

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale VAS**

présentée par

**Jérémy BOMO**

Préparée à l'unité de recherche Inserm U1085 - IRSET  
Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail  
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Impact des forces de  
tension sur le  
phénotype  
hépatocytaire *in vitro*  
- Caractérisation de la  
matrice de collagène  
dans la fibrose  
hépatique par  
microscopie SHG**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 15 Décembre 2014**

devant le jury composé de :

**Dr Sabine GERBAL-CHALOIN**

CR1 Inserm, U1040 Université de Montpellier /  
*rapporteur*

**Dr Pierre-Yves MORVAN**

Directeur R&D Codif International, Roz-sur-Cousnon  
/ *rapporteur*

**Dr Catherine CORCOS**

MCU UBO, Université de Brest / *examineur*

**Pr Daniel BOUJARD**

Professeur, université de Rennes 1 / *examineur*

**Dr Georges BAFFET**

DR1 Inserm, U1085 Université de Rennes 1 /  
*directeur de thèse*

**Dr Nathalie THERET**

DR2 Inserm, U1085, Université de Rennes 1 / *co-  
directeur de thèse*



## **Remerciements :**

Ce manuscrit conclut 3 années de thèses passées au sein du laboratoire U1085. Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Bernard Jegou pour l'accueil au sein de son unité, ainsi que le Dr. Dominique Lagadic-Gossmann, permettant le bon déroulement de cette thèse.

Je souhaite également exprimer ma sincère reconnaissance au Dr. Sabine Gerbal-Chaloin et Dr. Pierre-Yves Morvan d'avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. Je remercie également le Dr. Catherine Corcos et le Pr. Daniel Boujard pour leur participation en tant que membre du jury.

Je remercie énormément le Dr. Nathalie Théret et le Dr. Georges Baffet pour leur encadrement tout au long de cette thèse. Vous avez su être disponible à chaque instant, malgré vos emplois du temps très chargés. Vous m'avez également laissé une certaine liberté dans le déroulement de cette thèse, ce qui me semble être indispensable pour permettre de s'épanouir dans ses recherches. Je vous remercie également de m'avoir permis de découvrir le monde de la physique, un monde bien obscur pour nous biologistes, mais finalement pouvant nous être tellement important. Votre encadrement a vraiment été exceptionnel, me permettant de réaliser cette thèse de la meilleure manière possible.

Une grande partie de mes remerciements reviennent également à Frédéric Ezan, sans qui tout ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci à lui de m'avoir initié et enseigné tant de techniques, et d'enrichir ainsi mes compétences pour la suite de mon aventure. Merci également pour tout le soutien que tu as su m'apporter dans les moments difficiles (que ce soit lorsque les résultats n'étaient pas de la partie, ou lorsque le temps m'a manqué).

Je tiens également à remercier toute l'équipe 5 : Signalisation et Modélisation, qu'ils soient anciens ou nouveaux. Il ne faut pas se le cacher, on reste la meilleure équipe de l'unité. Je remercie tout d'abord Sophie Langouet pour m'avoir initié au monde merveilleux de l'HPLC. Maintenant, je ne peux concevoir un avenir sans cette merveilleuse technique ;). Merci également à Julie, Jean-Philippe, Gwendoline, Domi, Medjda, Priscilla, Sophie et tout particulièrement Michaël pour les bons moments passés ensemble, et les discussions plus ou moins scientifiques toujours les bienvenues (et je pense que certaines oreilles seront heureuses de ne plus avoir à endurer nos magnifiques duos en culture, dont les paroles de nos chansons étaient toujours très profondes).

Je remercie également les collègues du bureau, que certains appellent mon « harem » avec Medjda, Morgane, Manuella et Fabienne. Merci également pour tous les potins que savent si bien raconter les femmes, ainsi que tous les moments de détente nécessaire lorsque j'arrivais à saturation (pas si souvent au final non ;)).

Un grand Merci également à Kevin, alias Chuck Norris, pour m'avoir apporté une réponse à toutes mes questions, et pour toutes ses conversations (bien trop compliquées à mon goût) concernant

l'informatique. Bon courage pour la dernière ligne droite de ta thèse, par forcément la plus facile je te l'accorde.

Je remercie bien évidemment tous les autres membres de l'unité, et plus particulièrement Eric, Claudie, Normand et Marie, avec qui les petites anecdotes racontées à la cafèt m'ont bien fait marrer tout au long de ces 3 années, même si je n'étais pas le plus assidu aux petites pauses café.

Je remercie également Emmanuel Schaub, Denis Rouède et François Tiaho, les dénommés physiciens, qui ont su m'initier à ce domaine, non sans mal dans les débuts. Cela m'a permis de m'ouvrir à un autre monde que la biologie, et qui m'a permis de comprendre que de nombreux domaines scientifiques sont étroitement liés, et qu'il est nécessaire d'avancer main dans la main. Même si les discussions sont pas toujours très simples, en faisant des efforts de chaque cotés ce n'est pas insurmontable.

Je tiens à finir par remercier ma famille, m'ayant toujours soutenu dans ce projet de thèse, et ayant tout fait pour que celle-ci se passe de la meilleure façon que ce soit. Merci d'avoir toujours été présent et de m'avoir soutenu dans les moments importants de stress (et qu'est ce qu'il y a pu en avoir pendant ces trois ans) et les moments de doutes lorsque les manips ne suivaient plus. Et enfin, on garde toujours le meilleur pour la fin dit-on, je tiens à finir ces remerciements par ma petite Stéphanie, qui a su supporter mon quotidien pendant ces trois ans et m'aidant également à réaliser cette thèse dans les meilleurs conditions possible. Je pense que sans toi, cette thèse n'aurait pas pu se dérouler si bien.





# Sommaire

Liste des Abréviations .....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	3
I) Foie et fonctions hépatiques .....	5
A) L'anatomie du foie.....	5
B) L'organisation du foie.....	5
C) Les Fonctions hépatiques .....	5
D) Les différents types cellulaires du foie .....	8
E) Le cancer du foie.....	10
II) La fibrose hépatique .....	14
A) Réponse inflammatoire et fibrogénèse.....	16
B) Fibrogénèse et matrice extracellulaire .....	18
C) Diagnostics de la fibrose .....	19
D) Traitements de la fibrose.....	20
III) Aspects moléculaires de la fibrose .....	23
A) La matrice extracellulaire .....	23
B) La superfamille du collagène .....	24
C) Les cross-links enzymatiques du collagène .....	29
D) Les cross-links non enzymatique du collagène.....	32
E) Les récepteurs du collagène .....	32
F) La mécanotransduction et les voies de signalisations .....	35
Cadre et Buts du Travail.....	46
RÉSULTATS .....	48
Partie 1 : Impacts des forces de tensions sur le phénotype des cellules hépatiques normales et transformées .....	50
Introduction .....	50

A) Les différents modèles de culture 3D .....	50
B) Le modèle 3D des gels de collagène I.....	51
Résultats .....	53
Partie 2 : Caractérisation du collagène par microscopie SHG dans la fibrose hépatique.....	95
Introduction .....	95
A) Introduction à la microscopie biphotonique et des applications pour le collagène.....	96
B) La microscopie biphotonique.....	96
C) Signal SHG du collagène.....	99
Résultats .....	101
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....	119
MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	135
A) Culture cellulaire en 3D.....	137
B) Culture cellulaire en 3D.....	138
C) Transfection .....	140
D) Etude de la prolifération .....	140
E) Etude de la mort cellulaire.....	141
F) Mesure de l'activité des cytochromes P450 .....	142
G) Western Blot .....	142
H) PCR quantitative en temps réel .....	143
I) Modèle de fibrose murin par CCl <sub>4</sub> .....	144
J) Microscopie Multiphotonique .....	144
K) Analyse des cross-links .....	145
BIBLIOGRAPHIE .....	147
ANNEXES .....	163

## Liste des Abréviations:

- **ADAM** : A Disintegrin And Metalloproteinase
- **ADAMTS**: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
- **ADN**: Acide DéoxyriboNucléique
- **ADP** : Adénosine 5'-diphosphate
- **AGE**: Advanced Glycation End-product
- **AHA**: Amine Hétérocyclique Aromatique
- **BMP1**: Bone Morphogenetic Protein 1
- **BSP**: Bone SialoProtein
- **C3G**: CRK SH3-binding GNRP
- **CCl<sub>4</sub>**: Tétrachlorure de Carbone
- **CYP**: Cytochrome P450
- **DDR** : Discoidin Domain Receptor
- **deH-HLNL**: deHydro-HydroxyLysiNorLeucine
- **deH-LNL**: deHydro-LysiNorLeucine
- **DMN** : DiMéthylNitrosamine
- **DMSO** : Dimethyl Sulfoxide
- **EGF** : Epidermal Growth Factor
- **ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinases
- **FACIT**: Fibrils Associated Collagens with Interrupted Triple helice
- **FAK** : Focal Adhesion Kinase
- **FGF** : Fibroblast Growth Factor
- **FOS** : First Order Statistics
- **GAG** : Glycosaminoglycane
- **GAP** : GTPase Activating Proteins
- **GGT** : Galactosylhydroxylsyl GlucoTransferase
- **GLCM** : Gray Level Co-occurrence Matrix
- **GPVI** : GlycoProtein VI
- **Graf** : GTPase Regulator Associated with Focal adhesion kinase
- **Grb** : Growth factor Receptor-Bound protein
- **GST**: Gluthatione S-Transferase
- **GT**: hydroxylsyl GalactoTransferase
- **GTP**: Guanosine TriPhosphate
- **HCC**: Hépatocellular Carcinome
- **HGF**: Hepatocyte Growth Factor
- **HHL**: HistidinoHydroxylsiniNorLeucine
- **HLKNL**: HydroxyLysino-Keto-NorLeucine
- **HSP**: Heat Shock Proteins
- **HP**: Hépatectomie Partielle
- **HSC**: Hepatic Stellate Cell
- **IL**: InterLeukine
- **IRM**: Imagerie par résonance magnétique
- **ITAM** : Immunoreceptor Tyrosine Activation Motif
- **ITIM**: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
- **JNK** : Jun N-terminal Kinases
- **LAIR-1**: Leukocyte-Associated Ig-like Receptor-1
- **LAP**: Latency Associated Protein
- **LH** : Lysine Hydroxylase
- **LTBP-1**: Latent TGF- $\beta$  Binding Protein 1
- **LKNL**: Lysino-Keto-NorLeucine
- **MAPK** : Mitogen Associated Protein Kinases
- **MEC** : Matrice ExtraCellulaire
- **MEK** : MAP ERK Kinase
- **MLC** : Myosin Light Chain
- **MLCK** : Myosin Light Chain Kinase
- **MMP** : Matrix MetalloProteinase
- **MR** : Mannose Receptor
- **MRTF** : Myocardin Related Transcription Factor
- **NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphatase
- **NAFLD** : NonAlcoholic Fatty Liver Disease
- **NASH** : NonAlcoholic SteatoHepatitis
- **NK**: Natural Killer
- **OCN**: OstéoCalciNe
- **PDGF**: Platelet-Derived Growth Factor
- **PFA**: ParaFormAldéhyde
- **PI3K** : PhosphoInositol-3 Kinase
- **PIP2** : Phosphatidyl Inositol biPhosphate
- **PKA** : Protein Kinase A
- **PLA<sub>2</sub>R** : M-type PhoshoLipase A<sub>2</sub> receptor
- **PLC $\gamma$**  : PhosphoLipase C  $\gamma$
- **PTEN** : Phosphatase and TENsin homolog
- **ROCK** : Rho associated protein kinase

- **ROS**: Reactive Oxygen Species
- **RTK** : Récepteurs Tyrosines Kinases
- **$\alpha$ -SMA** :  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin
- **SAC** : Stretch Activated Channel
- **SHG** : Second Harmonic Generation
- **SOCS** : Suppressors of Cytokines Signaling
- **SREBPs** : Sterol Regulatory Element Binding Proteins
- **SRF** : Serum Response Factor
- **STAT** : Signal Transducer and Activators of Transcription
- **TAA**: Thioacétamide
- **TACS**: Tumor Associated Collagen Signature
- **TGF- $\beta$** : Transforming Growth Factor- $\beta$
- **TIMP**: Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
- **TNF**: Tumor Necrosis Factor
- **TPEF**: Two Photon Excitation Fluorescence
- **TRP**: Transcient Receptor Potential
- **VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor
- **VHB et VHC**: Virus de l'Hépatite B et C

# **INTRODUCTION GENERALE**



## **I) Foie et fonctions hépatiques**

### ***A) L'anatomie du foie***

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Son poids est approximativement de 1500g chez l'homme et il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen. Le foie est constitué par 4 lobes chez l'homme : les 2 plus gros correspondant au lobe gauche et lobe droit, et 2 plus petits correspondant au lobe caudé (ou lobe de Spiegel) et lobe carré. Le foie est recouvert d'une membrane fibreuse : la membrane de Glisson. Au niveau de la partie inférieure du foie se trouve le hile hépatique, regroupant les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les nerfs, et les canaux biliaires (Fig.1).

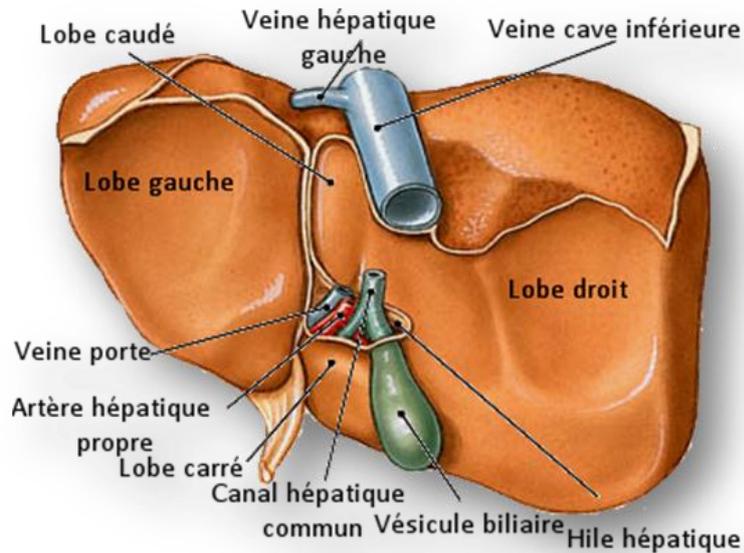
La vascularisation hépatique est dite mixte. En effet le sang est apporté d'une part par l'artère hépatique provenant de l'aorte et amenant le sang oxygéné, et d'autre part par la veine porte amenant le sang du tube digestif et de la rate, riche en nutriments. Le sang arrive dans les sinusoides hépatiques (entre les travées d'hépatocytes) qui se réunissent au centre du lobule hépatique en une veine centrolobulaire. Les veines hépatiques, permettant le retour du sang vers le cœur, sont nommées veines sus-hépatiques et se jettent dans la veine cave inférieure.

### ***B) L'organisation du foie***

L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique de forme hexagonale. Le foie est constitué d'environ 1 million de lobules hépatiques. Ils sont formés par un arrangement spécifique des hépatocytes en travées hépatocytaires bordant les sinusoides où se mélange le sang provenant de l'artère hépatique et de la veine porte (Fig.2). Ces sinusoides se rejoignent au centre du lobule dans la veine centro-lobulaire. Les lobules hépatiques sont délimités en périphérie par les espaces portes, zones composées de l'artère hépatique, la veine porte et d'un canal biliaire. Au niveau des contacts latéraux entre les hépatocytes, on trouve les canalicules biliaires permettant le transport de la bile. Ces canalicules biliaires sont formés par les jonctions serrées entre 2 hépatocytes, avec un diamètre d'environ 1µm. Au niveau de leurs membranes latérales, les hépatocytes possèdent également des desmosomes et gap junctions permettant les échanges entre les cellules.

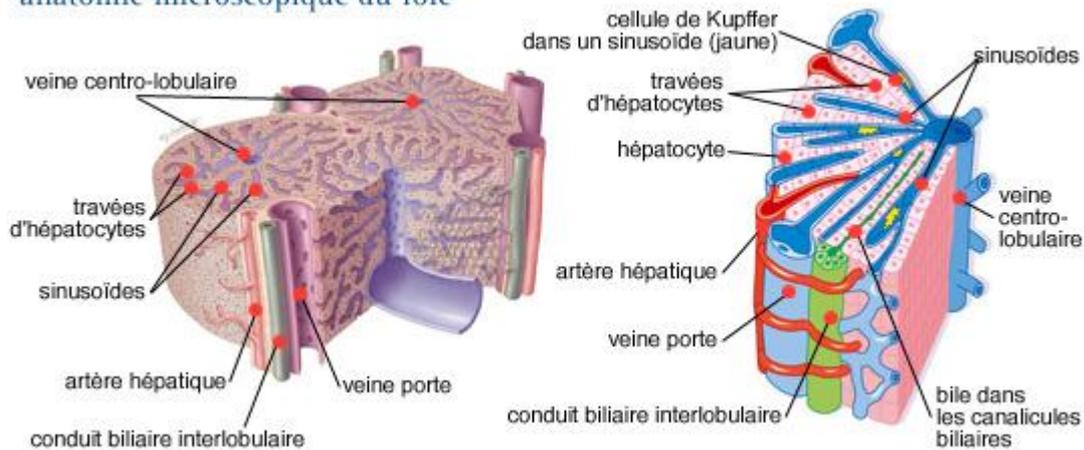
### ***C) Les Fonctions hépatiques***

Le foie réalise plus de 500 fonctions métaboliques dont les produits sont relargués dans la circulation sanguine, telles que le glucose provenant de la glycogénèse, les protéines plasmatiques, les facteurs de coagulation, l'urée. Le foie est également un organe de stockage, avec notamment l'accumulation du glycogène, de la graisse et des vitamines liposolubles et à un rôle important dans la



**Figure 1 : Anatomie du foie chez l'homme** Le foie est constitué de 4 lobes (gauche, droite, caudé et carré). Il est irrigué par la veine porte et l'artère hépatique. Le canal hépatique permet la circulation de la bile jusqu'au duodénum. ([http://angiocholite.blogspot.fr/2009\\_05\\_01\\_archive.html](http://angiocholite.blogspot.fr/2009_05_01_archive.html))

#### anatomie microscopique du foie



**Figure 2 : Organisation du lobule hépatique** Le lobule hépatique est constitué de travées hépatocytaires. Entre deux travées se trouvent les capillaires sinusoides se rejoignant dans la veine centro-lobulaire. Sur les faces latérales des hépatocytes se trouvent les canalicules biliaires. L'ensemble canal biliaire, artère hépatique et veine porte constitue un espace porte. (<http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancers-du-foie/maladie/anatomie-physiologie.html>)

détoxification, étant le premier organe en contact des substances absorbées par le système digestif.

- **Métabolisme des glucides**

Une des fonctions du foie est de réguler la glycémie en synthétisant du glycogène ou des lipides (acides gras et glycérol), et de libérer du glucose pendant les périodes de jeûne pour maintenir la glycémie à sa valeur normale (entre 3.9 et 6.1mmol/L, soit 0.8 et 1 g/L). Pour cela, le foie dispose de 3 voies métaboliques :

- La glycogénogénèse : une synthèse du glycogène qui permet le stockage du glucose dans le foie sous forme de glycogène.
- La glycogénolyse : la phosphopyrolyse du glycogène pour libérer du glucose, donc le déstockage du glycogène.
- La néoglucogenèse : une synthèse de glucose à partir d'éléments non glucosidiques, tels que les acides aminés.

- **Métabolisme des lipides**

Le foie joue également un rôle important dans l'homéostasie des lipides et du cholestérol. En effet, le foie est capable de synthétiser du cholestérol, mais également de le dégrader en acides biliaires permettant son élimination. Il est le seul organe de l'organisme permettant l'élimination du cholestérol. De plus, le foie est impliqué dans la production de triglycérides et lipoprotéines. Enfin, le foie est un lieu de stockage de vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, K et E.

- **Métabolisme des protéines**

Le foie est également impliqué dans le catabolisme des acides aminés non utilisés par l'organisme. Il peut se servir de ces acides aminés pour reformer des protéines (principalement des enzymes) ou les éliminer sous forme d'urée. Le foie est également à l'origine de la production de la majorité des protéines plasmatiques telles que l'albumine, des transporteurs, des inhibiteurs de protéase, des facteurs de coagulation...

