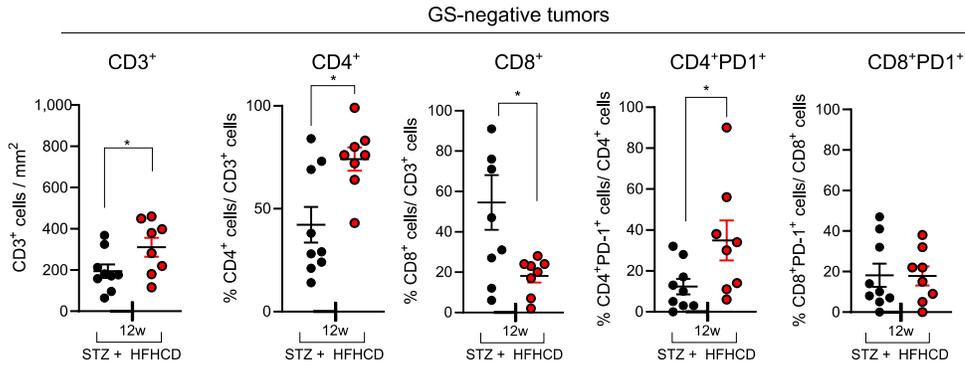
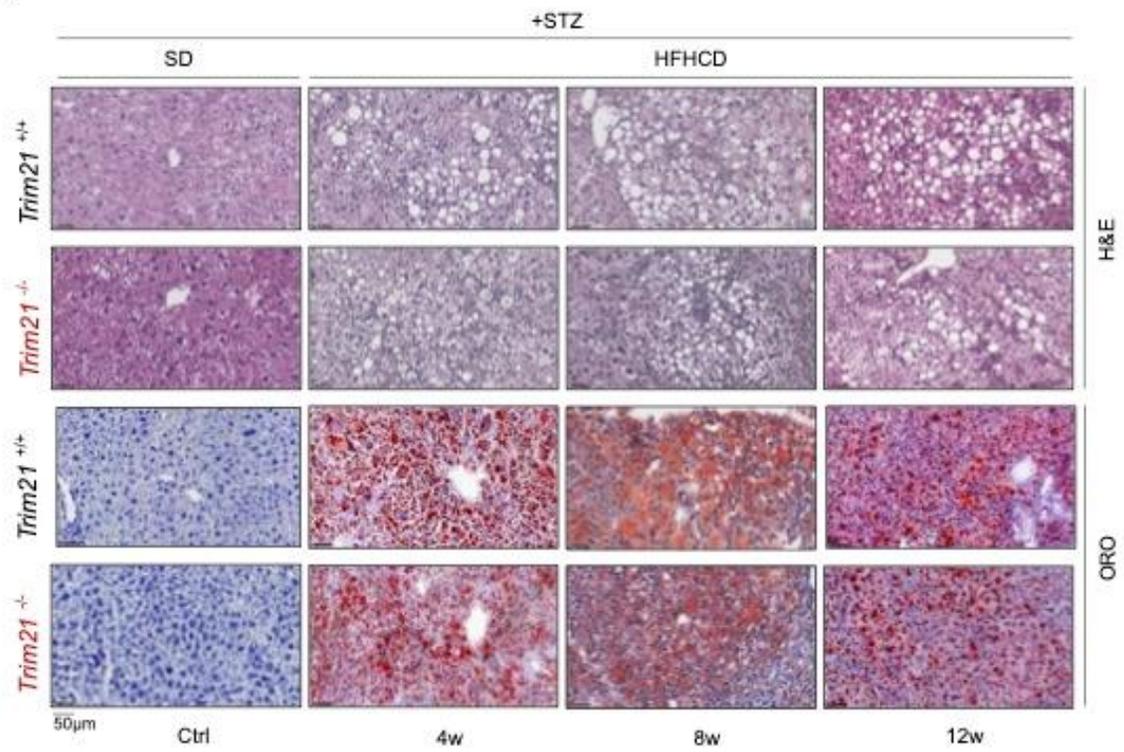
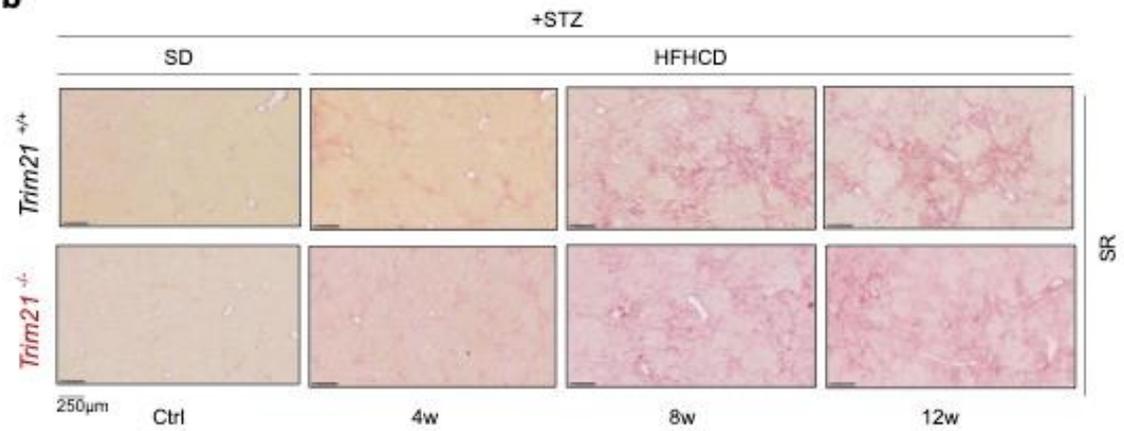
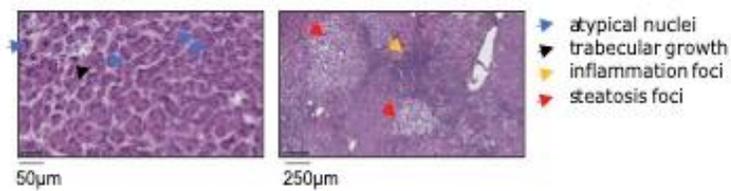
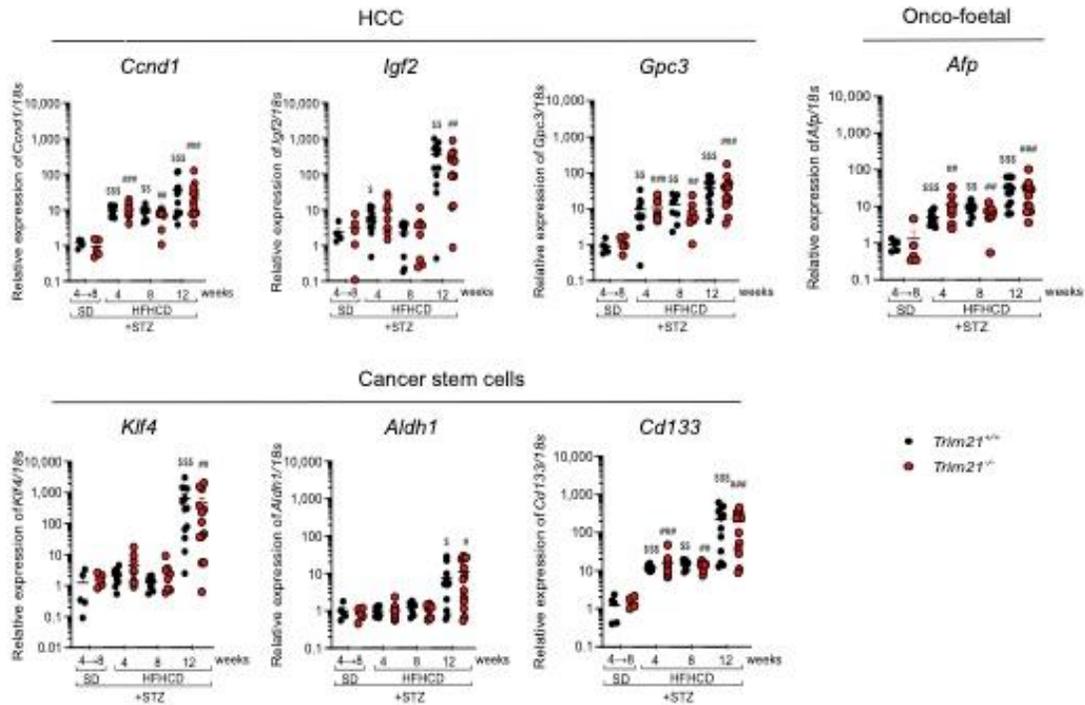


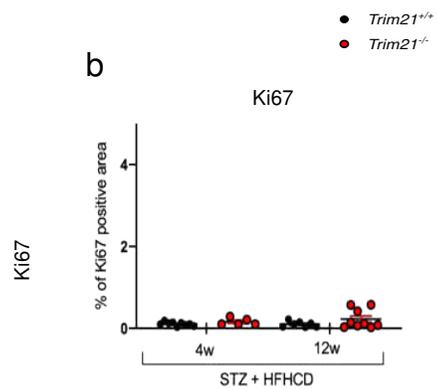
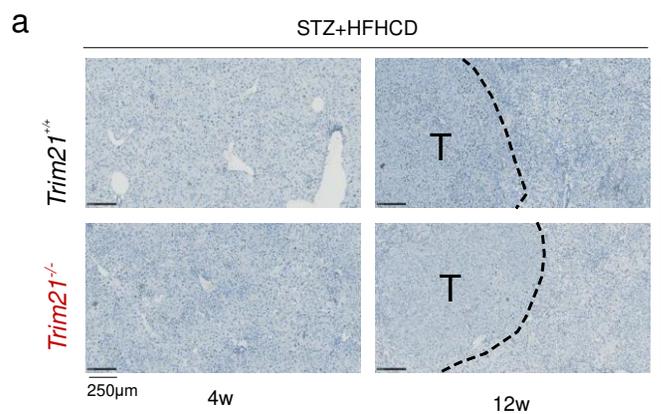
Figure 8

a**b****Figure 9**

a**b****c****Sup. data 1**

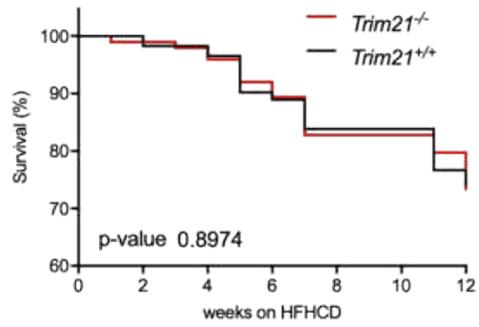


Sup. Data 2

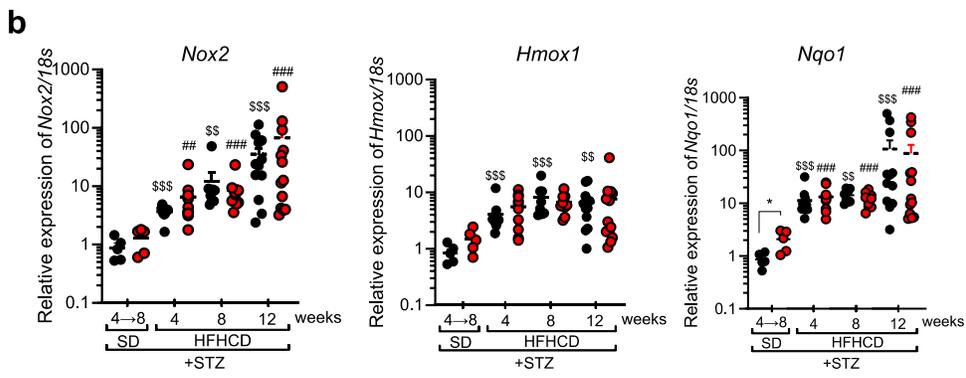
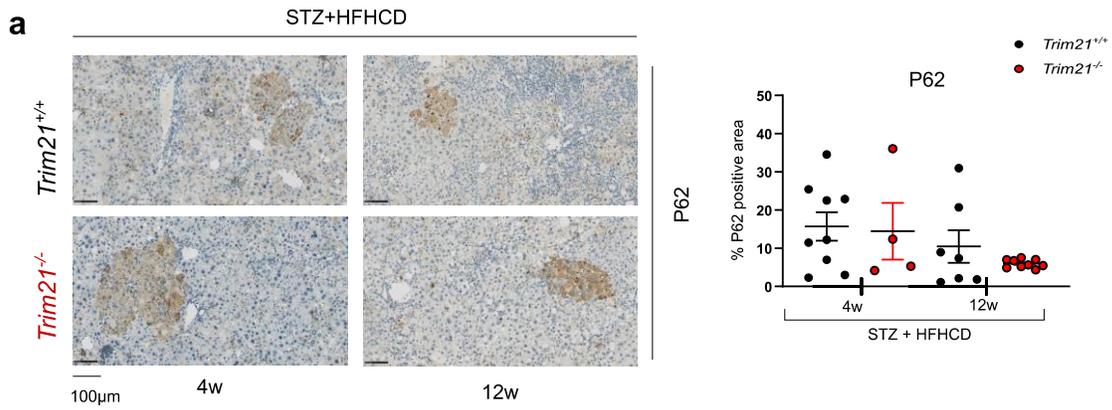


