



HAL
open science

Les mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par la β -caténine dans le Carcinome Hépatocellulaire humain

Thomas Guerbette

► To cite this version:

Thomas Guerbette. Les mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par la β -caténine dans le Carcinome Hépatocellulaire humain. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02640808

HAL Id: dumas-02640808

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02640808v1>

Submitted on 28 May 2020

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.

Année universitaire : 2018-2019

Spécialité :

Ingénieur Agronome

Spécialisation (et option éventuelle) :

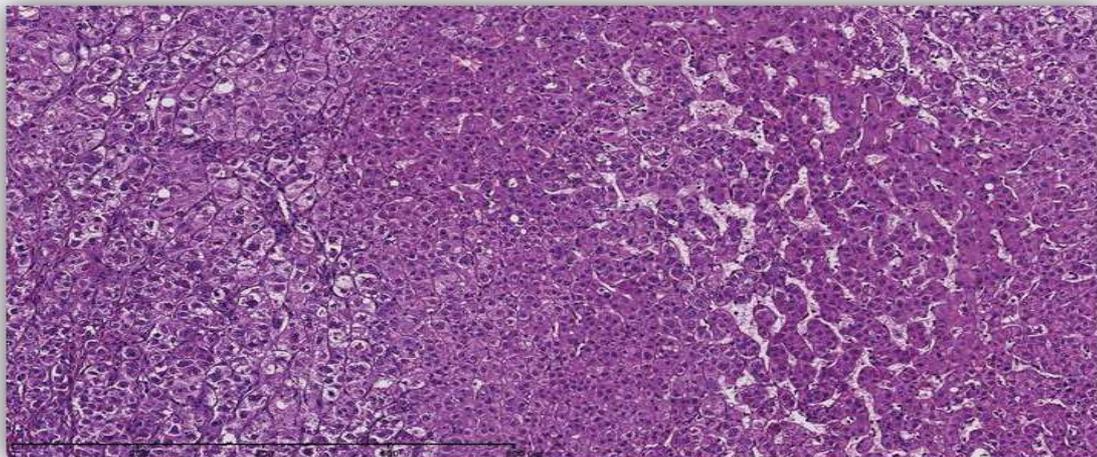
Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC)

Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Les mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par la β -caténine dans le Carcinome Hépatocellulaire humain

Par : Thomas GUERBETTE



Soutenu à Rennes le 11 Juin 2019

Devant le jury composé de :

- *Jean-Marc Fraslin*
- *Denis Michel*
- *Jean-Pierre Tassan*

Remerciements

Je tenais tout particulièrement à remercier Orlando Musso pour son encadrement, son soutien et son aide dans le rendu de tout ce travail.

Je voulais également remercier Lise Desquilles et Coralie Allain pour leur agréable compagnie, leurs conseils et leur aide dans la réalisation de ce travail.

Bien naturellement un grand merci à toute l'équipe du laboratoire NuMeCan pour leur accueil chaleureux, leur aide technique, leurs conseils avisés et surtout leur bonne humeur quotidienne.

Liste des Abréviations

- **ACTA2** : Alpha actine des muscles lisses
- **CHC** : Carcinome Hépatocellulaire
- **CRP** : Protéine C-réactive
- **EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique
- **GLUL** : Glutamate-ammonia Ligase
- **HAL** : Histidine Ammonia-Lyase
- **IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18** : Interleukine 4, Interleukine 6, Interleukine 8, Interleukine 10, Interleukine 18
- **IFN- γ** : Interféron gamma
- **LPS**: Lipopolysaccharide
- **NF- κ B**: Nuclear Factor Kappa B
- **PBS** : Phosphate Buffered Saline
- **RS** : Rouge Sirius
- **SHG** : Génération de Seconde Harmonique
- **TCGA** : The Cancer Genome Atlas
- **Tfi** : Fibrose Tumorale
- **TGF β 1**: Transforming Growth Factor β 1
- **TNF- α** : tumor necrosis factor alpha
- **VNN1** : Vanin 1
- **WT** : Wild Type

Table des matières

Introduction.....	1
Matériel et Méthodes	
> Modèle cellulaire HepaRG.....	4
> Culture de la lignée HepaRG.....	4
> Traitements des hepaRG en monoculture.....	4
> Tri des monocytes.....	5
> Coculture de cellules HepaRG et de monocytes.....	5
> Dosage ELISA.....	6
> Génération de Seconde Harmonique.....	7
> Exploitation d'expériences d'immunohistochimie par analyse d'images.....	7
> Extraction d'ARN et analyses.....	7
> Détermination du score de Fibrose Tumorale (TFi) et d'Inflammation Tumorale Binaire.....	7
> Analyses statistiques.....	8
> Base TCGA.....	8
Résultats	
> Mise en évidence d'un lien entre mutation de <i>CTNNB1</i> , inflammation et fibrose.	8
> Les cellules de carcinome hépatocellulaire humain HepaRG ayant une activation excessive de la β -caténine possèdent une activité anti-inflammatoire..	13
> Effets des monocytes sur la réponse inflammatoire des hépatocytes portant une <i>CTNNB1</i> sauvage ou mutée.....	14
Discussion.....	16
Références	19

Hepatocellular Carcinoma (HCC) has become the third leading cause of cancer related death worldwide and the seventh most frequent. Generally, this disease grows in a context of chronic inflammatory disease, which can lead to hepatic fibrosis, associated with chronic viral hepatitis (such as HBV and HCV), alcohol abuse, mycotoxins, genetic diseases and metabolic disorders. Increased proliferation of hepatic progenitor cells in an inflammatory microenvironment leads to genetic instability, with the emergence of mutations. Necrosis and hepatocyte senescence also lead to epigenetic modifications that contribute to the emergence of cancer cells. Chronic inflammatory activity also generates a dense extracellular matrix which is enriched with growth factors that promote cell proliferation, thereby increasing genetic instability. Multiple HCC etiologies in a stepwise inflammatory context lead to a high degree of tumor heterogeneity.

The three most frequent HCC mutations concern the telomerase gene promoter (*TERT*), involving ~60% of HCCs; the 3rd exon of β -catenin (*CTNNB1*), involving 30-40% of cases, and several p53 coding sequences (TP53). However, only the mutation of the 3rd exon of *CTNNB1* is associated with a fairly homogeneous and well-differentiated HCC subgroup, with fairly well-differentiated cyto-architecture and transcriptomic program. β -catenin is an ubiquitous transcriptional co-factor that regulates liver metabolism, cell differentiation and proliferation. Normally, β -catenin is activated by binding of members of the Wnt protein family to their Frizzled receptors. In cancers, including HCC, β -catenin can be activated by mutations and / or deletions spanning the 3rd exon of *CTNNB1*, which precludes phosphorylation of at least one of four amino acids leading to a loss of recognition of β -catenin by ubiquitin ligases, non-degradation of the protein by the proteasome and its accumulation in the cytoplasm and nucleus, with activation of the pathway beyond the physiological limits.

Transcriptomic studies revealed two major classes of HCCs. Proliferative HCCs are characterized by poorly differentiated tumors and poor prognosis. Non-proliferative HCCs are characterized by well-to-moderately differentiated tumors and better prognosis. My host team has shown that non-proliferative HCCs include two subclasses differing by the existence of *CTNNB1* mutations. Preliminary histopathological analysis by my host team showed that HCCs with mutated *CTNNB1*, unlike HCCs with wild-type *CTNNB1*, present low-level inflammation and fibrosis. These findings led to the hypothesis that β -catenin mutations may downregulate macrophage activation and/or modulate macrophage polarization toward type M1, associated with the Th1 lymphocyte response and marker of a "good immunity" or type M2, associated with the Th2 lymphocyte response and marker of "exhausted immunity"

Consequently, the aim of the project is to understand the mechanisms of regulation of the inflammatory response by β -catenin in human HCCs.

First, analysis of 80 HCCs from 70 patients by Tissue Micro Array (TMA)-based analysis combining histochemistry (Sirius Red, standard hematoxylin-eosin-safran), second harmonic generation (SHG) and

immunohistochemistry, followed by image analysis confirmed tumors with *CTNNB1* mutations show mild inflammation and are poorly fibrogenic. Protein and gene expression analyses of markers of inflammation and fibrogenesis in the 70 patient dataset was confirmed and extended in an external validation RNA sequencing dataset of 370 HCCs from The Cancer Genome Atlas from the National Cancer Institute of the United States. These analyses showed that mutated *CTNNB1* HCCs do not develop preferentially M1 or M2 polarization, but that they are characterized by a low expression level of cytokines and chemokines. This suggests that a low concentration of chemokines in tumors carrying a *CTNNB1* mutation, in addition with a low concentration of cytokines, explain the low rates of inflammatory infiltrates in HCC.

We then modeled the impact of the *CTNNB1* mutation in human HCC cells in co-culture with human monocytes in an inflammatory context. To this end, we used the human cell line of HepaRG HCC bipotent liver progenitors, which spontaneously differentiate into hepatocyte-like and biliary like cells in a 30 day time course, under defined culture conditions. Human monocyte-enriched primary cultures were obtained by incubation of peripheral blood mononuclear cells with CD14-antibody-coated magnetic beads. *In vitro* M1-type and M2-type inflammation were modeled by adding LPS or IL4 to the culture media, respectively. Cytokine and chemokine secretion were analyzed by ELISA and gene expression by qPCR. Our preliminary analyses suggests that regardless of the nature of the inflammatory response induced (LPS or IL4) on differentiated HepaRGs, pro-inflammatory cytokine (IL6) and chemokine (IL8 and Gro- α) secretion appears to be decreased in *CTNNB1* mutated cells with respect to wild-type cells. Importantly, phase contrast analyses of tissue cultures showed that although LPS or CD14 (+) monocytes induced no morphological changes in HepaRG cells when applied separately, co-culture of HepaRG cells in the presence of LPS in the culture media induced a conspicuous transdifferentiation of hepatocyte-like cells to bundles of fusiform, fibroblast-like cells and that these changes appeared to be less prominent in cells carrying mutated *CTNNB1*. These data call for further immunocytochemical and image confirmatory analyses. Taken together, our results showed that there is indeed a strong link between mutation of *CTNNB1* and low-grade inflammation and fibrosis. Precise characterization of immune cells involved in inflammatory infiltrates in HCCs carrying mutated versus wild-type *CTNNB1* is underway and will yield clues on the mechanisms of downregulation of the inflammatory response by β -catenin.