- **Production de la bile hépatique**

La bile est formée et sécrétée par les hépatocytes. Elle résulte à la fois de sécrétions et d'excrétions. Les produits de sécrétion sont les phospholipides, immunoglobulines A, acides biliaires. Les produits d'excrétion sont le cholestérol, les pigments biliaires (déchets provenant de la dégradation de l'hémoglobine), les métabolites des xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme). Le principal rôle de la bile est de favoriser l'absorption des graisses grâce aux sels biliaires. La bile est sécrétée en continu par le foie et stockée dans la vésicule biliaire.

- **Détoxification**

Le foie possède également un rôle important de détoxification de l'organisme. Il permet l'élimination des xénobiotiques et l'élimination de déchets ammoniacés par excrétion biliaire ou urinaire via la circulation sanguine. En effet, il possède un système enzymatique complexe permettant le catabolisme de nombreuses drogues (médicaments, alcool et toxines). Il permet ainsi la décontamination du sang mais est également la cible de nombreuses agressions par ces différents toxiques.

### ***D) Les différents types cellulaires du foie***

Le foie est constitué à 80% par les hépatocytes. Les autres types cellulaires sont les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer (macrophages), les cellules étoilées, les cellules épithéliales biliaires et les cellules ovales (progéniteurs hépatiques).

Au niveau des lobules hépatiques, les hépatocytes sont organisés en travées cellulaires, avec les capillaires sinusoides sur leurs 2 faces, qui leurs permettent d'être en contact avec les capillaires sanguins via l'espace de Disse (pôles sinusoidaux). Un pôle biliaire est formé par la présence de jonctions serrées entre 2 hépatocytes voisins sous forme de gouttière correspondant au canalicule biliaire. Leur pôle sinusoidal se caractérise par la présence de microvillosités permettant d'augmenter grandement leur surface d'échange, notamment pour la sécrétion des protéines plasmatiques ou la captation des toxines (Fig.3).

- **Les hépatocytes**

Les hépatocytes sont les cellules qui assurent la majorité des fonctions métaboliques du foie, constituant la majeure partie du parenchyme hépatique. Les hépatocytes sont de forme polyédrique et possèdent une durée de vie d'environ 300 jours. Ce sont de grosses cellules de 20 à 40µm. Dans les conditions physiologiques, très peu d'hépatocytes se divisent, avec en moyenne 1 division pour 20 000 cellules (Koniaris *et al.* 2003). Selon leur localisation au niveau du lobule hépatique, les hépatocytes présentent des gradients métaboliques, avec par exemple un gradient d'expression des CYP (cytochromes P450) de l'espace porte à l'espace centrolobulaire (Ratanasavanh *et al.* 1991). Ainsi les hépatocytes proches des systèmes portes sont en relation avec du sang fortement oxygéné et ont des fonctions d'oxydation très actives (gluconéogénèse, β-oxydation des acides gras et synthèse du cholestérol), alors que les hépatocytes proches de la veine centrolobulaire participent plus fortement à la glycolyse, lipogénèse et détoxification. Ils possèdent de nombreux organites (mitochondries, réticulum endoplasmique et lysosomes) reflétant une forte activité métabolique. Ils possèdent également un ou plusieurs noyaux volumineux, avec un nucléole important et une forte activité transcriptionnelle. Chez le rat adulte, environ 70% des hépatocytes sont tétraploïdes, 15-20% sont octoploïdes et seulement 10-15% sont diploïdes. Chez l'homme adulte, environ 50% des hépatocytes

sont diploïdes. Dans ces deux espèces, environ un tiers des hépatocytes est binucléé (Seglen 1997). Le rôle de ces polynucléations n'est pas clairement démontré mais elles pourraient avoir un rôle dans la protection contre les génotoxiques en augmentant le nombre de copies des gènes.

- **Les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales longent les sinusoides et possèdent de larges pores avec un diamètre de 0.1 à 0.3  $\mu\text{m}$ , ce qui permet de faciliter le passage des molécules entre le sang et les hépatocytes (Cogger *et al.* 2010). De plus, ces cellules ne possèdent pas de lame basale, facilitant les échanges. Cette fenêtration varie le long du sinusoides hépatique, avec des diamètres plus importants mais des pores moins nombreux dans la région portale, et des diamètres plus petits mais des pores en plus grand nombre dans la région centrolobulaire. De plus, ces cellules possèdent une forte capacité d'endocytose et participent ainsi à l'élimination de déchets présents dans le sang (Sorensen *et al.* 2012). Le principal facteur pour maintenir les cellules endothéliales dans un état différencié et fonctionnel est le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), principalement produit par les hépatocytes et les cellules étoilées (DeLeve *et al.* 2004).

- **Les cellules de Kupffer**

Ce sont des macrophages situés dans la lumière des capillaires sinusoides et aux intersections de leurs ramifications. Ils ont pour rôle de phagocyter les substances étrangères qui arrivent de l'intestin avant de gagner la circulation générale. En association avec les cellules endothéliales, ils forment la première barrière pour capter les toxines provenant de la veine porte. Ils jouent également un rôle important dans l'homéostasie hépatique de part leur capacité, après activation, à produire de grandes quantités de facteurs de croissance, cytokines inflammatoires et ROS (Reactive Oxygen Species).

- **Les cellules épithéliales biliaires (cholangiocytes)**

Ce sont des cellules polarisées cubiques qui forment les canaux biliaires, reposant sur une lame basale. Les domaines apicaux et basolatéraux de la membrane de ces cellules sont séparés par des jonctions serrées qui contribuent au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. En plus de leur rôle de barrière, l'épithélium biliaire participe à la sécrétion biliaire en modifiant la composition de la bile hépatocyttaire, par absorption ou sécrétion d'eau, d'électrolytes et de bicarbonates.

- **Les progéniteurs hépatiques : cellules ovales**

Les cellules progénitrices résidentes sont issues du canal de Hering situé entre les travées d'hépatocytes et les canaux biliaires. Elles sont d'origine intra ou extra-hépatique et ont la particularité de pouvoir se différencier en hépatocytes ou en cellules épithéliales biliaires (Sell 2001) selon leur environnement et les facteurs de croissances auxquelles elles sont soumises. Ces cellules peuvent ainsi

réparer le tissu lésé lorsque les hépatocytes ne sont plus fonctionnels et plus capables de se diviser (Libbrecht and Roskams 2002).

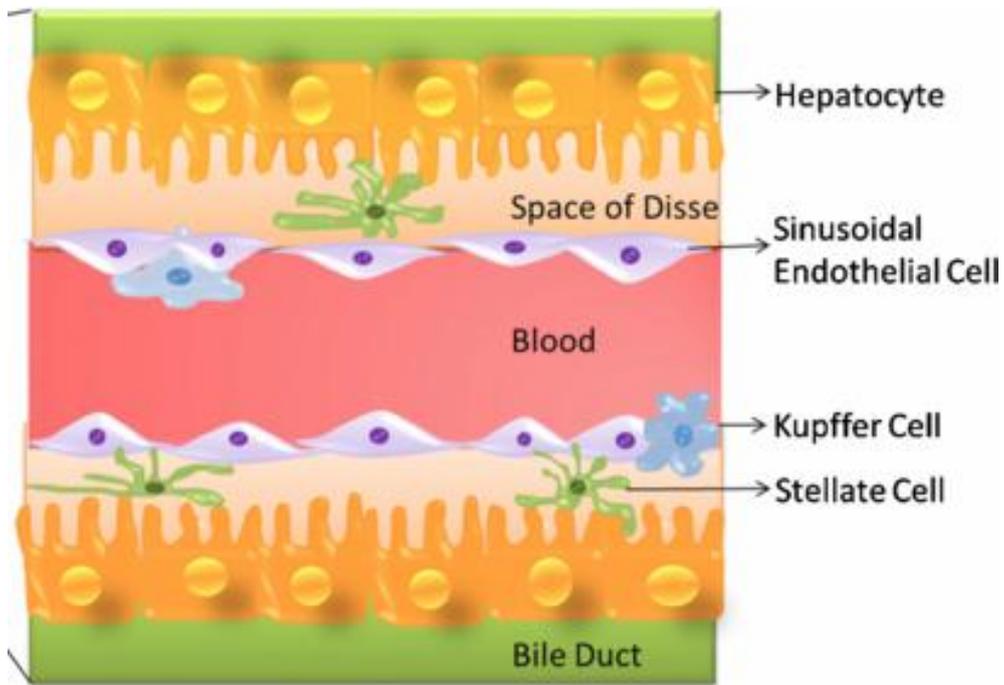
- **Les cellules étoilées**

Les cellules étoilées sont situées dans l'espace de Disse et leur activation constitue le phénomène central de la fibrogénèse. Dans des conditions physiologiques, ces cellules sont quiescentes et stockent la vitamine A sous forme de rétinoïdes (Blaner *et al.* 2009). Effectivement, 50 à 80% des rétinoïdes totales de l'organisme sont stockés dans le foie, dont 80 à 90% dans les cellules étoilées. Lors des pathologies d'inflammations chroniques (virus ou toxiques), les cellules étoilées sont activées, perdent leur vitamine A, ont un appareil de Golgi très développé et se transdifférencient en myofibroblastes, acquérant des propriétés de prolifération, contractilité, chimiotactisme et de production de matrice extra-cellulaire (Friedman 2008). Elles ont ainsi la capacité de se multiplier et de migrer dans la zone inflammatoire et d'y déposer de grandes quantités de MEC pour permettre une cicatrisation de la lésion. Elles y produisent notamment des quantités importantes de collagène I et de TGF- $\beta$ , qui induisent des perturbation des fonctions hépatiques et de l'architecture du foie (Lee and Friedman 2011), aboutissant au développement fibrotique.

### ***E) Le cancer du foie***

Les maladies du foie sont un problème de santé très importante de nos jours. En effet, plus de 2 millions de personnes sont concernées en France (dont 325 000 souffrant de cirrhose hépatique). La moitié concerne des personnes atteintes d'hépatite virale (Virus de l'hépatite B et C principalement) ou ayant un problème d'alcoolisme chronique, la seconde moitié correspondant à des foies atteints de stéatose hépatique non alcoolique. Il existe plus de 100 pathologies liées au foie. Ces maladies hépatiques chroniques aboutissent au développement d'une fibrose, pouvant évoluer vers une cirrhose, ainsi qu'au développement d'un cancer. La difficulté de diagnostiquer cette maladie est due au fait que bien souvent aucun symptôme n'est apparent, et le diagnostic se fait donc souvent à un stade tardif de la maladie.

Le carcinome hépatique est le 6<sup>ème</sup> au rang mondial en termes de fréquence (environ 782 000 nouveaux cas en 2012, correspondant à 6% des nouveaux cas de cancers), et est la 3<sup>ème</sup> cause de décès par cancer dans le monde avec environ 600 000 chaque année (Ferlay J 2013). La majorité des cas se développe dans les pays en voie de développement (82% des cas, avec 55% pour la Chine) (Parkin *et al.* 2005). Le développement de cancer du foie est fortement corrélé à la présence d'une cirrhose avec plus de 90% des cas de cancers du foie se développant dans un foie cirrhotique (Muller 2006). Le pronostic vital des personnes atteintes de ce cancer reste mauvais de nos jours, notamment dû à un pronostic tardif. Il existe principalement 4 stratégies thérapeutiques. La chimiothérapie est tout d'abord envisageable (doxorubicine, 5-fluorouracile et cisplatine), avec des traitements de chimioembolisation, pour bloquer l'arrivée du sang alimentant les tumeurs. Lorsque les tumeurs sont



**Liver Sinusoidal Functional Unit**

**Figure 3 : Organisation cellulaire du foie au niveau sinusoidal** Les travées hépatocytaires sont bordées par un vaisseau sinusoidal contenant les cellules de Kupffer. Les hépatocytes sont séparés de la circulation sanguine par des cellules endothéliales fenestrées. Entre les hépatocytes et les cellules endothéliales se retrouve l'espace de Disse contenant les cellules étoilées. (Kang *et al.* 2013)

de petite taille et que leur localisation le permet, il est également possible de les détruire à travers la peau par radiofréquence. Si les tumeurs sont trop grandes mais que le foie reste fonctionnel, il est possible de réaliser une ablation partielle du foie, permettant d'enlever la tumeur. Lorsque le foie ne fonctionne plus correctement, la transplantation hépatique est alors requise. Il est à noter que la présence de petits foyers cancéreux est un frein à l'efficacité de ces traitements (Blum 2005).

Selon l'origine cellulaire du développement tumoral, les cancers primitifs du foie sont divisés en 3 catégories : hépatocarcinome pour les hépatocytes, cholangiocarcinome pour les cellules des canaux biliaires ou angiosarcome à partir des vaisseaux sanguins.

- **Les hépatocarcinomes :**

Le carcinome hépatocellulaire (HCC : HepatoCellular Carcinoma) est le cancer primaire du foie le plus fréquent, représentant plus de 85% de ces cancers (Kew 2002). Une infection chronique par le virus de l'hépatite B ou C augmente le risque de développer un HCC. En effet, ces infections virales sont retrouvées dans 70% des cas d'HCC, et le traitement de ces infections diminue fortement le risque de développer la pathologie (El-Serag 2012). D'autres facteurs de risques sont répertoriés, tels que la cirrhose alcoolique, la stéatose hépatique non alcoolique, la stéatohépatite non alcoolique et des syndromes métaboliques. Les deux principaux traitements sont la résection ou transplantation hépatique, mais uniquement 20% des patients peuvent prétendre à ces traitements (principalement à cause d'un diagnostic souvent trop tardif). Pour les 80% des patients restants, la seule thérapie approuvée est l'utilisation de la chimiothérapie, mais possédant des effets secondaires non désirés dans 80% des cas, et seulement 20% des patients ont une bonne réponse à ce traitement. La survie médiane des HCC est de 8 mois, avec des taux de survie à 1 et 3 ans de 20% et 5% respectivement. De nombreux efforts se portent pour identifier des biomarqueurs pour détecter précocément la maladie. Ainsi l' $\alpha$ -fétoprotéine (Marrero *et al.* 2009), le glypican-3 (Lee *et al.* 2014), le Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Song *et al.* 2002) et plus récemment des micro ARNs ont été trouvés (Qu *et al.* 2011).

Le carcinome fibrolamellaire, une forme particulière et rare d'HCC apparaît plutôt chez les jeunes personnes (de moins de 40 ans), avec 90% des cas survenant avant l'âge de 25 ans (Chun and Zimmitti 2013). Il a la particularité de se développer sur un foie sain (sans cirrhose) chez des patients n'ayant aucune maladie chronique du foie ou hépatite virale. La tumeur est composée de cordons de cellules hépatocytaires néoplasiques séparées par des travées fibreuses. Ces travées fibreuses fusionnent parfois pour former une cicatrice centrale. La croissance de cette tumeur est plutôt lente et son pronostic est meilleur que celui de l'HCC. Les tumeurs sont bien délimitées avec des tailles pouvant atteindre 10 à 20 cm. Il est très rarement retrouvé des lésions satellites, des métastases ganglionnaires ou pulmonaires.

La quantité en fer est également un facteur aggravant pour le développement d'HCC. En effet, une surcharge en fer de l'organisme, appelée hémochromatose, est une maladie héréditaire où l'organisme absorbe trop de fer de l'alimentation. Une étude de Hezode et collaborateurs (Hezode *et al.* 1999) a démontré la prévalence de cette surcharge principalement pour les patients atteints de cirrhose, avec 78.9% des patients atteints de cirrhose étant en surcharge de fer. Cette accumulation de fer aggrave les lésions hépatiques, notamment lors de la fibrose, responsable d'une plus forte probabilité d'évoluer vers l'HCC.

- **Le cholangiocarcinome**

Ce type de cancer est beaucoup plus rare, représentant moins de 10% des cancers primaires du foie (mais correspondant au second cancer hépatique en terme de fréquence). La tumeur se développe à partir de l'épithélium des canaux biliaires intrahépatiques ou extrahépatiques. Le diagnostic est également sombre avec une survie à 5 ans de moins de 5% (Khan *et al.* 2005). Ce type de cancer est subdivisé en 3 groupes : les « mass-forming » qui forment une masse située dans le parenchyme hépatique (le plus fréquent, représentant environ 59% des cholangiocarcinomes), les péricanalaire infiltrant qui s'étendent de manière longitudinale le long des canaux biliaires, et les intracanales qui prolifèrent vers la lumière des canaux biliaires (Yamasaki 2003). Le traitement préférentiel pour ce type de cancer est le recours à la chirurgie pour une résection de la tumeur. Si cette option ne peut être utilisée, la chimiothérapie est envisagée, avec l'association de gemcitabine et cisplatine. La majorité des cholangiocarcinomes se développe *de novo*, et ce n'est que récemment que la cirrhose et les infections virales par VHB (virus de l'hépatite B) et VHC (virus de l'hépatite C) ont été démontrées comme facteurs de risques. Le faible pronostic de ce cancer vient du fait qu'il n'y a aucun symptôme spécifique, rendant le diagnostic très tardif.

- **L'angiocarcinome**

Cette tumeur représente seulement 2% des cancers primaires du foie (Neshiwat *et al.* 1992). Ils se développent à partir des structures mésenchymateuses, avec pour origine les cellules endothéliales délimitant les sinusoides hépatiques. Il est souvent lié à une intoxication chronique à un carcinogène, tel que le chlorure de vinyle : monomère du polychlorure de vinyle (PVC), l'arsenic ou le thorostrat (ancien produit de contraste en radiologie) et son évolution est très rapide.

- **Les tumeurs hépatiques secondaires**

Le foie est le premier site métastatique pour différents cancers de l'organisme du fait de sa grande vascularisation. Ainsi, tous les types de cancers, à l'exception des tumeurs cérébrales, peuvent métastaser dans le foie. Les plus fréquentes sont les métastases issues des cancers digestifs : côlon, pancréas et estomac.

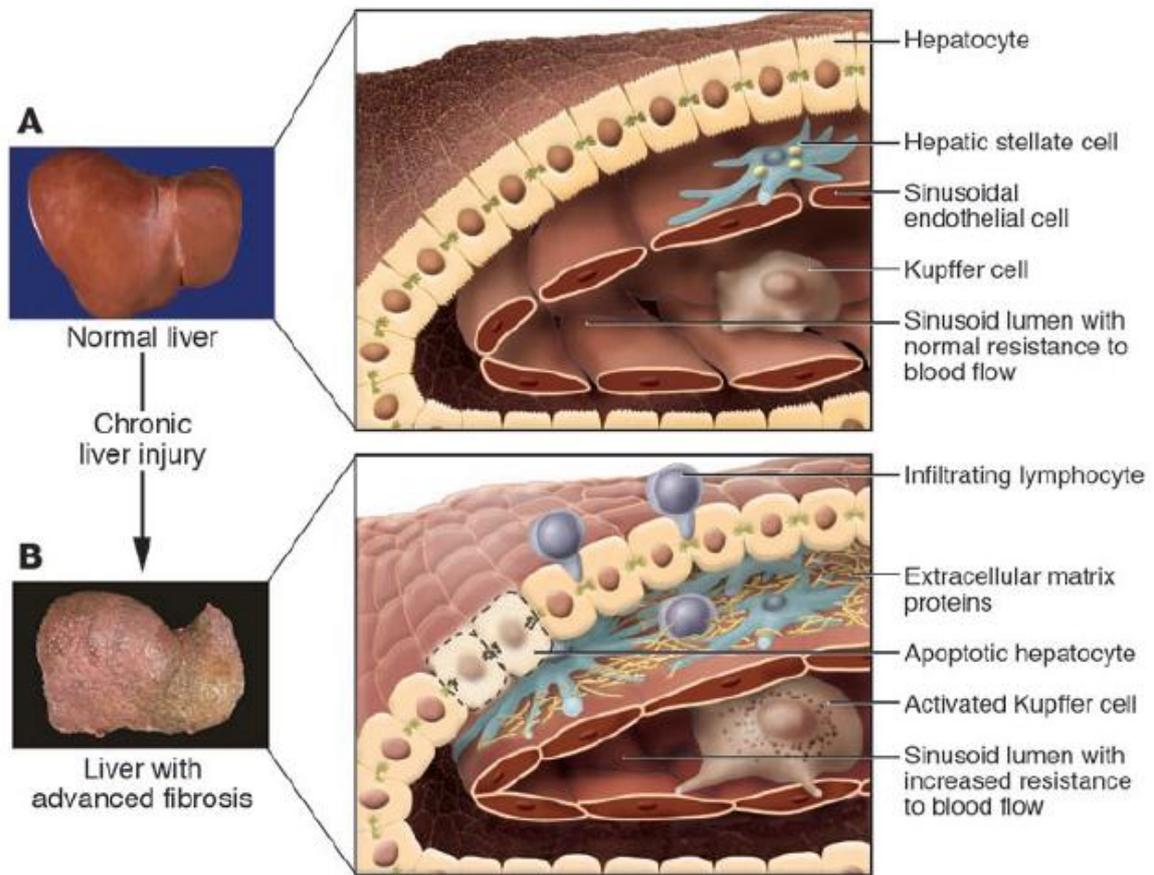
## II) La fibrose hépatique

La fibrose est un problème de santé publique avec une mortalité liée à la cirrhose et au développement de cancers de 1.5 millions de personnes par an dans le monde. Une proportion identique est retrouvée pour la France, avec 15 000 décès par an (Poynard *et al.* 2010). La prévalence estimée pour la cirrhose, stade ultime de la fibrose, est de 4.5 à 9.5% de la population générale, correspondant à plusieurs centaines de millions de patients dans le monde. Cependant, ces chiffres semblent sous-estimer la réalité, puisque 40% de patients atteints de cirrhose sont asymptomatiques (Lim and Kim 2008).