Sup. Data 3

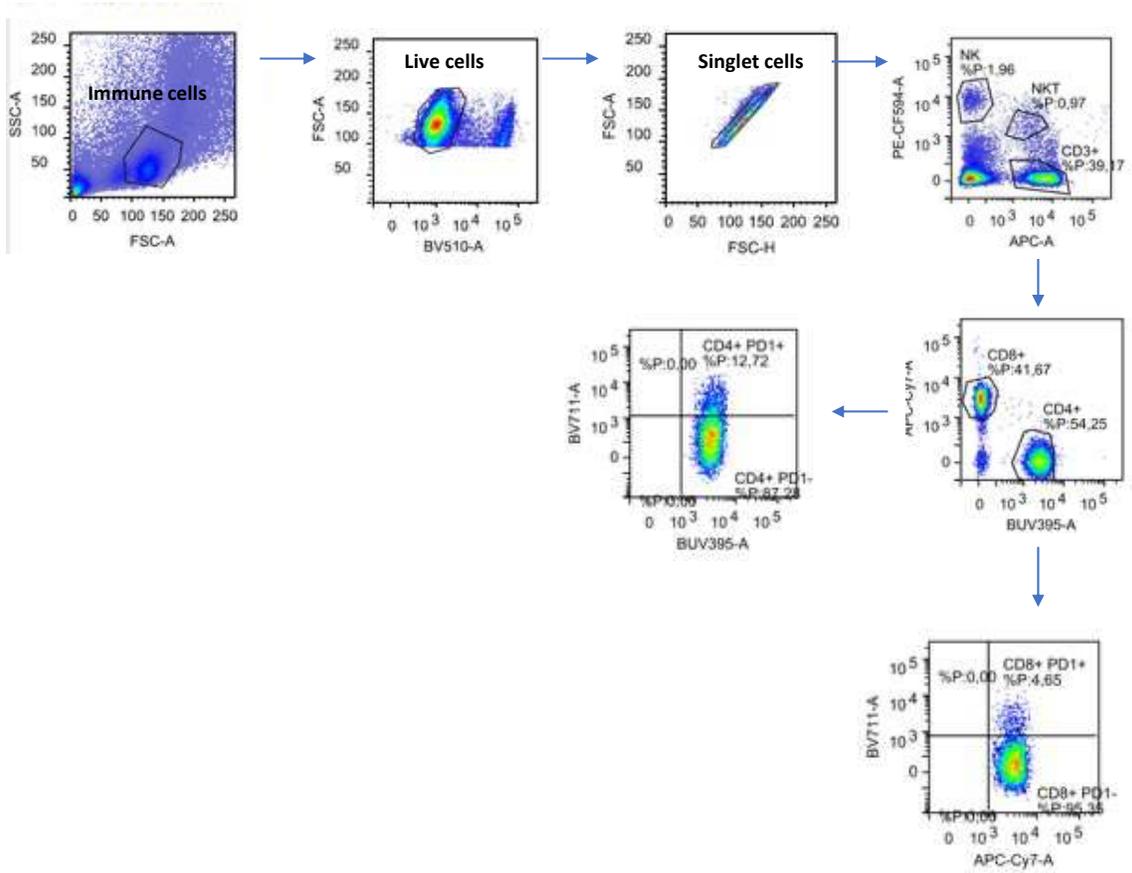
a



Sup. Data 4



Sup. Data 5



Sup. Data 6

Sup. Data 6

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>18s</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>Ccnd1</i>	GCCGAGAAGTTGTGCATCTAC	GGAGAGGAAGTGTTTCGATGAA
<i>Igf2</i>	ACATGCTGCCCAAGTAACC	CTGACAAAGATGGCCCATAG
<i>Afp</i>	CTCAGCGAGGAGAAATGGTC	GAGTTCACAGGGCTTGCTTC
<i>Klf4</i>	CGGACCACCTTGCCTTACACA	TGACTTGCTGGGAAGTTGACC
<i>Aldh1a1</i>	GGTGAACATTGTCCCTGGTTAT	GACACTTTGTCGATGTCCATGT
<i>Cd133</i> <i>(Prom1)</i>	TGGAGCTACCTGCGGTTTAGA	GGACCTGTGATTGCGATAATGA
<i>Hmox1</i>	AGGTACACATCCAAGCCGAGA	CATCACCAGCTTAAAGCCTTCT
<i>Cybb</i> <i>(Nox2)</i>	AGTGCGTGTTGCTCGACAA	GCGGTGTGCAGTGCTATCAT
<i>Nqo1</i>	AGGATGGGAGGTAAGTCAATC	AGGCGTCCTTCCTTATATGCTA
<i>Tgfb1</i>	CTTAGTTTGGACAGGATCTGG	CTCCACCTGCAAGACCATC
<i>Col1a1</i>	GAAGCACGTCTGGTTTGGGA	ACTCGAACGGGAATCCATC

Sup. Table 1

Antibody	Reference	Tissue	DAB	IHF	Flow Cyto.
Glutamine synthetase	Abcam, ab73599	Liver	1/100		
CD45	BioLegend, #103107	Liver	1/30		
CD68	Abcam, ab125212	Liver	1/100	1/200	
CD45R/B220	BioLegend, # 553084	Spleen		1/2000	
CD3	Dako, A0452	Liver		1/1000	
		Spleen			
Ki67	Novusbio, NB600-1252	Liver		1/100	
CD8	Abcam, ab209775	Liver		1/500	
		Spleen			
CD4	Interchim, #50134-R001	Liver		1/200	
		Spleen		1/1000	
FOXP3	Fisher Scientific, #15247457	Liver		1/50	
		Spleen			
PD-L1	Cell Signaling, #13684	Liver		1/50	
PD-1	NovusBio, #NBP1-77276	Liver		1/1000	
Collagen I a1 (Col1a1)	Abcam, ab34710	Liver		1/100	
CD3	BD Pharmingen, #553066	Spleen			1/25
CD8	BD Pharmingen, #557654	Spleen			1/100
CD4	BD Pharmingen, #565974	Spleen			1/50
PD-1	BioLegend, #135231	Spleen			1/25
NK1.1	BioLegend, #562921	Spleen			1/50

Sup. Table 2

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le cancer du foie reste un défi de santé majeur, et son incidence ne cesse d'augmenter dans le monde. Il est estimé que d'ici 2025, plus d'un million de personnes seront affectées par un cancer du foie. Même si les hépatites virales restent les facteurs de risque majoritaires dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), la stéatohépatite non alcoolique (NASH) représente l'étiologie avec l'augmentation de l'incidence la plus rapide pour le CHC, notamment dans les pays occidentaux. Il est estimé que l'incidence du CHC est entre 0,5 à 2% chez les patients atteints de NASH. Une méta-analyse sur des données de patients a identifié les NAFLD et NASH comme les facteurs de risque les plus fréquents, représentant 59% des cas de CHC aux États-Unis ²¹⁴.

La pathogenèse de la NASH a été décrite dans un premier temps comme un mécanisme simple en deux étapes : 1) une accumulation de lipides dans les hépatocytes, induisant une sensibilisation au 2) stress oxydatif induit par la lipotoxicité et l'inflammation²¹⁵. Cependant, aujourd'hui les données montrent que les mécanismes sous-jacents sont plus complexes avec la mise en jeu de différents facteurs (environnement, alimentation, mode de vie) ^{164,216}. Les mécanismes centraux dans ces pathologies sont la résistance à l'insuline induisant une accumulation de lipides dans le foie, la mort cellulaire et l'inflammation. En effet, une dérégulation métabolique chronique au niveau des hépatocytes, associée à un stress oxydatif, mène à une lipotoxicité et une inflammation induite par la mort des hépatocytes. Ce phénomène de mort est l'un des mécanismes clés dans la progression de la pathologie hépatique. Selon les inducteurs, différents types de mort seront induits en favorisant la progression de la pathologie, tels que l'apoptose, la pyroptose, la ferroptose, ou la nécroptose ¹⁵⁷.

La nécroptose est un mode de mort lytique dépendant de l'initiation par un récepteur de mort et de l'inhibition des caspases. Lorsque ces conditions sont réunies, alors le nécrosome composé de RIPK1, RIPK3 et MLKL, se met en place et induit la lyse cellulaire. Cette mort lytique est pro-inflammatoire et peut participer à la pathogenèse et à la progression des pathologies hépatiques. Cependant, le rôle de la nécroptose dans les pathologies hépatiques reste controversé ²¹⁷. Physiologiquement, RIPK3 est peu exprimée dans le foie, mais les patients atteints de NASH présentent une augmentation d'expression de RIPK3 comparés aux patients présentant une simple stéatose. Les souris déficientes en RIPK3 sont protégées des lésions hépatiques induites par un régime MCD ²¹⁸. Toutefois, lors de la carcinogenèse, RIPK3 est réprimée et induit la modulation de voies du métabolisme lipidique dans les macrophages ²¹⁹. Une autre étude semble montrer que les souris déficientes en MLKL soumises à un régime sans choline et, riche ou pauvre en gras (*high fat ou low fat diet*), sont protégées de l'inflammation médiée par la nécroptose et présentent une incidence tumorale réduite ²²⁰.

Au sein de notre équipe, nous avons découvert par spectrométrie de masse, une nouvelle protéine recrutée lors de la formation du nécrosome induit par TRAIL : l'E3 ubiquitine ligase TRIM21 ²⁷. Cette dernière a été décrite comme modulateur positif dans différents types de mort ^{25,26,29,30}. Nous avons donc voulu comprendre le rôle de TRIM21 au cours de la nécroptose. Pour ce faire, nous avons utilisé deux lignées cellulaires exprimant la protéine RIPK3, HT-29 et HaCat, traitées par le ligand de mort TRAIL. Ainsi, nous avons

utilisé ce ligand en association avec un inhibiteur pan-IAPs (*Birinapant, Bp*) et un inhibiteur pan-caspases (*z-VAD*) pour induire une nécroptose dans les deux lignées. Les différentes expériences de modulation de l'expression de TRIM21 dans ces conditions d'induction de la nécroptose montrent son rôle de modulateur positif de la voie nécroptotique. En effet, alors que la répression de TRIM21 induit une résistance partielle à la nécroptose induite par TRAIL, à l'inverse, sa surexpression sensibilise les cellules à la mort par nécroptose. De façon intéressante, cette modulation de la nécroptose par TRIM21 n'est observable que lors de l'utilisation du ligand TRAIL. En effet, TRIM21 ne module pas la nécroptose induite par Fas-L ou TNF α ²⁷.

TRAIL, membre de la super famille du TNF, suscitait beaucoup d'engouement et était une piste thérapeutique prometteuse, car il était capable d'induire une cytotoxicité des cellules cancéreuses sans avoir d'effet sur les cellules saines ²²¹. Différentes études sur modèles murins associées à une invalidation de TRAIL montrent une carcinogenèse sur différents organes (foie, nodules lymphatiques etc.) ²²¹. Le potentiel de TRAIL à induire l'apoptose de façon sélective sur les cellules cancéreuses a poussé au développement de différents agonistes des récepteurs de TRAIL (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Cependant, aucun de ces traitements n'a produit de résultats bénéfiques pour les patients. L'une des limites est le manque de biomarqueurs capables d'identifier les patients qui répondront ou non au traitement par les agonistes des récepteurs de TRAIL ²²¹.

Nos travaux montrent pour la première fois le rôle de TRIM21 en tant que modulateur positif de la nécroptose induite par TRAIL. De plus, notre étude met en avant potentiellement un biomarqueur permettant de cibler les cellules sensibilisées à la nécroptose induite par TRAIL. Il serait intéressant d'étudier le potentiel thérapeutique des cellules sensibles à la nécroptose induite par TRAIL, en utilisant les agonistes aux récepteurs TRAIL.

Néanmoins, il reste encore à comprendre les mécanismes moléculaires induisant la modulation de la nécroptose par TRIM21. Dans un contexte différent de TRIM21, Almagro *et al*, montrent que l'ubiquitination de la kinase RIPK1 permet de favoriser le recrutement du nécrosome induit par le ligand TNF²²². Étant donné que TRIM21 présente une fonction E3 ubiquitine ligase, nous avons analysé le profil d'ubiquitination de RIPK1 dans notre modèle cellulaire (Figure 24). Nos données préliminaires semblent montrer que les cellules réprimant TRIM21 par ARN interférence, présentent un profil d'ubiquitination de la protéine RIPK1 plus faible comparé aux cellules sauvages. Il serait intéressant de confirmer ce mécanisme, d'une part en utilisant les cellules HT29 TRIM21-KO et HT29 TRIM21-WT, et d'autre part, en tronquant le domaine RING de la protéine TRIM21. De plus, déterminer spécifiquement la lysine ubiquitinée et le type d'ubiquitination sur la protéine RIPK1 permettrait une meilleure compréhension de la modulation par TRIM21 de la réponse à la nécroptose induite par TRAIL.

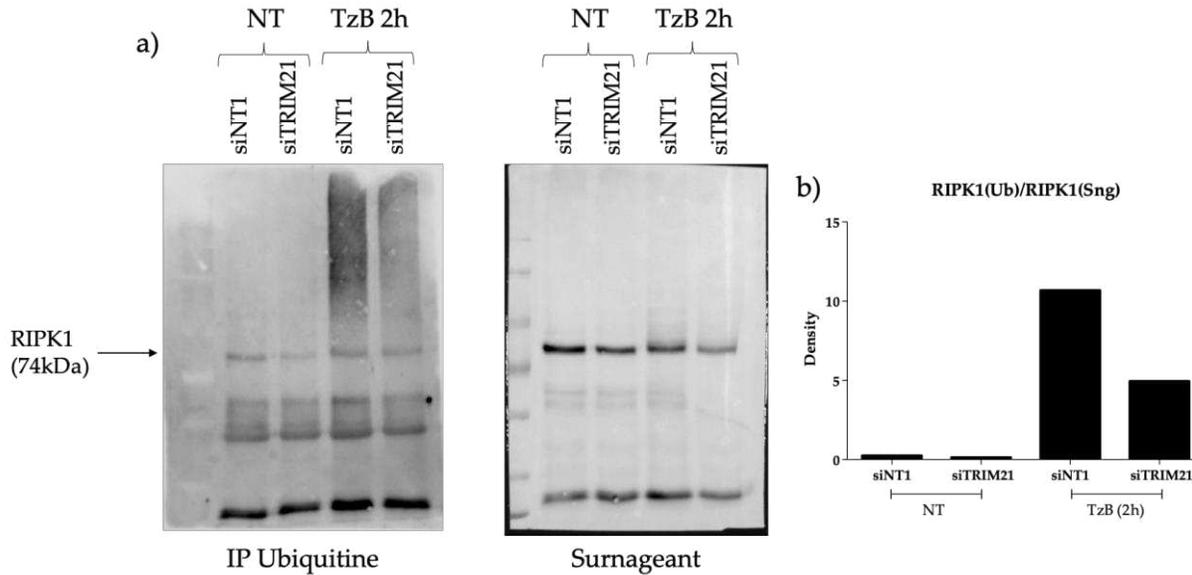


Figure 24: **Ubiquitination de RIPK1 durant la nécroptose induite par TRAIL**. Les cellules HT-29 ont été transfecté avec un siTRIM21 ou siNT (contrôle négatif). 48h après transfection, les cellules sont traitées avec TRAIL/Bp/zVAD pendant 2h. a) Immunoblot de l'ubiquitination après immunoprécipitation avec un anticorps anti-RIPK1. b) Densitométrie associé.