Introduction

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), est le 3^{ème} cancer le plus mortel au monde et le septième le plus fréquent. Dans plus de 80% des cas, ce cancer se développe dans un contexte de maladie chronique inflammatoire qui progresse vers la fibrose hépatique sévère. Les épisodes répétés de nécrose et d'inflammation conduisent à la formation de nodules de régénération hépatique (Forner et al., 2018). Ainsi, la prolifération accrue des cellules progénitrices hépatiques dans un microenvironnement inflammatoire conduit à une instabilité génétique, avec l'émergence de mutations. La nécrose et la sénescence hépatocytaire mènent également à des modifications épigénétiques contribuant à l'émergence de cellules cancéreuses (Seehawer et al., 2018). D'autre part, l'activité inflammatoire chronique génère une matrice extracellulaire enrichie en facteurs de croissance favorisant la prolifération cellulaire, accentuant ainsi l'instabilité génétique. Ce microenvironnement inflammatoire, qui caractérise le foie atteint d'une fibrose sévère, a été comparé à un terrain miné, ce qui est connu comme « *field effect* ». De nombreuses étiologies peuvent conduire à cet état : les hépatites virales chroniques B et C ; la consommation excessive d'alcool ; l'exposition à des mycotoxines comme l'aflatoxine ; des maladies génétiques comme l'hémochromatose ou encore le syndrome métabolique observé dans un nombre croissant des cas de surpoids ou obésité associés à une résistance périphérique à l'insuline. En conséquence, des modèles épidémiologiques très récents prévoient une augmentation de l'incidence du CHC, malgré une décroissance de la prévalence des hépatites chroniques virales (Estes et al., 2018 et Goldberg et al., 2017). L'étiologie multifactorielle du CHC explique sa forte hétérogénéité. Cette hétérogénéité conduit à une résistance aux traitements anti-cancéreux, ce qui explique pourquoi les seuls traitements à visée curative sont la transplantation hépatique, la résection et l'ablation tumorale (Llovet et al., 2016). Toutefois, des succès thérapeutiques relatifs ont été obtenus avec des inhibiteurs de kinases (sorafenib, régorafenib) avec une prolongation de la survie des patients de 3 à 24 mois. Plus récemment, l'immunothérapie avec des anti-PD1/PDL-1 a été approuvée comme traitement de 2^{ème} ligne. Ces avancées thérapeutiques soulignent l'intérêt d'une connaissance approfondie des phénotypes moléculaires des CHCs et des cibles moléculaires sous-jacentes (Désert et al., 2018).

La pratique clinique qui conduit au diagnostic du CHC diffère des autres tumeurs. La biopsie hépatique transcutanée n'est réservée qu'aux cas atypiques ; le diagnostic étant basé sur le dosage de taux élevés d'une protéine oncofœtale, l'alpha-fœtoprotéine, et sur l'imagerie (ultrasons, imagerie par résonance magnétique), en raison des risques de saignement grave ou de dissémination de la tumeur chez ces patients (Forner et al., 2018 ; EASL, 2018 ; Sherman

et al., 2015). Une fois le diagnostic établi, la décision de prise en charge thérapeutique du CHC est basée sur la taille et le nombre des tumeurs, la présence d'invasion vasculaire et sur l'état du foie sous-jacent. Bien que les classifications moléculaires des CHCs soient en constante évolution, elles n'ont pas encore d'impact sur la prise en charge des patients en l'absence de cibles moléculaires précises associées à chacune des sous-classes de CHC.

Malgré un nombre limité de mutations, les CHCs montrent une grande diversité phénotypique (Désert et al., 2018 ; Liu et al., 2018 ; Schulze et al., 2015). Les trois mutations majeures du CHC concernent le promoteur du gène de la télomérase (*TERT*) (60% des cas) ; l'exon 3 de la β -caténine (*CTNNB1*), environ 30-40% des cas, et plusieurs séquences codantes de la p53 (*TP53*), environ 20-30% des cas (Schulze et al., 2015). Toutefois, seule la mutation de l'exon 3 du gène *CTNNB1* est associée à un sous-groupe de CHCs assez homogène et bien différencié, de par sa cyto-architecture et son programme transcriptomique.

La β -caténine est un co-facteur transcriptionnel ubiquiste qui intervient dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Nusse et al., 2017 ; Wiese et al., 2018). Dans les hépatocytes adultes normaux, son activité contrôle l'expression de gènes du métabolisme hépatique (Ng CKY et al., 2017 ; Berasain et al., 2014 ; Gougelet et al., 2014). Cette voie est physiologiquement activée au cours de l'embryogenèse, la régénération et la cicatrisation tissulaire, par l'interaction des facteurs solubles Wnts avec les récepteurs frizzled à la surface cellulaire. Cette activation est finement régulée par des récepteurs leurres solubles et par l'interaction de la voie Wnt/ β -caténine avec d'autres voies de signalisation (Waisberg et al., 2015). Dans les cancers, dont le CHC, elle peut être activée par des mutations et/ou délétions au niveau de l'exon 3 du gène *CTNNB1*, qui obèrent la phosphorylation d'au moins un sur quatre acides aminés (S33 ; S37 ; T41 et S45), ce qui entraîne une perte de reconnaissance de la β -caténine par des ubiquitine-ligases, sa non dégradation par le protéasome et son accumulation dans le cytoplasme et le noyau, avec une activation excessive de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, au-delà des limites physiologiques (de La Coste et al., 1998).

Au cours des dix dernières années, les études transcriptomiques ont révélé deux grandes classes de CHCs (Zucman-Rossi et al., 2015). La première est de type prolifératif ; elle est caractérisée par des tumeurs peu différenciées et de mauvais pronostic. La seconde est de type non-prolifératif, caractérisée par des tumeurs bien à modérément différenciées et de meilleur pronostic. Mon équipe d'accueil a montré que la classe de CHCs non prolifératifs est constituée de deux sous-classes qui diffèrent par l'existence de mutations du gène *CTNNB1* (Désert et al., 2017 et 2018 ; Ng CKY et al., 2017). Ainsi, les tumeurs où le gène *CTNNB1* est sauvagement déployé déploient le programme métabolique appelé « Péri-portal » ; tandis que les tumeurs

où la *CTNNT1* est mutée, déploient un programme métabolique appelé « Péri-veineux ». De plus, chez l'Homme, les CHCs avec une *CTNNT1* mutée, à la différence des CHCs avec une *CTNNT1* sauvage, montrent peu d'infiltrats inflammatoires et peu de fibrose, ce qui est associé à de faibles taux d'expression de chimiokines, cytokines et de composants de la matrice extracellulaire (*manuscrit en préparation*). Cependant, l'étude des mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par la β -caténine dans le cancer du foie murin a révélé des résultats variables, selon le modèle utilisé (Anson et al., 2012).

Des résultats préliminaires non publiés de mon équipe d'accueil suggèrent que les CHCs dont la β -caténine est mutée présentent une faible réponse inflammatoire et fibrogénique. Ainsi, l'objectif de ce travail est de comprendre les mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par la β -caténine mutée dans le CHC chez l'Homme. Il est donc pertinent d'analyser, d'une part, l'intensité de l'inflammation et, d'autre part, de caractériser les cellules inflammatoires et immunitaires impliquées dans les interactions avec les cellules tumorales. Ces données contribueront à déterminer si la faible inflammation et fibrogenèse observées dans les tumeurs où la *CTNNT1* est mutée sont la conséquence d'une faible immunogénicité de la tumeur ou, au contraire, de la mise en place par celle-ci de mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, en ce qui concerne l'immunité anti-tumorale, deux grands types de CHCs se distinguent : ceux dont l'immunité est préservée et ceux dits à « immunité d'épuisement » avec une réponse inflammatoire fibrosante, plus destructrice que protectrice (Sia et al., 2017).

Ainsi, la β -caténine pourrait posséder un effet anti-inflammatoire direct et les cellules portant une mutation activatrice de la *CTNNT1* pourraient donc moduler l'activation des macrophages hépatiques, Ceci est important puisque le spectre de l'inflammation s'étend entre deux extrêmes de polarisation fonctionnelle des macrophages. D'un côté, le macrophage de type M1 est marqueur d'une « bonne immunité » ; de l'autre côté, le macrophage M2 marqueur de « l'immunité d'épuisement » (Ruytinx et al., 2018). La régulation de ces deux types d'inflammation dépend des communications croisées entre cellules tumorales, lymphocytes et macrophages. Ainsi, sous l'induction de cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes T Helper 1, telles que TNF- α et IFN- γ , ou encore sous l'effet du LPS bactérien, les monocytes se différencient en macrophage M1. Ces derniers se caractérisent par la production d'IL-6, IL-1 β et TNF- α . En revanche, les cytokines produites par les lymphocytes T helper 2, telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, provoqueront la différenciation des monocytes en Macrophages M2. Ces derniers produisent alors des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β) et favorisent la fibrose et la croissance tumorale. Il semblerait par ailleurs que la

perturbation du microenvironnement soit responsable de l'apparition de près de 80% des CHCs (L'Hermitte et al., 2019). Certaines cytokines caractéristiques des réponses pro-inflammatoires (de type M1) et induites par le LPS bactérien ou anti-inflammatoires (de type M2) induites notamment par l'IL-4 méritent alors d'être étudiées. L'IL-4 est en effet responsable de la maturation des monocytes en macrophage M2 à phénotype anti-inflammatoire. Il est utile d'ajouter que Gro- α (*i.e.* CXCL1), MCP1 (*i.e.* CCL2) et IL-8 (*i.e.* CXCL8) sont des chimiokines chargées de recruter les neutrophiles sur le site de l'infection (Bayo *et al.*, 2017). Puis, IL-6 est chargée de stimuler la prolifération des lymphocytes T dans le foie et joue un rôle dans la maturation et la prolifération des lymphocytes B. Cette cytokine n'est d'ailleurs que très peu produite dans les hépatocytes dans des conditions non inflammatoires (Rubin et al., 2014). En revanche, IL-10 bloque la synthèse des cytokines des lymphocytes T helper 1 tandis que CCL18 favorise la différenciation des cellules dendritiques et des macrophages vers un phénotype immunosuppresseur M2 (Budhu et al., 2006).

Matériel et Méthodes

Modèle cellulaire HepaRG. Lignée de CHC HepaRG : sauvage (WT) ou avec transduction rétrovirale d'une β -caténine mutée au niveau du T41 de l'exon 3 (T41). Ces cellules sont une lignée de progéniteurs hépatiques humains bipotents capables de se différencier en hépatocytes ou en cellules biliaires (Dubois-Pot-Schneider et al., 2014).

Cultures de la lignée HepaRG. Les cellules ont été cultivées dans un milieu William's E supplémenté de sérum de vœu fœtal (SVF à 10%), glutamine (2 mM), pénicilline/streptomycine (5000 U/ml, 5000 μ g/ml), insuline (5 μ g/ml) et hydrocortisone 50 μ M. Les cellules sont entretenues par repiquages à J15 et différenciées dans des flasques T75 durant 30 jours dans des d'incubateurs à 37°C et dont l'atmosphère est chargée à 5% de CO₂. Le repiquage se fait par lavage de la flasque par 10 ml de PBS puis 2 ml de trypsine sont ajoutés dans la T75. Après un passage de 3 à 5 minutes dans l'incubateur à 37°C, la trypsine est reprise dans 18 ml de milieu complet. Les cellules sont comptées et réensemencées à hauteur de 2 millions de cellules par T75.