La fibrose hépatique résulte de dommages chroniques du foie, aboutissant à l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) (Fig.4). Ces agressions peuvent être de diverses origines, telles que les virus, des maladies auto-immunes, des drogues, des xénobiotiques, des maladies cholestatiques (détérioration du flux de la bile) et métaboliques (stéatose hépatique non alcoolique). La fibrose est d'abord un mécanisme de cicatrisation dont le but est de réparer les tissus lésés en cas d'agression et de restaurer l'architecture hépatique. En cas d'agression chronique, la réparation échoue et la fibrose évolue vers une cirrhose qui constitue le risque majeur de survenue d'un HCC.

La cirrhose hépatique est caractérisée histologiquement par la présence de nodules de régénération entourés par des cloisons fibreuses denses entraînant la disparition du parenchyme et provoquant des altérations architecturales et fonctionnelles du foie. Des septa fibrotiques relient les espaces portes entre eux, ainsi que les veines centrales, aboutissant à des zones de parenchyme entourées de tissus fibrotique sans relation avec une veine centrale. Les principales conséquences sont la perte de fonctions hépatocytaires, une augmentation de la résistance pour le flux sanguin portal (hypertension portale), et le développement d'HCC (Schuppan and Afdhal 2008). Ce stade de la pathologie se caractérise par un dysfonctionnement hépatocellulaire, une insuffisance hépatique grave et une hypertension portale.

La cirrhose hépatique est fortement associée au développement d'HCC, avec 90% des cas d'HCC se développant à partir d'un foie cirrhotique (Seitz and Stickel 2006). Le développement d'HCC peut être relié à une infection par HBV (Yuen *et al.* 2009), ou HCV (Lok *et al.* 2009), une cirrhose alcoolique (Fattovich *et al.* 2004), une stéatohépatite non alcoolique (Ascha *et al.* 2010) ou une hémochromatose (Kowdley 2004). Malgré toutes ces relations, les mécanismes reliant la fibrose et l'HCC ne sont pas complètement établis. Plusieurs facteurs semblent importants : l'augmentation de la signalisation via les intégrines, la stimulation paracrine entre HSCs (Hepatic Stellate Cells) et hépatocytes, l'augmentation de la rigidité matricielle, la séquestration de facteurs de croissances par la MEC et la diminution de la surveillance tumorale par les cellules NK (Natural Killer). Ces trois points



**Figure 4 : Modifications architecturales lors du développement de la fibrose hépatique.** En A est représenté le foie dans des conditions normales, sa morphologie ainsi que la composition cellulaire au niveau d'un sinusoïde hépatique. En B est représenté le foie fibrotique, sa morphologie ainsi que les mécanismes cellulaires à l'origine de la pathologie. (Bataller and Brenner 2005)

sont rapidement développés :

- Augmentation de la signalisation des intégrines : l'accumulation des collagènes I et III, ainsi que de la fibronectine au cours de la fibrose induit une activation importante des intégrines via les voies de signalisations PI3K (PhosphoInositol-3 Kinase) et MAPK (Mitogen Associated Protein Kinases) (Cox *et al.* 2010). Cette relation est confirmée par une étude qui corrèle l'expression du collagène et des intégrines avec la tumorigénicité (Lai *et al.* 2011).

- Relations paracrines entre les cellules étoilées et les hépatocytes : les HSCs favorisent le développement tumoral par la synthèse de facteurs de croissance. En effet, après activation, elles synthétisent de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), de l'interleukine 6 et le Wnt ligands, qui favorisent la prolifération hépatocytaire (Friedman 2008). Les myofibroblastes peuvent également activer la prolifération et migration des hépatocytes par la production de PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et TGF- $\beta$  (van Zijl *et al.* 2009).

- Séquestration de facteurs de croissance par la MEC : de nombreuses cytokines sont séquestrées par la MEC, dont le FGF (Fibroblast Growth Factor), le TGF- $\beta$ , le BMP (Bone Morphogenetic Protein), le Wnt et de nombreuses interleukines. Les Matrix MetalloProtéases (MMPs) peuvent ensuite activer ou inhiber les signalisations via ces facteurs de croissance (Faktor *et al.* 1980). En effet, elles peuvent libérer les facteurs de croissances de la MEC, mais également cliver leurs récepteurs à la surface cellulaire. Par ce mécanisme de rétention et de relargage, la MEC joue donc un rôle primordial sur les réponses des hépatocytes aux facteurs de croissance et cytokines.

- Augmentation de la rigidité matricielle : la rigidité du stroma hépatique précède et accompagne la fibrose hépatique (Georges *et al.* 2007). L'augmentation de rigidité du foie, estimée par élastographie, est associée à une augmentation du risque de développer un HCC (Masuzaki *et al.* 2008).

Lors des agressions hépatiques, une réponse inflammatoire se met en place, étant à l'origine de la fibrogénèse et du développement fibrotique. Les mécanismes de cette réponse inflammatoire sont maintenant présentés.

### ***A) Réponse inflammatoire et fibrogénèse***

Différents facteurs sont à l'origine du développement de la fibrose et les mécanismes impliqués lors des fibroses alcooliques ont été particulièrement étudiés. A la suite d'une absorption d'alcool, une modification de la flore intestinale recouvrant le tube digestif se produit, altérant sa motilité, ce qui favorise la croissance bactérienne. On note une augmentation de la perméabilité des intestins, qui augmente l'exposition du foie aux agents toxiques provoquant une inflammation. Cette inflammation aboutit notamment à la production d'un stress oxydatif avec production de composés oxydants via la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphatase) oxydase (Wheeler *et al.* 2001, Bode and Bode 2005). L'atteinte des hépatocytes par l'alcool peut également directement

aboutie à leur apoptose et production de ROS. Pour les fibroses développées à la suite d'une infection par le VHC, il a été décrit une augmentation du stress oxydatif en réponse à l'infection, favorisant ainsi le recrutement de cellules inflammatoires (Bataller *et al.* 2004).

Lors de cette réaction inflammatoire, de nombreuses interactions entre les différentes cellules du foie se produisent, avec la production de nombreuses cytokines jouant un rôle important dans le développement de la pathologie. Les cellules de Kupffer sont à l'origine de la production d'un large panel de cytokines et des formes actives de l'oxygène, ainsi que du PDGF en partie responsable de l'activation des HSCs en myofibroblaste. L'inhibition chimique de l'activité des cellules de Kupffer entraîne une diminution du développement de la fibrose induite par CCl<sub>4</sub> chez le rongeur (Rivera *et al.* 2001), dont le principe est expliqué dans la partie résultats. Les cytokines permettent le recrutement des leucocytes résidents du foie au niveau de la zone lésée (Bilzer *et al.* 2006). Le mécanisme est facilité par une modification de la surface des cellules endothéliales qui vont exprimer des protéines d'adhésion permettant le passage des leucocytes (Jaeschke and Hasegawa 2006). Dans certains cas, la réponse immunitaire peut générer des anticorps dirigés contre des antigènes du patient, aboutissant au développement d'une hépatite auto-immune (Manns and Vogel 2006).

L'activation des HSCs est le phénomène central du développement de la fibrogénèse, et le TGF- $\beta$  joue un rôle essentiel dans ce mécanisme (Gressner *et al.* 2002). Le TGF- $\beta$  agit sur les HSCs pour activer leur différenciation en myofibroblastes sécréteurs de matrice (Geerts 2001). Il stimule la prolifération et la migration, permettant aux myofibroblastes d'atteindre le site inflammatoire. Plusieurs études ont démontré que l'inhibition de production de TGF- $\beta$  permet de diminuer le développement de la fibrose (Shek and Benyon 2004). En plus de son action dans la stimulation de production de MEC, le TGF- $\beta$  joue également un rôle sur la dégradation de la MEC en inhibant de manière indirecte certaines métalloprotéases matricielles, augmentant ainsi le déséquilibre entre production et dégradation. De plus, le PDGF produit par les cellules de Kupffer, dont l'expression est fortement augmentée au cours de la fibrose (Pinzani *et al.* 1989) peut également activer les HSCs et induire une augmentation de la production de MEC. Lors d'une infection par le VHC, de nombreuses protéines virales peuvent stimuler les HSCs et induire leur production de MEC (Schulze-Krebs *et al.* 2005).

D'autres cytokines jouent également un rôle important dans le renouvellement des hépatocytes après nécrose ou apoptose. Le TNF $\alpha$  et l'IL-6 interviennent au cours de la phase d'initiation de la régénération hépatique. L'HGF et l'EGF (Endothelial Growth Factor) stimulent la progression des hépatocytes en phase S (Fausto *et al.* 2006). Lorsque la capacité de prolifération n'est plus suffisante pour pallier la perte cellulaire, les hépatocytes sont remplacés par du tissu fibreux.

## ***B) Fibrogénèse et matrice extracellulaire***

La fibrose est le résultat d'un mécanisme de cicatrisation du foie suite à des agressions répétées. Après une lésion hépatique aigüe, les cellules parenchymateuse régénèrent et remplacent les cellules nécrotiques ou apoptotiques. Ce processus est accompagné d'une réaction inflammatoire et d'un dépôt très faible de MEC. Lorsque l'agression persiste, la régénération hépatique n'est plus capable de renouveler le tissu lésé, et les hépatocytes sont remplacés par de la MEC, et notamment par du collagène fibrillaire. La distribution de la MEC dépend de l'origine de l'agression. Si celle-ci est due à une hépatite virale ou un désordre cholestatique chronique, la fibrose se développera à partir des espaces portes. Pour les fibroses liées à un alcoolisme chronique, elles se développent à partir des zones péri-centrales et péri-sinusoïdales. Lorsque la pathologie se développe, la progression du dépôt de collagène dans le parenchyme augmente, jusqu'à relier des systèmes portes entre eux et aboutir à une cirrhose. Le développement de la fibrose est accompagné d'une modification de la quantité de la MEC.

La MEC dans le foie normal est un compartiment limité, correspondant à environ 3% de la surface d'une section (Lin *et al.* 1998). Dans les conditions normales, la MEC se retrouve uniquement dans les espaces portes, parois des sinusoides et les veines centrales. Les protéines majoritaires de cette MEC sont les collagènes, avec principalement ceux de type I, III, IV et V. Les collagènes possèdent une localisation particulière : les fibrillaires (type I, III et V) au niveau des espaces portes et veines centrales ; le type IV en association avec la laminine et l'entactine nidogène forment une membrane basale-like le long des sinusoides, permettant la diffusion entre le sang et les hépatocytes (Martinez-Hernandez 1984). D'autres constituants majeurs de la MEC sont les glycoprotéines, dont la laminine, fibronectine, tenascine... ainsi que les protéoglycanes tels que l'héparane, dermatane, chondroïtine sulfate, l'acide hyaluronique... Lors de la fibrose, on retrouve les mêmes constituants, mais exprimés en grande quantité (de 3 à 5 fois plus importante) et redistribués dans le foie. Par exemple au niveau de l'espace de Disse, ce sont les collagènes I et III qui s'accumulent, aboutissant à l'obstruction des pores des cellules endothéliales (également appelée capillarisation des sinusoides), et ayant pour conséquence un dysfonctionnement hépatique. Dans les stades avancés, le foie contient environ 6 fois plus de MEC qu'en condition normale, principalement constituée de collagènes I, III et IV, fibronectine, élastine, laminine, acide hyaluronique et protéoglycanes. L'accumulation de MEC est la conséquence d'une augmentation de sa production, mais également d'une diminution de sa dégradation (Arthur 2000), principalement causée par la surexpression des TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase), qui sont des inhibiteurs des MMPs.

Au stade précoce de la fibrose, l'accumulation de MEC reste modérée et réversible (Chua and Wang 2011). Les principales enzymes de dégradation de la MEC sont les MMPs synthétisées par les cellules de Kupffer. Ces enzymes ont une spécificité d'action. La MMP-2 et la stromélysine/MMP-3 dégradent les composants matriciels des membranes basales composées de collagène IV, alors que la

MMP-1 dégrade les principaux types de collagènes accumulés lors de la fibrose. L'activité de MMP-1 est donc très importante pour l'homéostasie du collagène, et dans des conditions fibrotiques son activité diminue fortement en corrélation avec une augmentation de son inhibiteur, le TIMP-1 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases-1) (Benyon *et al.* 1996).

### ***C) Diagnostics de la fibrose***

La fibrose hépatique peut être estimée par des techniques telles que l'ultrasonographie, la tomographie et l'IRM permettant de détecter des modifications du parenchyme (Hirata *et al.* 2001). Il est également possible d'estimer la fibrose par élastographie impulsionnelle à vibration contrôlée (FibroScan®) qui détermine l'élasticité du foie. En effet, la rigidité du foie est corrélée avec l'accumulation de MEC lors de la fibrose. Pour cela une onde sismique basse fréquence (50Hz) est générée par un capteur ultrason à la surface de la peau. La vitesse de propagation de cette onde est déterminée par ultrason par un transducteur et dépend de la dureté de l'organe qu'elle traverse. Cette technique est donc une alternative non invasive qui permettrait d'apprécier le développement fibrotique.

Les études non invasives peuvent être approfondies par des analyses tissulaires. Pour cela, la biopsie hépatique est considérée comme la technique de référence pour diagnostiquer la fibrose hépatique (Afdhal and Nunes 2004). Après coloration des coupes histologiques, il est possible de déterminer la localisation et l'importance de l'accumulation de la MEC, ainsi que le stade de nécro-inflammation à l'aide des méthodes de classements tels que le score Metavir (stade 1 à 4) (Fig.4) ou le score Ishak (stade I à V). Pour cela une coloration de la MEC est réalisée avec du rouge Sirius ou du Trichrome de Masson, permettant de quantifier la quantité de collagène. Cette méthode est robuste mais peut engendrer plusieurs biais, tels que des hétérogénéités de coloration de la MEC ou des différences d'appréciation du stade fibrotique intra ou inter individuelles. La détermination du stade fibrotique est une appréciation basée sur différents critères : la quantité de collagène, l'inflammation et la nécrose (Theodossi *et al.* 1980, Westin *et al.* 1999, Gronbaek *et al.* 2002, Regev *et al.* 2002). Récemment il a été démontré que cette étape de coloration de la MEC peut être supprimée en utilisant la microscopie de génération de seconde harmonique (SHG), qui permet la visualisation du collagène fibrillaire sans marquage. La quantification automatisée et standardisée de la quantité de collagène permet l'évaluation du stade fibrotique (Masseroli *et al.* 2000, Matalka *et al.* 2006, Gailhouste *et al.* 2010). Cependant, cette méthode de diagnostic basée sur le prélèvement tissulaire reste invasive, à l'origine de souffrances dans 40% des cas, et de complications pour 1 à 5% des cas, nécessitant une nouvelle hospitalisation avec une morbidité pour 1 cas sur 1 000 à 10 000 (Thampanitchawong and Piratvisuth 1999).

Les techniques non invasives ont été développées à partir de prélèvements sanguins qui visent à identifier des marqueurs de la maladie. Ceux-ci sont représentatifs de défaillances fonctionnelles du

foie, et non de l'accumulation de MEC. On retrouve la numération plaquettaire, les niveaux sériques d'aminotransférase, de prothrombine, et de protéines de la phase aigüe (Imbert-Bismut *et al.* 2001, Forns *et al.* 2002). D'autres marqueurs sériques en relation directe avec la fibrose hépatique sont également dosés, tels que le pro-peptide N terminal du collagène III, l'acide hyaluronique, le TIMP-1 et le YKL-40 (Rockey and Bissell 2006). Ces techniques ont l'inconvénient de ne détecter que les stades avancés de fibrose et de cirrhose, et ne permettent pas de différencier les différents stades ni d'évaluer la progression de la pathologie. Certains de ces marqueurs pourraient, de plus, être le reflet de la fibrose d'autres organes que le foie.

### ***D) Traitements de la fibrose***

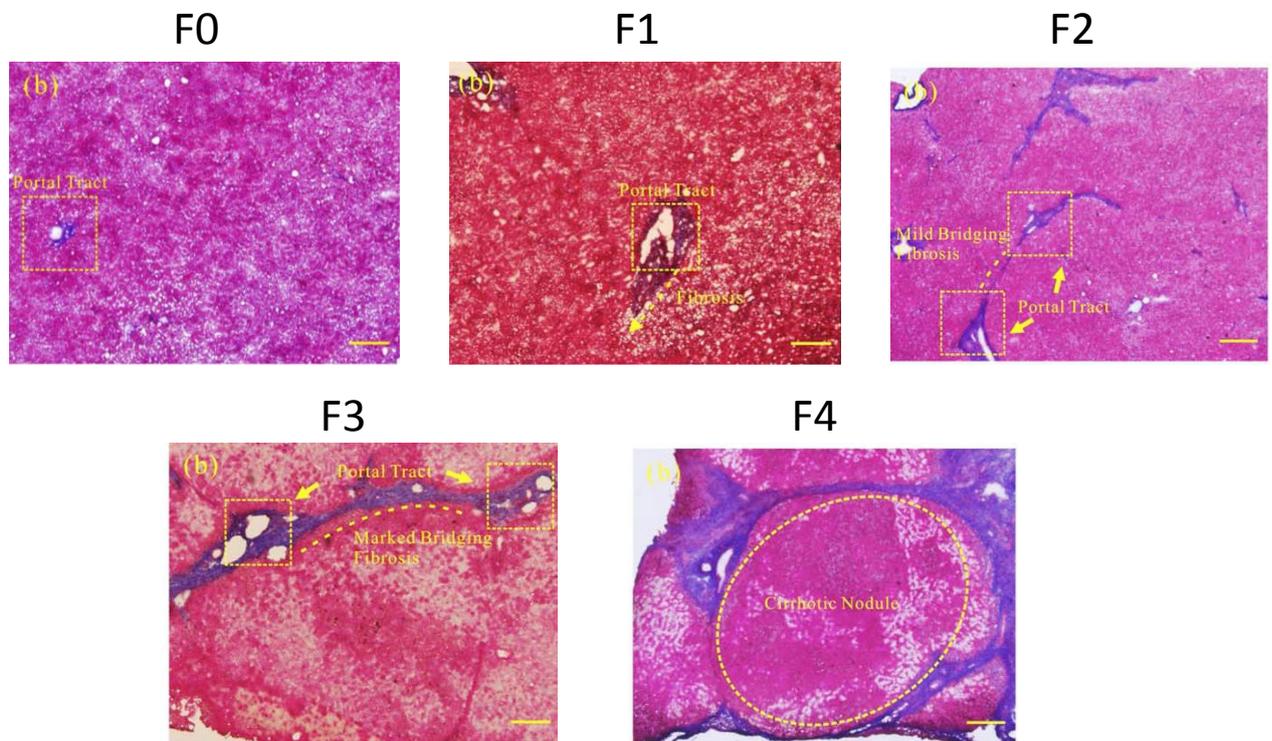
Actuellement, la majorité des traitements développés ou en développement ont pour objectifs de supprimer l'origine des agressions responsables du développement fibrotique. Par exemple, suite à une infection par le VHB ou VHC, le principal traitement sera l'utilisation d'agents antiviraux (IFN- $\alpha$  combiné à la ribavirine) ainsi que le vaccin contre le VHB, pour les fibroses alcooliques, une abstinence de consommation et pour les maladies auto-immunes, un traitement immunosuppresseur.

La meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la production de la MEC et de sa production par les cellules étoilées a permis de mettre en place de nouvelles stratégies ciblant l'accumulation de ces cellules au niveau de la zone lésée (Bataller and Brenner 2001). L'utilisation de stratégies visant à interférer avec la synthèse ou la signalisation du TGF- $\beta$  ont démontré une diminution du développement fibrotique dans des modèles expérimentaux *in vivo* (Shek and Benyon 2004). Des anti-inflammatoires, tels que les corticostéroïdes ou des antagonistes du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), sont également utilisés pour inhiber l'activation des HSCs. Une autre stratégie est de stimuler la dégradation de la MEC par des antagonistes du TGF- $\beta$  qui ont le double avantage d'inhiber les TIMPs et d'augmenter l'activité des collagénases (Breitkopf *et al.* 2005).

Contrairement au dogme longtemps défendu, il a été démontré que la fibrose et la cirrhose sont des mécanismes réversibles (Arthur 2002, Poynard *et al.* 2002). Dans les modèles animaux d'induction de fibrose, l'arrêt du traitement cytotoxique aboutit à la régression de la fibrose (Issa *et al.* 2004). D'autres études ont également démontré que chez l'homme, après l'élimination de l'agent fibrogénique, la réversion peut également avoir lieu (Pares *et al.* 1986, Hammel *et al.* 2001, Dixon *et al.* 2004), sur une cinétique longue de plusieurs années. Un paramètre important pour cette réversion est la présence de cross-links entre les molécules de collagène qui augmentent leurs stabilités. Réverser la fibrose nécessite d'une part, d'éliminer la source de l'inflammation à l'origine de la synthèse excessive de MEC (pour arrêter son accumulation), et d'autre part de réussir à dégrader la MEC qui s'est accumulée, en activant des collagénases. La réduction des dépôts de collagène est limitée par les interactions fortes entre les fibres de collagène par les liaisons de type cross-link qui empêchent l'action des collagénases. Des études ont montré que plus une matrice de collagène possède de cross-

links, plus difficile sera sa dégradation (Issa *et al.* 2004), pouvant être à l'origine de la résistance aux traitements de certains patients. Dans le foie, les deux principaux cross-links retrouvés sont la Pyridinoline et la Déoxypyridinoline (Ricard-Blum *et al.* 1992).

En conclusion, de nombreuses questions sur la réversion de la fibrose restent sans réponse: Pouvons-nous accélérer pharmacologiquement la réversion de la fibrose chez l'homme ? Un foie fibrotique peut-il complètement redevenir normal ? La réversion se déroule-t-elle de la même manière dans des contextes étiologiques différents ? Pour répondre à ces questions il est nécessaire d'appréhender la nature moléculaire de la fibrose hépatique.



**Figure 4 : Morphologies histologiques des différents stades fibrotiques par classification Métavir.** Coupes histologiques après marquage au Trichrome de Masson. Les différents stades de la classification Métavir sont représentés : stade F0, F1, F2, F3 et F4 (Sun *et al.* 2010).

### III) Aspects moléculaires de la fibrose

#### A) La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un composant non cellulaire présent dans tous les tissus et organes. Elle procure non seulement un support physique pour les cellules, mais initie également des signaux biochimiques et biomécaniques requis pour les tissus lors de la morphogénèse, la différenciation et l'homéostasie. La MEC est constituée d'eau, de protéines et de polysaccharides, dont les quantités relatives varient en fonction des tissus. Les cellules interagissent avec la MEC par différents récepteurs, dont principalement les intégrines, les discoïdine receptors et les syndécans (Leitinger and Hohenester 2007, Schwartz 2010, Xian *et al.* 2010). Ces interactions permettent de coupler le cytosquelette à la MEC, et sont impliquées dans les mécanismes de migration (Schmidt and Friedl 2010). De plus, la MEC est une structure hautement dynamique qui est continuellement remodelée, par des processus enzymatiques ou non enzymatiques, la MEC subissant de nombreuses modifications post-traductionnelles.

De part ces caractéristiques physiques et biochimiques, la MEC a un rôle primordial dans les mécanismes de tensions, compressions et élasticités tissulaires. Elle joue un rôle également sur l'organisation morphologique et la physiologie des tissus en séquestrant des facteurs de croissance et en interagissant avec des récepteurs membranaires, qui médient l'activation de voies de signalisations intracellulaires. Les propriétés biochimiques, biomécaniques et protectrices de la MEC varient fortement d'un tissu à un autre, au sein d'un même tissu ou entre les états physiologiques et pathologiques.

La MEC est composée principalement de deux types de macromolécules structurales : les protéines fibreuses et les protéoglycans:

- Les protéines fibreuses

Les protéines fibreuses sont constituées principalement par trois types de protéines: le collagène, l'élastine et la fibronectine.

- Le collagène :

Le collagène est la protéine fibreuse la plus abondante et le principal élément structural de la MEC. Il est à l'origine des forces de tensions (Kolacna *et al.* 2007), régule l'adhésion cellulaire, joue un rôle dans le chimiotactisme, la migration ainsi que dans le développement tissulaire (Rozario and DeSimone 2010). Sa constitution et ses propriétés seront détaillées dans le chapitre suivant.

- L'élastine :

L'élastine apporte au tissu la capacité de se rétracter lorsqu'il est soumis à des étirements répétés. Son étirement est limité par son association avec les fibrilles de collagène, (Wise and Weiss 2009). Le précurseur de l'élastine, la tropoélastine, après être sécrétée s'assemble pour former des fibres fortement « cross-linkées » par leurs résidus lysine. L'élastine est recouverte par des microfibrilles de glycoprotéines qui permettent le maintien de l'intégrité des fibres (Wise and Weiss 2009).

- La fibronectine :

La fibronectine est impliquée dans l'organisation de la MEC, et a également un rôle dans l'adhésion cellulaire. La fibronectine peut s'étirer de plusieurs fois sa longueur lorsqu'elle est soumise à des forces de tractions cellulaires (Smith *et al.* 2007). Cet étirement de la fibronectine permet l'apparition de sites de fixations des intégrines, jouant ainsi un rôle dans les mécanismes de mécanotransduction (Smith *et al.* 2007). La fibronectine est également importante pour la migration cellulaire lors du développement et dans certaines pathologies cardiovasculaires et métastases (Rozario and DeSimone 2010, Tsang *et al.* 2010).

- Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont composés de chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) liées sur une protéine « noyau » (Iozzo and Murdoch 1996). Les protéoglycanes sont classifiés selon leur protéine « noyau », leur localisation et leur constitution en GAG. Trois familles principales sont ainsi constituées : small leucine-rich proteoglycans, modular proteoglycans et cell-surface proteoglycans (Schaefer and Schaefer 2010). Ces molécules sont extrêmement hydrophiles et adoptent donc une conformation très étendue, essentielle pour la formation d'hydrogel et permettant à la matrice formée de résister à de fortes forces de compression. Les protéoglycanes remplissent la majorité de l'espace extracellulaire interstitiel sous forme d'hydrogel (Jarvelainen *et al.* 2009).

## ***B) La superfamille du collagène***

Le collagène est le constituant majoritaire de la MEC. C'est une superfamille de protéines de 28 membres (Tableau I) qui représente 30% de la masse protéique totale chez les mammifères (Ricard-Blum 2011). Tous les membres de cette superfamille sont caractérisés par la présence d'un domaine en triple hélice, constitué de la répétition de la séquence Gly-X-Y (avec une majorité de Proline et Hydroxyproline pour X et Y). La présence de la Glycine tous les 3 acides aminés est importante car il est le plus petit acide aminé, et possède donc le plus faible encombrement stérique, permettant la torsion en hélice. La proportion de ce domaine en triple hélice est variable selon les membres de la famille, et peut aller de 96% de la protéine pour le collagène I à seulement 10% pour le collagène XII.

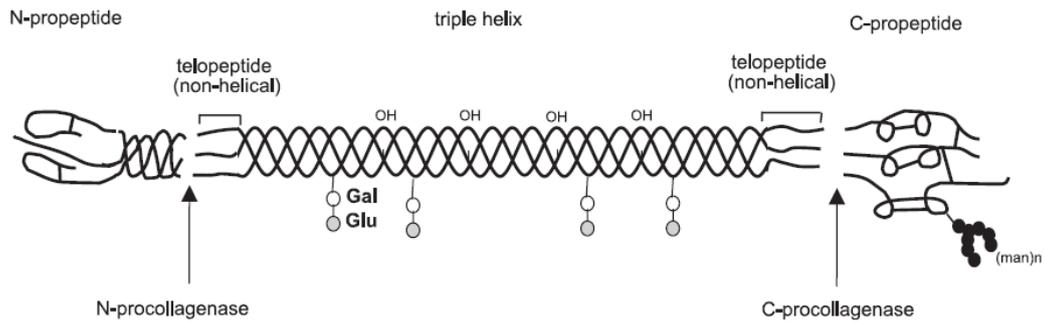
Les différents collagènes peuvent être classés en sous-groupes. On retrouve ainsi les collagènes formant des fibrilles, les « fibrils-associated collagens with interrupted triple helices » ou FACIT, les collagènes formant un réseau, les fibrilles d'ancrages, les collagènes transmembranaires, les collagènes des membranes basales, et les autres collagènes avec une fonction unique (Gelse *et al.* 2003) (Tableau I). La famille de collagène formant des fibrilles est la majoritaire, et représente 90% du collagène total.

Malgré la très forte diversité de structure entre les différentes familles, toutes les formes possèdent une caractéristique qui est l'association de 3 chaînes  $\alpha$  en une triple hélice à pas droit (Fig.5) formant le procollagène. Cette association peut être homotrimérique (collagène II, III, VII...) ou hétérotrimérique (collagène I, IV, V, VI...)

#### *Collagène de type I et formation de fibrilles :*

Le collagène de type I se retrouve dans tous les tissus de l'organisme. Il forme 90% de la masse organique de l'os, et est également le collagène le plus abondant dans les tendons, la peau, les ligaments, la cornée et de nombreux tissus de connexions interstitielles. Il est constitué de l'association de deux chaînes  $\alpha 1(I)$  et d'une chaîne  $\alpha 2(I)$ . La nucléation, pour l'assemblage des 3 chaînes en triple hélice, se fait à partir de la partie C-terminale (Canty and Kadler 2005) (Fig.6) au niveau du réticulum endoplasmique (Lamande and Bateman 1999), puis l'association se fait de manière « zipper-like » jusqu'à la partie N-terminale. Les courtes parties non hélicoïdales aux extrémités N et C terminales serviront pour la formation de cross-links entre les triples hélices, ainsi qu'à la fixation du collagène à d'autres molécules. Le procollagène ainsi produit est sécrété hors de la cellule, où il subira les différentes modifications permettant son association en fibrilles (Kadler *et al.* 1996). Il est ainsi converti en collagène par le clivage enzymatique des parties terminales par les collagènes métalloprotéinases permettant l'association entre les triples hélices. Le propeptide-N est clivé par les ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs), alors que le propeptide-C est clivé par la BMP1/Tolloid like proteinase (Canty and Kadler 2005). Le propeptide-C a été montré comme étant essentiel pour le maintien en solution du procollagène, alors que le propeptide-N régule le diamètre des fibrilles. Les triples hélices (de 300 nm de longueur et 1.5 nm de diamètre) sont alignées parallèlement, et des cross-links font la liaison entre elles. Les triples hélices de collagène sont assemblées avec un espace de 40 nm créant un décalage entre les différents niveaux, aboutissant à une apparence striée du collagène I (fig.7).

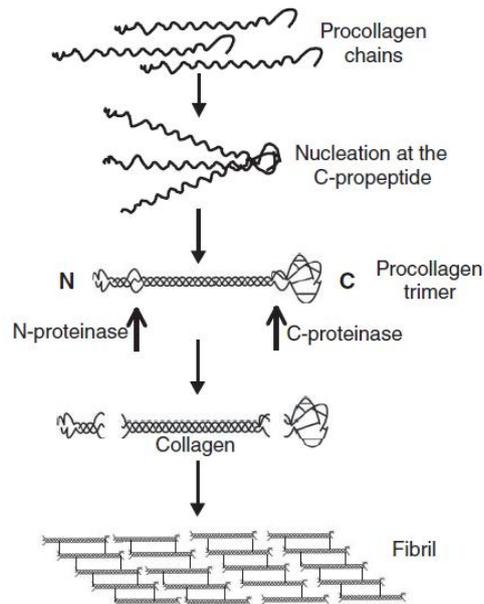
Les fibrilles (de 50 à 500 nm de diamètre) sont formées par l'assemblage de microfibrilles (20 à 40nm de diamètre) constituées par l'association de 5 rangées de molécules de collagènes de façon quasiment hexagonale (Orgel *et al.* 2001) (fig.8). Au final, ces fibrilles s'assemblent entre elles pour former une structure plus épaisse qui est la fibre de collagène (4 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre) (Fig.9).



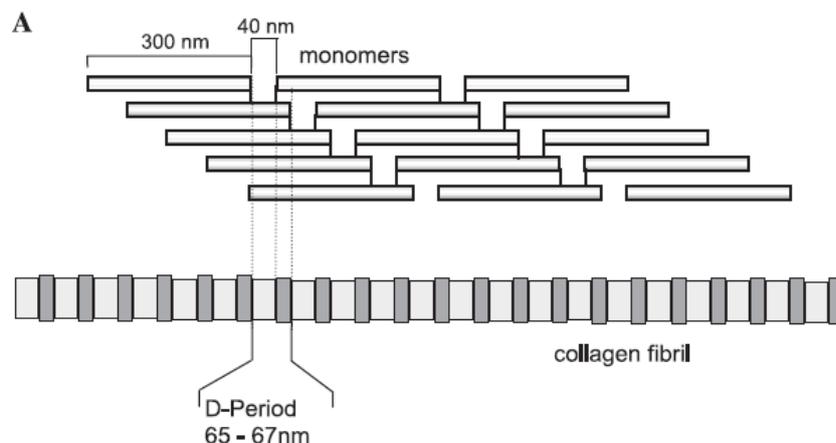
**Figure 5 : Structure moléculaire du collagène fibrillaire de type I.** Le collagène de type I est constitué de l'association de 3 triples hélices. Cet assemblage se produit après clivage du C-propetide et N-propetide. (Gelse *et al.* 2003)

**Tableau I : Classification des différents types de collagènes, de leurs gènes et localisation tissulaire** (Gelse *et al.* 2003)

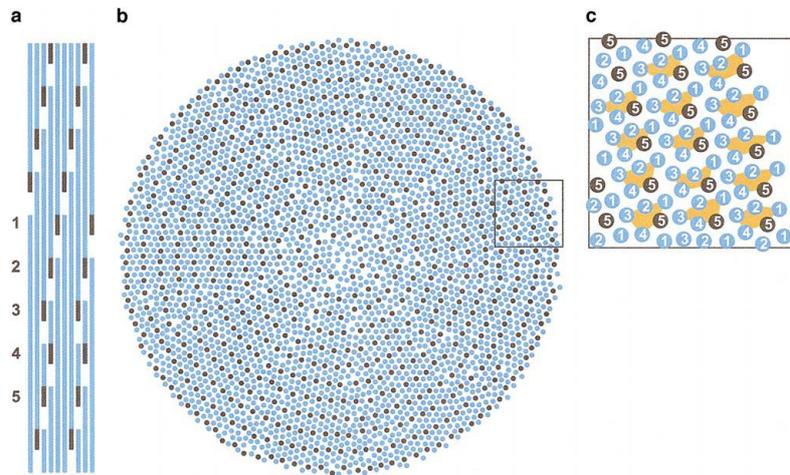
Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
<i>Fibril-forming collagens</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
V	$\alpha 1(V),\alpha 2(V),\alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2–q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	cartilage, vitreous body
<i>Basement membrane collagens</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36–q37) COL4A4 (2q36–q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	basement membranes
<i>Microfibrillar collagen</i>			
VI	$\alpha 1(VI),\alpha 2(VI),\alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
<i>Anchoring fibrils</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	skin, dermal–epidermal junctions; oral mucosa, cervix,
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	endothelial cells, Descemet's membrane
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1 (6q21–q22.3)	hypertrophic cartilage
<i>FACIT collagens</i>			
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	cartilage, vitreous humor, cornea
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12–q13)	perichondrium, ligaments, tendon
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$		corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3–11.2)	blood vessel wall
<i>Transmembrane collagens</i>			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1 (10q22)	epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermal–epidermal junctions
<i>Multiplexins</i>			
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1 (9q21–q22)	fibroblasts, smooth muscle cells, kidney, pancreas,
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1 (21q22.3)	lungs, liver



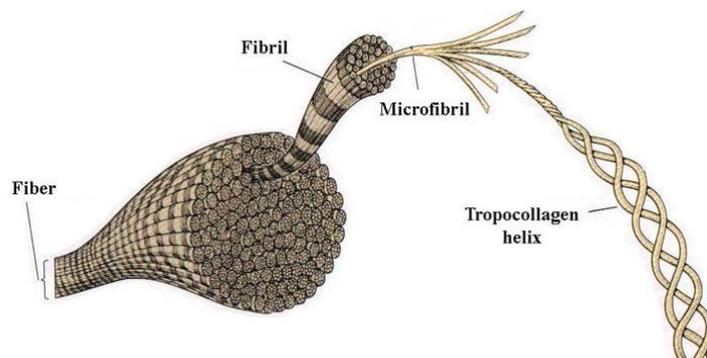
**Figure 6 : Les différentes étapes de synthèse du collagène fibrillaire.** Après synthèse des chaînes de procollagènes débute une étape de nucléation à partir du propeptide C. Suite à l'action de protéinases, les extrémités N et C terminales sont clivées permettant l'association des trimères par les télépeptides non hélicoïdaux à l'origine des fibrilles de collagène. (Canty and Kadler 2005)



**Figure 7 : Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire des fibrilles de collagènes.** Les monomères (triple hélice de collagène) de 300 nm de long sont séparés par un espace de 40 nm donnant l'aspect strié caractéristique du collagène de type I. Cette striation possède une période de 65-67 nm. (Gelse *et al.* 2003)



**Figure 8 : Organisation moléculaire d'une fibrille de collagène.** A) Vue longitudinale des molécules de collagène en quinconce. B) Section transversale d'une fibrille de collagène, montrant l'organisation des molécules de collagène, associées par groupe de 5 correspondants aux microfibrilles. C) Grossissement d'une région de l'image b montrant plus précisément l'organisation des microfibrilles (représentées en orange). (Hulmes 2002)



**Figure 9 : Schéma bilan des différents niveaux d'organisation du collagène.** Le collagène est initialement synthétisé sous forme de chaînes individuelles, qui s'associent en triple hélice. 5 triples hélices s'associent ensuite pour former des microfibrilles, qui une fois empaquetées forment une fibrille de collagène. Enfin les fibrilles sont alignées et associées les unes aux autres pour former les fibres de collagène. (d'après Campbell, NA Biology 1995.)

### ***C) Les cross-links enzymatiques du collagène***

Les cross-links sont très importants car ils permettent de faire les liaisons entre les molécules de collagène lors de l'assemblage en microfibrilles, fibrilles et fibres. Ils permettent de moduler l'élasticité et la rigidité du collagène, essentielle à sa fonction. A titre d'exemple, le collagène de la peau est souple et élastique, alors que pour d'autres tissus, tels que l'os, le collagène est très résistant et rigide, ce qui est rendu possible par la présence d'une plus ou moins grande quantité de cross-links. Différents types de cross-links ont été décrits, et leurs expressions semblent être tissus dépendantes (Wu 2005).