Ainsi, l'absence d'expression de TRIM21 induit une résistance non seulement à la nécroptose²⁷, mais également à différents types de morts^{26,29,30}. La question se pose alors du rôle de TRIM21 dans un contexte de NASH-CHC. La NASH est caractérisée par l'induction d'une mort des hépatocytes, phénomène pro-inflammatoire favorisant la progression de la pathologie. Par contre, aux stades cancéreux, les cellules tumorales développent à l'inverse des mécanismes de résistance aux différents types de mort cellulaire. Plusieurs études montrent la corrélation entre la faible expression de TRIM21 et un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de différents cancers^{97,108,111,112,115}, notamment le CHC¹¹⁶. Dans le contexte du cancer du foie, les auteurs supposent alors que l'absence TRIM21 module négativement les voies de mort et positivement les voies d'inflammation¹¹⁶. Nous avons donc mis des souris n'exprimant plus TRIM21 (*Trim21*^{-/-}) sous un protocole de carcinogénèse hépatique dans un contexte de NASH (le modèle STAMTM).

Nos résultats montrent des lésions hépatiques plus importantes chez les souris *Trim21*^{-/-} comparées à leurs congénères sauvages. Ces lésions sont accompagnées d'un taux d'émergence de tumeurs plus important chez ces souris génétiquement modifiées. De façon assez surprenante, nos résultats suggèrent que les voies de mort ne sont pas impliquées dans la différence observée entre les deux génotypes. En effet, nous n'observons pas de différence d'expression d'ARN messagers (ARNm) de certains effecteurs tel que *Ripk1* ou *Ripk3* après 4 ou 12 semaines de régimes entre les souris *Trim21*^{-/-} et leur congénères sauvages (Figure 25). L'expression de *Mkl1* semble diminuer chez les souris mutées à 4 semaines sous régimes, mais à 12 semaines cette différence est abolie (Figure 25). Nous avons également regardé d'autre gènes impliqués dans la mort comme *Apaf-1*, *Bid* ou encore *Bax* (Figure 25). Ces derniers sont surexprimés à 12

semaines mais sans différence notable entre les deux génotypes. Il serait intéressant de compléter ces résultats d'expression génique par des immunomarquages de la caspase 3 clivée ou un marquage « tunnel ».

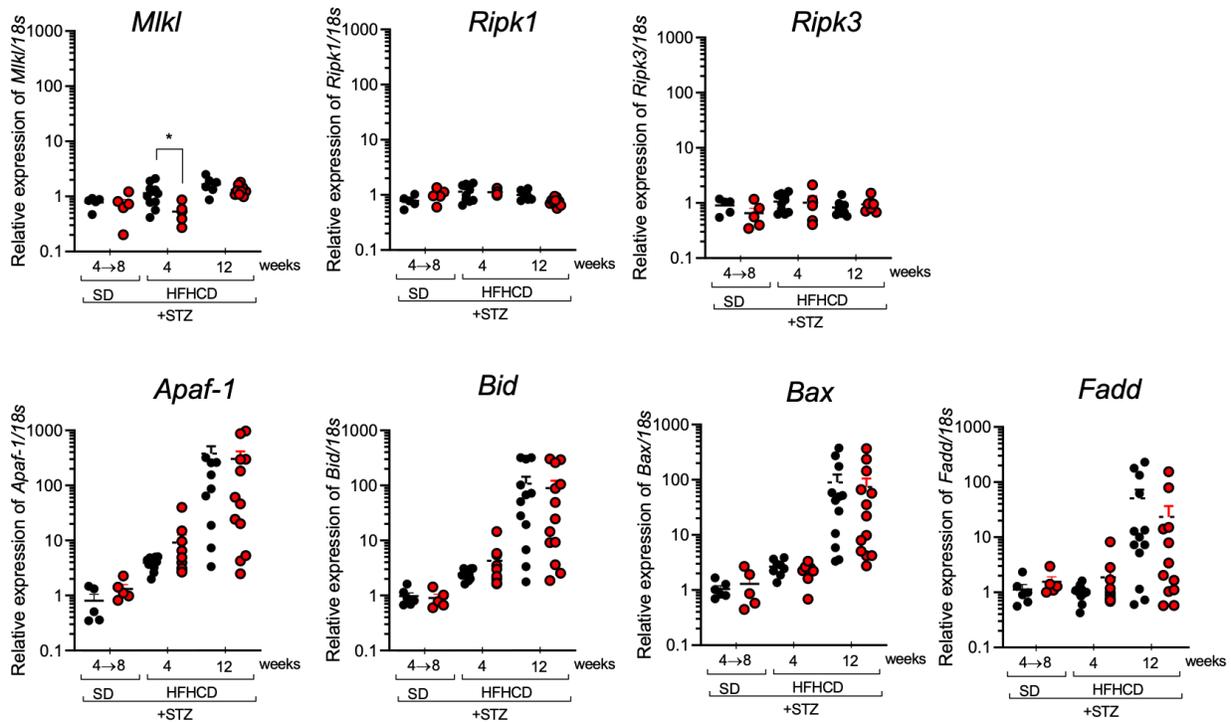


Figure 25: **Expression des ARNm des différents marqueurs de morts.** Expression au niveau du foie de *Mik1*, *Ripk1*, *Ripk3*, *Apaf-1*, *Bid*, *Bax* et *Fadd* à 4 et 12 semaines sous régime HFHCD. SD : souris diabétique sous régime standard ; noir : souris *Trim21*^{+/+} ; rouge : souris *Trim21*^{-/-}

Nous nous sommes également intéressés à certaines voies métaboliques dans notre modèle murin. Dans un premier temps le score de NAFLD (NAS) ainsi qu'un marquage Oil Red O confirment la mise en place d'une stéatose, néanmoins aucune différence n'est observée entre les souris mutées et les souris sauvages. De la même façon, aucune différence d'expression d'ARNm impliqués dans certaines voies du métabolisme telles que *Pepck* (néoglucogénèse), *Fasn* (lipogénèse), *Foxo1*, *Foxo3*, *Foxo4* (glycogénogénèse ou lipogénèse) ; *Srebp1a* (régulateur du métabolisme lipidique), n'est observé entre les deux génotypes (Figure 26). Il est intéressant de noter que le gène *Foxo1* peut également réguler l'apoptose²²³, et dans notre modèle le profil d'expression de ce dernier est similaire à l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose. Aucune différence n'est retrouvée également dans le processus de fibrose. Nous supposons que le délai sous régimes est court et que nous ne voyons pas encore les effets de *Trim21* sur ces voies de métabolisme et de fibrose. Afin de confirmer ou non cette hypothèse, nous devons mettre nos souris sous régime pendant au moins 16 semaines.

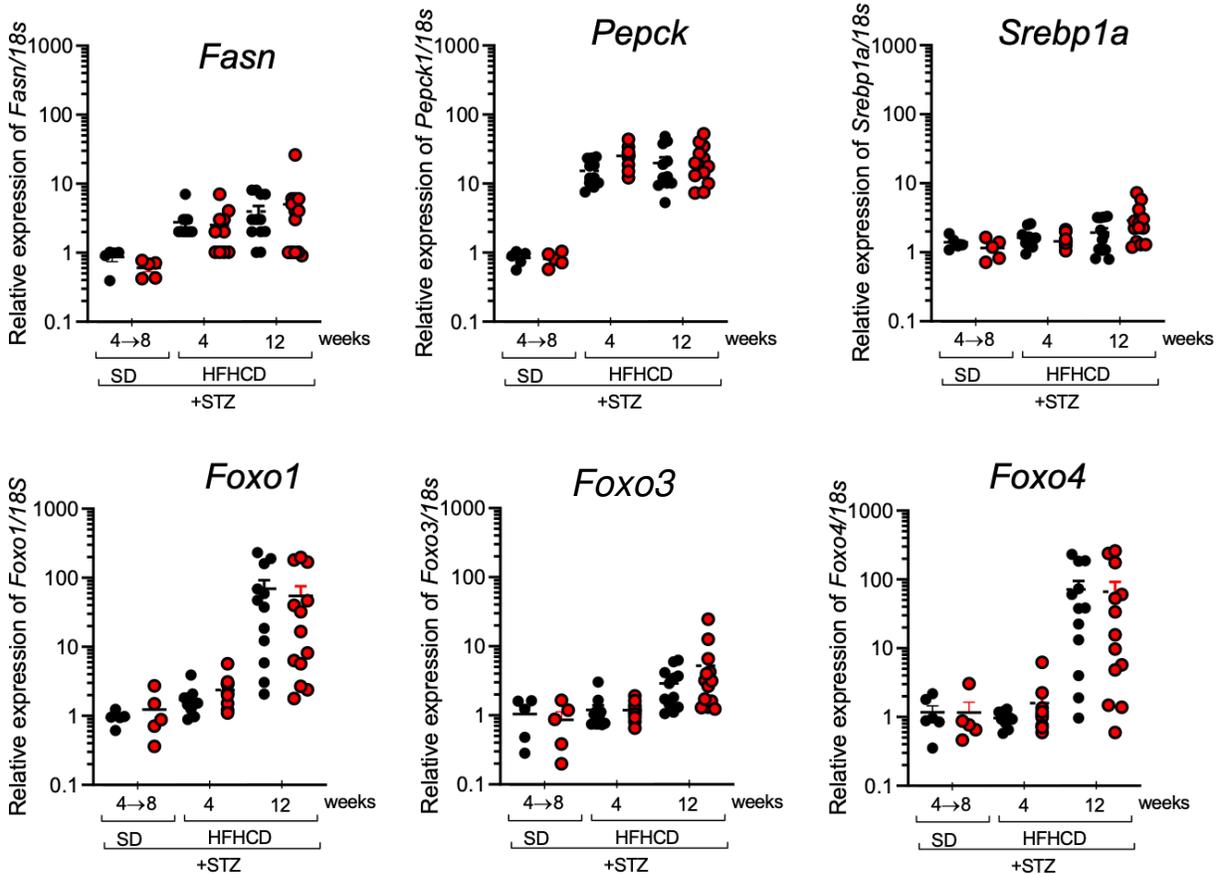


Figure 26: **Expression des ARNm des différentes voies du métabolisme.** Expression au niveau du foie de *Fasn*, *Pepck*, *Srebp1a*, *Foxo1*, *Foxo3* et *Foxo4* à 4 et 12 semaines sous régime HFHCD. SD : souris diabétique sous régime standard ; noir : souris *Trim21*^{+/+} ; rouge : souris *Trim21*^{-/-}

De par le rôle de TRIM21 dans l'inflammation et l'importance de ce mécanisme dans la carcinogenèse hépatique, nous nous sommes intéressés à l'environnement inflammatoire dans le foie chez les souris *Trim21*^{-/-}. Nous avons trouvé une surexpression du marqueur PD-1 sur les cellules lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ au niveau des rates et du foie. Il a été montré récemment dans un contexte NASH-CHC, une augmentation des cellules T CD8⁺PD-1⁺ et CD4⁺PD-1⁺ chez la souris et chez l'homme^{151,182,186,187}. Toutefois, cette expression semble exacerbée dans un environnement hépatique où TRIM21 n'est plus exprimé. Cette surexpression du récepteur est souvent accompagnée par une augmentation de son ligand²²⁴⁻²²⁶. En l'occurrence, l'expression du ligand PD-L1⁺ est également augmentée dans le foie et les tumeurs de ces souris *Trim21*^{-/-}. Plus spécifiquement, nous montrons une augmentation des macrophages CD68⁺PD-L1⁺. Or les macrophages exprimant cet immune checkpoint sont souvent associés aux TAMs. Ces derniers corrént avec un mauvais pronostic dans différents cancer^{219,227-229}. En effet, ces macrophages exprimant PD-L1, jouent un rôle important dans la modulation de l'immunité anti-tumorale²²⁹.

Par ailleurs, de façon originale, les tumeurs surnuméraires observées chez les souris *Trim21*^{-/-} sont des tumeurs négatives pour le marqueur glutamine synthétase (GS). Dans la littérature, il est montré que chez l'Homme, les tumeurs GS-négatives présentent plus d'infiltrats lymphocytaires (*Tumor infiltrating lymphocytes*, TIL), dont les lymphocytes T PD-1⁺ et répondraient donc mieux aux immunothérapies^{225,226,230}. Nous nous sommes alors intéressés aux infiltrats immunitaires au sein des tumeurs des souris *Trim21*^{-/-}. Ces dernières présentent un taux plus élevé de lymphocytes T, et plus spécifiquement nous observons une augmentation des CD4⁺ et CD4⁺PD-1⁺ dans les tumeurs GS-négatives des souris *Trim21*^{-/-}. Cependant, de façon assez inattendue, nous observons à l'inverse, une diminution des lymphocytes CD8⁺ dans les tumeurs GS-négatives chez les souris *Trim21*^{-/-} et aucune différence pour les CD8⁺PD-1⁺. Compte tenu de l'augmentation de la proportion des CD8⁺PD-1⁺ dans le foie total, nous nous attendions à retrouver également cette augmentation dans les tumeurs. Une étude récente sur un modèle murin de NASH-CHC, montre que les lymphocytes T CD8⁺ hépatiques sont métaboliquement reprogrammés, induisant une perte de leur motilité. Ainsi les lymphocytes ne sont plus capables d'infiltrer les tumeurs, même après un traitement anti-PD-1. Nous supposons que ce mécanisme aurait lieu chez nos souris NASH-CHC, et permettrait d'expliquer la baisse d'infiltrat CD8⁺ observé dans les tumeurs de souris *Trim21*^{-/-}. Néanmoins, la question se pose sur rôle des T CD4⁺ observés dans les tumeurs GS-négatives des souris *Trim21*^{-/-}.