Traitements des HepaRG en monoculture. Des HepaRG WT et celles portant la mutation T41 du gène *CTNNB1* ont été cultivées pendant 30 jours. Une fois différenciées, les cellules reçoivent du milieu William's E complet avec 2% SVF et sans hydrocortisone contenant soit du LPS (0.1 μ g/ml) ou de l'IL-4 (10 ng/ml). Les milieux conditionnés sont récupérés 24 h plus tard en vue de doser les cytokines par ELISA.

Tri des monocytes. Les monocytes sont triés à partir de poches de sang de donneurs provenant de l'établissement français du sang du CHU de Rennes. Une première phase d'isolation des PBMC est réalisée par centrifugation de tubes UNI-SEP U-10 à 1000 g pendant 20 minutes sans frein ni accélération ; la poche de sang a préalablement été diluée dans un volume équivalent de PBS + EDTA (2mM). L'anneau de globules blancs est ensuite prélevé et subit plusieurs lavages successifs par centrifugation (500 g puis 160 g) dans la solution de PBS+EDTA afin d'éliminer les plaquettes et le plasma. Les cellules sont par la suite filtrées à travers un filtre de 30 µm. Après centrifugation des cellules restantes, le culot est resuspendu dans du tampon (D-PBS, 2 mM EDTA, 0.5% SVF - 80µL de tampon pour 10 millions de cellules) et les monocytes sont isolés par l'ajout de billes aimantées provenant du kit (15 minutes à 4°C – 10 µL pour 10 millions de cellules). Après centrifugation et suspension dans le tampon, les monocytes sont isolés des autres cellules par séparation magnétique. Ils doivent enfin directement être ensemencés.

Coculture de cellules HepaRG et de monocytes. Les expériences de coculture transwell (figure 1A) sont réalisées à l'aide d'inserts transwell avec des pores d'un µm dans des plaques multi-well de 24 puits *NUNC* (Thermo Fisher, Etats-Unis). Les cellules HepaRG sont placées sur le fond du puits (46 000 cellules par puits) et les monocytes CD14 (+) dans les inserts (170 000 cellules par insert). Dès le lancement de la coculture avec les monocytes CD14 (+) et pendant trois jours, les cellules reçoivent du milieu William's avec 2% SVF, glutamine, insuline et antibiotiques avec 10 ng/ml de LPS pour les boîtes LPS (+). Après trois jours de co-culture, les monocytes CD14 (+) non adhérents dans les inserts seront récupérés avec le milieu. Le tout sera centrifugé à 1000 RPM pendant 3 à 5 minutes, le surnageant sera jeté et les culots cellulaires fixés dans du formol pendant 15 minutes, puis lavés trois fois au PBS avant d'être inclus en gel Cytoblock (Shandon, Thermo Scientific) puis en paraffine. Les membranes contenant les cellules adhérentes sont quant à elles fixées au formol pendant 15 minutes, puis rincées trois fois au PBS, découpées avec une lame de bistouri et incluses en gel, puis en paraffine dans le même bloc que les cellules non adhérentes. Pour les cellules HepaRG sur fond de puits, le milieu est collecté puis centrifugé afin de retirer les débris. Sur l'une des deux boîtes de chaque condition, les cellules sont lavées au PBS puis placées dans des tubes après grattage afin d'être congelées en culot secs pour extraction d'ARNm. Pour chacun des puits de l'autre boîte, les cellules sont trypsinées, puis comptées avec un compteur automatique de cellules (TC20 Automated Cell Counter, BioRad, Hercules USA). Chaque milieu conditionné est collecté, aliquoté et congelé pour réaliser des ELISAs.

Pour la coculture directe (Figure 1B), des monocytes CD14+ (500 000 cellules par puits) sont mis en coculture avec des HepaRG (22 000 cellules par puits) dans des lames LabTek pendant trois jours directement après avoir été triés de la poche de sang. Le milieu de culture est le même que celui utilisé pour la coculture en Transwell.

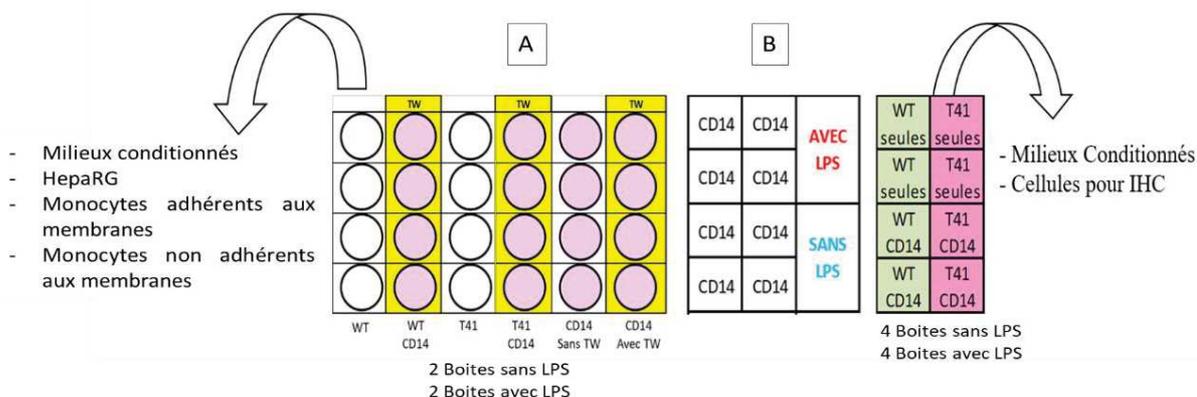


Figure 1. Schéma des plans de plaques pour les expérimentations en coculture de cellules HepaRG avec des Monocytes CD14 en plaque 24 puits et LabTek 8 puits. A : Les puits colorés en rose indiquent la position des monocytes ; les colonnes colorées en jaune indiquent la présence de monocytes dans des Transwell (Tw). B : Les cellules WT sont représentées en vert, en coculture ou non avec les monocytes, tandis que les cellules portant la mutation T41 de l'exon 3 de *CTNNB1* apparaissent en violet. Les échantillons générés à l'issue de l'expérimentation sont représentés par la flèche.

Dosage ELISA. Les milieux conditionnés sont conservés à -20°C en attendant leur dosage par ELISA. Ces derniers sont réalisés à partir de kit DuoSet® ELISA. Le protocole fourni par le fabricant a été rigoureusement suivi. Les courbes et gammes de standards ont été réalisées pour chaque dosage et lues sur un scanner FLUOstar OMEGA de chez BMG Labtech. Les milieux conditionnés doivent être dilués selon le tableau de dilution (Tableau 1), afin que le rapport entre l'absorbance générée par l'échantillon et la concentration des antigènes détectés soit dans la gamme linéaire des standards.

Cellules	Conditions	IL-6	IL-8	Gro-α	PARC
Hepa RG	NO LPS	Pur	1/5	1/5	1/5
Hepa RG	LPS (3h ou 24h)	1/10	1/20	1/20	
CD14 seul		pur	1/5	1/5	1/5
CD14 seul	LPS (24h ou 3j)	1/5	1/200	1/200	1/200
HepaRG + CD14	No LPS	Pur	1/5	1/5	1/5
HepaRG + CD14	3h LPS	1/2	1/20	1/20	
HepaRG+CD14	24h LPS	1/10	1/200	1/200	1/200
HepaRG + CD14	3j LPS	1/200	1/200	1/200	1/200

Tableau 1. Facteur de dilution des milieux conditionnés par condition et cytokines pour ELISA.

Génération de Seconde Harmonique (SHG). La SHG a été réalisée en collaboration avec F. Ezan, G. Baffet et F. Tiaho (Institut de Physique de Rennes et IRSET). Les images sont acquises sur un microscope inversé (IX71, Olympus, Japon), avec un laser IR 80 MHz Titane:Saphir (MAITAI, Spectra Physics). Le signal est détecté par des photomultiplicateurs GasAsP à photon unique de haute sensibilité (H7421-40, Hamamatsu). Les photopulsions sont dénombrées par un module d'acquisition (NI-USB 6363, National Instruments). Le logiciel d'acquisition a été développé avec LabView 2010 et en C (Visual Studio 2010, Microsoft), (Rouède et al., 2017).

Exploitation d'expériences d'immunohistochimie par analyse d'images. Des expériences d'immunohistochimie ont été effectuées sur des micro-arrays de tissus de CHCs provenant de 70 patients. L'acquisition du signal a été effectuée avec un scanner de lames Nanozoomer (Hamamatsu) à la plateforme d'histopathologie haute précision (H2P2) et les images exportés en format .tif avec le logiciel NDP.view (ver. 2.7.25). Le mode "analyses" est choisi dans NDP.view afin que l'acquisition des données soit linéaire ; le même grossissement est conservé pour l'acquisition de tous les spots dans chaque micro-array de tissu (autour de X2.5 à 3.0). Ensuite, l'analyse d'images a été effectuée avec logiciel NIS Elements-AR (ver 4.50.00) (Nikon Instruments). Un seuil est déterminé intrinsèquement pour chaque marqueur à partir d'une sélection de pixels, celui-ci étant utilisé pour mesurer l'intensité du signal, le nombre d'objets moyen et la fraction de la surface de chaque spot occupée par du signal d'immunohistochimie.

Extraction d'ARN et analyses. L'ARN des puits de chaque répétition biologique a été poolé par conditions puis extrait à partir d'un kit Macherey-Nagel (Hoerd, France). L'ARN total est élué dans 40 µL d'eau ultra-pure, stérile et libre de nucléases, puis dosé à l'aide d'un NanoDrop (Ozyme, Paris, France). L'ARN récupéré est dilué dans de l'eau pour obtenir une solution à 0.1 M pour un volume de 10 µL. Il subit ensuite une transcription inverse pour obtenir de l'ADNc amplifié par RT-PCR. La qPCR est réalisée avec un kit PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Warrington, Royaume-Uni) contenant le SYBR Green utilisé. Les gènes d'intérêt sont analysés selon la méthode $2^{\Delta\Delta CT}$ [échantillon contrôle-(CTgène d'intérêt-CTgène de ménage)].

Détermination des scores de Fibrose Tumorale (TFi) et d'Inflammation Tumorale. L'importance de la fibrose dans une tumeur est déterminée par deux chercheurs (O. Musso, Inserm U1241 et B. Turlin, laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU de Rennes) qui ont mesuré le degré de fibrose tumorale par une échelle en 4 catégories (1 ; 2 ; 3 ; 4) basée sur le score METAVIR, utilisé en routine en Anatomie Pathologique pour l'évaluation de la fibrose hépatique sur des colorations histochimiques standard d'hématoxyline-eosine-safran (Poynard

et al., 1997). Les images analysées proviennent de Tissue Micro Array de CHC réalisées à la plate-forme H2P2.

Analyses statistiques. Les données d'ELISA sont représentées avec l'écart-type obtenu pour chaque duplicat par condition. Les *p-values* obtenues pour les nuages de points sont issues d'un test de Student (t-test) ou de Mann-Whitney (test U) en fonction des *p-values* obtenues au test de Shapiro réalisé avec le logiciel R (version 3.6.0).