Au niveau de la peau et des tendons, on retrouve principalement le déhydro-hydroxylysinonorleucine (deH-HLNL). La première étape indispensable pour la formation de ce cross-link est la déamination du groupement  $\epsilon$ -aminé de lysines spécifiques au niveau des télépeptides par la lysyl oxidase. En effet, celle-ci ne peut pas déaminer les lysines au niveau de la triple hélice. La lysine-aldéhyde ainsi obtenue pourra réagir avec une hydroxylysine au niveau de la triple hélice d'une molécule de collagène voisine, formant ainsi une base de Schiff (aldimine). Ces réactions sont très fréquentes dans la peau et les tendons puisque dans ces tissus les lysines des télépeptides sont très peu hydroxylées, donc le cross-link majoritaire est la forme aldimine deH-HLNL provenant de la réaction de la lysine-aldéhyde du télépeptide avec une hydroxylysine de triple hélice d'une molécule voisine. Ce cross-link peut facilement être clivé *in vitro* par ajout d'acide acétique, ou par augmentation de la température. Ces cross-links sont dit immatures. La purification de collagène *in vitro* se fait principalement à partir de tendon de queue de rat ou de peau bovine, car plus facilement isolable. Une autre réaction est également possible, entre la lysine-aldéhyde et une lysine (au lieu d'une hydroxylysine) formant le cross-link dehydro-lysinonorleucine (deH-LNL). Celui-ci est beaucoup moins fréquent au niveau de la peau puisque la majorité des lysines sont hydroxylées.

Au niveau de l'os et du cartilage, les lysines des télépeptides sont hydroxylées, donc la réaction de la lysyl oxidase produit une hydroxylysine-aldéhyde. Comme pour la peau, cette hydroxylysine-aldéhyde peut réagir avec une hydroxylysine d'une triple hélice appartenant à une molécule de collagène voisine et ainsi former une base de Schiff qui subira un réarrangement d'Amadori pour former une hydroxylysino-keto-norleucine (HLKNL). Cette kéto-amine est beaucoup plus stable que les cross-links au niveau de la peau, et donc beaucoup plus résistante à une digestion acide ou aux fortes températures. Au contraire de la peau, les lysines au niveau des triples hélices sont beaucoup moins hydroxylées, une réaction entre l'hydroxylysine-aldéhyde et une lysine d'une molécule voisine est donc beaucoup plus probable, suivie d'un réarrangement d'Amadori formant une lysino-keto-norleucine (LKNL).

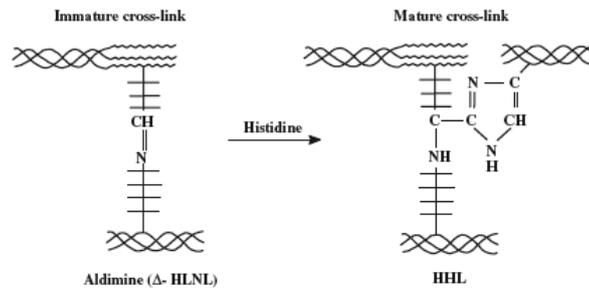
Ces cross-links divalents sont dits immatures car ils sont réductibles, et à partir de ceux-ci des cross-links matures peuvent être produits. Ces cross-links seront également différents selon les tissus et dépendent de la nature du/des cross-links divalent(s).

Au niveau de la peau, le deH-HLNL (cross-link divalent) réagit spontanément avec l'histidine d'une 3<sup>ème</sup> molécule de collagène pour former le cross-link mature trivalent histidinohydroxylysinonorleucine (HHL) (Fig.10).

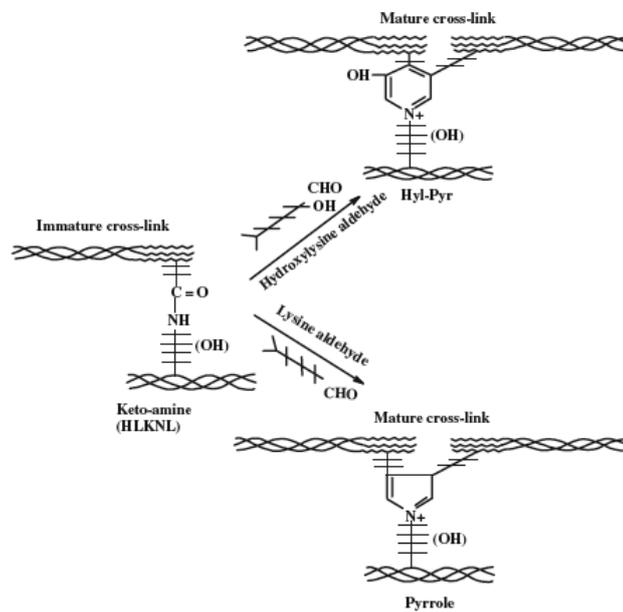
Au niveau de l'os et du cartilage, deux cross-links matures existent : la réaction entre HLKNL et une hydroxylysine-aldéhyde forme l'hydroxylysyl-pyridinoline (Hyl-Pyr) également appelée Pyridinoline. La réaction entre LKNL et une hydroxylysine-aldéhyde forme la lysyl-pyridinoline appelée à tort Déoxypyridinoline, cela suggérant que lors de la condensation il y a perte d'eau, alors qu'en réalité c'est une réaction avec une lysine au lieu d'une hydroxylysine (Fig.11).

Enfin, dans les tendons a été détecté un dernier type de cross-link mature provenant de la réaction entre HLKNL et une lysine-aldéhyde formant un pyrrole qui est extrêmement labile, ce qui rend très difficile son étude.

Il est donc évident qu'un paramètre très important dans la formation des différents cross-links est principalement la présence de lysine hydroxylée, que ce soit au niveau des télépeptides ou des parties hélicoïdales. Il existe 3 Lysines Hydroxylases (LH) (Passoja *et al.* 1998), possédant une spécificité d'action pour chacune d'elles. La LH1 hydroxyle les résidus lysine dans les domaines hélicoïdaux des collagènes fibrillaires et non fibrillaires. La LH2 possède 2 isoformes : la LH2a (forme courte) et la LH2b (forme longue et majoritaire) (Yeowell and Walker 1999). Ces 2 enzymes hydroxylent les lysines des télépeptides. Enfin la LH3 est une enzyme multifonctionnelle, qui en plus d'hydroxylater des lysines possède une fonction GT (hydroxylysyl galactotransférase) et GGT (galactosylhydroxylysyl glucotransférase), mais ne modifie que les collagènes de type IV et V et pas le type I (Myllyla *et al.* 2007). Les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , constitutives du collagène de type I, contiennent respectivement 38 lysines (36 hélicoïdales) et 31 lysines (30 hélicoïdales). Leur état d'hydroxylation varie selon les tissus, et donc selon les LH exprimées, ce qui aboutit à la formation de différents cross-links.



**Figure 10 : Formation du cross-link mature HHL.** La réaction entre une lysine aldéhyde d'un télopeptide avec une hydroxylysine d'une triple hélice aboutit à la formation de la d'un aldimine  $\Delta$ -HLNL, un cross-link immature. Lorsque celui-ci réagit en plus avec une histidine d'une 3<sup>ème</sup> triple hélice, aboutit à la formation d'un HHL, un cross-link mature (Avery and Bailey 2008).



**Figure 11 : Formation des cross-links matures Pyridinolines et Pyrrole.** La réaction entre une hydroxylysine-aldéhyde d'un télopeptide et une hydroxylysine d'une triple hélice aboutit à la formation de l'hydroxylysino-Keto-Norleucine (HLKNL), un cross-link immature. Celui-ci peut réagir soit avec une hydroxylysine-aldéhyde formant l'hydroxylysyl-Pyridinoline (Hyl-Pyr ou Pyridinoline), ou avec une lysine aldéhyde pour former un Pyrrole, deux cross-links matures (Avery and Bailey 2008).

## ***D) Les cross-links non enzymatique du collagène***

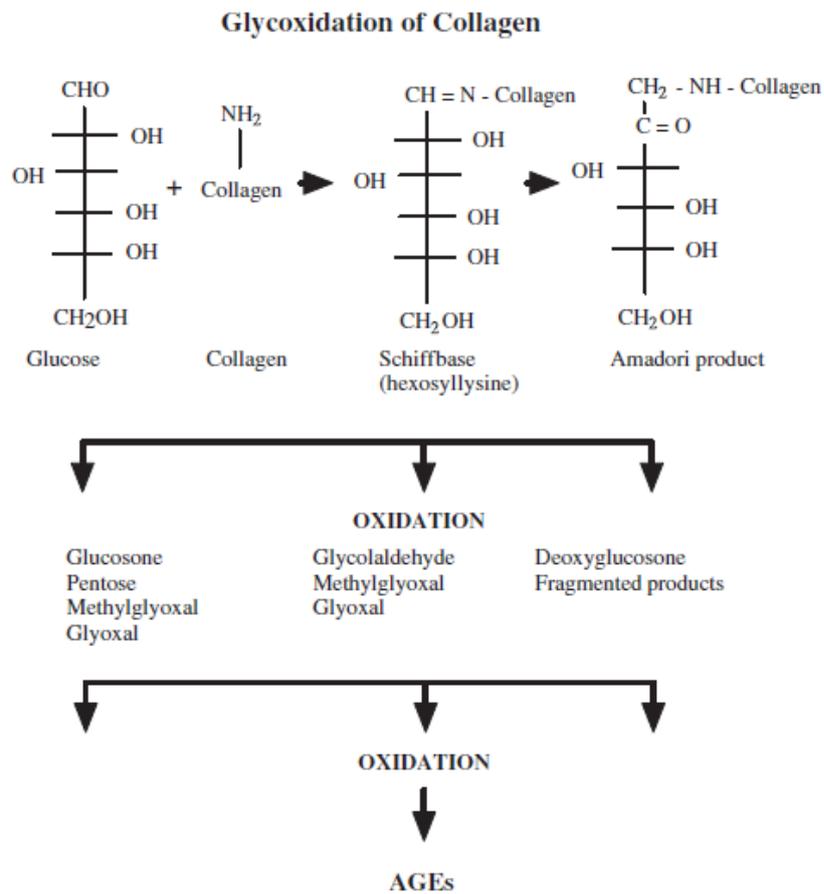
En plus des cross-links présentés dans la partie précédente, d'autres cross-links peuvent être produit par la glycation du collagène. Ils sont dit non enzymatiques et aboutissent aux « Advanced Glycation End-products » ou AGEs (Paul and Bailey 1996). Ce processus joue un rôle important dans les modifications des propriétés mécaniques des tissus lors du vieillissement, puisque la présence des cross-links non enzymatiques et enzymatiques réduit les capacités élastiques du collagène, propriété essentielle au maintien de sa fonction. Les cross-links non enzymatiques sont obtenus par la réaction d'un glucose avec un groupement  $\epsilon$ -aminé d'une lysine du collagène formant une base de Schiff. Ensuite se produit un réarrangement d'Amadori pour donner une lysine-fructose. Celles-ci sont ensuite oxydées et fragmentées en des espèces très réactives qui réagissent avec des lysines et arginines (réaction de glycoxydation), telles que le déoxyglucosone, le glyoxal ou méthyl glyoxal (Fig.12). Ces lysines et arginines modifiées et voisines réagiront enfin ensemble pour former ces cross-links (AGEs) (Avery and Bailey 2005). Contrairement aux cross-links enzymatiques qui servent au bon fonctionnement des fibres de collagène, ces cross-links non enzymatiques ont un effet délétère, et se produisent surtout avec l'âge, mais sont également très fréquents chez les personnes diabétiques.

## ***E) Les récepteurs du collagène***

Il existe différents récepteurs qui rendent compte des nombreuses fonctions du collagène : soutien mécanique, migration, différenciation, cicatrisation.... Cinq classes de récepteurs ont été identifiées: les intégrines (Hynes 2002), les Discoidin Domain Receptors (DDR) (Shrivastava *et al.* 1997), la glycoprotéine VI (Nieswandt and Watson 2003), le Leukocyte-Associated Ig-like Receptor-1 (LAIR-1) (Lebbink *et al.* 2006) ainsi que la famille des récepteurs aux mannoses (East and Isacke 2002) (Fig.13).

- **Les intégrines :**

La famille des intégrines est constituée par les principaux récepteurs pour l'adhésion cellulaire à la MEC. Elles sont constituées par la combinaison d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Il existe 18 sous-unités  $\alpha$  et 8  $\beta$ , pouvant donner 24 intégrines différentes. Les deux sous-unités sont constituées d'une grande partie extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique permettant la liaison avec le cytosquelette. Les intégrines sont soumises à un contrôle allostérique complexe. En effet, elles présentent différentes conformations, correspondant à des formes de peu ou beaucoup d'affinité pour les ligands extracellulaires. L'équilibre entre ces deux formes peut être influencé par leurs partenaires cytosoliques (signal « inside-out ») ou par les ligands extracellulaires (signal « outside-in »).



**Figure 12 : Glycoxydation du collagène.** Représentation des réactions aboutissant au réarrangement d'Amadori, suivi d'oxydations pour aboutir à la synthèse des cross-links « Advanced Glycation End-products » ou AGE (Avery and Bailey 2005).

L'association de l'intégrine avec le collagène se fait grâce à la sous-unité  $\beta 1$ . On retrouve ainsi principalement 4 intégrines pouvant interagir avec le collagène : l' $\alpha 1\beta 1$  (exprimée principalement par les cellules mésenchymateuses) (Voigt *et al.* 1995), l' $\alpha 2\beta 1$  (exprimée principalement par les cellules épithéliales et les plaquettes) (Zutter and Santoro 1990), l' $\alpha 10\beta 1$  (exprimée principalement par les chondrocytes) (Camper *et al.* 2001) et l' $\alpha 11\beta 1$  (exprimée principalement par les cellules mésenchymateuses dans des régions contenant un réseau de collagène interstitiel bien organisé) (Tiger *et al.* 2001). La fixation du collagène entraîne un changement conformationnel de l'intégrine, permettant la transmission du signal.

- **Les Discoidin Domain Receptor :**

La famille est constituée de 2 récepteurs, DDR1 et DDR2, qui sont des Récepteurs Tyrosines Kinases (RTK) dimériques (Vogel *et al.* 1997). Ce sont les seuls RTK activés par un constituant de la MEC. Ils sont constitués par i) un domaine extracellulaire avec un domaine homologue à la discoidine (Baumgartner *et al.* 1998), un domaine qui permet la liaison avec le collagène lorsque le récepteur est en forme de dimère, ii) une partie transmembranaire, et iii) un domaine cytoplasmique contenant le domaine catalytique tyrosine kinase.

DDR1 est principalement exprimé par les cellules épithéliales et les leucocytes, et DDR2 principalement par les cellules mésenchymateuses. De même que les intégrines, ils contrôlent l'adhésion cellulaire, la migration, prolifération, et le remodelage de la MEC, notamment en contrôlant l'expression de MMPs (Vogel *et al.* 2006). Une spécificité de substrat existe entre les 2 formes pour certains types de collagène, avec par exemple le DDR1 qui interagit avec le collagène IV (Vogel *et al.* 1997), et le DDR2 avec le collagène II (Leitinger *et al.* 2004) et X (Leitinger and Kwan 2006). La transmission du signal se fait de la manière classique des RTKs, c'est-à-dire une autophosphorylation de la partie intra-cellulaire après fixation du collagène puis activation d'une cascade de kinases.

- **La glycoprotéine VI (GPVI):**

Ce récepteur est exprimé par les plaquettes et joue un rôle central dans la réparation des lésions vasculaires. Il interagit avec l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (Auger *et al.* 2005) et la signalisation intracellulaire aboutit au relargage de médiateurs d'agrégation tels que l'ADP (Adénosine 5'-diphosphate) et le thromboxane A2. La signalisation se fait également par des cascades de phosphorylations via ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Activation Motif) par des kinases de la famille Src, Fyn et Lyn (Moroi and Jung 2004).

- **Le leukocyte-Associated Ig-like Receptor-1 (LAIR-1):**

Ce récepteur est constitué d'un domaine Immunoglobuline extra-cellulaire, une hélice transmembranaire et un court domaine cytoplasmique contenant 2 motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIMs). Nous avons peu de données sur sa fonction. Il est principalement exprimé par les cellules immunitaires, et son interaction avec le collagène inhibe l'activation de ces cellules par les motifs ITIMs (Meyaard 2008).

- **La famille des récepteurs au mannose :**

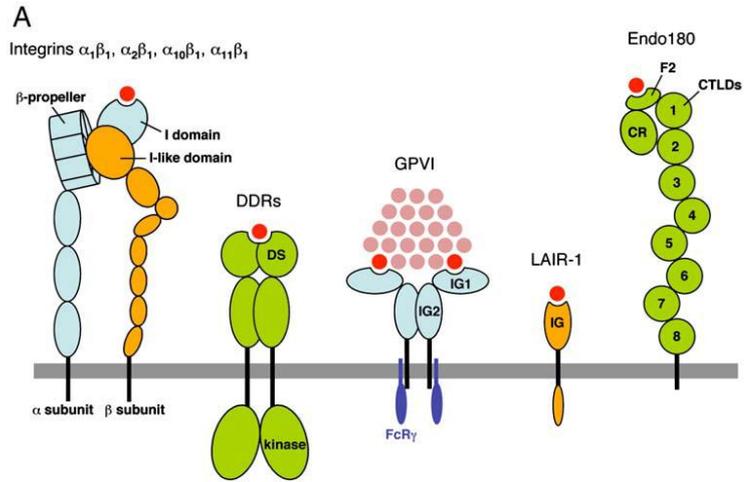
Cette famille de récepteurs est constituée de 4 membres : le Mannose Receptor (MR), le M-type phospholipase A2 receptor (PLA<sub>2</sub>R), le DEC-205 et l'Endo 180. Certains de ces récepteurs reconnaissent aussi d'autres ligands extra-cellulaires : MR les glycoprotéines, PLA<sub>2</sub>R les phospholipases solubles, et DEC-205 certains antigènes. En ce qui concerne PLA<sub>2</sub>R, on ne connaît pas le rôle de la fixation du collagène pour sa fonction. Les mécanismes de fixation de MR et d'Endo 180 ne sont également pas encore clairement définis, mais joueraient un rôle dans la dégradation et le renouvellement du collagène par voie lysosomale (Engelholm *et al.* 2003).

## ***F) La mécanotransduction et les voies de signalisations***

### **1) Introduction**

Nous venons de voir dans les chapitres précédents que la fibrose se caractérise par une accumulation de MEC et que les cellules expriment à leur surface des récepteurs permettant de se lier aux différents constituants de la MEC. Pour cela, il existe au moins 4 types différents d'adhésions cellules-matrices qui diffèrent par leur constitution moléculaire, les forces qu'elles exercent et les substrats extra-cellulaires requis pour les former (Cukierman *et al.* 2002). Les deux premières sont les contacts focaux et adhésions focales, qui ne nécessitent qu'un composant de la MEC et peuvent transmettre les forces de la cellule vers le substrat. Les adhésions fibrillaires ont besoin de la fibronectine pour se former, ainsi qu'un autre composant de la MEC et semblent importantes pour l'organisation et la liaison de la fibronectine à la surface cellulaire avec la MEC. Enfin, les adhésions de matrice 3D qui nécessite la fibronectine et au moins 2 autres composants de la matrice extra-cellulaire (Fig.14).

La MEC peut également, par les tensions qu'elle exerce sur les cellules, intervenir sur la régulation des fonctions hépatocytaires. Les cellules peuvent répondre aux signaux physiques, par l'activation de diverses voies de signalisations. A titre d'exemple, l'application de tensions sur la cellule modifie la conformation de certaines protéines telles que p130<sup>CAS</sup> (Sawada *et al.* 2006) ou des intégrines (Puklin-Faucher *et al.* 2006), permettant l'apparition de nouveaux sites de fixations pour des protéines de signalisation (Johnson *et al.* 2007), et la transformation d'un signal physique en un signal biochimique (Vogel 2006). En effet, au niveau biochimique, l'activation via les récepteurs



**Figure 13 : Structures des récepteurs du collagène.** Différentes structures de récepteurs du collagène sont représentées, avec les sites de liaison au collagène représentés (cercles rouges) (Leitinger and Hohenester 2007).