Ainsi nous avons montré le rôle protecteur de TRIM21 dans la carcinogenèse hépatique dans un contexte NASH. Cette protection semble être dépendante de l'immunité et de l'expression plus faible des points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1. Récemment, des études démontrent l'interaction de l'E3 ubiquitine ligase avec le ligand PD-L1, et sa dégradation par le protéasome qui en découlerait. Nous supposons donc que dans notre modèle *in vivo*, les souris *Trim21*^{-/-} n'expriment plus l'E3 ubiquitine ligase, PD-L1 n'est plus dégradée, induisant ainsi une inactivation de la surveillance anti-tumorale. De plus, TRIM21 ayant été décrite comme un frein dans la réponse pro-inflammatoire, les souris *Trim21*^{-/-} sous régimes HFHCD pendant 4 semaines surexpriment les gènes inflammatoires tels que TNF α , IFN γ ou IL1 β (Figure 27). Or IFN γ peut également induire l'expression de PD-L1 au niveau des cellules tumorales²³¹.

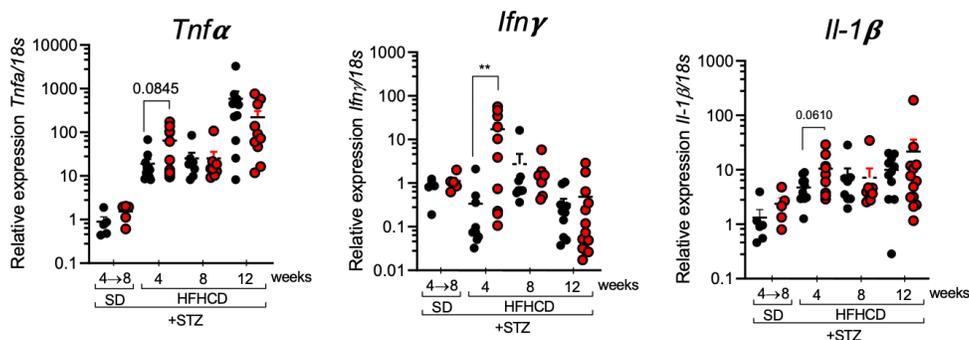


Figure 27: **Expression des ARNm de cytokines pro-inflammatoires.** Expression au niveau du foie *Tnf α* , *Ifn γ* et *IL-1 β* à 4 et 12 semaines sous régime HFHCD. SD : souris diabétique sous régime standard ; noir : souris *Trim21*^{+/+} ; rouge : souris *Trim21*^{-/-}

Nos résultats mettent en avant un mécanisme potentiel de TRIM21 dans la progression du CHC dans un contexte de NASH. Toutefois, différentes études décrivent TRIM21 comme favorisant la carcinogenèse hépatocellulaire^{106,232,233}. Certaines études sont faites sur des données humaines de séquençage à haut débit, or ces données sont rarement stratifiées et l'étiologie virale est majoritaire. Une étude présentée plus haut démontre qu'une infection virale chez la souris induit une augmentation d'expression de TRIM21⁴³. De plus, des études récentes démontrent l'interaction et le rôle de TRIM21 dans un contexte d'infection par le VHB^{234,235}. De par son rôle antiviral, il n'est donc pas surprenant que l'E3 ubiquitine ligase entre en jeu lors des hépatites virales et que sa surexpression soit retrouvée dans les CHC à étiologie virale. De surcroit, une analyse d'expression à haut débit des tumeurs de patients développant un CHC suite au VHC montre que ces derniers surexpriment TRIM21 (*Analyse faite par le laboratoire du Pr Jessica Zucman-Rossi*). Il est par ailleurs intéressant de noter que la plus part de ces études décrivent l'expression de TRIM21 au niveau de la tumeur et donc des cellules tumorales, or nos résultats semblent mettre en avant le rôle de TRIM21 au niveau des cellules immunitaires.

Une autre étude *in vivo* montre également que TRIM21 joue un rôle d'oncogène en inhibant la voie anti-oxydante¹⁰⁶. Le groupe de recherche qui a réalisé ces travaux utilise des souris *Trim21*^{-/-} dans un modèle chimique d'induction de CHC (par la DEN/ PB). Nous avons décrit plus haut comment les modèles chimiques non chroniques ne reproduisaient pas la physiopathologie humaine. De plus la DEN induit des dommages à l'ADN et une oxydation, un environnement hépatique favorisant probablement le rôle de TRIM21 dans la voie anti-oxydante^{106,192,236}. A l'inverse, une étude récente semble montrer que l'activation de la voie anti-oxydante favorise la carcinogenèse en déjouant la voie TRIM21/NRF2/p62²³⁷. Nous avons également analysé les gènes impliqués dans la régulation de cette voie dans notre modèle de souris diabétiques soumises au régime HFHCD, mais nous n'avons pas observé de modulation de l'expression des gènes anti-oxydants dans le foie entre nos deux génotypes. Au final, ces études divergentes soulignent d'un côté, le rôle controversé de NRF2 dans le CHC^{163,238}, mais également la dualité de TRIM21.

La meilleure compréhension de la pathogenèse du CHC dans un contexte de NASH a permis de mettre en avant le rôle important du type d'étiologie dans les mécanismes de carcinogenèse^{151,177,186,187,239}. De plus, le modèle expérimental semble jouer également sur le microenvironnement immunitaire. Par exemple, notre équipe a montré que deux régimes hyperlipidémiques différents peuvent induire une réponse immunitaire différente, et *in fine*, jouer sur l'immunité anti-tumorale et la progression du carcinome hépatocellulaire¹⁹⁵. De plus différents travaux semblent également souligner la modulation de certaines populations immunitaires selon la charge lipidique, et ainsi changer la fonction d'activateur ou inhibiteur de la réponse anti-tumorale de certaines cellules immunitaires^{240,241}.

Nos travaux mettent en avant un rôle intéressant de TRIM21 dans un contexte jamais décrit alors, cependant il est important de pouvoir confirmer ce mécanisme en 1) vérifiant sur des échantillons humains NASH-CHC l'expression de TRIM21 en corrélation avec l'expression de PD-1/PD-L1 par des marquages multiplexes ou *RNAscope* par exemple ; et 2) reproduire ces résultats sur un autre modèle murin de NASH-CHC. Ces résultats permettraient de confirmer un rôle avéré de TRIM21 dans la pathogenèse de la NASH-CHC.

Ensuite, nos résultats ouvrent la question de la modulation de l'expression des points de contrôle immunitaire par TRIM21. Dans un premier temps il serait intéressant de savoir si l'expression de PD-L1 est modulée directement, par l'ubiquitination puis la dégradation par le protéasome par exemple, ou indirectement, par la production de cytokines telles que IFN γ . Des travaux antérieurs de l'équipe semblent montrer l'augmentation de différents marqueurs immune checkpoints dans le model STAM+HFHCD. Il serait donc intéressant dans un second temps, d'évaluer le rôle de TRIM21 dans la modulation ou non de l'expression d'autres points de contrôle immunitaire tels que CTLA-4 ou TIM3 par exemple.

À première vue, nos résultats semblent indiquer que le phénomène observé de régulation de l'immunité anti-tumorale par TRIM21 dépend des cellules immunitaires et probablement pas des hépatocytes. Afin de confirmer ou non cette hypothèse, il serait intéressant d'utiliser des souris avec une invalidation conditionnelle du gène TRIM21 sur différents types de cellules, dans un premier temps uniquement sur les hépatocytes, puis éventuellement uniquement sur les cellules immunitaires. Si l'implication des populations immunitaires est validée, la question se pose de savoir quels sous-types entre en jeu spécifiquement. TRIM21 est exprimée majoritairement dans les LT, macrophages, et DCs. Ces différentes cellules immunitaires jouent chacune un rôle important dans la pathogenèse et le système de surveillance immunitaire antitumorale. Il est donc fort probable que la modulation de TRIM21 au sein de ces différentes cellules pourrait jouer sur la sévérité de la pathologie NASH-CHC.

Enfin, l'expression de TRIM21 semble être inversement corrélée avec l'expression de PD-1/PD-L1. Nous pourrions donc nous poser la question de savoir si l'expression de TRIM21 peut impacter les immunothérapies et donc prédire la réponse des patients qui répondraient ou non à ce type de traitements.

En résumé, nos travaux apportent de nouvelles données sur le rôle de TRIM21 dans la mort cellulaire et dans l'immunité. Une caractérisation plus approfondie des mécanismes sous-jacents permettrait d'évaluer le potentiel de TRIM21 en tant que biomarqueur dans le CHC.

BIBLIOGRAPHIE

1. Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM Superfamily Reveals a Novel Motif Necessary for Microtubule Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(13):8970-8980. doi:10.1074/jbc.M512755200
2. Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*. 1991;64(3):483-484. doi:10.1016/0092-8674(91)90229-r
3. Reddy BA, Etkin LD. A unique bipartite cysteine-histidine motif defines a subfamily of potential zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(22):6330-6330. doi:10.1093/nar/19.22.6330
4. Reddy BA, Etkin LD, Freemont PS. A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. *Trends Biochem Sci*. 1992;17(9):344-345. doi:10.1016/0968-0004(92)90308-V
5. Reymond A. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J*. 2001;20(9):2140-2151. doi:10.1093/emboj/20.9.2140
6. Hatakeyama S. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(4):297-311. doi:10.1016/j.tibs.2017.01.002
7. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(11):792-804. doi:10.1038/nrc3139
8. Joazeiro CAP, Weissman AM. RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 2000;102(5):549-552. doi:10.1016/S0092-8674(00)00077-5
9. Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of “single protein RING finger” E3 ubiquitin ligases. *BioEssays*. 2005;27(11):1147-1157. doi:10.1002/bies.20304
10. Hu MM, Yang Q, Xie XQ, et al. Sumoylation Promotes the Stability of the DNA Sensor cGAS and the Adaptor STING to Regulate the Kinetics of Response to DNA Virus. *Immunity*. 2016;45(3):555-569. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.014
11. Hu MM, Liao CY, Yang Q, Xie XQ, Shu HB. Innate immunity to RNA virus is regulated by temporal and reversible sumoylation of RIG-I and MDA5. *Journal of Experimental Medicine*. 2017;214(4):973-989. doi:10.1084/jem.20161015
12. Foss S, Bottermann M, Jonsson A, Sandlie I, James LC, Andersen JT. TRIM21—From Intracellular Immunity to Therapy. *Front Immunol*. 2019;10(AUG):1-14. doi:10.3389/fimmu.2019.02049
13. D’Cruz AA, Babon JJ, Norton RS, Nicola NA, Nicholson SE. Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity. *Protein Science*. 2013;22(1):1-10. doi:10.1002/pro.2185
14. Foss S, Watkinson R, Sandlie I, James LC, Andersen JT. TRIM21: a cytosolic Fc receptor with broad antibody isotype specificity. *Immunol Rev*. 2015;268(1):328-339. doi:10.1111/imr.12363
15. Choudhury NR, Heikel G, Trubitsyna M, et al. RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is required for ubiquitination. *BMC Biol*. 2017;15(1):1-20. doi:10.1186/s12915-017-0444-9

16. Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-Binding Proteins: Decoders of Ubiquitin-Mediated Cellular Functions. *Annu Rev Biochem.* 2012;81(1):291-322. doi:10.1146/annurev-biochem-051810-094654
17. Versteeg GA, Benke S, García-Sastre A, Rajsbaum R. InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(5):563-576. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.08.001
18. Komander D, Rape M. The Ubiquitin Code. *Annu Rev Biochem.* 2012;81(1):203-229. doi:10.1146/annurev-biochem-060310-170328
19. Dynek JN, Goncharov T, Dueber EC, et al. c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* 2010;29(24):4198-4209. doi:10.1038/emboj.2010.300
20. Meroni G. Genomics and Evolution of the TRIM Gene Family. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 770. Springer, New York, NY; 2012:1-9. doi:10.1007/978-1-4614-5398-7_1
21. Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, et al. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2011;108(20):8212-8217. doi:10.1073/pnas.1101544108
22. Lv D, Li Y, Zhang W, et al. TRIM24 is an oncogenic transcriptional co-activator of STAT3 in glioblastoma. *Nat Commun.* 2017;8(1):1454. doi:10.1038/s41467-017-01731-w
23. Sun G, Sui X, Han D, Gao J, Liu Y, Zhou L. TRIM59 promotes cell proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *Pharmazie.* 2017;72(11):674-679. doi:10.1691/ph.2017.7659
24. Zhao Z, Wang Y, Yun D, et al. TRIM21 overexpression promotes tumor progression by regulating cell proliferation, cell migration and cell senescence in human glioma. 2020;10(1):114-130.
25. Jauharoh SNA, Saegusa J, Sugimoto T, et al. SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):582-587. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.010
26. Zhang J, Fang L, Zhu X, et al. Ro52/SSA sensitizes cells to death receptor-induced apoptosis by down-regulating c-FLIP(L). *Cell Biol Int.* 2012;36(5):463-468. doi:10.1042/CBI20110322
27. Simoes Eugénio M, Faurez F, Kara-Ali GH, et al. TRIM21, a New Component of the TRAIL-Induced Endogenous Necrosome Complex. *Front Mol Biosci.* 2021;8:139. doi:10.3389/fmolb.2021.645134
28. Gao X, Xu F, Zhang HT, et al. PKC α -GSK3 β -NF- κ B signaling pathway and the possible involvement of TRIM21 in TRAIL-induced apoptosis. *Biochemistry and Cell Biology.* 2016;94(3):256-264. doi:10.1139/bcb-2016-0009
29. Gao W, Li Y, Liu X, et al. TRIM21 regulates pyroptotic cell death by promoting Gasdermin D oligomerization. *Cell Death Differ.* 2022;29(2):439-450. doi:10.1038/s41418-021-00867-z
30. Hou K, Shen J, Yan J, et al. Loss of TRIM21 alleviates cardiotoxicity by suppressing ferroptosis induced by the chemotherapeutic agent doxorubicin. *EBioMedicine.* 2021;69:103456. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103456