Base TCGA (The Cancer Genome Atlas). L'exploitation de cette base de données a été effectuée par ma collègue Lise Desquilles, stagiaire en Master 2 de bio-informatique dans mon laboratoire d'accueil. Les données transcriptomiques obtenues par séquençage d'ARN provenant de la base TCGA ont été normalisées par la médiane. La normalisation a été validée par : 1) l'analyse des données de survie selon le grade d'extension tumorale dit « TNM » (Taille de la tumeur, Nombre de tumeurs et Métastases) ; 2) la prédiction de la mutation du gène *CTNNB1* selon l'expression d'ARN de cinq gènes marqueurs : *GLUL*, *LGR5*, *HAL*, *VNN1* et *ODAM* comme décrit (Désert et al., 2017). Nous avons étudié 370 CHCs dont 290 étaient non mutées et 80 mutées pour le gène *CTNNB1*.

Résultats

1. Confirmation d'un lien entre mutation de *CTNNB1*, inflammation et fibrose

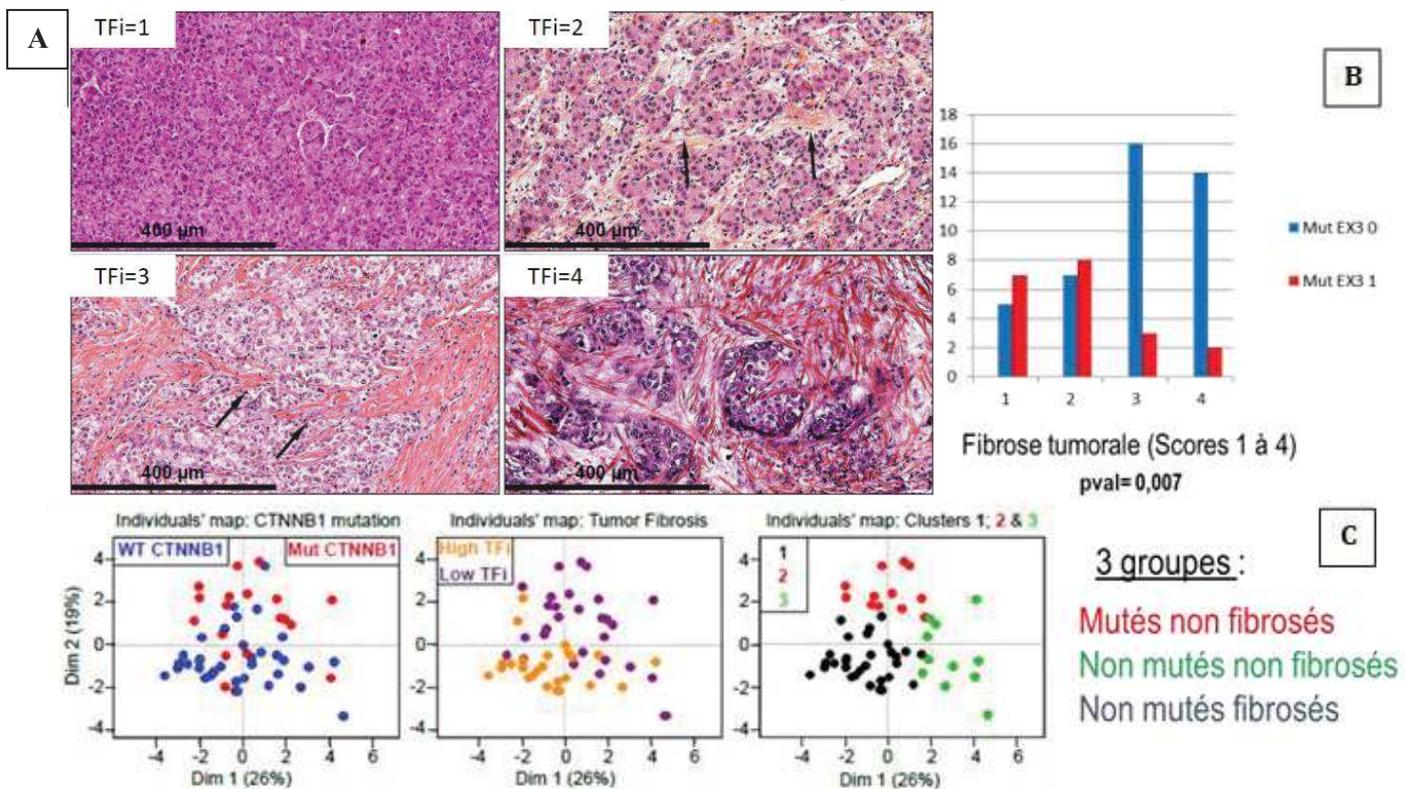


Figure 2. β -caténine et fibrose tumorale dans 70 CHCs humains. (A) Les images sont obtenues à partir d'une coloration Hématoxyline Eosine Safran (HES). Le score de fibrose tumorale (TFi) est établi sur une échelle de 1 (le moins fibrosé) à 4 (le plus fibrosé). (B) La *p-value* obtenue par un test du χ^2 de Pearson entre le score de fibrose et la mutation de l'exon 3 de *CTNNB1* est de 0.007, l'abscisse correspond au score de fibrose tumorale tandis que l'ordonnée désigne le nombre de tumeurs. (C) PLS-DA, d'abord réalisée en fonction de la mutation puis du score de tumeur fibrosante, révèle trois groupes distincts de patients : les mutés non fibrosés, les non mutés non fibrosés et les non mutés fibrosés.

Pour confirmer le lien entre la mutation de l'exon 3 du gène codant pour la β -caténine, *CTNNB1*, et l'importance de la fibrose dans une tumeur, le score METAVIR modifié a été utilisé (Figure 2A). L'absence de fibrose (matrice extracellulaire fine et interrompue au niveau du stroma tumoral) correspond au score « 1 » ; l'épaississement du stroma sinusoidal de la tumeur par une fibrose lâche formant un treillis entre les travées d'hépatocytes tumoraux correspond à un score « 2 » ; la formation de ponts entre des septa d'une matrice plus dense correspond à un score de « 3 » et, enfin, la délimitation de nodules tumoraux entièrement entourés d'une fibrose dense, correspond à un score de « 4 ».

La Figure 2B montre que les tumeurs mutées présenteraient moins de fibrose que les non-mutées. En appliquant la méthode de Régression des Moindre Carrés Partiels (PLS-DA) sur une classification binaire entre les tumeurs mutées/non mutées et une haute/faible fibrose tumorale, trois groupes de tumeurs assez distinctes peuvent être identifiées : les tumeurs mutées non fibrosées, les non-mutées non fibrosées et les non mutées fibrosées (Figure 2C). Afin de confirmer cette première observation, plusieurs mesures ont été effectuées par analyse d'image sur des coupes histologiques regroupées dans un micro-array de tissus. Premièrement, la fibrose tumorale a été réévaluée par deux approches différentes : une coloration histochimique par du Rouge Sirius, qui met en évidence la matrice extracellulaire et une analyse par génération de seconde harmonique (SHG) qui met en évidence les collagènes fibrillaires notamment.

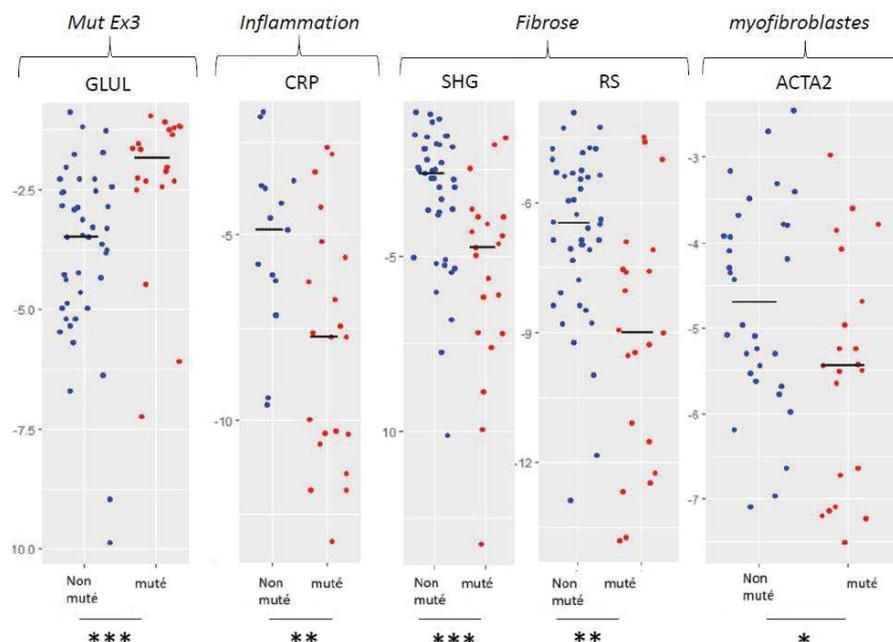


Figure 3. Impact de la mutation de la *CTNNB1* sur l'inflammation et la fibrose. qPlots réalisés à partir de la fraction objet/surface obtenue par analyse d'image de chaque TMA des 70 CHCs de patients. La *p-value* est déterminée par un test de Student pour la CRP et par un test de Wilcoxon pour GLUL, SHG et RS. GLUL est un marqueur d'activation du gène *CTNNB1*, CRP est un marqueur d'inflammation, la génération de seconde harmonique (SHG) et la coloration au Rouge Sirius (RS) permettent de quantifier le collagène et ACTA2 est un marqueur des myofibroblastes, cellules capables de synthétiser du collagène.

Ces deux techniques ont confirmé une association inverse entre les mutations de l'exon 3 de la *CTNNB1* et la fibrose tumorale (Figure 3). Par la suite, le marquage immunohistochimique détectant la glutamate-ammonia ligase (GLUL), qui est un marqueur reconnu de mutation de l'exon 3 de la *CTNNB1* (Zucman-Rossi et al., 2007) a confirmé l'activation de la β -caténine dans les CHCs où la mutation avait été identifiée (Figure 3). En accord avec ces données, les marqueurs protéine C réactive (CRP) et alpha actine de muscle lisse (ACTA2) ont respectivement confirmé une inflammation et activation de myofibroblastes accrues dans les CHCs qui ne portaient pas de mutation de la *CTNNB1*.

Par la suite, nous avons effectué une analyse en composante principale (Figure 4) en associant la présence/absence d'infiltrats inflammatoires et de fibrose tumorale détectées sur des coupes histologiques colorées par l'hématoxyline-éosine-safran avec les données obtenues avec plusieurs marqueurs d'inflammation (CRP et VNN1), de fibrose (RS, SHG), d'émergence de populations de cellules souches (CD44, SOX9), de prolifération (KI67), d'activation myofibroblastique (ACTA2), de phénotype péri-portal (HAL, VNN1, qui lui est opposé au phénotype péri-veineux des tumeurs portant une *CTNNB1* mutée), et de mutation du gène *CTNNB1* (Mut.EX3, GLUL). Nous avons remarqué une association inverse entre les indicateurs de mutation de *CTNNB1* d'un côté et de l'autre de fibrose, d'inflammation, ainsi que de phénotype péri-portal, et d'émergence d'un contingent de cellules cancéreuses souches/progénitrices et de prolifération cellulaire.