	Focal complex	Focal adhesion	Fibrillar adhesion	3D-adhesion
Markers	Paxillin Vinculin Phospho-Tyr FAK	Paxillin Vinculin Phospho-Tyr FAK FAK-pY <sup>397</sup> $\alpha_5\beta_3$ integrin Tensin	- - - - $\alpha_5\beta_1$ integrin Tensin	Paxillin Vinculin Phospho-Tyr FAK - $\alpha_5\beta_1$ integrin Tensin
Substrate	At least one ECM protein	At least one ECM protein	Fibronectin and one more ECM protein	Fibronectin and more than one ECM protein
Other	Rac	Cell contractility Rho	Cell contractility Ligated $\alpha_5\beta_1$ integrin Pliable substrate	Three-dimensional $\alpha_5\beta_1$ integrin Pliable substrate

Current Opinion in Cell Biology

**Figure 14 : Illustration des différentes adhésions cellules-matrice :** complexe focal, adhésion focale, adhésion fibrillaire et adhésion 3D. Chaque type d'adhésion possède une morphologie caractéristique (flèche blanche), des composants moléculaires spécifiques (« Markers »), différents substrats des intégrines (« Substrate »), ainsi que des partenaires nécessaires à la formation de ces adhésions (« Other ») (Cukierman *et al.* 2002).

membranaires (Giannone and Sheetz 2006), permet le recrutement de protéines, des signaux secondaires au niveau intracellulaire. Par exemple, p130<sup>CAS</sup> est une protéine de transduction du signal intracellulaire impliquée dans la migration, survie, transformation et invasion cellulaire (Defilippi *et al.* 2006). L'activation de p130<sup>CAS</sup> se fait par phosphorylations par des kinases de la famille src. Les travaux de Sawada et collaborateurs (Sawada *et al.* 2006) démontrent que l'activation de p130<sup>CAS</sup> se produit lors de l'étirement cellulaire, sans aucune augmentation de la phosphorylation et l'activité de c-src. p130<sup>CAS</sup> est fixée au cytosquelette et c'est un changement de conformation de la protéine qui permet au c-src endogène de la phosphoryler et de transduire le signal. En ce qui concerne l'intégrine, l'application de tensions sur cette protéine aboutit au dépliement et l'ouverture au niveau de l'I-domaine de la sous-unité  $\beta$ , permettant une capacité de fixation plus importante avec les éléments de la MEC.

Par ces mécanismes, les cellules ont la capacité de détecter des modifications de la rigidité de la MEC et d'adapter leurs réponses en fonction des tensions induites par leur microenvironnement : la mécanotransduction.

## 2) Rôles de la mécanotransduction dans l'organisme

La tension exercée par la MEC peut participer à la régulation de la croissance cellulaire, la survie et de la migration (Lo *et al.* 2000). Par exemple, l'augmentation de rigidité de la MEC perturbe la morphogénèse du tissu et les forces de tensions cellulaires, qui par « clustering » des intégrines va activer les signalisations ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) et Rho pour réguler la formation d'adhésions focales. En effet, une réduction des tensions cellulaires, par inhibition de ERK, Rho ou des intégrines, réprime le phénotype agressif de cellules mammaires (Paszek *et al.* 2005). Dans cette étude, les cellules tumorales cultivées sur une surface rigide présentent une augmentation de la prolifération et de la migration. La formation d'adhésions focales sur les substrats rigides permet une co-localisation des intégrines, de la taline, de la vinculine et de la Focal Adhesion Kinase (FAK) phosphorylée, aboutissant à la formation de fibres de stress. Ces mécanismes aboutissent à l'activation des voies ERK et Rho qui permettent la prolifération et la contraction des cellules tumorales, participant ainsi au phénotype cancéreux. Ces travaux ont mis en évidence qu'en plus du remodelage de la MEC dans le développement tumoral, il faut également considérer les tensions exercées par la matrice et les mécanismes de transductions activés. Mais la mécanotransduction n'est pas impliquée uniquement dans des phénomènes pathologiques et possède également des rôles dans d'autres mécanismes tels que:

- les mécanismes de cicatrisation par les myofibroblastes (Van De Water *et al.* 2013). La cicatrisation est caractérisée par une synthèse importante en fibronectine au niveau de la blessure. La fibronectine est une protéine qui possède une capacité de s'étirer lorsqu'elle est soumise à des tensions. La fixation des intégrines aux fibronectines permet le dépliement des fibronectines, ce qui

engendre leurs compactations en fibrilles et augmente ainsi les tensions appliquées sur les cellules (Zhong *et al.* 1998), aboutissant à la formation d'«adhésions fortes» (Choquet *et al.* 1997). Une modification de conformation de taline1 est alors obtenue, permettant le recrutement de la vinculine et l'engagement du cytosquelette d'actine dans l'adhésion focale des myofibroblastes (Dugina *et al.* 2001). La mise en place de ces adhésions focales, impliquant la polymérisation des filaments d'actines, permet le relargage de MRTF-A (Myocardin-Related Transcription Factor) qui est alors transloqué au noyau et induit l'expression des gènes responsables de la différenciation en myofibroblaste via SRF (Serum Response Factor) (Wang *et al.* 2011).

- le contrôle du cycle cellulaire. L'induction de l'expression de la cycline D1 est une étape essentielle pour la progression en phase G1 du cycle cellulaire. Une étude de Klein et collaborateurs démontre que cette expression est dépendante de la rigidité matricielle (Klein *et al.* 2009). En effet, la phosphorylation de FAK est diminuée dans les cellules en culture sur des substrats lâches, parallèlement à une inhibition de l'expression de la cycline D1. Toutefois, la transfection avec FAK constitutivement activée ne permet pas de restaurer la synthèse de la cycline D1 dans ces cellules cultivées.

- la différenciation cellulaire : durant l'ostéogénèse à partir de cellules souches embryonnaires (Evans *et al.* 2009), la différenciation neuronale (Engler *et al.* 2006)... En ce qui concerne l'ostéogénèse, la rigidité du substrat est corrélée avec la différenciation en ostéoblaste, avec une augmentation des dépôts minéralisés pour les matrices rigides. Quant à la différenciation neuronale, il a été montré que les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en neurones sur des substrats lâches, de rigidités proches de celles du cerveau, alors que sur des surfaces rigides, les cellules souches se différencient en myocytes ou ostéoblastes.

### **a) Rôle des intégrines dans la mécanotransduction**

Comme nous venons de le voir, pour que les cellules puissent répondre à des tensions du milieu extérieur, il faut que l'information mécanique soit transformée en message biochimique. Cela se fait principalement via les intégrines, des protéines transmembranaires, liées à la fois à la matrice extracellulaire et au cytosquelette (Ingber 1991). La sous-unité  $\beta$  des intégrines est l'effectrice pour la signalisation et la fixation des protéines cytoplasmiques. La sous-unité  $\alpha$  sert à moduler cette fixation, et peut modifier l'efficacité de fixation du ligand par une interaction intermoléculaire au niveau de la partie cytoplasmique de la sous unité  $\beta$  (Liu *et al.* 2000). Les intégrines permettent la transmission du signal de manière bi-directionnelle, du milieu extérieur à la cellule, mais également de la cellule à la MEC. De nombreuses protéines peuvent ainsi se fixer au niveau de leurs domaines intracytoplasmiques et former une adhésion focale permettant de transmettre le signal. On retrouve des protéines structurelles ( $\alpha$ -actinine, la taline, la vinculine...), des protéines adaptatrices ( Grb2, Sos... ) et des molécules de signalisation (FAK, protéines-G Rho, ERK...) (Friedl and Brocker 2000) (Fig.15).

Lors de l'activation des intégrines dans les adhésions focales, de nombreux messagers secondaires sont produits pour aboutir à la réponse cellulaire, et l'activation des voies des MAPKs et de PI3K (Cornillon *et al.* 2003). L'acteur central est l'activation de FAK qui autophosphorylée interagit avec Src et le phosphoryle sur de nombreux sites permettant de fixer d'autres partenaires :

- Grb (GTPase Regulator Associated with Focal adhesion kinase), Grb7 (Growth factor Receptor-Bound protein 7) (Han and Guan 1999) et PLC $\gamma$  (PhosphoLipase C  $\gamma$ ) (Zhang *et al.* 1999), aboutissant à l'activation de Rho et participant au remaniement du cytosquelette d'actine impliqué dans la migration.

- Grb2 (Growth factor Receptor-bound protein 2) et Sos, recrute la GTPase Ras (Schlaepfer *et al.* 1994). Fak s'associe également à p130<sup>Cas</sup> et Crk pour recruter la GTPase Rac (Polte and Hanks 1995). Ensuite Ras et Rac peuvent recruter Raf1, puis MEK (MAP ERK Kinase) et enfin ERK (Klemke *et al.* 1998), qui pourront activer des substrats cytoplasmiques et des facteurs de transcription et permettre ainsi la réponse de la cellule, notamment en contrôlant la prolifération et la différenciation.

- p130<sup>Cas</sup> peut se lier à C3G (CRK SH3-binding GNRP) (Kirsch *et al.* 1998) puis recruter JNK (Jun N-terminal Kinases) qui activera également des substrats cytoplasmiques et des facteurs de transcription (Geiger 2006).

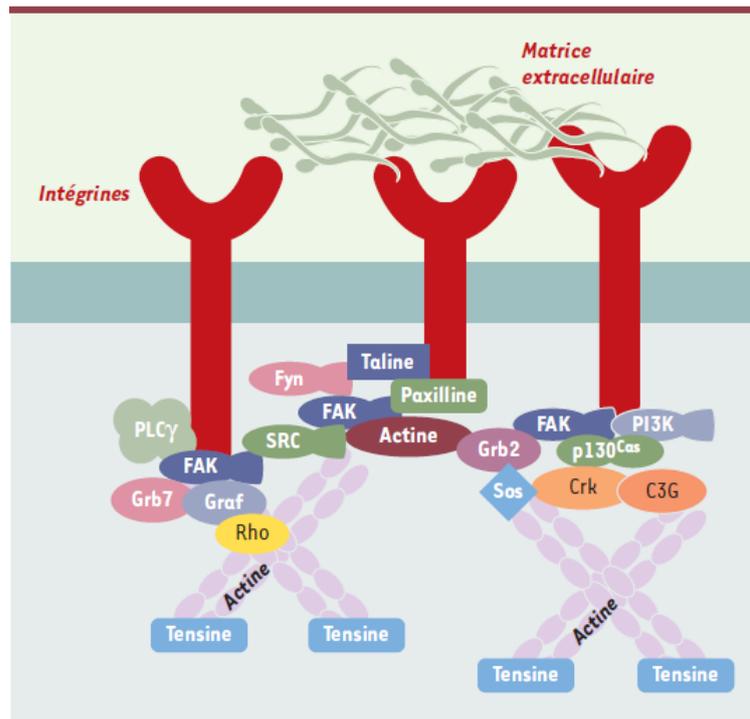
- PI3K phosphoryle l'inositol notamment en PIP2 (Phosphatidyl Inositol biPhosphate). Le PIP2 active la protéine kinase Akt qui régule à son tour NF $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B) et peut induire des signaux anti-apoptotiques (Sonoda *et al.* 2000). L'activation de ces voies via les intégrines montre que leurs activations peuvent être à l'origine de nombreuses réponses par la cellule (Fig.16) suite à une stimulation par la MEC.

## **b) Les voies de signalisation impliquées dans la mécanotransduction**

Les principales voies de signalisation activées par et associées aux mécanismes de mécanotransduction sont les voies TGF- $\beta$ /Smad, les MAPKs (MEK/ERK), RhoA/ROCK et les Stretch Activated Channels (SACs)/MLCK.

- La voie TGF- $\beta$ /Smad

Le TGF- $\beta$  joue un rôle important dans la mécanotransduction durant la prolifération des fibroblastes. En effet, de nombreux types cellulaires soumis à un stimulus mécanique induisent une production, sécrétion et activation de TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  agit après fixation sur un récepteur homo- ou hétéro-dimérique avec activité sérine/thréonine kinase, dont la signalisation canonique passe par les protéines Smads. Les Smad2 et Smad3 sont ainsi activés par le récepteur au TGF- $\beta$ , et pourront former un hétérotrimère avec Smad4. Ce complexe migre ensuite dans le noyau où il peut se fixer à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et transactiver ses gènes cibles. Des données *in vivo* montrent qu'au niveau de la cicatrisation d'une plaie, en présence d'un environnement rigide, l'activation de Smad2/3 est plus forte que celle du tissu ou du stroma relâché (Wipff *et al.* 2007). Il est montré que lorsque des



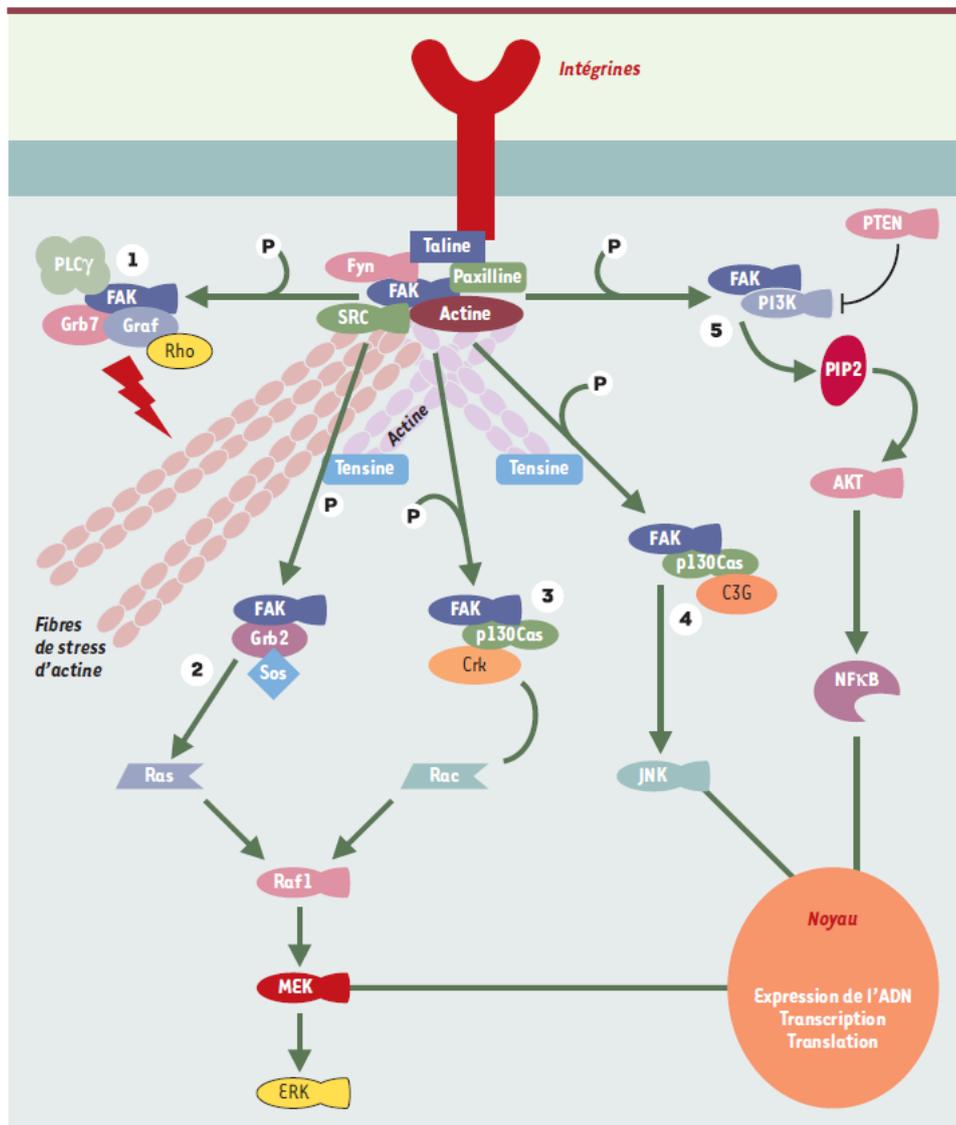
**Figure 15 : Le complexe d'adhérence focale.** La protéine FAK est un point central qui fait la liaison entre les récepteurs, les protéines du cytosquelette et des différentes voies de signalisations. (Cornillon *et al.* 2003)

tensions sont appliquées sur des fibroblastes, ceux-ci ont la capacité d'activer le TGF- $\beta$  de manière indépendante des métalloprotéases MMPs. L'activation du TGF- $\beta$  se fait via la contraction des fibroblastes, appliquant une tension par les intégrines sur la protéine LAP (Latency Associated Protein). Si le TGF- $\beta$  est ancré dans une matrice rigide, cette contraction des fibroblastes fournira une force assez importante pour déplier la protéine LTBP-1 (Latent TGF- $\beta$  Binding Protein 1) permettant la libération du TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  peut alors activer les fibroblastes et aboutir au maintien et à la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes producteurs de MEC.

- Les voies des MAPKs

Les voies des MAPKs ont également un rôle important dans la mécanotransduction, et peuvent répondre à divers stimuli mécaniques. Les MAPKs sont divisés en 3 groupes majeurs : ERK1/2, JNK et p38. Ces voies de signalisation sont caractérisées par des cascades de signalisations, avec activation en amont d'une « Mitogen-Activated Protein Kinase kinase kinase » (MAP3K) suivi de l'activation de MAP2K et enfin de la MAPK par une série de phosphorylation.

Les voies des MAPKs peuvent être activées suite à l'adhésion des intégrines à la matrice extracellulaire (Danen and Yamada 2001). Cette activation de la voie MAPK permet le contrôle de la migration cellulaire, la prolifération (Kleotka *et al.* 2001) et différenciation cellulaire (Giancotti and Ruoslahti 1999). Cette activation via les intégrines passe par l'autophosphorylation de FAK et le recrutement de Src ou Fyn, de Grb2 et Ras, puis de Raf-1 pour aboutir à l'activation de MEK/ERK. Cette relation entre la voie des MAPKs et les intégrines peut être modulée suite à des modifications de rigidité de la MEC. Il a ainsi été démontré que la rigidité peut réguler l'expression de cycline D1, et ainsi permettre l'avancée en fin de phase G1 du cycle cellulaire des fibroblastes (Assoian and Klein 2008). En effet, lorsque la matrice est rigide, la voie ERK est inhibée et la cycline D1 plus exprimée, induisant alors un arrêt du cycle en phase G1. Lorsque les cellules sont cultivées sur des substrats lâches la voie ERK est activée, induisant la synthèse de cycline D1 et l'avancé du cycle cellulaire en phase S. Cependant, ces effets sont très dépendants des types cellulaires analysés, des conditions expérimentales et des substrats. Dans les cellules hépatiques transformées Huh-7, la voie des MAPKS MEK/ERK est préférentiellement activée par l'HGF lorsque les cellules sont cultivées sur un substrat rigide, en relation avec une induction de la prolifération (Schrader *et al.* 2011). La Protéine Kinase A (PKA), via la voie des MAPKs, semble avoir également un rôle dans la modulation de la réponse des hépatocytes à la rigidité du substrat (Hansen *et al.* 2006). En effet, des hépatocytes cultivés sur des gels de collagène (substrat lâche) ont une inhibition de la prolifération et une augmentation de la différenciation, alors que sur un coating de collagène (substrat rigide), les hépatocytes prolifèrent plus et se dédifférencient. En ce qui concerne les cellules sur coating de collagène, le substrat résiste à la contraction de l'actomyosine cellulaire, permettant la formation d'une adhésion focale et l'activation du récepteur à l'EGF qui active la voie Ras/MEK/ERK et ainsi la production de la cycline D1.



**Figure 16 :** Les voies de signalisations de l'adhérence focale. Schéma simplifié représentant les interactions entre les protéines d'adhérence et les voies de signalisations sous-jacentes. (Cornillon *et al.* 2003)

Les cellules cultivées sur les gels de collagène, ont elles une activité de PKA très fortement augmentée, qui a pour conséquence une inhibition de la voie Ras/MEK/ERK.