31. Versteeg GA, Rajsbaum R, Sánchez-Aparicio MT, et al. The E3-Ligase TRIM Family of Proteins Regulates Signaling Pathways Triggered by Innate Immune Pattern-Recognition Receptors. *Immunity*. 2013;38(2):384-398. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.013
32. Foss S, Bottermann M, Jonsson A, Sandlie I, James LC, Andersen JT. TRIM21—From Intracellular Immunity to Therapy. *Front Immunol*. 2019;10:2049. doi:10.3389/fimmu.2019.02049
33. Czerwińska P, Mazurek S, Wiznerowicz M. The complexity of TRIM28 contribution to cancer. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):63. doi:10.1186/s12929-017-0374-4
34. Mohammadi A, Pour Abbasi MS, Khorrami S, Khodamoradi S, Mohammadi Goldar Z, Ebrahimzadeh F. The TRIM proteins in cancer: from expression to emerging regulatory mechanisms. *Clinical and Translational Oncology*. 2022;24(3):460-470. doi:10.1007/s12094-021-02715-5
35. Ben-Chetrit E, Chan EK, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med*. 1988;167(5):1560-1571. doi:10.1084/jem.167.5.1560
36. Ben-Chetrit E, Fox RI, Tan EM. Dissociation of immune responses to the ss-a (ro) 52-kd and 60-kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1990;33(3):349-355. doi:10.1002/art.1780330307
37. Rhodes DA, Ihrke G, Reinicke AT, et al. The 52 000 MW Ro/SS-A autoantigen in Sjogren's syndrome/systemic lupus erythematosus (Ro52) is an interferon-gamma inducible tripartite motif protein associated with membrane proximal structures. *Immunology*. 2002;106(2):246-256. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01417.x
38. Bournazos S, Klein F, Pietzsch J, Seaman MS, Nussenzweig MC, Ravetch J V. Broadly Neutralizing Anti-HIV-1 Antibodies Require Fc Effector Functions for In Vivo Activity. *Cell*. 2014;158(6):1243-1253. doi:10.1016/j.cell.2014.08.023
39. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):34-47. doi:10.1038/nri2206
40. Dickinson BL, Badizadegan K, Wu Z, et al. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(7):903-911. doi:10.1172/JCI6968
41. Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(46):19985-19990. doi:10.1073/pnas.1014074107
42. James LC, Keeble AH, Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(15):6200-6205. doi:10.1073/pnas.0609174104
43. Vaysburd M, Watkinson RE, Cooper H, et al. Intracellular antibody receptor TRIM21 prevents fatal viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(30):12397-12401. doi:10.1073/pnas.1301918110
44. Bottermann M, Foss S, van Tienen LM, et al. TRIM21 mediates antibody inhibition of adenovirus-based gene delivery and vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(41):10440-10445. doi:10.1073/pnas.1806314115

45. McEwan WA, Hauler F, Williams CR, et al. Regulation of Virus Neutralization and the Persistent Fraction by TRIM21. *J Virol.* 2012;86(16):8482-8491. doi:10.1128/JVI.00728-12
46. Fletcher AJ, Mallery DL, Watkinson RE, Dickson CF, James LC. Sequential ubiquitination and deubiquitination enzymes synchronize the dual sensor and effector functions of TRIM21. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015;112(32):10014-10019. doi:10.1073/pnas.1507534112
47. Watkinson RE, McEwan WA, Tam JCH, Vaysburd M, James LC. TRIM21 Promotes cGAS and RIG-I Sensing of Viral Genomes during Infection by Antibody-Opsonized Virus. *PLoS Pathog.* 2015;11(10):e1005253. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1005253
48. Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B, Liu YJ. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nat Immunol.* 2013;14(2):172-178. doi:10.1038/NI.2492
49. Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(3):619-630. doi:10.1002/eji.200737916
50. Michalska A, Blaszczyk K, Wesoly J, Bluysen HAR. A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses. *Front Immunol.* 2018;9(MAY). doi:10.3389/fimmu.2018.01135
51. Sjöstrand M, Ambrosi A, Brauner S, et al. Expression of the Immune Regulator Tripartite-Motif 21 Is Controlled by IFN Regulatory Factors. *The Journal of Immunology.* 2013;191(7):3753-3763. doi:10.4049/jimmunol.1202341
52. Jones EL, Laidlaw SM. TRIM21/Ro52 - Roles in Innate Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.738473
53. Higgs R, Lazzari E, Wynne C, et al. Self Protection from Anti-Viral Responses – Ro52 Promotes Degradation of the Transcription Factor IRF7 Downstream of the Viral Toll-Like Receptors. *PLoS One.* 2010;5(7):e11776. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0011776
54. Manocha GD, Mishra R, Sharma N, Kumawat KL, Basu A, Singh SK. Regulatory role of TRIM21 in the type-I interferon pathway in Japanese encephalitis virus-infected human microglial cells. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1):24. doi:10.1186/1742-2094-11-24
55. Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Downregulation of active IKK β by Ro52-mediated autophagy. *Mol Immunol.* 2010;47(14):2378-2387. doi:10.1016/j.molimm.2010.05.004
56. Yoshimi R, Chang TH, Wang H, Atsumi T, Morse HC, Ozato K. Gene disruption study reveals a nonredundant role for TRIM21/Ro52 in NF-kappaB-dependent cytokine expression in fibroblasts. *J Immunol.* 2009;182(12):7527-7538. doi:10.4049/jimmunol.0804121
57. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, et al. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by dysregulating the IL-23-Th17 pathway. *J Exp Med.* 2009;206(8):1661-1671. doi:10.1084/jem.20090585
58. Vinter H, Langkilde A, Ottosson V, et al. TRIM21 is important in the early phase of inflammation in the imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation mouse model. *Exp Dermatol.* 2017;26(8):713-720. doi:10.1111/exd.13269
59. Higgs R, Gabhann JN, Larbi N Ben, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA. The E3 Ubiquitin Ligase Ro52 Negatively Regulates IFN- β Production Post-Pathogen Recognition by

- Polyubiquitin-Mediated Degradation of IRF3. *The Journal of Immunology*. 2008;181(3):1780-1786. doi:10.4049/JIMMUNOL.181.3.1780
60. Young JA, Sermwittayawong D, Kim HJ, et al. Fas-associated death domain (FADD) and the E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 interact to negatively regulate virus-induced interferon production. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(8):6521-6531. doi:10.1074/jbc.M110.172288
 61. Kunishita Y, Yoshimi R, Kamiyama R, et al. TRIM21 Dysfunction Enhances Aberrant B-Cell Differentiation in Autoimmune Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020;11(February):1-19. doi:10.3389/fimmu.2020.00098
 62. Lenart M, Rutkowska-Zapała M, Szatanek R, et al. Alterations of TRIM21-mRNA expression during monocyte maturation. *Immunobiology*. 2017;222(3):494-498. doi:10.1016/J.IMBIO.2016.10.016
 63. Legrand AJ, Konstantinou M, Goode EF, Meier P. The Diversification of Cell Death and Immunity: Memento Mori. *Mol Cell*. 2019;76(2):232-242. doi:10.1016/j.molcel.2019.09.006
 64. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-257. doi:10.1038/bjc.1972.33
 65. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/S41418-017-0012-4
 66. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):475-493. doi:10.1016/J.TCB.2018.02.003
 67. Giampazolias E, Zunino B, Dhayade S, et al. Mitochondrial permeabilization engages NF- κ B-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nat Cell Biol*. 2017;19(9):1116-1129. doi:10.1038/NCB3596
 68. Riley JS, Quarato G, Cloix C, et al. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J*. 2018;37(17). doi:10.15252/EMBJ.201899238
 69. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):46-55. doi:10.1038/CDD.2017.179
 70. White MJ, McArthur K, Metcalf D, et al. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell*. 2014;159(7):1549-1562. doi:10.1016/J.CELL.2014.11.036
 71. Rongvaux A, Jackson R, Harman CCD, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell*. 2014;159(7):1563-1577. doi:10.1016/J.CELL.2014.11.037
 72. Annibaldi A, Meier P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends Mol Med*. 2018;24(1):49-65. doi:10.1016/J.MOLMED.2017.11.002
 73. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):46-55. doi:10.1038/CDD.2017.179
 74. Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*. 2009;460(7258):1035-1039. doi:10.1038/NATURE08229

75. Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, Mann DL. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2692-2701. doi:10.1172/JCI29134
76. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *The Journal of Immunology.* 1988;141(8).
77. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, et al. Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *Journal of Experimental Medicine.* 1998;187(9):1477-1485. doi:10.1084/jem.187.9.1477
78. Chan FKM, Shisler J, Bixby JG, et al. A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(51):51613-51621. doi:10.1074/jbc.M305633200
79. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-119. doi:10.1038/nchembio711
80. Cho YS, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 2009;137(6):1112-1123. doi:10.1016/J.CELL.2009.05.037
81. Degtarev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology* 2005 1:2. 2005;1(2):112-119. doi:10.1038/nchembio711
82. Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase. *Cell.* 2012;148(1-2):213-227. doi:10.1016/J.CELL.2011.11.031
83. Weinlich R, Green DR. The Two Faces of Receptor Interacting Protein Kinase-1. *Mol Cell.* 2014;56(4):469-480. doi:10.1016/J.MOLCEL.2014.11.001
84. Petrie EJ, Czabotar PE, Murphy JM. The Structural Basis of Necroptotic Cell Death Signaling. *Trends Biochem Sci.* 2019;44(1):53-63. doi:10.1016/J.TIBS.2018.11.002
85. Newton K, Wickliffe KE, Maltzman A, et al. RIPK1 inhibits ZBP1-driven necroptosis during development. *Nature* 2016 540:7631. 2016;540(7631):129-133. doi:10.1038/nature20559
86. Lin J, Kumari S, Kim C, et al. RIPK1 counteracts ZBP1-mediated necroptosis to inhibit inflammation. *Nature* 2016 540:7631. 2016;540(7631):124-128. doi:10.1038/nature20558
87. Dillon CP, Weinlich R, Rodriguez DA, et al. RIPK1 Blocks Early Postnatal Lethality Mediated by Caspase-8 and RIPK3. *Cell.* 2014;157(5):1189-1202. doi:10.1016/J.CELL.2014.04.018
88. Kuriakose T, Kanneganti TD. ZBP1: Innate Sensor Regulating Cell Death and Inflammation. *Trends Immunol.* 2018;39(2):123-134. doi:10.1016/J.IT.2017.11.002
89. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature.* 1992;358(6382):167-169. doi:10.1038/358167A0
90. Boise LH, Collins CM. Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol.* 2001;9(2):64-67. doi:10.1016/S0966-842X(00)01937-5
91. Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014;514(7521):187-192. doi:10.1038/NATURE13683
92. Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature.* 2015;526(7575):660-665. doi:10.1038/NATURE15514

93. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*. 2015;526(7575):666-671. doi:10.1038/NATURE15541
94. Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*. 2017;547(7661):99-103. doi:10.1038/NATURE22393
95. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060-1072. doi:10.1016/J.CELL.2012.03.042
96. Pan JA, Sun Y, Jiang YP, et al. TRIM21 Ubiquitylates SQSTM1/p62 and Suppresses Protein Sequestration to Regulate Redox Homeostasis. *Mol Cell*. 2016;61(5):720-733. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.007
97. Alomari M. TRIM21 - A potential novel therapeutic target in cancer. *Pharmacol Res*. 2021;165:105443. doi:10.1016/j.phrs.2021.105443
98. Halmos B, Huettner CS, Kocher O, Ferenczi K, Karp DD, Tenen DG. Down-Regulation and Antiproliferative Role of C/EBP α in Lung Cancer. *Cancer Res*. 2002;62(2):528-534.
99. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBP α Differentiation Pathway in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(4):619-628. doi:10.1200/JCO.2008.17.9812
100. Nguyen JQ, Irby RB. TRIM21 is a novel regulator of Par-4 in colon and pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2017;18(1):16-25. doi:10.1080/15384047.2016.1252880
101. Zhang P, Li X, He Q, et al. TRIM21–SERPINB5 aids GMPS repression to protect nasopharyngeal carcinoma cells from radiation-induced apoptosis. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):30. doi:10.1186/s12929-020-0625-7
102. Guha A, Ahuja D, das Mandal S, et al. Integrated Regulation of HuR by Translation Repression and Protein Degradation Determines Pulsatile Expression of p53 Under DNA Damage. *iScience*. 2019;15:342-359. doi:10.1016/J.ISCI.2019.05.002
103. Guha A, Nag S, Ray PS. Negative feedback regulation by HuR controls TRIM21 expression and function in response to UV radiation. *Scientific Reports 2020 10:1*. 2020;10(1):1-14. doi:10.1038/s41598-020-68646-3
104. Zeng QZ, Liu WT, Lu JL, et al. YWHAZ Binds to TRIM21 but Is Not Involved in TRIM21-stimulated Osteosarcoma Cell Proliferation. *Biomed Environ Sci*. 2018;31(3):186-196. doi:10.3967/bes2018.024
105. Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev*. 2013;27(20):2179-2191. doi:10.1101/gad.225680.113
106. Wang F, Zhang Y, Shen J, et al. The Ubiquitin E3 Ligase TRIM21 Promotes Hepatocarcinogenesis by Suppressing the p62-Keap1-Nrf2 Antioxidant Pathway. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;11(5):1369-1385. doi:10.1016/j.jcmgh.2021.01.007
107. Tsai YS, Jou YC, Tsai HT, Shiau AL, Wu CL, Tzai TS. Prothymosin- α enhances phosphatase and tensin homolog expression and binds with tripartite motif-containing protein 21 to regulate Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling in human bladder cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(4):1208-1219. doi:10.1111/CAS.13963
108. Zhou W, Zhang Y, Zhong C, et al. Decreased expression of TRIM21 indicates unfavorable outcome and promotes cell growth in breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:3687-3696. doi:10.2147/CMAR.S175470