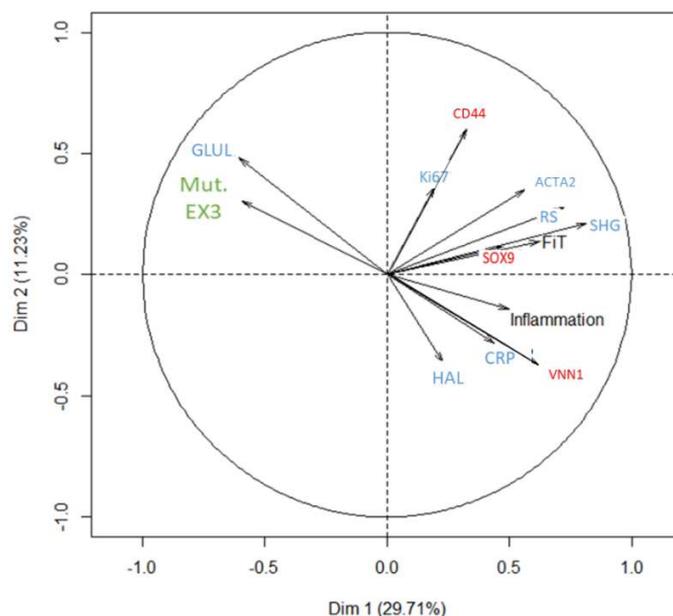


Figure 4. L'analyse en composantes principales met en évidence un lien entre fibrose, inflammation, prolifération et mutation de l'exon 3 de la *CTNNB1*. En bleu, observations issues de l'analyse d'image de 70 CHCs humains, en rouge expression d'ARN, en vert données binaires déterminées par séquençage pour la mutation de l'exon 3 de *CTNNB1* et en noir l'inflammation tumorale et le score de Fibrose Tumorale (FiT). RS et SHG désignent la fibrose, CD44 et SOX9 sont des marqueurs de cellules souches, Ki67 marque la prolifération, ACTA2 pour l'activation des myofibroblastes, HAL et VNN1 marquent le phénotype périportal et CRP ainsi que VNN1 sont des marqueurs d'inflammation

Les tumeurs présentant une mutation sur l'exon 3 du gène *CTNNB1*, engendrant une suractivation de la β -caténine, seraient alors caractérisées par une faible inflammation, peu de fibrose et une faible émergence de cellules souches progénitrices.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à ces observations et de confirmer celles-ci, nous avons étudié une base de données externe composée de 370 CHCs, accessible publiquement (*The Cancer Genome Atlas*, de l'Institut National du Cancer des Etats Unis). Cette base est composée de données cliniques, biologiques, transcriptomiques (séquençage d'ARNm) et de séquençage génomique, permettant ainsi corrélérer le statut mutationnel de l'exon 3 de la *CTNNB1* avec le transcriptome des tumeurs. Dans cette base, nous avons identifié 290 CHCs non mutés et 80 mutés *CTNNB1*. L'analyse de données a confirmé une augmentation significative de l'inflammation, dans les tumeurs non-mutées *CTNNB1* (Figure 5A). Cela était également visible par l'augmentation significative de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-18 et IL-6, dans les tumeurs non-mutées. En outre, nous avons observé une augmentation des facteurs anti-inflammatoires de type Th2 chez les non mutés, comme le montrent la hausse de GATA3, facteur de transcription intrinsèque aux lymphocytes Th2, et de l'IL-10, cytokine immunosuppressive produite notamment par les lymphocytes T régulateurs. Il semblerait ainsi que les tumeurs mutées *CTNNB1* ne développent ni de programme pro-inflammatoire ni anti-inflammatoire mais qu'elles se caractérisent par une très faible inflammation générale.

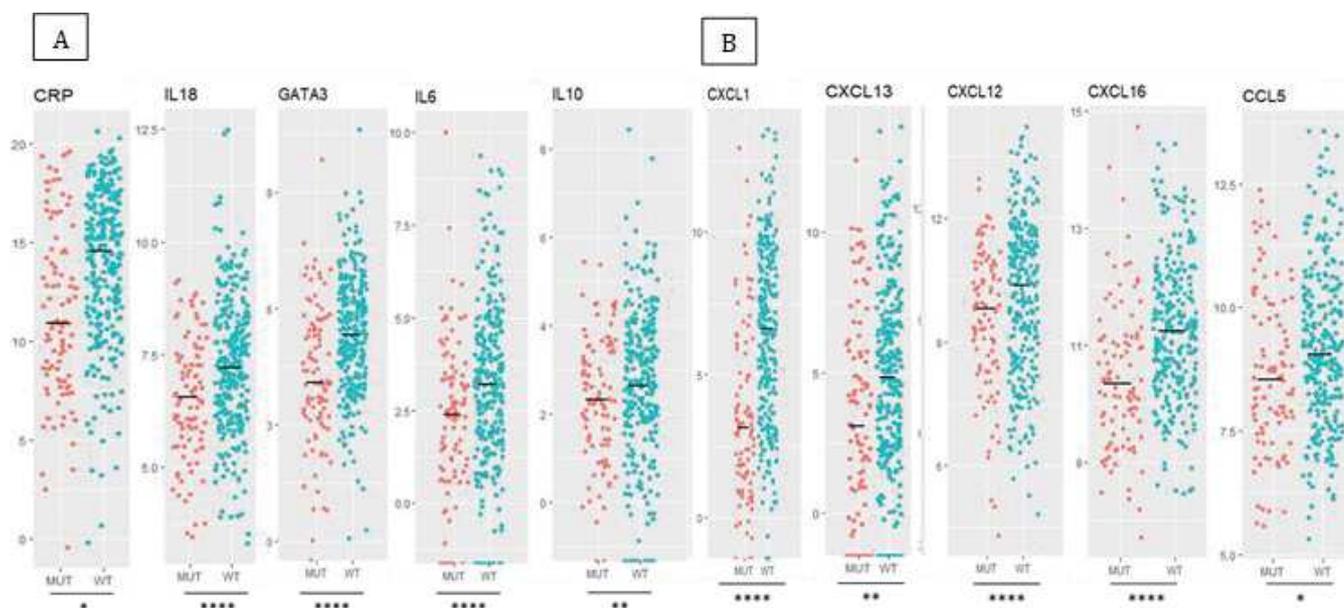


Figure 5. Comparaison des marqueurs de l'inflammation (A) et de chimiokines (B) entre tumeurs mutées et non-mutées pour le gène *CTNNB1* provenant de 370 CHCs référencés dans la base TCGA. L'ordonnée correspond au log2 FoldChange des données RNAseq de ces patients pour les gènes en question. MUT désigne les tumeurs présentant une mutation de *CTNNB1* tandis que WT désigne les tumeurs non mutées.

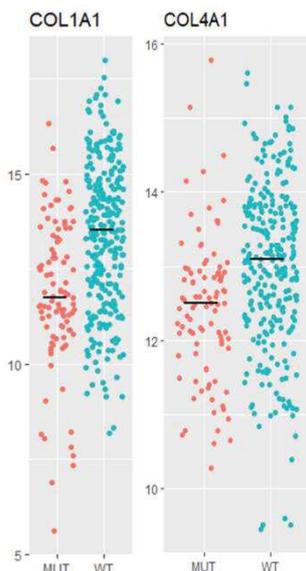


Figure 6. Expression d'ARNm des collagènes de type I et IV entre tumeurs mutées *CTNNB1* et WT extraits des 370 CHCs de la base TCGA. Les *p-values* sont obtenues à partir d'un test de Wald.

De plus, l'analyse de l'expression des chimiokines révèle que celles-ci sont nettement moins exprimées par les tumeurs mutées (Figure 5B). Or, les chimiokines ont pour principale fonction d'exercer une action chimiotactique sur les cellules du système immunitaire. Ainsi, une faible concentration en chimiokines chez les tumeurs portant une mutation *CTNNB1*, en lien avec une faible concentration des cytokines, est en accord avec la faible présence des infiltrats inflammatoires dans le CHC.

L'expression des marqueurs de collagène de type I (*COL1A1*) et IV (*COL4A1*) (Figure 6), a suggéré que la fibrose était significativement plus faible dans les tumeurs présentant une mutation du gène *CTNNB1*.

2. Les cellules de carcinome hépatocellulaire humain HepaRG ayant une activation excessive de la β -caténine possèdent une activité anti-inflammatoire

Comme il était attendu, la transduction rétrovirale du gène *CTNNB1* muté induit une activation de la β -caténine (Figure 7), avec expression accrue de LGR5, GLUL et ODAM et diminuée de HAL et VNN1 (Désert et al., 2017).

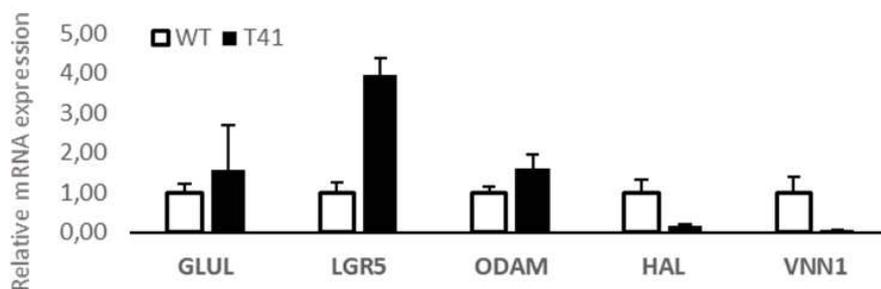


Figure 7. qPCR réalisée sur des HepaRG mutées T41 et WT pour les marqueurs de la mutation de *CTNNB1*. L'ordonnée correspond au fold change par rapport au gène de ménage TBP