La voie de signalisation des MAPKs possède également un rôle dans l'ostéogenèse induite par les tensions de la matrice. En effet, Khatiwala et collaborateurs (Khatiwala *et al.* 2007, Khatiwala *et al.* 2009) montrent que la lignée cellulaire MC3T3 se différencie en ostéoblaste lorsque les cellules sont cultivées sur des substrats rigides, avec une augmentation de l'activité des alcalines phosphatases, et une augmentation de production d'ostéocalcine (OCN) et de la protéine Bone SialoProtein (BSP). Ces inductions sont corrélés avec une augmentation de l'activité des MAPK, et une inhibition de MAPK par le PD98059 inhibe les alcalines phosphatases et la production d'OCN et BSP. Les tensions appliquées sur les cellules peuvent donc activer les MAPKs, une voie indispensable à la différenciation en ostéoblastes.

La voie MAPK est également sensible aux contraintes de cisaillements (Shepherd *et al.* 2009). Des cellules endothéliales aortiques humaines soumises à des contraintes de cisaillement, par une variation du flux du milieu de culture, ont une phosphorylation des protéines MAPKs : ERK, JNK et p38 augmentée par rapport aux cellules en conditions statiques. De plus, cette phosphorylation des MAPKs est d'autant plus importante que le flux est augmenté, démontrant la capacité de ces cellules à détecter les forces variables appliquées à leur surface.

- La voie RhoA/ROCK

La voie RhoA/ROCK (Rho associated protein Kinase) joue également un rôle important dans les pathologies liées à l'accumulation de MEC et dans la réponse liée à la rigidification de l'environnement cellulaire. La famille des Rho GTPase est divisée en 8 sous-familles. Les plus importantes sont Rho, Rac et Cdc42. La famille Rho est constituée de 3 membres : RhoA, RhoB et RhoC. Les Rho GTPase régulent l'organisation du cytosquelette d'actine en facilitant la mise en place des adhésions focales et des fibres de stress (Ridley and Hall 1992). ROCK est l'effecteur direct de RhoA. Il existe 2 isoformes de ROCK : ROCKI et ROCKII. Les substrats de ROCK sont divers, on retrouve notamment des protéines en relation avec le cytosquelette, telles que LIM Kinase et MLC (Myosin Light Chain). La voie Rho kinase a une forte influence sur l'activité d'autres voies, telles qu'ERK1/2, JNK et p38. La voie RhoA/ROCK joue principalement un rôle dans le développement de la fibrose hépatique par son action sur les cellules étoilées. Il a ainsi été démontré qu'un inhibiteur de Rho kinase, l'Y-27632, inhibe le développement de la fibrose hépatique, en partie via l'inhibition de l'activation des cellules étoilées (Tada *et al.* 2001).

La voie RhoA/ROCK peut être directement activée suite à un stress mécanique dans les cellules endothéliales (Lin *et al.* 2003). En effet, l'activation des gènes de l'homéostasie des stérols et des lipides dans les cellules endothéliales par les facteurs de transcriptions SREBPs (Sterol Regulatory

Element Binding Proteins) nécessitent un clivage des SREBPs pour pouvoir être transloqués dans le noyau. Lorsque les cellules endothéliales sont soumises à un stress de cisaillement, Rho se localise au niveau de la membrane plasmique et active deux de ces effecteurs : ROCK et LIMK, qui phosphorylent ensuite la cofiline. Ce mécanisme aboutit au clivage des SREBPs par S2P, et ainsi la transcription des gènes cibles permettant l'activation des gènes de l'homéostasie des stérols et des lipides.

La voie RhoA est également impliquée dans l'induction d'expression de l' $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin) lors de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes suite à une activation mécanique (Zhao *et al.* 2007). Dans cette étude, les forces sont appliquées par l'intermédiaire de collagène coaté de billes magnétiques dans un champ magnétique. Cette même cascade est impliquée lorsque les cellules sont soumises à des forces de tension, avec une activation de Rho, puis de LIMK qui aboutit à la phosphorylation de la cofiline. La cofiline se sépare alors de l'actine et permet la polymérisation des filaments d'actine sous forme de fibres de stress. Ensuite une translocation de MRTF-A dans le noyau active la transcription du gène codant pour l' $\alpha$ -SMA, en partie responsable de la différenciation en myofibroblaste.

RhoA peut également modifier la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes ou en ostéoblastes (McBeath *et al.* 2004). Dans ce cas, ce n'est pas les tensions extérieures à la cellule qui sont impliquées, mais les tensions intracellulaires induites par le réseau actine/myosine. En effet, selon la forme des cellules, les tensions intracellulaires sont nettement différentes. Ainsi, les cellules rondes et peu étalées possèdent peu de tensions intracellulaires comparées à ces mêmes cellules très étalées. Cette étude montre que lorsque les cellules adoptent la forme étalée, avec de fortes tensions intracellulaires, RhoA puis ROCK sont activés. Ces activations ont pour conséquence la différenciation des cellules souches en ostéoblastes. A l'inverse, lorsque la voie RhoA est inhibée, les cellules souches restent rondes et se différencient préférentiellement en adipocytes.

- Stretch Activated Channels (SACs)/MLCK

Les SACs sont des canaux ioniques mécanosensibles. Lorsqu'une force de contraction leur est appliquée, ils deviennent perméables pour les ions. Une hypothèse est que les forces appliquées séparent les protéines les unes des autres et forment ainsi un pore dans la membrane (Hamill and McBride 1996). La famille de récepteurs la plus étudiée est celle des TRPs (Transient Receptor Potential), une famille de récepteurs perméables au calcium (Clapham 2003). Ces récepteurs sont sensibles aux contraintes et permettent l'influx transitoire de calcium lorsque les cellules sont étirées (Follonier *et al.* 2008).

Il a de plus été montré que des cellules cultivées sur des substrats présentant différentes rigidités ont des variations d'amplitudes de leurs oscillations de calcium, montrant que la perméabilité des SAC

est sensible à la tension du microenvironnement cellulaire (Kobayashi and Sokabe 2010). Une étude a également démontré que l'étirement d'une cellule par des micro-aiguilles induit une entrée de calcium dans la cellule dépend des SACs (Lee *et al.* 1999). Les modifications de concentration en ions calcium pourront ensuite activer la voie Calmoduline/MLCK (Myosin Light Chain Kinase). Pour cela le calcium se fixe sur la Calmoduline et l'active. La calmoduline peut ensuite activer la MLCK qui phosphoryle MLC sur la sérine 19. Cette phosphorylation permet à MLC de se fixer sur les filaments d'actine et de promouvoir la contraction cellulaire et la migration (Blumenthal and Stull 1980).

## Cadre et Buts du Travail

La fibrose hépatique est caractérisée par une accumulation excessive de MEC qui a pour conséquence une augmentation de la rigidité du foie, et des forces de tensions appliquées sur les hépatocytes résidents. Des mécanismes de mécanotransduction permettent de répondre à ces modifications de rigidité et participent à la régulation du phénotype cellulaire : prolifération, apoptose, différenciation, migration. Lors du développement de la pathologie fibrotique, les tensions importantes appliquées sur les cellules hépatiques engendrent une perturbation des fonctions cellulaires qu'il est nécessaire de caractériser.

Le but de mon travail a été d'étudier l'effet des forces de tensions sur la survie, la prolifération et la différenciation des hépatocytes normaux et transformés, *in vitro*. Nous avons également caractérisé les modifications quantitatives et qualitatives de la matrice extracellulaire *in vivo* dans un modèle expérimental de fibrose chez la souris.

- **Partie I** : Impacts des forces de tensions sur le phénotype des cellules hépatiques *in vitro*.

Pour cette étude, des cultures cellulaires en 3D dans des gels de collagène ont été développées. Ce modèle possède plusieurs avantages liés principalement à l'environnement 3D dans lequel les cellules sont cultivées. Il est en effet possible de faire varier la rigidité de la matrice en modifiant la concentration en collagène. Dans ce contexte, les relations entre forces de tensions et survie, prolifération, apoptose, différenciation et migration des hépatocytes peuvent être analysées. Les modifications d'organisation et de structure du gel par les cellules peuvent être également caractérisées. Ce modèle nous a permis de caractériser le phénotype des cellules hépatiques normales (hépatocytes de rat) et transformées (Huh-7 et F1) dans un contexte de forces de tension variables.

- **Partie II** : Caractérisation de la matrice de collagène, *in vivo*, lors du développement de la fibrose, par microscopie SHG.

Pour cette étude, un modèle murin de fibrose hépatique par administration de CCl<sub>4</sub> a été mis en place. La microscopie SHG a été développée pour caractériser et quantifier l'accumulation de collagène. Cette approche a permis de déterminer également les modifications des paramètres de texture du collagène lors du développement de la fibrose.



# RÉSULTATS



# Partie 1 : Impacts des forces de tensions sur le phénotype des cellules hépatiques normales et transformées

## Introduction

Depuis les années 1970, différents modèles d'hépatocytes en culture primaire ont été développés. En effet, la culture d'hépatocytes constitue un intérêt majeur pour l'étude des mécanismes régulant la prolifération, la différenciation ou la survie hépatocytaire. La survie des hépatocytes en culture 2D sur support plastique est limitée à une semaine pour les rongeurs et deux semaines pour l'homme. Le maintien des fonctions différenciées peut être amélioré par l'addition de facteurs solubles (corticoïdes, nicotinamides, facteurs de croissance tels que l'EGF ou l'HGF) (Hamamoto *et al.* 1999, Liu *et al.* 2013). Le groupe d'Isom a montré que le DMSO (Dimethyl Sulfoxide) est un puissant modulateur de la survie et différenciation des hépatocytes en culture primaire 2D (Isom *et al.* 1985, Isom *et al.* 1987). La stabilité fonctionnelle des hépatocytes peut également être améliorée en modifiant le microenvironnement cellulaire par ajout d'une MEC ou d'un second type cellulaire à la culture tel que des cellules épithéliales biliaires (Guguen-Guillouzo *et al.* 1983). Dans ces conditions, les hépatocytes survivent plusieurs semaines et maintiennent une bonne activité fonctionnelle. Plus récemment, il est également possible d'obtenir des hépatocytes en culture primaire par la différenciation de cellules progénitrices hépatiques en hépatocytes-like (Gerbal-Chaloin *et al.* 2010). En effet, lors de la culture des cellules progénitrices hépatiques à confluence, en présence de HGF et EGF ou FGF, un processus de différenciation est initié avec l'expression de marqueurs de différenciation hépatiques tels que l'albumine, l' $\alpha$ 1-antitrypsine, le fibrogène... (Duret *et al.* 2007)

### ***A) Les différents modèles de culture 3D***

Pour s'affranchir des inconvénients liés aux cultures d'hépatocytes en 2D et mimer un environnement 3D plus proche de celui du tissu, des modèles de cultures en 3D ont été développés. Il s'agit des :

- **Gels sandwich** : les hépatocytes sont cultivés entre 2 couches de collagène (Dunn *et al.* 1991). Ces conditions permettent de reproduire l'interaction avec la MEC sur deux faces, améliorant ainsi le maintien des fonctions hépatiques, mais ne modifiant que faiblement l'organisation en 3D des cellules.

- **Cultures en bioréacteurs** : dans ces systèmes, les hépatocytes adhèrent sur des surfaces fibreuses ou des membranes (Busse and Gerlach 1999). Les bioréacteurs ont une rotation autour d'un axe horizontal qui permet aux cellules de s'agréger dans un environnement présentant un minimum de contraintes fluidiques et de turbulences.

- **Cultures sur plaques non adhésives** : les hépatocytes sont cultivés dans des boîtes de cultures dont la surface est traitée pour éviter l'adhérence des cellules. Les hépatocytes s'agrègent entre eux et forment des sphéroïdes permettant le maintien des fonctions différenciées (Landry *et al.* 1985, Koide *et al.* 1990).

- **Inclusions des cellules dans des gels 3D** : la culture des hépatocytes est effectuée dans des gels de MEC. L'un des premiers gels à avoir été commercialisé est le Matrigel™, une MEC extraite d'un sarcome de souris (Kleinman *et al.* 1986). Ainsi, il a été démontré que les interactions avec des éléments de la MEC peuvent suffire à maintenir dans un état différencié les cellules (Moghe *et al.* 1997). L'un des inconvénients de son utilisation est que la constitution exacte du Matrigel est peu ou pas connue, et qu'il existe une variabilité de composition entre les différents lots. L'Extracel™, un hydrogel à base d'acide hyaluronique (Prestwich 2008), permet de maintenir l'activité des CYP pendant plus de 17 jours de culture. Un autre gel, le PuraMatrix™, à base d'un peptide qui s'auto-assemble, permet la différenciation de progéniteurs hépatocytaires en hepatocyte-like matures qui expriment l'albumine et ont une bonne activité CYP (Semino *et al.* 2003). Enfin, l'utilisation du collagène de type I permet de former des gels 3D constitué d'un unique composé simplifiant ainsi le modèle 3D. C'est un modèle de premier choix, la fibrose hépatique étant caractérisée par une forte accumulation de collagène I.

### ***B) Le modèle 3D des gels de collagène I***

Le modèle de culture d'hépatocytes dans des gels 3D de collagène est une technique permettant de maintenir une activité des enzymes du métabolisme plus importante que dans les cultures classiques en 2D. L'activité des cytochromes CYP 2E1 (de Smet *et al.* 1997), CYP 1A, 2A2, 2B1 et 3A1 (Gomez-Lechon *et al.* 1998), ainsi que la survie des hépatocytes sont maintenues sur une longue période (plusieurs semaines).

Cette technique est adaptée aux études de l'impact des tensions sur le phénotype cellulaire, une caractéristique de la MEC importante durant le développement de la fibrose hépatique. Les propriétés physiques des gels peuvent être modulées de différentes manières :

- Certains agents chimiques permettent de créer des cross-links entre les fibres de collagène. C'est le cas du poly(éthylène glycol) di-(succinic acid N-hydroxysuccinimidyl ester) (Liang *et al.* 2011), du glutaraldéhyde (Miron-Mendoza *et al.* 2010), de la glycation (Mason *et al.* 2013), du « photo crosslinking » (Brinkman *et al.* 2003) ou de la genipin (Dare *et al.* 2009). Cependant ces substances sont pour la majorité cytotoxiques et/ou peuvent modifier le collagène en masquant des sites de fixation pour les cellules.

- la rigidité des gels de collagène peut être modifiée de manière mécanique (Brown 2005) en comprimant les gels par une charge ou en réduisant leur hydratation. Durant la culture, les cellules

augmentent la rigidité des gels en les contractants (Kamel *et al.* 2014). Mais ces méthodes sont difficilement contrôlables, avec des possibilités d'hétérogénéités à l'intérieur des gels.

- la taille des pores, ainsi que le diamètre des fibres de collagène peuvent être contrôlés en modulant la concentration en collagène et le pH durant la gélification (Roeder *et al.* 2002). Cependant une faible gamme de pH peut être utilisée afin de préserver la viabilité des cellules, limitant ainsi l'utilisation de ce paramètre.

La variation de la rigidité des gels par la concentration en collagène a été choisie pour cette étude. En effet, elle ne nécessite pas d'ajout de substances chimiques cytotoxiques qui modifieraient la réponse cellulaire.

## Résultats

### Etude du phénotype des cellules hépatiques soumises à différentes tensions dans des gels 3D

Une accumulation de MEC est retrouvée dans de nombreuses pathologies chroniques du foie. Cette accumulation entraîne la rigidification du tissu et quelques études ont démontré la relation entre l'augmentation de la rigidité du tissu hépatique, déterminée par élastographie, et le risque de développer un HCC (Masuzaki *et al.* 2009). Il est admis que dans le foie, les cancers se développent à partir d'un microenvironnement matriciel particulier pouvant affecter le phénotype cellulaire et la réponse aux facteurs de croissances et cytokines. Il nous a paru donc nécessaire de caractériser le phénotype des cellules hépatiques dans un environnement de rigidité variable. Dans ce contexte, nous avons caractérisé les effets des forces de tensions sur le phénotype de cellules hépatiques normales et transformées lorsqu'elles sont placées dans des gels de collagène.

#### 1) La rigidité des gels induit une augmentation de la croissance des cellules hépatiques Huh-7 en sphéroïdes

Nous avons tout d'abord démontré par rhéométrie que la concentration en collagène est corrélée avec une augmentation de la rigidité des gels. Deux concentrations en collagène, correspondant à des tensions de 1 et 3.5 Pa, ont été utilisées dans cette étude. Nos résultats montrent que l'augmentation de rigidité est accompagnée d'une variation importante de la morphologie cellulaire des cellules Huh-7. Alors que dans les gels de 1 Pa les cellules sont étalées et forment des plages de cellules connectées, les cellules se regroupent en sphéroïdes dans les gels rigides, indiquant un effet très net des tensions sur la morphologie cellulaire. Ces variations morphologiques sont accompagnées d'une augmentation de la prolifération des cellules dans les gels de 3,5 Pa comparés aux gels de 1 Pa et à la culture 2D, montrant un effet positif des forces sur la prolifération des cellules hépatiques transformées. Ces résultats ont été confirmés à l'aide d'un second modèle cellulaire. En effet, les hépatocytes de rat en culture 3D sont également sensibles aux variations de rigidité par rapport aux cultures en monocouche 2D.

Nos résultats indiquent que les cellules Huh-7 cultivées dans les gels rigides ont un phénotype plus épithélial que lorsqu'elles sont cultivées dans les gels lâches, et notamment une augmentation d'expression de l'E-cadhérine et une diminution de la N-cadhérine et de la vimentine. L'analyse de certains marqueurs liés à la différenciation des hépatocytes de rat dans ces gels a montré qu'ils exprimaient plus fortement l'albumine, l'aldolase et la GSTa2 (Gluthatione S-Transferase a2) dans des conditions de rigidités plus fortes.

Dans ces conditions de culture 3D, très peu de cellules sont en nécrose, quel que soit le temps de culture, et en absence de traitement par des composés toxiques, peu de cellules sont en apoptose. Une protection partielle vis-à-vis de l'apoptose induite par un traitement par le cisplatine à haute concentration (30µg/ml) est mesurée dans les cellules cultivées dans les gels rigides à 3,5 Pa.

## **2) Importance de la voie MEK/ERK dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules Huh-7**

Des études réalisées au sein de l'équipe ont démontré l'importance de la voie de signalisation MEK/ERK dans les mécanismes de régulation de l'apoptose et de la prolifération des hépatocytes normaux et transformés. Dans un premier temps, nous avons confirmé le rôle de la voie MEK/ERK dans la prolifération et l'apoptose des cellules Huh-7 en culture 3D, que ce soit dans les gels lâches ou rigides. La prolifération, comme dans les cultures 2D, est dépendante d'ERK2 tandis que l'apoptose est régulée préférentiellement par ERK1. La régulation de l'expression du facteur pro-apoptotique Noxa semble être sous la dépendance du rapport d'expression/d'activation des deux isoformes ERK1/ERK2. Ces résultats en gel 3D confirment l'importance de développer des traitements visant à cibler spécifiquement ERK2, permettant ainsi une inhibition de la prolifération des cellules hépatiques transformées sans inhiber l'induction d'apoptose, dépendante de ERK1.

## **3) La migration cellulaire et la réorganisation de la matrice semblent dépendantes des voies MEK/ERK et MLCK**

Les modifications de la structure du gel de collagène durant la culture ont été caractérisées par microscopie biphotonique de génération de seconde harmonique (SHG). Nos résultats indiquent que dans les gels rigides, les cellules modifient fortement le réseau de collagène. Après 5 jours de culture, les sphéroïdes sont entourés par un épais réseau de collagène très dense (similaire au TACS 2 (Tumor Associated Collagen Signature) décrit *in vivo*). Des faisceaux parallèles de collagène entre les sphéroïdes (TACS 3) sont également présents. *In vitro*, nous avons confirmé ces observations à l'aide d'un autre type de cellules hépatiques transformées, la lignée F1, des cellules épithéliales très motiles. Dans les gels rigides, après 5 jours de culture, les cellules F1 forment des ponts cellulaires plus ou moins développés entre les sphéroïdes et situés sur les TACS 3. Nous avons également montré que de telles structures (TACS 1, 2 et 3) sont également visibles par microscopie SHG dans les foies cirrhotiques s'étant développés sur HCC.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la réorganisation de la MEC pour la formation des TACS 3, nous avons inhibé trois voies de signalisations cellulaires décrites comme importantes dans la régulation des mécanismes de mécanotransduction : les voies MEK/ERK, ROCK et MLCK. La quantification des noyaux dans les cultures 3D inhibées comparées aux contrôles indique que le ciblage de MEK/ERK et MLCK inhibe fortement la prolifération cellulaire des cellules

F1, alors que l'inhibition de la voie ROCK n'a aucun effet. De plus, nos résultats démontrent que l'inhibition de la voie MEK/ERK, bien que ne bloquant pas la formation des TACS 3, bloque les ponts cellulaires entre les sphéroïdes. L'inhibition de la voie MLCK bloque à la fois l'apparition des cellules entre les sphéroïdes et la réorganisation de la matrice en TACS. La voie ROCK ne semble pas impliquée dans ces phénomènes, puisque son inhibition ne modifie ni les TACS 3 ni la présence des cellules entre les sphéroïdes.