109. Itou J, Li W, Ito S, et al. Sal-like 4 protein levels in breast cancer cells are post-translationally down-regulated by tripartite motif– containing 21. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(17):6556-6564. doi:10.1074/JBC.RA117.000245/ATTACHMENT/12BF0496-886E-4D0D-8921-5CE5574564C5/MMC1.DOCX
110. Jin Y, Zhang Y, Li B, et al. TRIM21 mediates ubiquitination of Snail and modulates epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Int J Biol Macromol*. 2019;124:846-853. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.269
111. Jin Y, Zhao X, Zhang Q, et al. Cancer-associated mutation abolishes the impact of TRIM21 on the invasion of breast cancer cells. *Int J Biol Macromol*. 2020;142:782-789. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.019
112. Zhou G, Wu H, Lin J, Lin R, Feng B, Liu Z. TRIM21 Is Decreased in Colitis-associated Cancer and Negatively Regulates Epithelial Carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2021;27(4):458-468. doi:10.1093/ibd/izaa229
113. Brauner S, Zhou W, Backlin C, et al. Reduced expression of TRIM21/Ro52 predicts poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients with and without rheumatic disease. *J Intern Med*. 2015;278(3):323-332. doi:10.1111/JOIM.12375
114. Lin HP, Cheng ZL, He RY, et al. Destabilization of fatty acid synthase by acetylation inhibits de novo lipogenesis and tumor cell growth. *Cancer Res*. 2016;76(23):6924-6936. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1597
115. Gu L, Zhu Y, Lin X, Tan X, Lu B, Li Y. Stabilization of FASN by ACAT1-mediated GNPAT acetylation promotes lipid metabolism and hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2020;39(11):2437-2449. doi:10.1038/s41388-020-1156-0
116. Ding Q, He D, He K, et al. Downregulation of TRIM21 contributes to hepatocellular carcinoma carcinogenesis and indicates poor prognosis of cancers. *Tumor Biology*. 2015;36(11):8761-8772. doi:10.1007/s13277-015-3572-2
117. Gao L, Xia L, Ji W, Zhang Y, Xia W, Lu S. Knockdown of CDK5 down-regulates PD-L1 via the ubiquitination-proteasome pathway and improves antitumor immunity in lung adenocarcinoma. *Transl Oncol*. 2021;14(9):101148. doi:10.1016/j.tranon.2021.101148
118. Zhang H, Zhou F, Wang Y, et al. Eliminating Radiation Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer by Dihydroartemisinin Through Abrogating Immunity Escaping and Promoting Radiation Sensitivity by Inhibiting PD-L1 Expression. *Front Oncol*. 2020;10:595466. doi:10.3389/fonc.2020.595466
119. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
120. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):1-28. doi:10.1038/s41572-020-00240-3
121. Islami F, Ward EM, Sung H, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part 1: National Cancer Statistics. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(12):1648-1669. doi:10.1093/jnci/djab131
122. Giraud J, Chalopin D, Blanc JF, Saleh M. Hepatocellular Carcinoma Immune Landscape and the Potential of Immunotherapies. *Front Immunol*. 2021;12:655697. doi:10.3389/fimmu.2021.655697

123. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sørensen HT, Vilstrup H. Risk for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Alcoholic Cirrhosis. *Ann Intern Med.* 2012;156(12):841. doi:10.7326/0003-4819-156-12-201206190-00004
124. Lin CW, Lin CC, Mo LR, et al. Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;58(4):730-735. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.045
125. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64(1):73-84. doi:10.1002/hep.28431
126. Negro F. Natural history of NASH and HCC. *Liver International.* 2020;40(S1):72-76. doi:10.1111/liv.14362
127. Huby T, Gautier EL. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(7):429-443. doi:10.1038/s41577-021-00639-3
128. Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol.* 2018;19(3):222-232. doi:10.1038/s41590-018-0044-z
129. Kubes P, Jenne C, Snyder J. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol.* Published online 2018:44. doi:10.1146/annurev-immunol
130. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, et al. Liver Inflammation Abrogates Immunological Tolerance Induced by Kupffer Cells. *Hepatology.* 2015;62(1):279-291. doi:10.1002/HEP.27793/SUPPINFO
131. Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell.* 2017;169(7):1342-1356.e16. doi:10.1016/j.cell.2017.05.035
132. Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 2019;179(4):829-845.e20. doi:10.1016/j.cell.2019.10.003
133. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: wheeler@bcm.edu, Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 2017;169(7):1327-1341.e23. doi:10.1016/j.cell.2017.05.046
134. Haas JT, Vonghia L, Mogilenko DA, et al. Transcriptional network analysis implicates altered hepatic immune function in NASH development and resolution. *Nat Metab.* 2019;1(6):604-614. doi:10.1038/s42255-019-0076-1
135. Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(3):151-172. doi:10.1038/s41571-021-00573-2
136. Hou J, Zhang H, Sun B, Karin M. The immunobiology of hepatocellular carcinoma in humans and mice: Basic concepts and therapeutic implications. *J Hepatol.* 2020;72(1):167-182. doi:10.1016/j.jhep.2019.08.014
137. Han Y, Chen Z, Yang Y, et al. Human CD14+ CTLA-4+ regulatory dendritic cells suppress T-cell response by cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-dependent IL-10 and indoleamine-2,3-dioxygenase production in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2014;59(2):567-579. doi:10.1002/hep.26694

138. Calderaro J, Petitprez F, Becht E, et al. Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2019;70(1):58-65. doi:10.1016/j.jhep.2018.09.003
139. Bruno TC. B cells to the forefront of immunotherapy. *Nature*. 2020;577(7791):474-476. doi:10.1038/d41586-019-03943-0
140. Dong L qing, Peng L hua, Ma L jie, et al. Heterogeneous immunogenomic features and distinct escape mechanisms in multifocal hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2020;72(5):896-908. doi:10.1016/j.jhep.2019.12.014
141. Jhunjhunwala S, Hammer C, Delamarre L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(5):298-312. doi:10.1038/s41568-021-00339-z
142. Pallett LJ, Burton AR, Amin OE, et al. Longevity and replenishment of human liver-resident memory T cells and mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 2020;217(9). doi:10.1084/jem.20200050
143. Amsen D, van Gisbergen KPJM, Hombrink P, van Lier RAW. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat Immunol*. 2018;19(6):538-546. doi:10.1038/s41590-018-0114-2
144. Zecca A, Barili V, Canetti D, et al. Energy metabolism and cell motility defect in NK-cells from patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020;69(8):1589-1603. doi:10.1007/s00262-020-02561-4
145. Reig M, Forner A, Rimola J, et al. BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *J Hepatol*. 2022;76(3):681-693. doi:10.1016/j.jhep.2021.11.018
146. Llovet JM, Pinyol R, Kelley RK, et al. Molecular pathogenesis and systemic therapies for hepatocellular carcinoma. *Nat Cancer*. 2022;3(4):386-401. doi:10.1038/s43018-022-00357-2
147. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(4):378-390. doi:10.1056/NEJMoa0708857
148. Akce M, El-Rayes BF, Bekaii-Saab TS. Frontline therapy for advanced hepatocellular carcinoma: an update. *Therap Adv Gastroenterol*. 2022;15:175628482210861. doi:10.1177/17562848221086126
149. Zhang Y, Zhang X, Kuang M, Yu J. Emerging insights on immunotherapy in liver cancer. *Antioxid Redox Signal*. Published online June 25, 2022. doi:10.1089/ars.2022.0047
150. Chan LL, Chan SL. Novel Perspectives in Immune Checkpoint Inhibitors and the Management of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(6):1526. doi:10.3390/cancers14061526
151. Pfister D, Núñez NG, Pinyol R, et al. NASH limits anti-tumour surveillance in immunotherapy-treated HCC. *Nature*. 2021;592(7854):450-456. doi:10.1038/s41586-021-03362-0
152. Foerster F, Gairing SJ, Müller L, Galle PR. NAFLD-driven HCC: Safety and efficacy of current and emerging treatment options. *J Hepatol*. 2022;76(2):446-457. doi:10.1016/j.jhep.2021.09.007
153. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver

- disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1343-1351.
doi:10.1172/JCI200523621
154. Zhang X, Coker OO, Chu ES, et al. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. *Gut*. 2021;70(4):761-774.
doi:10.1136/gutjnl-2019-319664
 155. Liang JQ, Teoh N, Xu L, et al. Dietary cholesterol promotes steatohepatitis related hepatocellular carcinoma through dysregulated metabolism and calcium signaling. *Nat Commun*. 2018;9(1):4490. doi:10.1038/s41467-018-06931-6
 156. Magusto J, Majdi A, Gautheron J. Les mécanismes de mort cellulaire dans la stéatohépatite non alcoolique. *Biol Aujourd'hui*. 2020;214(1-2):1-13.
doi:10.1051/jbio/2020002
 157. Gautheron J, Gores GJ, Rodrigues CMP. Lytic cell death in metabolic liver disease. *J Hepatol*. 2020;73(2):394-408. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.001
 158. Tran S, Baba I, Poupel L, et al. Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity*. 2020;53(3):627-640.e5. doi:10.1016/j.immuni.2020.06.003
 159. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2003;125(2):437-443. doi:10.1016/S0016-5085(03)00907-7
 160. Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, et al. Deletion of NEMO/IKK γ in Liver Parenchymal Cells Causes Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*. 2007;11(2):119-132.
doi:10.1016/j.ccr.2006.12.016
 161. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2020;152:116-141.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025
 162. Arroyave-Ospina JC, Wu Z, Geng Y, Moshage H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants*. 2021;10(2):174. doi:10.3390/antiox10020174
 163. Shin SM, Yang JH, Ki SH. Role of the Nrf2-are pathway in liver diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/763257
 164. Campani C, Nault JC. Molecular mechanisms of liver carcinogenesis related to metabolic syndrome. *Hepatoma Res*. Published online 2022. doi:10.20517/2394-5079.2021.126
 165. Hoogerland JA, Staels B, Dombrowicz D. Immune–metabolic interactions in homeostasis and the progression to NASH. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Published online August 2022. doi:10.1016/j.tem.2022.07.001
 166. Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, et al. Metabolic Activation of Intrahepatic CD8 $^{+}$ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. *Cancer Cell*. 2014;26(4):549-564. doi:10.1016/J.CCELL.2014.09.003
 167. McVey JC, Green BL, Ruf B, et al. NAFLD indirectly impairs antigen-specific CD8 $^{+}$ T cell immunity against liver cancer in mice. *iScience*. 2022;25(2):103847.
doi:10.1016/j.isci.2022.103847
 168. Malehmir M, Pfister D, Gallage S, et al. Platelet GPIIb α is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nat Med*. 2019;25(4):641-655. doi:10.1038/s41591-019-0379-5

169. Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology*. 2014;59(5):2034-2042. doi:10.1002/hep.26754
170. Ho DWH, Tsui YM, Chan LK, et al. Single-cell RNA sequencing shows the immunosuppressive landscape and tumor heterogeneity of HBV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2021;12(1):3684. doi:10.1038/s41467-021-24010-1
171. Ambade A, Satishchandran A, Saha B, et al. Hepatocellular carcinoma is accelerated by NASH involving M2 macrophage polarization mediated by hif-1 α induced IL-10. *Oncoimmunology*. 2016;5(10):e1221557. doi:10.1080/2162402X.2016.1221557
172. Ramadori P, Kam S, Heikenwalder M. T cells: Friends and foes in NASH pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2022;75(4):1038-1049. doi:10.1002/hep.32336
173. Deczkowska A, David E, Ramadori P, et al. XCR1+ type 1 conventional dendritic cells drive liver pathology in non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Med*. 2021;27(6):1043-1054. doi:10.1038/s41591-021-01344-3
174. Ibrahim J, Nguyen AH, Rehman A, et al. Dendritic cell populations with different concentrations of lipid regulate tolerance and immunity in mouse and human liver. *Gastroenterology*. 2012;143(4):1061-1072. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.003
175. Dudek M, Tacke F. Immature neutrophils bring anti-PD-1 therapy in NASH-HCC to maturity. *Gut*. Published online April 27, 2022;1-2. doi:10.1136/gutjnl-2022-327396
176. Wang X, Yousefi S, Simon HU. Necroptosis and neutrophil-associated disorders. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):111. doi:10.1038/s41419-017-0058-8
177. Leslie J, Mackey JBG, Jamieson T, et al. CXCR2 inhibition enables NASH-HCC immunotherapy. *Gut*. 2022;(May). doi:10.1136/gutjnl-2021-326259
178. Ou R, Liu J, Lv M, et al. Neutrophil depletion improves diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Endocrine*. 2017;57(1):72-82. doi:10.1007/s12020-017-1323-4
179. Sutti S, Albano E. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(2):81-92. doi:10.1038/s41575-019-0210-2
180. Miyake T, Abe M, Tokumoto Y, et al. B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*. 2013;7(2):539-547. doi:10.1007/s12072-012-9345-8
181. Bruzzi S, Sutti S, Giudici G, et al. B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Free Radic Biol Med*. 2018;124:249-259. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.015
182. Shalapour S, Lin XJ, Bastian IN, et al. Inflammation-induced IgA+ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature*. 2017;551(7680):340-345. doi:10.1038/nature24302
183. Ramadori P, Kam S, Heikenwalder M. T cells: Friends and foes in NASH pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2022;75(4):1038-1049. doi:10.1002/hep.32336
184. Breuer DA, Pacheco MC, Washington MK, et al. CD8 T cells regulate liver injury in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastro-intest Liver Physiol*. 2019;318. doi:10.1152/ajpgi.00040.2019.-Nonalcoholic
185. Bhattacharjee J, Kirby M, Softic S, et al. Hepatic Natural Killer T-Cell and CD81 T-Cell Signatures in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2017;1:299-310. doi:10.1002/hep4.1041/suppinfo