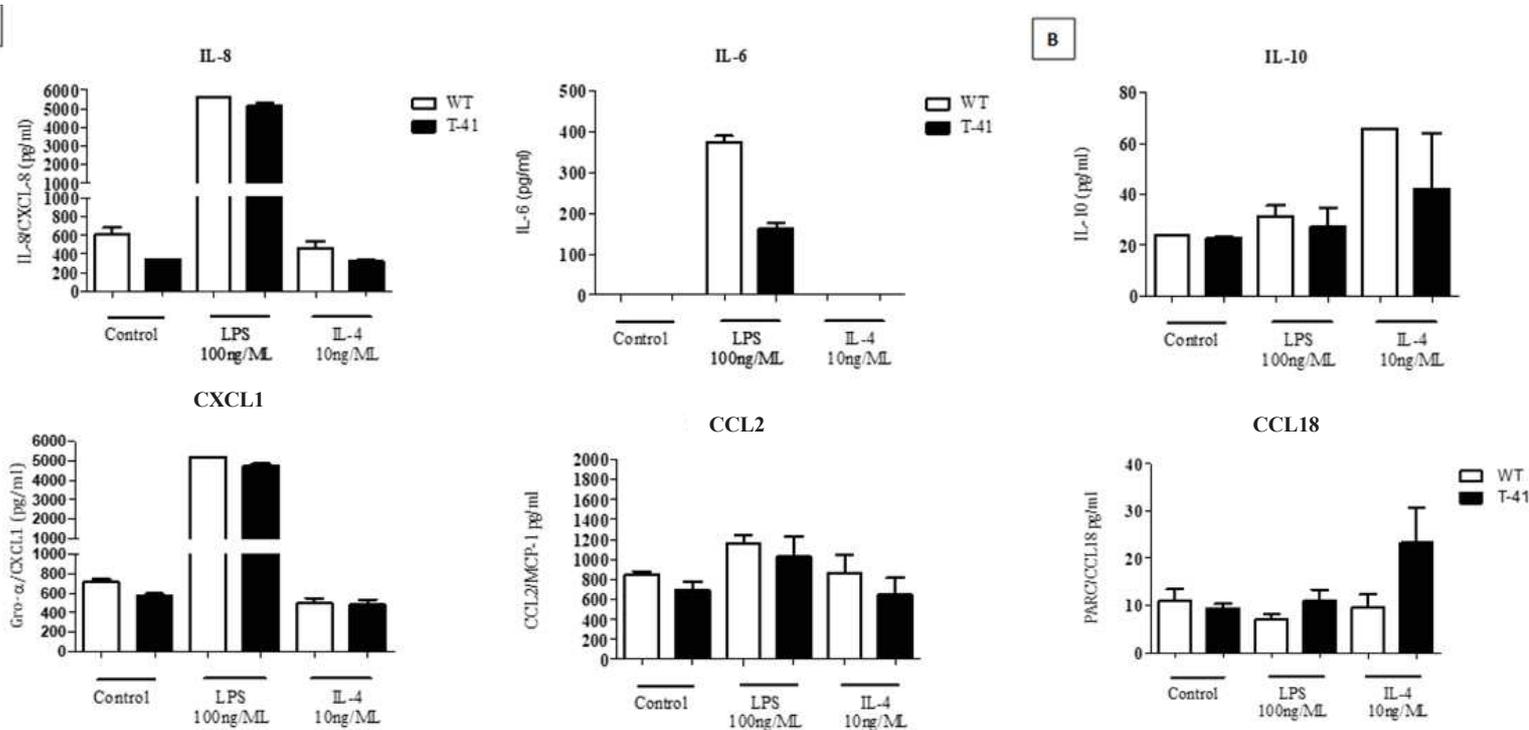


Figure 8. Test ELISA montrant la diminution de la production de cytokines de type M1 par les cellules HepaRG mutées. Les milieux conditionnés sont récupérés 24h après l'induction de LPS (100 ng/ml) ou de IL-4 (10 ng/ml). (A) Le dosage ELISA montre que la sécrétion de cytokines de type M1 pro-inflammatoire par les HepaRG est diminuée chez les mutées par rapport au contrôle pour une réponse de type M1 (LPS) ou M2 (IL-4). Le niveau de MCP-1 semble constant chez les deux lignées. (B) L'induction des mêmes types de réponse semble favoriser la production de la cytokine de type M2 PARC/CCL18, révélée par ELISA, chez les mutées par rapport aux cellules WT.

Nous avons ensuite dosé les cytokines libérées par des cellules HepaRG différenciées après traitement avec du LPS (100 ng/ml) ou de l'IL-4 (10 ng/ml) afin d'évaluer l'impact de la mutation de *CTNNB1* sur le profil inflammatoire développé.

Comme montré en figure 8A, quelle que soit la nature de la réponse inflammatoire induite par le LPS et l'IL-4 sur les cellules HepaRG différenciées, la production de cytokines pro-inflammatoires semble diminuée chez les cellules mutées contrairement aux cellules non mutées pour la *CTNNB1*. On retrouve par ailleurs que la production de cytokines pro-inflammatoires est plus importante avec l'induction d'une réponse M1.

En revanche, la cytokine de type anti-inflammatoire CCL18 serait produite de manière plus importante chez les cellules portant la mutation T41 et ceci de façon encore plus importante avec l'induction de la réponse de type M2 anti-inflammatoire (Figure 8B). Il est en revanche difficile de conclure sur l'évolution de la synthèse de l'IL-10 avec ces expériences.

3. Effets des monocytes sur la réponse inflammatoire des hépatocytes portant une *CTNNB1* sauvage ou mutée.

La modification du micro-environnement tumoral par la libération de différents types de cytokines pourrait avoir un effet sur la maturation des macrophages. Ces derniers jouent également un rôle dans la progression du CHC en fonction du phénotype adopté après maturation (Nishida *et al.*, 2017). Ainsi, afin d'évaluer l'effet de la réponse inflammatoire sur la libération des cytokines par les hépatocytes et la maturation des monocytes en macrophages, des cellules HepaRG différenciées ont été placées pendant 3 jours en coculture, directe ou *transwell*, avec des monocytes CD14⁺ issus de poches de sang de donneurs humains sains.

D'un point de vue morphologique (Figure 9), il n'a pas été constaté de différence notable entre les cellules avec une *CTNNB1* sauvage et les cellules portant la mutation T41, que ce soit avec ou sans LPS. Les cellules sont en effet bien différenciées dans les deux cas et forment un tapis d'hépatocytes et de cellules épithéliales biliaires. De même, l'ajout de monocytes dans des conditions sans LPS montrait un même tapis de cellules bien différenciées, sans différence morphologique notable. En revanche, l'ajout de LPS (10 ng/ml) aux cocultures HepaRG/monocytes CD14 (+) semble radicalement affecter la différenciation cellulaire. Seuls quelques foyers d'hépatocytes bien différenciés persistaient, tandis que les autres cellules s'organisaient sous la forme de faisceaux fusiformes.

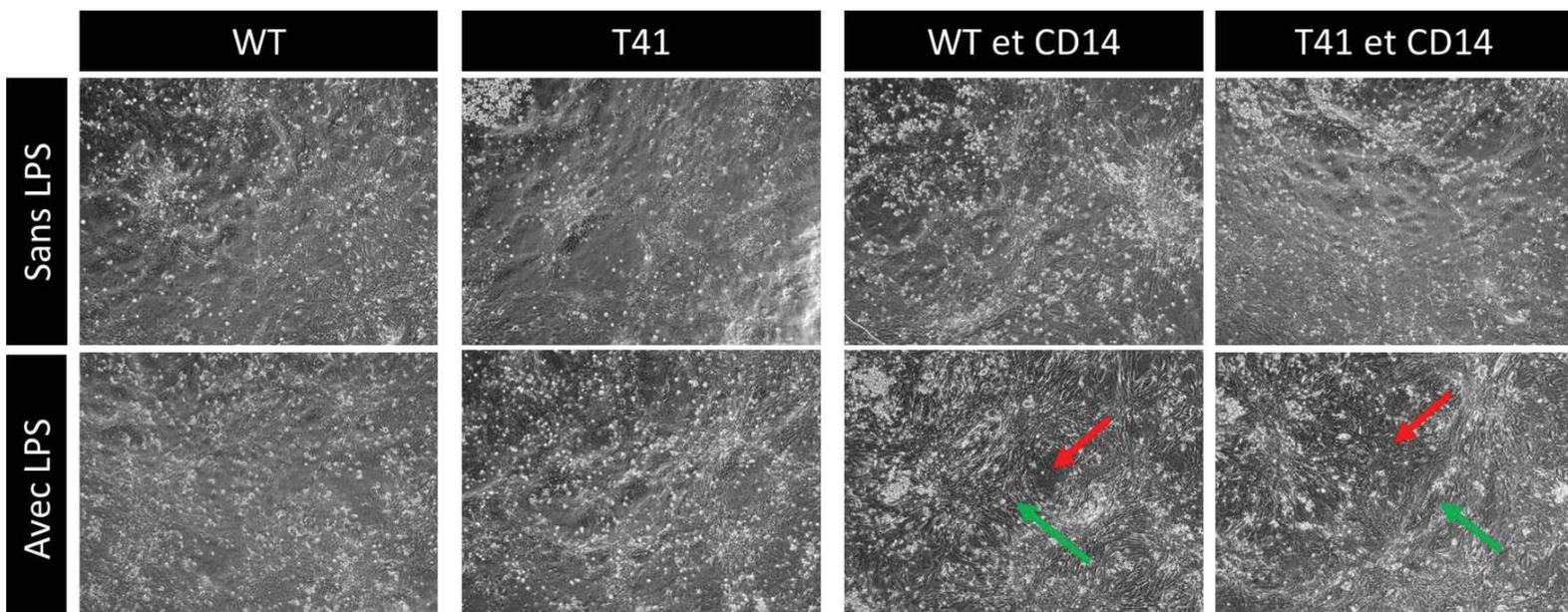


Figure 9. HepaRG WT et mutées T41 en coculture avec monocytes (CD14) et induction au LPS (10 ng/ml). Images acquises au microscope de contraste de phase à l'objectif 10x. Les flèches rouges indiquent les foyers d'hépatocytes et les flèches vertes indiquent des faisceaux de cellules fusiformes.

L'ajout de monocytes dans des conditions inflammatoires semble donc déclencher une réaction épithélio-mésenchymateuse chez les hépatocytes. Si on compare les cocultures de cellules sauvages avec celles de cellules mutées, on remarque une plus grande importance des foyers d'hépatocytes et moins de cellules fusiformes chez les mutées par rapport aux sauvages.

Il est possible de remarquer (Figure 10) une nouvelle fois que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires semble légèrement diminuée chez les cellules mutées *CTNNB1* seules par rapport aux cellules sauvages après traitement au LPS (10 ng/ml). Puis, les résultats de coculture ont montré que l'effet des monocytes sur les hépatocytes suffit à considérablement augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires.