186. Dudek M, Pfister D, Donakonda S, et al. Auto-aggressive CXCR6+ CD8 T cells cause liver immune pathology in NASH. *Nature*. 2021;592(7854):444-449. doi:10.1038/s41586-021-03233-8
187. Wabitsch S, McCallen JD, Kamenyeva O, et al. Metformin treatment rescues CD8+ T-cell response to immune checkpoint inhibitor therapy in mice with NAFLD. *J Hepatol*. 2022;77(3):748-760. doi:10.1016/j.jhep.2022.03.010
188. Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, et al. NAFLD causes selective CD4+ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature*. 2016;531(7593):253-257. doi:10.1038/nature16969
189. Gomes AL, Teijeiro A, Burén S, et al. Metabolic Inflammation-Associated IL-17A Causes Non-alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016;30(1):161-175. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.020
190. Dywicki J, Buitrago-Molina LE, Noyan F, et al. The Detrimental Role of Regulatory T Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2022;6(2):320-333. doi:10.1002/hep4.1807
191. Wang H, Zhang H, Wang Y, et al. Regulatory T-cell and neutrophil extracellular trap interaction contributes to carcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2021;75(6):1271-1283. doi:10.1016/j.jhep.2021.07.032
192. Friemel J, Frick L, Unger K, et al. Characterization of HCC Mouse Models: Towards an Etiology-Oriented Subtyping Approach. *Molecular Cancer Research*. 2019;17(7):1493-1502. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-1045
193. Dow M, Pyke RM, Tsui BY, et al. Integrative genomic analysis of mouse and human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(42):E9879-E9888. doi:10.1073/pnas.1811029115
194. Macek Jilkova Z, Kurma K, Decaens T. Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: The Role of Immune System and Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1487. doi:10.3390/cancers11101487
195. Simoes Eugénio M, Farooq M, Dion S, et al. Hepatocellular Carcinoma Emergence in Diabetic Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis Depends on Diet and Is Delayed in Liver Exhibiting an Active Immune Response. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1491. doi:10.3390/cancers12061491
196. MA F, S R, S S, et al. Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They? *Cell Metab*. 2019;29(1):18-26. doi:10.1016/j.cmet.2018.10.012
197. Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, et al. ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell*. 2014;26(3):331-343. doi:10.1016/j.ccr.2014.07.001
198. Schierwagen R, Maybüchen L, Zimmer S, et al. Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep*. 2015;5(1):12931. doi:10.1038/srep12931
199. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, et al. Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. Sookoian SC, ed. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127991. doi:10.1371/journal.pone.0127991
200. Dowman JK, Hopkins LJ, Reynolds GM, et al. Development of hepatocellular carcinoma in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis induced by use of a high-fat/fructose diet

- and sedentary lifestyle. *Am J Pathol*. 2014;184(5):1550-1561.
doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.034
201. Fujii M, Shibasaki Y, Wakamatsu K, et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2013;46(3):141-152. doi:10.1007/s00795-013-0016-1
 202. Chen J, Qian Z, Li F, Li J, Lu Y. Integrative Analysis of Microarray Data to Reveal Regulation Patterns in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Gut Liver*. 2017;11(1):112-120. doi:10.5009/gnl16063
 203. Park EJ, Lee JH, Yu GY, et al. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell*. 2010;140(2):197-208. doi:10.1016/j.cell.2009.12.052
 204. Takahashi Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(19):2300. doi:10.3748/wjg.v18.i19.2300
 205. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol*. 2016;65(3):579-588. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.005
 206. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):6. doi:10.1038/s41572-020-00240-3
 207. Green CD, Weigel C, Brown RDR, et al. A new preclinical model of western diet-induced progression of non-alcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma. *The FASEB Journal*. 2022;36(7). doi:10.1096/fj.202200346R
 208. Ally A, Balasundaram M, Carlsen R, et al. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017;169(7):1327-1341.e23. doi:10.1016/j.cell.2017.05.046
 209. de Conti A, Ortega JF, Tryndyak V, et al. MicroRNA deregulation in nonalcoholic steatohepatitis-associated liver carcinogenesis. *Oncotarget*. 2017;8(51):88517-88528. doi:10.18632/oncotarget.19774
 210. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*. 2009;50(4):1072-1078. doi:10.1002/HEP.23050
 211. TOMIZAWA M, KAWANABE Y, SHINOZAKI F, et al. Triglyceride is strongly associated with nonalcoholic fatty liver disease among markers of hyperlipidemia and diabetes. *Biomed Rep*. 2014;2(5):633-636. doi:10.3892/BR.2014.309
 212. Sattar N, Forrest E, Preiss D. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ*. 2014;349. doi:10.1136/BMJ.G4596
 213. Adams LA, Ratziu V. Non-alcoholic fatty liver - perhaps not so benign. *J Hepatol*. 2015;62(5):1002-1004. doi:10.1016/J.JHEP.2015.02.005
 214. Sanyal A, Poklepovic A, Moyneur E, Barghout V. Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. *Curr Med Res Opin*. 2010;26(9):2183-2191. doi:10.1185/03007995.2010.506375
 215. DAY C, SAKSENA S. Non-alcoholic steatohepatitis: Definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17:S377-S384. doi:10.1046/j.1440-1746.17.s3.31.x

216. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
217. Dara L, Liu ZX, Kaplowitz N. Questions and controversies: the role of necroptosis in liver disease. *Cell Death Discov*. 2016;2(June):16089. doi:10.1038/cddiscovery.2016.89
218. Gautheron J, Vucur M, Reisinger F, et al. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO Mol Med*. 2014;6(8):1062-1074. doi:10.15252/emmm.201403856
219. Wu L, Zhang X, Zheng L, et al. RIPK3 orchestrates fatty acid metabolism in tumor-associated macrophages and hepatocarcinogenesis. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(5):710-721. doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0261
220. Mohammed S, Thadathil N, Tran AL, et al. Blocking necroptosis reduces inflammation and tumor incidence in a mouse model of diet-induced hepatocellular carcinoma. *Oklahoma Medical Research Foundation*. doi:10.1101/2022.08.03.502666
221. von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(6):352-366. doi:10.1038/nrc.2017.28
222. de Almagro MC, Goncharov T, Izrael-Tomasevic A, et al. Coordinated ubiquitination and phosphorylation of RIP1 regulates necroptotic cell death. *Cell Death Differ*. 2017;24(1):26-37. doi:10.1038/cdd.2016.78
223. Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The Many Forks in FOXO's Road. *Science's STKE*. 2003;2003(172). doi:10.1126/stke.2003.172.re5
224. Mo Z, Liu J, Zhang Q, et al. Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 is associated with differentiation status and histological type of endometrial cancer. *Oncol Lett*. 2016;12(2):944-950. doi:10.3892/ol.2016.4744
225. Kitano A, Ono M, Yoshida M, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open*. 2017;2(2):e000150. doi:10.1136/esmoopen-2016-000150
226. Jiang C, Cao S, Li N, Jiang L, Sun T. PD-1 and PD-L1 correlated gene expression profiles and their association with clinical outcomes of breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2019;19(1):233. doi:10.1186/s12935-019-0955-2
227. Arvanitakis K, Koletsis T, Mitroulis I, Germanidis G. Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis, Prognosis and Therapy. *Cancers (Basel)*. 2022;14(1):226. doi:10.3390/cancers14010226
228. Ho DW, Tsui YMM, Chan LKK, et al. Single-cell RNA sequencing shows the immunosuppressive landscape and tumor heterogeneity of HBV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-14. doi:10.1038/s41467-021-24010-1
229. McVey JC, Green BL, Ruf B, et al. NAFLD indirectly impairs antigen-specific CD8+ T cell immunity against liver cancer in mice. *iScience*. 2022;25(2):103847. doi:10.1016/j.isci.2022.103847
230. Calderaro J, Ziol M, Paradis V, Zucman-Rossi J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *J Hepatol*. 2019;71(3):616-630. doi:10.1016/j.jhep.2019.06.001

231. Wei Y, Zhao Q, Gao Z, et al. The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2019;129(8):3347-3360. doi:10.1172/JCI127726
232. Dai W, Wang J, Wang Z, et al. Comprehensive Analysis of the Prognostic Values of the TRIM Family in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol*. 2021;11(December):1-20. doi:10.3389/fonc.2021.767644
233. Qi Z, Yan F, Chen D, et al. Identification of prognostic biomarkers and correlations with immune infiltrates among cGAS-STING in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep*. 2020;40(10):1-17. doi:10.1042/BSR20202603
234. Mu T, Zhao X, Zhu Y, Fan H, Tang H. The E3 Ubiquitin Ligase TRIM21 Promotes HBV DNA Polymerase Degradation. *Viruses*. 2020;12(3). doi:10.3390/V12030346
235. Song Y, Li M, Wang Y, Zhang H, Wei L, Xu W. E3 ubiquitin ligase TRIM21 restricts hepatitis B virus replication by targeting HBx for proteasomal degradation. *Antiviral Res*. 2021;192. doi:10.1016/J.ANTIVIRAL.2021.105107
236. Aleksic K, Lackner C, Geigl JB, et al. Evolution of genomic instability in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*. 2011;53(3):895-904. doi:10.1002/HEP.24133
237. Feng X, Jiang T, Yang C, et al. RPRD1A stabilizes NRF2 and aggravates HCC progression through competing with p62 for TRIM21 binding. *Cell Death Dis*. 2021;13(1). doi:10.1038/S41419-021-04447-4
238. Menegon S, Columbano A, Giordano S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol Med*. 2016;22(7):578-593. doi:10.1016/j.molmed.2016.05.002
239. Haas JT, Vonghia L, Mogilenko DA, et al. Transcriptional network analysis implicates altered hepatic immune function in NASH development and resolution. *Nat Metab*. 2019;1(6):604-614. doi:10.1038/s42255-019-0076-1
240. Ibrahim J, Nguyen AH, Rehman A, et al. Dendritic cell populations with different concentrations of lipid regulate tolerance and immunity in mouse and human liver. *Gastroenterology*. 2012;143(4):1061-1072. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.003
241. Singanayagam A, Triantafyllou E. Macrophages in Chronic Liver Failure: Diversity, Plasticity and Therapeutic Targeting. *Front Immunol*. 2021;12:1086. doi:10.3389/fimmu.2021.661182

ANNEXE

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Poster- International Liver Congress - EASL, **Londres** (*Abstract in 2022 Hepatology 77,S389-S664*)

G. H. Kara-Ali, G. Imerzoukene, M. Simoes Eugénio, L. Cano, A. Hamon, H. Hameed, C. Piquet-Pellorce, S. Dion, C. Raguenes-Nicol, J. Zucman-Rossi, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel

Lack of the E3-ubiquitin ligase TRIM21 promotes a higher emergence of hepatocellular carcinoma nodules in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis. (22 – 26 juin 2022)

Poster – 25^e journée jeune et chercheur - ARC, **Paris**

G. H. Kara-Ali, G. Imerzoukene, M. Simoes Eugénio, L. Cano, A. Hamon, H. Hameed, C. Piquet-Pellorce, S. Dion, C. Raguenes-Nicol, J. Zucman-Rossi, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel

The E3-Ubiquitin ligase TRIM21 limits HCC development in hypoinsulinemic mice with NASH (18 -19 Nov 2021)

Oral - 7^e journée SCAN (signalization and cancer), **Rennes**

G. H. Kara-Ali, G. Imerzoukene, M. Simoes Eugénio, L. Cano, A. Hamon, H. Hameed, C. Piquet-Pellorce, S. Dion, C. Raguenes-Nicol, J. Zucman-Rossi, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel

The E3-Ubiquitin ligase TRIM21 limits hepatocellular carcinoma development in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis (5 Nov 2021)

Poster - Liver Meeting - AASLD, **Anaheim, USA**. (*Abstract in 2021 Hepatology 74,714A-714A*)

G. H. Kara-Ali, G. Imerzoukene, M. Simoes Eugénio, L. Cano, A. Hamon, H. Hameed, C. Piquet-Pellorce, S. Dion, C. Raguenes-Nicol, J. Zucman-Rossi, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel

The E3-Ubiquitin ligase TRIM21 acts as a brake on hepatocellular carcinoma development in hypoinsulinemic mice with non-alcoholic steatohepatitis (12 - 15 Nov 2021)

Oral - 89^e journée de l'AFEF, **Biarritz – Obtention d'une bourse de voyage**

G. H. Kara-Ali, G. Imerzoukene, M. Simoes Eugénio, L. Cano, A. Hamon, H. Hameed, C. Piquet-Pellorce, S. Dion, C. Raguenes-Nicol, J. Zucman-Rossi, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel.

L'E3 ubiquitine ligase TRIM21 freine la progression du carcinome hépatocellulaire dans un modèle murin diabétique de stéatohépatite non alcoolique, (29 sep - 2 oct 2021)

Oral – 8^e journée du Printemps de la recherche à l'Irset , **Rennes – Prix pour la meilleur présentation**

G. H. Kara-Ali, G. Imerzoukene, M. Simoes Eugénio, L. Cano, A. Hamon, H. Hameed, C. Piquet-Pellorce, S. Dion, C. Raguenes-Nicol, J. Zucman-Rossi, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel.

The E3-Ubiquitin ligase TRIM21 acts as a brake on hepatocellular carcinoma development in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis (11 mai 2021)

Oral - Journée jeune chercheur - UBL, **Nantes**

G. H. Kara-Ali, M. Simoes Eugénio, A. Hamon, C. Devisme, C. Piquet-pellorce, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel.

TRIM21 deficiency increases hepatocellular carcinoma progression in diabetic mice under non-alcoholic steatohepatitis condition (10 - 12 Dec 2020).

Oral – 14^e journée jeunes chercheurs - Canceropole Grand Ouest, **Angers**.

G. H. Kara-Ali, M. Simoes Eugénio, A. Hamon, C. Devisme, C. Piquet-pellorce, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel.

L'absence d'expression de TRIM21 favorise l'émergence du carcinome hépatocellulaire chez des souris diabétiques en conditions de stéatohépatite non alcoolique (Oct 2020).

Poster - Journée jeunes chercheur - Ligue Contre le Cancer, **Paris**.

G. H. Kara-Ali, M. Simoes Eugénio, A. Hamon, C. Devisme, C. Piquet-pellorce, M. Samson, J. Le Seyec, MT. Dimanche-Boitrel.

TRIM21 deficiency increases hepatocellular carcinoma progression in diabetic mice under non-alcoholic steatohepatitis condition (Oct 2020).



Receptor-interacting protein kinase-1 ablation in liver parenchymal cells promotes liver fibrosis in murine NASH without affecting other symptoms

Muhammad Farooq^{1,2} · Mélanie Simoes Eugénio¹ · Claire Piquet-Pellorce¹ · Sarah Dion¹ · Céline Raguenes-Nicol¹ · Kathleen Santamaria¹ · Ghania Hounana Kara-Ali¹ · Thibaut Larcher³ · Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel¹ · Michel Samson¹ · Jacques Le Seyec¹

Received: 8 April 2021 / Revised: 8 March 2022 / Accepted: 22 March 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), a chronic liver disease that emerged in industrialized countries, can further progress into liver fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. In the next decade, NASH is predicted to become the leading cause of liver transplantation, the only current interventional therapeutic option. Hepatocyte death, triggered by different death ligands, plays key role in its progression. Previously, we showed that the receptor-interacting protein kinase-1 (RIPK1) in hepatocytes exhibits a protective role in ligand-induced death. Now, to decipher the role of RIPK1 in NASH, *Ripk1*^{LPC-KO} mice, deficient for RIPK1 only in liver parenchymal cells, and their wild-type littermates (*Ripk1*^{fl/fl}) were fed for 3, 5, or 12 weeks with high-fat high-cholesterol diet (HFHCD). The main clinical signs of NASH were analyzed to compare the pathophysiological state established in mice. Most of the symptoms evolved similarly whatever the genotype, whether it was the increase in liver to body weight ratio, the steatosis grade or the worsening of liver damage revealed by serum transaminase levels. In parallel, inflammation markers followed the same kinetics with significant equivalent inductions of cytokines (hepatic mRNA levels and blood cytokine concentrations) and a main peak of hepatic infiltration of immune cells at 3 weeks of HFHCD. Despite this identical inflammatory response, more hepatic fibrosis was significantly evidenced at week 12 in *Ripk1*^{LPC-KO} mice. This coincided with over-induced rates of transcripts of genes implied in fibrosis development (*Tgfb1*, *Tgfb1*, *Timp1*, and *Timp2*) in *Ripk1*^{LPC-KO} animals. In conclusion, our results show that RIPK1 in hepatocyte limits the progression of liver fibrosis during NASH.

Keywords NASH · RIPK1 · Fibrosis · Hepatocyte

Key messages

- NASH is becoming the leading cause of liver transplantation.
- Cell death plays a pivotal role in NASH progression.
- RIPK1 is a key cell survival or death hub.
- RIPK1 in liver parenchymal cells limits fibrosis establishment in murine NASH.

Muhammad Farooq and Mélanie Simoes Eugénio contributed equally as co-first authors, while Michel Samson and Jacques Le Seyec contributed equally as co-last authors.

✉ Michel Samson
michel.samson@univ-rennes1.fr

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

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, non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) would nearly affect a quarter of the world's population, with some geographical disparity [1, 2]. These diseases cover a spectrum of hepatic disorders ranging from benign steatosis to inflammatory status, defined as

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

³ INRAE, Oniris, UMR0703, APEX, Nantes, France

CURRICULUM VITAE

Ghania H. Kara-Ali

INSERM UMR_S 1085 Irset

PROFESSIONAL EXPERIENCE

- Oct 2022- ... Postdoctoral researcher, Institut Pasteur de Lille (INSERM U1011)**
Team “Inter-organ cross-talk in cardiometabolic diseases”
Project: Adipose-liver axis in the development of non-alcoholic fatty liver disease
Supervisors: Dr. Joel Haas & Dr. Delphine Eberlé
- 2018 - 2022 PhD fellowship on immuno-oncology, Irset (INSERM U1085), 4 years**
Team “Infection, Immunity and Environmental Factors in Liver”
Project: Role of TRIM21 in necroptosis and hepatocellular carcinoma progression
Directors: Dr. Marie-Thérèse Dimanche Boitrel & Dr. Jacques Le Seyec
Fundings : **MESRI** (3,5 years); **ARC** (6 months)
- 2018 Masters Internship, Research Center for Respiratory Diseases (Inserm U1100), 6 months**
Team “Proteolytic Mechanisms in Inflammation”
Project: Anti-inflammatory proprieties of natural polyphenols: study on lung fibroblasts
Supervisors: Pr. Gilles Lalmanach & Dr. Ahlame Saidi
- 2017 Masters Internship, Research Center for Respiratory Diseases (Inserm U1100), 2 months**
Team “Proteolytic Mechanisms in Inflammation”
Project: Cystein cathepsin regulation by Quercetin
Supervisors: Pr. Gilles Lalmanach & Dr. Ahlame Saidi

DIPLOMAS

- 2018-2022** PhD at University of Rennes 1
Rennes, France
- 2019** Animal experimentation, Conceptor Level, “rodent and rabbit”
Oniris, Nantes, France
- 2016 - 2018** Research Master, Health Biology, Physiopathology, with honors (4th /14)
University of Tours, Tours, France
- 2013 - 2016** Bachelor of Biology, with honors
University of Tours, Tours, France

SKILLS

Molecular Biology

- DNA, RNA extraction, PCR, RT-qPCR
- Protein extraction, Immunoblotting, Immunoprecipitation
- ELISA ; Legendplex
- Sircol ; Triglyceride assay
- Enzyme activity

Cellular Biology

- Cell culture (primary and cell lines)
- Live cell imaging (IncuCyte)
- Cell death experiments
- Cell transfection (expression vectors; siRNA; AMAXA 4D)
- Flow Cytometry (*basics*)

Histology & Image analysis

- Immunohistochemistry on primary cells & liver tissue
- Paraffin and frozen sectioning
- Liver tissue coloration (Oil Red O; Reticulin, IHC; IF; multiplex IF, etc.)
- Histology analysis (ImageJ; HALO; Qupath; Cytomap)

Animal experimentation

- Mouse colony management
- Organs harvesting and dissection
- Subcutaneous injection

- Blood withdrawal: retro-orbital; submandibular

Teaching:

- Supervision of lab interns (5 students)
- Assistant professor at University of Rennes 1 (24h)

Project Management:

- Writing of reports, scientific manuscripts, scientific papers, grants applications

Scientific Dissemination

- Scientific day organization (2)
- Declic' Ambassador for high schools (3)

Informatics skills

- Inkscape
- Graphpad
- PackOffice
- R (*basics*)
- Python (*basics*)
- MAC Os & Windows

Language:

- French *Bilingual*
- English *Fluent*
- Arab *Mother tongue*
- Chinese, Spanish *notions*

COMMUNICATIONS

Oral presentation:

- 2021 7th day of SCAN (Signalisation and Cancer) Rennes, **France**
- 2021 89th day of the AFEF, AFEF, Biarritz, **France** – **TRAVEL GRANT received**
- 2021 Young Researcher day, Spring Research at Irset, Rennes, **France** – **AWARD received**
- 2020 Young Researcher day, Université Bretagne et Loir, Nantes, **France**
- 2020 Young Researcher day, Canceropôle Grand Ouest, Angers, **France**

Poster presentation :

- 2022 The International Liver Congress, EASL, London, **UK**
- 2021 Young Researcher's Day, ARC, **Paris, France**
- 2021 The Liver Meeting, AASLD, Anaheim, **USA**
- 2020 Young Researcher day, Ligue contre le cancer, Paris, **France**

SCIENTIFIC PUBLICATIONS

G. H. Kara-Ali, L. Cano, S. Dion, G. Imezoukene, A. Hamon, M. Simoes Eugénio, C. Piquet-Pellorce, G. Ghukasyan, M. Samson, J. Le Seyec* and M.T. Dimanche-Boitrel*. Lack of the E3 ubiquitin ligase Trim21 in mice increases hepatocellular carcinogenesis in a non-alcoholic steatohepatitis context and is associated with immune checkpoint upregulation. **Sub.**

M. Farooq*, M. Simoes Eugénio*, C. Piquet-Pellorce, S. Dion, C. Raguene-Nicol, K. Santamaria, **G. H. Kara-Ali**, T. Larcher, M.T. Dimanche-Boitrel, M. Samson and J. Le Seyec. Receptor-interacting protein kinase-1 ablation in liver parenchymal cells promotes liver fibrosis in murine NASH without affecting other symptoms. **Journal of Molecular Medicine**, Springer Verlag, (2022).

M. Simoes Eugénio*, F. Faurez*, **Ghania H. Kara-Ali**, M. Lagarrigue, M. C. Bonnet, S. Jouan-Lanhouet, I. Gallais, E. Com, C. Pineau, J. Le Seyec and M.T. Dimanche-Boitrel. TRIM21 is a new component of the TRAIL-induced endogenous necrosome complex and a positive modulator of necroptosis, **Front. Mol. Biosci.**(2021) 8:645134. doi: 10.3389/fmolb.2021.645134

A. Saidi, M. Kasabova, L.Vanderlynden, M.Wartenberg, **Ghania H. Kara-Ali**, D. Marc, F. Lecaille and G. Lalmanach. Curcumin inhibits TGF- β 1-dependent lung fibroblast differentiation via PPAR γ -driven upregulation of cysteine cathepsins B and L. **Sci Rep** 9, 491 (2019). doi.org/10.1038/s41598-018-36858-3

AFFILIATION & MEMBERSHIP

- Femmes&Sciences (women in science association)
- PhD candidate's Representative at Irset's board meeting (2019-2021)
- Young researcher in hepatology (affiliated with AFEF)
- Doctoral and post-doctoral association at Irset (DOC'7) (2018-2019)

Titre : Rôle de l'E3-ubiquitine ligase TRIM21 dans la nécroptose induite par TRAIL et dans la progression du carcinome hépatocellulaire

Mots clés : TRIM21, NASH, CHC, PD-1, PD-L1

Résumé : L'E3-ubiquitine ligase TRIM21 est une protéine impliquée dans différents processus biologiques tels que l'inflammation, le cycle cellulaire, la mort cellulaire ou encore l'immunité. Or ces différentes voies sont souvent dérégulées dans le cancer. La communauté scientifique s'est alors intéressée de plus près au rôle de TRIM21 dans certains cancers et montre qu'une faible expression de TRIM21 corrèle avec un mauvais pronostic de survie, notamment dans le carcinome hépatocellulaire. Ce dernier est aujourd'hui la 3^e cause de mortalité à la suite d'un cancer et son incidence ne cesse de progresser. Différents facteurs contribuent à la pathogenèse, notamment la stéatohépatite non alcoolique, un facteur majeur aujourd'hui de progression vers le cancer du foie, souvent lié à une obésité et une hypoinsulinémie. Ces syndromes métaboliques peuvent mener à l'accumulation de lipides dans le foie, une lipotoxicité et la mort des hépatocytes. Parmi les morts cellulaires, on peut citer la nécroptose, dépendant du recrutement des acteurs moléculaires principaux : RIPK1 ; RIPK3 et MLKL. Des études montrent que cette nécrose programmée dans le carcinome hépatocellulaire dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique induit une inflammation qui exacerbe les lésions hépatiques et favorise la progression vers un hépatocarcinome.

Lors de ces travaux de thèse, nous avons découvert pour la première fois le recrutement de la protéine TRIM21 au sein du nécrosome suite à un traitement par le ligand de mort TRAIL.

Ainsi, sur différents modèles cellulaires et en modulant l'expression de l'E3 ubiquitine ligase, nous avons démontré le rôle de modulateur positif de cette protéine dans la nécroptose induite par TRAIL.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle de TRIM21 dans la progression du carcinome hépatocellulaire dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique. Pour ce faire, nous avons induit une hypoinsulinémie chez des souris mâles exprimant ou non la protéine TRIM21. Puis au sevrage, ils ont été soumis à un régime hyperlipidique et riche en cholestérol pendant 4, 8 ou 12 semaines. Les données montrent que les souris n'exprimant pas TRIM21 développent des lésions hépatiques plus sévères, conduisant au développement d'un plus grand nombre de nodules cancéreux. Cette progression tumorale semble être liée à une diminution de l'immunité anti-tumorale. En effet, ces souris surexpriment les points de contrôle immunitaire PD-1/PD-L1, notamment dans le foie, ce qui favoriserait donc la progression du carcinome hépatocellulaire.

En résumé, nous avons démontré d'une part, le rôle de modulateur positif de TRIM21 au cours de la nécroptose induite par TRAIL. D'autre part, nous avons montré le rôle de TRIM21 dans le maintien d'un microenvironnement avec une immunité anti-tumorale active dans le carcinome hépatocellulaire se développant dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique.

Title : Role of the E3-ubiquitin ligase TRIM21 in TRAIL-induced necroptosis and in hepatocellular carcinoma progression

Keywords : TRIM21, NASH, HCC, PD-1, PD-L1

Abstract : The E3 ubiquitin ligase TRIM21 is implicated in a wide range of biological processes such as inflammation, cell cycle, cell death or immunity. These pathways are often found dysregulated in cancer, thus it prompted the interest of cancer research community. Studies have shown a low expression of TRIM21 in different cancers, including hepatocellular carcinoma. Today, liver cancer is the 3rd cause of death by cancer, and different factors contribute to the pathology. Non-alcoholic steatohepatitis, the main factor of liver cancer progression nowadays, is mainly induced by obesity and hypoinsulinemia. These metabolic dysregulations favor lipid accumulation in hepatocytes, lipotoxicity and thus cell death. Among the cell death pathway, necroptosis is dependent on RIPK1, RIPK3 and MLKL recruitment into the necrosome. Some researches show the involvement of this pathway in non-alcoholic steatohepatitis-induced hepatocellular carcinoma by exacerbating liver inflammation.

During this thesis, we described for the 1st time the recruitment of the E3 ubiquitin ligase TRIM21 in the necrosome during TRAIL-induced necroptosis. Using different cell lines and by modulating TRIM21 expression, we showed the positive modulator role of TRIM21 in this death pathway.

Following these results, we investigated the role of TRIM21 in nonalcoholic steatohepatitis leading to hepatocellular carcinoma using a mouse model. We used diabetic male mice expressing or no TRIM21, and fed them a high-fat high-cholesterol diet for 4, 8 or 12 weeks. Our data show that TRIM21-knockout mice developed more liver lesions and showed higher tumor emergence. This tumor progression seems to be due to the decrease of the antitumor immunity. The TRIM21- knockout mice showed an upregulation expression of immune checkpoints PD-1 and PD-L1 in the liver, thus promoting hepatocellular carcinoma progression.

To sum up, we showed in one hand, the positive modulator role of TRIM21 in TRAIL-induced necroptosis, and on the other hand, we showed how TRIM21 sustains a microenvironment with active anti-tumor immunity to slowdown liver cancer progression developed in a nonalcoholic steatohepatitis context.