Cela étant, il est difficile de tirer une conclusion quant à l'effet du mode de coculture sur la libération de cytokines : une coculture directe ne provoque pas toujours une plus grande libération qu'une *transwell* et inversement. La quantité de cytokines produite restait en revanche toujours plus importante pour une coculture avec des cellules sauvages qu'avec des mutées *CTNNB1*. Cela semble, là encore, souligner l'adoption d'un profil anti-inflammatoire par les cellules présentant une sur-activation de la β -caténine. En outre, la quantité de cytokines produites par les monocytes seuls ajoutée à celle produite par les cellules HepaRG seules n'était pas aussi importante que celle sécrétée par les cellules en coculture : il y aurait

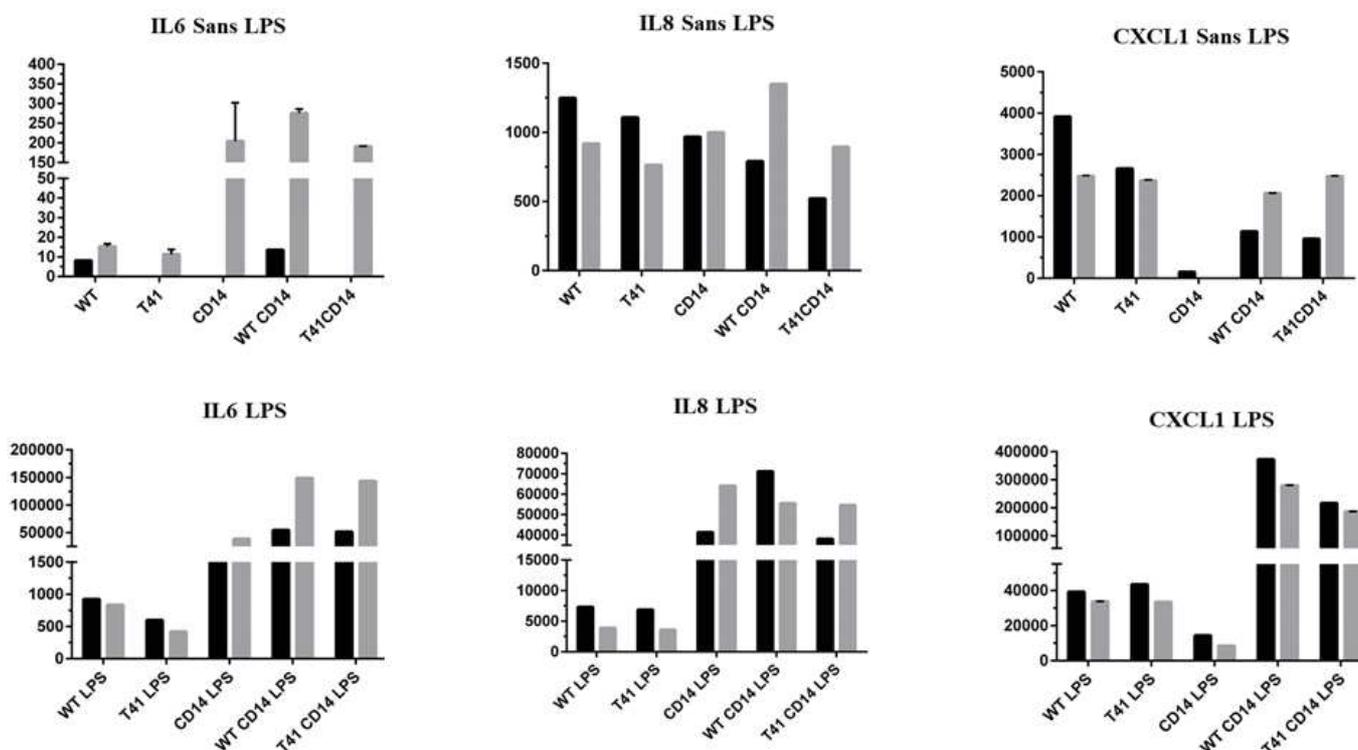


Figure 10. Diminution de la production de cytokines de type M1 par les cellules HepaRG mutées *CTNNB1* en coculture avec des monocytes après traitement au LPS (10 ng/ml) pendant 3 jours. Les milieux conditionnés sont récoltés après 3 jours de traitement au LPS en coculture directe en (NOIR) ou transwell (GRIS) puis dosés par ELISA. Les cytokines de type M1 sont de nouveau produites à des taux plus bas par les cellules HepaRG mutées par rapport aux sauvages que ce soit en monoculture ou coculture. Les ordonnées sont en *pg/ml*.

donc un effet synergique entre les monocytes et les hépatocytes dans la synthèse des composants de la réponse inflammatoire. Les cellules portant une *CTNNB1* sauvage modifieraient alors le microenvironnement tumoral par la sécrétion préférentielle de cytokines pro-inflammatoires qui favoriseraient la maturation des monocytes en macrophages de type M1 pro-inflammatoires. En somme, ces données préliminaires, qui restent à confirmer, suggèrent que la sur-activation de la β -caténine, induite par la mutation T41 de l'exon 3 de la *CTNNB1*, pourrait alors être responsable de l'acquisition d'un profil anti-inflammatoire remarquable par la diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines.

Discussion

Le faible nombre d'infiltrats inflammatoires et de lésions fibrogéniques constatés par histologie conventionnelle dans les carcinomes hépatocellulaires portant une mutation du gène codant la β -caténine a conduit mon équipe d'accueil à confirmer ces données par d'autres approches et en étudier les mécanismes. Tant les données provenant de notre propre cohorte d'apprentissage de 70 patients (80 CHCs) que la validation externe sur la base de données publiques de l'Institut National du Cancer des Etats Unis (base TCGA), indiquent une association négative entre mutation de *CTNNB1* d'une part, et fibrose et inflammation d'autre part. L'étude des marqueurs de la matrice extracellulaire et inflammatoires attestent en effet que les tumeurs mutées *CTNNB1* développent significativement moins de fibrose et d'inflammation que les tumeurs où ce gène est sauvage. Toutefois, ces données sont à interpréter avec précaution dans la mesure où nous avons également identifié un sous-groupe de tumeurs portant une *CTNNB1* sauvage, mais sans fibrose tumorale remarquable (Figure 1C). Puisque les tumeurs portant une *CTNNB1* mutée sont en général moyennement à bien différenciées et qu'elles appartiennent à la classe de CHCs peu prolifératifs, la première hypothèse à explorer était que la faible activité inflammatoire fût le résultat de la préservation d'un phénotype hépatocytaire différencié dans certaines tumeurs. Cette raison nous a conduit à effectuer des expériences *in vitro* avec la lignée HepaRG de carcinome hépatocellulaire, qui adopte un phénotype bien différencié, exprimant un programme métabolique et transcriptionnel très proche des hépatocytes adultes normaux (Dubois-Pot-Schneider et al., 2014). La transduction rétrovirale de la mutation T41 de la *CTNNB1* nous a permis de tester le clone muté par rapport au clone sauvage, après 30 jours de culture en milieu de différenciation.

Dans ces conditions, l'exposition des cellules HepaRG différenciées au LPS ou la coculture de ces cellules avec des monocytes humain CD14 (+) pendant trois jours n'a pas révélé des

changements morphologiques majeurs. Par contre, la coculture de cellules HepaRG avec des monocytes CD14 (+) en présence de LPS a déclenché une réaction de transition épithélio-mésenchymateuse fleurie. L'observation au microscope de contraste de phase semble indiquer des différences quantitatives entre les cellules portant une *CTNNT1* sauvage et mutée, avec des faisceaux de cellules fusiformes moins denses et des plages hépatocytaires probablement plus abondantes, ce qui sera à confirmer par immunohistochimie, comme décrit précédemment par mon équipe d'accueil (Mebarki et al., 2016). Quoiqu'il en soit, l'association LPS avec des monocytes CD14 (+) modélise *in vitro* le contexte inflammatoire du foie atteint d'une fibrose sévère. De plus, ces observations effectuées dans ce modèle *in vitro* soulignent la pertinence de l'analyse des cyto/chimiokines sécrétées et des gènes activés.

La mesure du taux de sécrétion pour certaines cytokines pro et anti-inflammatoires suggère que les tumeurs mutées *CTNNT1* sécrèteraient moins de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines justifiant ainsi le faible nombre d'infiltrats inflammatoires observé en histologie pour les tumeurs mutées *CTNNT1*. Au contraire, les taux de sécrétion de PARC, plus importants pour les cellules mutées *CTNNT1* par rapport aux sauvages, pourraient indiquer un effet préférentiel de la production de cytokines immunosuppressives par les tumeurs mutées. Cependant, l'analyse de l'expression d'ARNm à partir de la base TCGA semble révéler le contraire concernant les niveaux d'expression de *PARC* (résultats non présentés). A ce stade, il est difficile d'affirmer si la faible inflammation des tumeurs mutées *CTNNT1* est due à une faible immunogénicité de la tumeur ou bien à la mise en place de mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, les expériences de biologie cellulaire effectuées en trois à quatre réplicats techniques et trois réplicats biologiques indépendants n'ont pas encore été complètement exploitées, tant au niveau du taux de sécrétion de cyto/chimiokines dans les milieux conditionnés, que de l'expression d'ARNm. A noter qu'une panne de chambre froide au bâtiment 7 de la Faculté de Médecine a rendu un réplicat biologique inexploitable au niveau de l'ARNm.

A la suite des résultats présentés ici, j'exploiterai les restant des échantillons disponibles au laboratoire durant le mois de juin 2019, afin d'en tirer une analyse statistique. Nous procéderons de plus à une analyse en immunohistochimie des monocytes cultivés en coculture avec les cellules HepaRG, tant sur membranes *Transwell* qu'en coculture directe, en utilisant des anticorps spécifiques de la polarisation M1 et M2. Ces marqueurs de polarisation macrophagique ont été acquis durant mon stage et sont disponibles au laboratoire.

En parallèle des expériences sur le modèle HepaRG, nous avons cultivé des cellules BMEL (Bipotential Mouse Embryonic Liver) en modèle 3D sur boîtes à faible adhérence. Les

premières expériences ont montré que les sphéroïdes formés atteignaient une taille maximale 3 jours après l'ensemencement, puis implosaient, vraisemblablement suite à une hypoxie au cœur des sphéroïdes. En conséquence, des expériences d'optimisation du nombre de cellules ensemencés seront nécessaires, probablement sur des plaques de 96 puits avec un plus faible nombre de cellules pour limiter la taille des sphéroïdes.

Enfin, l'une des hypothèses pouvant expliquer la faible inflammation des tumeurs mutées *CTNNB1* concerne la modification du micro-environnement tumoral par une action de concert entre β -caténine, LECT2 et NF- κ B. La mutation du gène codant la β -caténine provoque son accumulation dans le noyau et active la voie NF- κ B. Deux médiateurs de la réponse immunitaire sont induits par la β -caténine : LECT2 (Leukocyte cell-derived chemotaxin-2, cible directe de la β -caténine) et les cellules iNKT. Les iNKT produisent des cytokines de type Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-4). Ils peuvent alors adopter un profil pro ou anti-inflammatoire en fonction du remodelage du microenvironnement par l'activation de NF- κ B et de LECT2 sous l'influence de la β -caténine. Or, dans le CHC présentant une sur-activation de la β -caténine, LECT2 est up-régulé et a principalement un rôle anti-inflammatoire (Anson *et al.*, 2012). Toutefois, nous envisageons une approche différente pour étudier les mécanismes conduisant à une réduction de la réponse inflammatoire et fibrogénique des tumeurs portant une mutation de la *CTNNB1*. Nous avons en effet acquis une batterie d'anticorps permettant d'identifier les populations de cellules immunitaires et inflammatoires *in situ* par immunohistochimie multiplex (polymorphonucléaires, lymphocytes dont Th1, Th2, Th17 et Treg, macrophages M1 et M2 ; Tsujikawa *et al.*, 2017) ce qui permettra d'interpréter nos résultats *in vitro* à la lumière des modifications du microenvironnement tumoral dans des échantillons tumoraux obtenus dans le cadre du parcours de soins de patients de CHC.

Références

1. Anson M, Crain-Denoyelle AM, Baud V, Chereau F, Gougelet A, Terris B, Yamagoe S, Colnot S, Viguier M, Perret C, Couty JP: Oncogenic beta-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice, *The Journal of clinical investigation* 2012, 122:586-599
2. Bayo J, Real A, Fiore E.J, Malvicini M, Sganga L, Bolontrade M, Andriani O, Bizama C, Fresno C, Podhajcer O, et al. IL-8, GRO and MCP-1 produced by hepatocellular carcinoma microenvironment determine the migratory capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells without affecting tumor aggressiveness. *Oncotarget* 2018, 8(46).
3. Berasain C, Avila MA: Deciphering liver zonation: new insights into the beta-catenin, Tcf4, and HNF4alpha triad, *Hepatology* 2014, 59:2080-2082
4. Budhu A, and Wang X.W. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *Journal of Leukocyte Biology* 2006, 80 :1197–1213
5. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C: Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:8847-8851
6. Desert R, Mebarki S, Desille M, Sicard M, Lavergne E, Renaud S, Bergeat D, Sulpice L, Perret C, Turlin B, Clement B, Musso O: "Fibrous nests" in human hepatocellular carcinoma express a Wnt-induced gene signature associated with poor clinical outcome, *Int J Biochem Cell Biol* 2016, 81(Pt A):195-207
7. Desert R, Nieto N, Musso O: Dimensions of hepatocellular carcinoma phenotypic diversity, *World journal of gastroenterology* 2018, 24:4536-4547
8. Desert R, Rohart F, Canal F, Sicard M, Desille M, Renaud S, Turlin B, Bellaud P, Perret C, Clement B, Le Cao KA, Musso O: Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection, *Hepatology* 2017, 66:1502-1518
9. Dubois-Pot-Schneider H, Fekir K, Coulouarn C, Glaise D, Aninat C, Jarnouen K, Le Guével R, Kubo T, Ishida S et Corlu A : Inflammatory Cytokines Promote the Retrodifferentiation of Tumor-derived Hepatocyte-like Cells to Progenitor Cells, *Hepatology* 2014, 60:2077-90

10. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma, *Journal of hepatology* 2018, 69:182-236
11. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, Colombo M, Craxi A, Crespo J, Day CP, Eguchi Y, Geier A, Kondili LA, Kroy DC, Lazarus JV, Loomba R, Manns MP, Marchesini G, Nakajima A, Negro F, Petta S, Ratziu V, Romero-Gomez M, Sanyal A, Schattenberg JM, Tacke F, Tanaka J, Trautwein C, Wei L, Zeuzem S, Razavi H: Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030, *Journal of hepatology* 2018, 69:896-904
12. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ: Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease, *Hepatology* 2018, 67:123-133
13. Forner A, Reig M, Bruix J: Hepatocellular carcinoma, *Lancet* 2018, 391:1301-1314
14. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, Charlton M: Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation, *Gastroenterology* 2017, 152:1090-1099 e1091
15. Gougelet A, Torre C, Veber P, Sartor C, Bachelot L, Denechaud PD, Godard C, Moldes M, Burnol AF, Dubuquoy C, Terris B, Guillonneau F, Ye T, Schwarz M, Braeuning A, Perret C, Colnot S: T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice, *Hepatology* 2014, 59:2344-2357
16. L'Hermitte A, Pham, S, Cadoux M, Couchy G, Caruso S, Anson M, Crain-Denoyelle A.-M, Celton-Morizur S, Yamagoe S, Zucman-Rossi J, et al. Lect2 Controls Inflammatory Monocytes to Constrain the Growth and Progression of Hepatocellular Carcinoma: Hepatobiliary Malignancies. *Hepatology* 2019, 69:160–178
17. Liu J, Dang H, Wang XW: The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer, *Exp Mol Med* 2018, 50:e416
18. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G: Hepatocellular carcinoma, *Nat Rev Dis Primers* 2016, 2:16018
19. Mebarki S, Desert R, Sulpice L, Sicard M, Desille M, Canal F, Dubois-Pot Schneider H, Bergeat D, Turlin B, Bellaud P, Lavergne E, Le Guevel R, Corlu A, Perret C, Coulouarn C, Clement B, Musso O: De novo HAPLN1 expression hallmarks Wnt-induced stem cell and fibrogenic networks leading to aggressive human hepatocellular carcinomas, *Oncotarget* 2016, 7:39026-39043

20. Ng CKY, Piscuoglio S, Terracciano LM: Molecular classification of hepatocellular carcinoma: The view from metabolic zonation, *Hepatology* 2017, 66:1377-1380
21. Nishida N, and Kudo M. Immunological Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Implication. *Oncology* 2017, 92, 40–49.
22. Nusse R, Clevers H: Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities, *Cell* 2017, 169:985-999
23. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997, 349:825-32.
24. Rubin K, Janefeldt A, Andersson L, Berke Z, Grime K, and Andersson T.B. HepaRG Cells as Human-Relevant In Vitro Model to Study the Effects of Inflammatory Stimuli on Cytochrome P450 Isoenzymes. *Drug Metabolism and Disposition* 2014, 43 :119–125.
25. Rouède D, Schaub E, Bellanger J-J, Ezan F, Scimeca J-C, Baffet G, and Tiaho F : Determination of extracellular matrix collagen fibril architectures and pathological remodeling by polarization dependent second harmonic microscopy. *Scientific Reports* 2017, 7
26. Ruytinx P, Proost P, Van Damme J, Struyf S: Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions, *Frontiers in Immunology* 2018, 9:1
27. Seehawer M, Heinzmann F, D'Artista L, Harbig J, Roux PF, Hoenicke L, Dang H, Klotz S, Robinson L, Dore G, Rozenblum N, Kang TW, Chawla R, Buch T, Vucur M, Roth M, Zuber J, Luedde T, Sipos B, Longerich T, Heikenwalder M, Wang XW, Bischof O, Zender L: Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer, *Nature* 2018, 562:69-75
28. Sherman M, Bruix J: Biopsy for liver cancer: how to balance research needs with evidence-based clinical practice, *Hepatology* 2015, 61:433-436
29. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, Meiller C, Shinde J, Soysouvanh F, Calatayud AL, Pinyol R, Pelletier L, Balabaud C, Laurent A, Blanc JF, Mazzaferro V, Calvo F, Villanueva A, Nault JC, Bioulac-Sage P, Stratton MR, Llovet JM, Zucman-Rossi J: Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets, *Nature genetics* 2015, 47:505-511
30. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, Putra J, Camprecios G, Bassaganyas L, Akers N, Losic B, Waxman S, Thung SN, Mazzaferro V, Esteller M, Friedman SL, Schwartz M, Villanueva A, Llovet JM: Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features, *Gastroenterology* 2017, 153:812-826

31. Tsujikawa T, Kumar S, Borkar R.N, Azimi V, Thibault G, Chang Y.H, Balter A, Kawashima R, Choe G, Sauer D, et al. : Quantitative Multiplex Immunohistochemistry Reveals Myeloid-Inflamed Tumor-Immune Complexity Associated with Poor Prognosis, *Cell Reports* 2017, 19:203–217.
32. Waisberg J, Saba GT: Wnt/-beta-catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma, *World J Hepatol* 2015, 7:2631-2635
33. Wiese KE, Nusse R, van Amerongen R: Wnt signalling: conquering complexity, *Development* 2018, 145:1-9
34. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM: Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma, *Gastroenterology* 2015, 149:1226-1239 e1224
35. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, Cunha AS, Bioulac-Sage P and Perret C: Differential effects of inactivated Axin1 and activated b-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas, *Oncogene* 2007, 26:774-780

	Diplôme : Ingénieur – Master Spécialité : Agronome Spécialisation / option : Biologie Moléculaire et Cellulaire Enseignant référent : Jean-Marc Fraslin
Auteur(s) : Thomas GUERBETTE Date de naissance* : 19 Novembre 1996	Organisme d'accueil : Hôpital Pontchaillou Adresse : 2 rue Henri Le Guiloux - 35033 – Rennes - France
Nb pages : 18 Annexe(s) : 0	Maître de stage : Orlando Musso
Année de soutenance : 2019	
Titre français : Les mécanismes de régulation de la réponse inflammatoire par la β -caténine dans le Carcinome Hépatocellulaire chez l'Homme Titre anglais : Mechanisms of regulation of inflammatory response by β -catenin in hepatocellular carcinoma in humans	
Résumé (1600 caractères maximum) : Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est devenu la troisième cause de décès par cancer au monde et le septième le plus fréquent. Généralement, cette maladie se développe dans un contexte de maladie inflammatoire chronique. La prolifération accrue de cellules progénitrices hépatiques dans un microenvironnement inflammatoire conduit à une instabilité génétique, avec l'émergence de mutations. L'une des trois mutations majeures qui survient dans la CHC concerne l'exon 3 du gène <i>CTNNB1</i> , associé à un sous-groupe de CHCs relativement homogène et bien différencié. Les CHCs portant une mutation activatrice du gène codant pour la β -caténine présentent peu d'inflammation et de fibrose, ce qui a suggéré que les cellules mutées <i>CTNNB1</i> puissent moduler l'activation des macrophages hépatiques. En conséquence, nous avons étudié les cellules mutées <i>CTNNB1</i> dans un contexte inflammatoire en coculture ou non avec des monocytes humains. Utilisant des approches méthodologiques complémentaires, qui incluent l'étude <i>in vivo</i> sur plus de 300 CHCs humains, nos résultats confirment que les CHCs portant une <i>CTNNB1</i> mutée présentent peu d'inflammation et de fibrogenèse et montrent que ce tableau histologique est associé à de faibles taux de sécrétion de chimiokines, de cytokines et de composants de la matrice extracellulaire, suggérant que l'activation mutationnelle de la β -caténine puisse réduire la réponse inflammatoire dans les CHCs chez l'homme.	
Abstract (1600 caractères maximum) : Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the third leading cause of cancer related death and the seventh most frequent cause of cancer worldwide. Generally, this disease emerges in a context of chronic inflammatory disease. Increased proliferation of hepatic progenitor cells in an inflammatory microenvironment leads to genetic instability, with the emergence of mutations. One of the three major mutations arising in HCCs concerns the exon 3 of the <i>CTNNB1</i> gene, associated with a fairly homogeneous and well-differentiated CHC subgroup. Gain-of-function mutations of <i>CTNNB1</i> are associated with low levels of inflammation and fibrogenesis in human HCCs. Therefore, we hypothesized that cells carrying activating <i>CTNNB1</i> mutations could modulate the macrophage activation. We thus studied HCC cells carrying an activating <i>CTNNB1</i> mutation in coculture with monocytes in an inflammatory context. Applying complementary methodological approaches, including the study of over 300 human HCCs, our results confirm that HCC tissues with mutated <i>CTNNB1</i> present low-level inflammation and fibrogenesis and show that this histological picture is linked to low secretion levels of chemokines, cytokines and extracellular matrix components, suggesting that mutational activation of β -catenin could downregulate the inflammatory response in human HCCs.	
Mots-clés : Carcinome hépatocellulaire, β -caténine, immunité tumorale, microenvironnement tumoral Key Words: Hepatocellular carcinoma, β -catenin, inflammation, tumor immunity, tumor microenvironment	