Nos résultats obtenus à l'aide de cultures 3D, confirment et étendent l'importance du rôle des voies de signalisations MEK/ERK et MLCK dans la prolifération et la motilité des cellules hépatiques transformées.

**Stiffness strengthens proliferation and motility of human liver cells in 3D collagen matrices through the MEK/ERK and MLCK pathways.**

**Jérémy Bomo<sup>1</sup>, Frédéric Ezan<sup>1</sup>, François Tiaho<sup>1</sup>, Denis Rouède<sup>2</sup>, Alain Fautrel<sup>3</sup>, Sophie Langouët<sup>1</sup>, Nathalie Theret<sup>1</sup> and Georges Baffet<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Inserm-University of Rennes 1 UMR1085, IRSET Institut de Recherche sur la Santé l'Environnement et le Travail, SFR Biosit, F-35043 Rennes, France

<sup>2</sup>CNRS-University of Rennes 1 UMR 6251 IPR, Institut de Physique de Rennes, F-35043 Rennes, France

<sup>3</sup> Plate-forme H<sup>2</sup>P<sup>2</sup>, SFR Biosit, Biogenouest, University of Rennes 1, France

\*Running title: 3D matrix stiffness and liver cells phenotype

**Correspondence should be addressed to:** Georges Baffet, UMR 1085, IRSET, Inserm-University of Rennes 1, Campus de Villejean, CS 34317, 35043 Rennes, France. Tel: (33)2.23.23.45.92. E-mail: georges.baffet@inserm.fr

## **Keywords**

---

Matrix stiffness, liver cells, proliferation, apoptosis, “SHG microscopy”

**Abstract:**

Mechanical forces influence the growth and shape of virtually all tissues and organs. Recent studies show that increased cell contractibility, growth and differentiation might be normalized by modulating cell tensions. Particularly, the role of these tensions applied by the extracellular matrix during liver fibrosis could greatly influence the hepatocarcinogenesis process. The objective of this study is to determine how ECM stiffness could influence growth, survival and differentiation of transformed human hepatocytes and to integrate the specific role of intracellular signaling associated with mechano-regulatory pathways linking matrix ECM stiffness to tensional homeostasis. We have developed an appropriate 3D culture model: human liver tumor cells within three-dimensional collagen matrices with varying rigidity which mimic the ECM forces. Our results show that the rigidity greatly influenced the cell phenotype and induced spheroid clusters proliferation whereas in soft matrices, cells were less proliferative, well-spread and flattened. As compared to 2D culture, increasing 3D matrix stiffness is associated with a graduate shift from mesenchymal to epithelial states, showing the crucial importance of variations of 3D rigidity in the MET/EMT process in liver cells. Differentiation of normal hepatocytes was also greatly induced in 3,5 Pa gels, as compared to 1 Pa gels and 2D cultures. To better understand cluster organisations within stiff collagen gels, we imaged liver cells using Two-Photon-Electron-Fluorescence (TPEF) whereas collagen was ascertained by Second Harmonic Generation (SHG) microscopy. We evidenced fibers stretched around 3,5 Pa spheroids (TACS2) and noted an important radially aligned and parallel organization between spheroids typical of tumor-associated collagen signatures (TACS3) also found in vivo, in HCC with liver cirrhosis. Furthermore, we demonstrated that contact guidance of cell migration of highly motile liver cells on TACS3 collagen could be under MLCK and MAPK dependent mechanisms.

## **Introduction:**

Chronic liver diseases leading to HCC are associated with extracellular matrix (ECM) overproduction. Studies in the field of Mechanical Biology have revealed that many cell behaviors for multi-step cancer formation can be controlled by physical interactions between cells and their ECM (Paszek and Weaver, 2004; Paszek et al., 2005). Cells in vivo are often surrounded by ECM and will encounter varying three-dimensional matrix environments and mechanical forces during wound healing fibrosis development. It is now accepted that insoluble factors, particularly components of the ECM, have equally essential roles as soluble mitogens and antimitogens in the proliferation/differentiation of many cell types. Soluble mitogens and ECM proteins jointly regulate activation of the G1 phase which is required for S phase entry, mainly through the activation of ERK MAPKinases and Rho/MLCK pathways in hepatic cells. Temporal activations/inhibitions are key determinants in generating precise biological responses (Frémin et al., 2012; Kholodenko et al., 2010). As a hallmark of ECM-cell interactions, the ability to sense extracellular stiffness and tissue stiffness/compliance, may be an important determinant of downstream dependent signaling events. These findings question basic assumptions in the field of cancer research, and raise the intriguing possibility that cancer development may be, up until a certain point, a potentially reversible disease that results from progressive dysregulation of tissue architecture leading to physical changes in ECM/cells and altered mechanical signaling. This perspective raises the possibility of developing biologically-inspired materials that mimic microenvironment and that could be used to induce and reverse cell phenotype into cells and tissues. A pervasive model approach to the study of ECM function could be using cells cultured in substrat which mimic the variations in rigidity of the extracellular environment that liver cells encounter in vivo.

Liver fibrosis is a wound-healing process leading to ECM deposit and formation of macro-regenerative nodules, in response to various toxic injuries and associated with almost all chronic liver diseases (for review (Wallace et al., 2008)). Indeed, cirrhosis is characterized by macro-regenerative nodules (also referred as adenomatous hyperplastic nodules or dysplastic nodules) which correspond to premalignant lesions. These early malignant nodules are quite similar to large regenerative nodules and are under increasing mechanical stress. Once established, tumor development is associated with further increases in matrix stiffness. Prospective studies have shown the association between liver stiffness measurement by elastography and the risk of HCC development in patients with hepatitis C (Masuzaki et al., 2009). It is now accepted that HCC develops and grows in a particular microenvironment surrounded by mechanical forces that could greatly affect the phenotype

of liver cells. The role of the extracellular matrix stiffness in the process of hepatocarcinogenesis could therefore greatly influence cell fate and the balance between proliferation, differentiation, survival and motility. However, little is known about whether and how intracellular signalling pathways are activated by mechanical microenvironment in the liver during fibrosis and cirrhosis.

Collagen, the most important structural component of ECM, is a readily available biomaterial which can be used in a 3D matrix model with varying fitness. In contrast to cells on two-dimensional (2D) surfaces, 3D cultures requires that cells adapt their morphology, phenotype, migration to forces around the microenvironment surroundings. Cells can also interact with the ECM by an active remodeling of the matrix. This led us to develop a mechano-biochemical model to analyse experimentally the adaptive response of the hepatic cells variations in stiffness of its extracellular environment. To test the link between stiffness and cell proliferation/survival, experiments have been done in vitro with liver cells cultured in collagen substrata with varying stiffness. In this study, we have developed a 3D collagen I model of stiffness that mimics the fold increase and some properties of in vivo ECM stiffening during fibrosis. One of the key features of fibrotic/cirrhotic liver is the overabundance of collagen I fibers, the most abundant form of collagens in both normal and pathologic livers, mainly produced by activated stellate cells (Lee and Friedman, 2011). Rheometry was used to measure the elastic modulus ; Two-Photon-Excited-Fluorescence microscopy (TPEF) was used to image proliferative liver cells ; and Second Harmonic Generation (SHG) was used to quantify collagen I, visualize fibril orientations and build integrative mechano-biochemical models. Depending on different collagen gel stiffness, the phenotype of transiently and long term normal and transformed liver cells have been analyzed by looking at the capacity of the cell to progress in the cell cycle, survive and differentiate. As extracellular substrates with easily tunable stiffness properties, 3D type I collagen gels provide valuable flexible media for studying in vitro the dynamical response of liver cells responding to variations in stiffness. This goal led us to experimentally analyse the adaptive response of the liver cells to stiffness variations of its 3D extracellular microenvironment.

This approach allowed us to establish that rigidity greatly influences the phenotype of liver cells embedded in the matrix when compared to 2D cultures. Important differences are certified when different forces are applied and increasing matrix stiffness emphasizes both proliferation and differentiation whereas EMT is more accentuated in soft gels. Furthermore, we demonstrated that the contact guidance cell migration and proliferation are under MLCK and MAPK MEK1/2-ERK1/2 dependent mechanisms.

## **Materials and Methods:**

### *Cell culture and reagents*

Human Huh7D12 (Huh7) hepatocarcinoma cell line (Health Protection Agency Culture Collections, n°01042712) were grown in DMEM 4.5g/L glucose containing penicillin (100 IU/ml)-streptomycin (100µg/ml) and supplemented with 10% foetal calf serum (FCS). F1 biliary epithelial cells were obtained from the liver of a 10-day-old Fischer rat (Morel-Chany et al., 1978). F1 cells were grown in William's E Medium without L-Glutamin containing penicillin (100IU/ml)-streptomycin (100µg/ml) and supplemented with 7.5 FCS. Rat hepatocytes were isolated and purified from rat liver by in situ perfusion with highly active purified collagenase Liberase (Roche, Meylan, France), as previously described (Guguen-Guillouzo, 2002). Rat hepatocytes were cultured in 75% minimum essential medium (MEM), and 25% medium 199, supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), insulin (5 µg/ml), bovine serum albumin (1 mg/ml), glutamine (2 mM) and 5% FCS, and after 24h medium was supplemented with  $1.4 \times 10^{-7}$  M of hydrocortisone hemisuccinate and 50ng/ml EGF.

*Reagents* : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Propidium Iodide (PI) and Hoechst were from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Cell proliferation Reagent WST-1 was from Roche (Meylan, France). The Cisplatin was from Mylan (Saint-Priest, France). The MEK inhibitors U0126 and EGF were from Promega (Charbonnières, France), the MLCK inhibitor ML7 was from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) and the ROCK inhibitor Y-27632 was from Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Antibodies against phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Puma, Bid, Bax, Paxillin and E-cadherin were purchased from Cell Signaling (Ozymz, Saint-Quentin-en-Yveline, France). Anti-human Noxa was from Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Polyclonal antibodies against ERK1 (sc-94), ERK2 (sc-154) and hsc-70 (sc-7298) were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France). Anti-vimentin and secondary antibodies conjugated to horse-radish peroxidase were obtained from Dako (Trappes, France). Secondary antibodies coupled with Alexa Fluor were from Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, CA).

### *Collagen 3D culture*

To include cells in 3D collagen gels, Type I collagen from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) at 3mg/ml is diluted with culture medium to obtain a collagen solution of

0.75mg/ml and 1.5mg/ml. At the same time, the cells were added at a concentration of  $125 \cdot 10^3$  cells/ml to this solution, and the pH was adjusted to 7.4 by NaOH 0.01N. This mix of cells and collagen was poured into 96-well plates (100 $\mu$ L) or 24-well plates (400 $\mu$ L) and incubated at 37°C. After 10 minutes, the gels were polymerized and an equal volume of medium was added.

### *SHG microscopy*

The SHG imaging system is composed of a confocal TCS SP2 scanning head (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) mounted on a DMIRE2 inverted microscope (Leica Microsystems) and equipped with a MAITAI femtosecond laser (Spectra Physics, Santa Clara, CA). A 10X dry objective (NA= 0.4; Leica Microsystems) and 60X water immersion (Olympus LUMFL 60W x 1.1NA) was used for applying an 820-nm excitation to the sample. The SHG signal was collected in the forward direction using the condenser (S1, NA = 0.9–1.4; Leica Microsystems), and the TPEF was epi-collected in the backward direction. IRSP 715 bandpass and 410-nm infrared (IR) filters (10-nm full width at half-maximum, FWHM) were placed before the photomultiplier tube. The image processing was performed with imageJ software (National Institutes of health;<http://rsb.info.nih.gov/gate2.inist.fr/ij/>).

### *Rheometry*

Rheometry was used to determine the stiffness of collagen gels with a Kinexus (Malvern, Orsay, France). Gels were synthetysed in 12-well plates with a volume of 1.2ml to have a thickness of 3mm. After releasing the gel in the dish, a round turntable with a diameter of 2cm crushed the gel to a height of 0.5cm. This turntable applied oscillation at a frequency of 0.1Hz as well as shear stress ranging from 0.02Pa to 2Pa. The elastic and viscous modulus were obtained in the constant part of the curve.

### *Cells staining*

For TPEF observation, cells were stained with DiA 10 $\mu$ g/ml (Interchim, Montluçon, France) overnight prior to being included in gels and observed with SP2 microscope.

For confocal observation, after fixation in formol 4%, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100. After saturation with 2% bovine serum albumin for 1h at room temperature, cells were stained. To see actin, Phalloidin-Fluoprobes 457H (Interchim) 66nmol/L and

Hoechst 5µg/ml were used. For immunostaining, cells were incubated with anti-Paxillin (1:500, Cell Signaling) in BSA 1% at 4°C overnight. After, a secondary antibody coupled with Alexa Fluor 488 was incubated 1h

at room temperature. After being washed, nucleus were stained with Hoechst. Cells were observed with a LEICA DMI 6000 CS SP8 microscope (Leica Microsystems).

#### *Collagen gels inclusion in paraffin*

After fixation, (formol 4%) collagen gels were dehydrated with successive increasing concentrations of alcohol and Xylene baths before being impregnated with paraffin using EXCELSIOR ES tools (Thermo Scientific, Waltham, USA) and left overnight. After impregnation, gels were included in paraffin blocs and 4µm cuts were made. Immunostainings were done with Ventana Discovery XT tools and the Ventana DABMap detection kit (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona). Slides were observed with a Nanozoomer NDP slide scanner (Hamamatsu, Massy, France).

#### *Viability assays*

For viability assays, cells were seeded in 96-well plates in 2D or 3D. After the time of culture or treatment indicated an MTT or WST1, assays were performed. Briefly, cells were incubated with 0.5mg/ml of MTT for 2h at 37°C. For the 3D cells, gels were degraded by a Liberase solution (8µg/m) for twenty minutes, then the cells were pelleted by centrifugation to eliminate the Liberase. After, cells were lysed by dimethyl sulfoxide and the absorbance was measured at 540nm on Spectrostar<sup>nano</sup> (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). For the WST1 viability assay, the WST1 stock solution (conc , !) was diluted 10 fold and incubated with the cells at 37°C for 1h. The absorbance was measured at 430nm.

#### *[<sup>3</sup>H] Thymidine incorporation*

The rate of DNA synthesis in cells was measured by adding 2µCi of [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK) during 24H. After the incubation, an ice-cold trichloroacetic acid (30%) was used to precipitate the DNA. In parallel, a MTT assay was performed to normalize thymidine incorporations.

### *Necrosis study*

Necrosis cells are determined by a double staining with Hoechst 5µg/ml and Propidium Iodide 5µg/ml. The doubled stained nucleus corresponding to necrosis cells are counted and mean percentages of necrosis cells are reported.

### *Caspase-3/7 activity*

For cisplatin-induced hepatotoxicity experiments, caspase 3/7 activity was measured by the 'SensoLyte Homogeneous AMC Caspase-3/7 Assay' kit (Anaspec, Le-Perray-en-Yvelines, France) following manufacturer's instructions. Briefly, the cells were lysed in a 96-well plate (for 3D after gel degradation by Liberase) and the caspase-3/7 substrate solution (DEVD-AMC) was incubated with the cell lysates for one hour at 37°C. AMC cleavage was monitored by spectrofluorometry (Vmax). As cells were directly lysed in the plate, MTT assays were performed in parallel to normalize the Vmax to an approximation of viable cells.

### *Measurement of P450 Activities*

Ethoxyresorufin O-deethylation (EROD) associated with P450 1A1/2 activity was measured in cultured hepatocytes, essentially as described by Burke and Mayer (Burke and Mayer, 1983). Methoxyresorufin O-demethylation (MROD) was used as a substrate for specific P450 1A2 activity. After the lecture of activities, a WST-1 test was done to normalize activity with the viable cells.

### *Western blot*

Extracts from Huh7 or F1 cells were separated using SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes in a transfer buffer (25mM Tris, 200mM glycine and ethanol 20%). Membranes were blocked in 5% low fat milk in tris-buffer saline (TBS) (65mM Tris pH7,4, 150mM NaCl) for one hour at room temperature. Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After being washed with TBS, appropriate secondary antibodies linked to horseradish peroxidase were incubated for one hour in 5% low fat milk in TBS at room temperature. Immunocomplexes were visualized with Ommobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) and scanned with a Fujifilm LAS-3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan). Densitometric analyses of the bands were carried out with MultiGauge software (Fujifilm).

### *Reverse transcription and polymerase chain reactions*

Total RNA was extracted from cultured cells using NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Hoerd, France). The concentration of total RNA-XS was measured with a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). Real-time quantitative PCR for all genes was performed using SYBR green methodology with the Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) and the ABI 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

Primers for human N-cadherin cDNA were 5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3' (forward) and 5'-ATGCCATCTTCATCCACCTT-3' (reverse), E-cadherin 5'-TGCTCTTGCTGTTTCTTCGG-3' (forward) and 5'-TGCCCCATTCGTTCAAGTAG-3' (reverse), Vimentin 5'-CCAACTTTTCCTCCCTGAACC-3' (forward) and 5'-GTGATGCTGAGAAGTTTCGTTGA-3' (reverse), Cytokeratin 8 5'-AGCTGGAGTCTCGCCTGGAA-3' (forward) and 5'-TGTGCCTTGACCTCAGCAATG-3' (reverse), and Cytokeratin 18 5'-GAGCCTGGAGACCGAGAAC-3' (forward) and 5'-TTGCGAAGATCTGAGCCC-3' (reverse).

Primers for rat Albumin were 5'-CTGACACCGAAGCTTGATGC-3' (forward) and 5'-GACAGCTGCGACCAGTGCT-3' (reverse), Aldolase B 5'-ACAGCTTCTGATACCTTGGAGCA-3' (forward) and 5'-GATGACAGGTACAGCCAAGGG-3' (reverse), and GST a2 5'-CATCGCCAAATATGACCT-3' (forward) and 5'-AGGGCTCTCTCCTTCATGTCC-3' (reverse). The amplification curves were read with ABI Prism 7000 SDS software using the comparative cycle threshold method. Relative mRNA levels were calculated after normalization with 18S RNA.

### *Cell transfection*

The stable shERK1 and shERK2 cell line were obtained using the protocol described (Guégan et al., 2013). For transient transfections, DNA Plasmids S218D/S222D (MEK1-DD) and S222D/S226D (MEK2-DD) were kindly provided by Dr. Silvain Meloche (Institute for Research in Immunology and Cancer, Montréal, Canada). MEK1-DD and MEK2-DD are constitutively active. DNA transfections were carried out using Lipofectamine RNAi max transfection reagent (Invitrogen, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated in a 35 mm-petri dish. After overnight incubation,

pBABE-puro vector + 1µg of expression plasmid were mixed with 5µl of Lipofectamine RNAi max and then added to the cells. Cells were selected for 24 hours by puromycin (4.5µg/ml) and cyclosporine (5µM) as described (Lefloch et al., 2008).

#### *Statistical analysis*

Results are expressed as the mean ± standard deviation. Data were analyzed with two-tailed Student's *t*-test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ (\*),  $P < 0.01$ (\*\*),  $P < 0.005$ (\*\*\*). All experiments were performed at least three times.

## Results:

### 1. Increased collagen gel concentration induces 3D stiffness which mimics an environment of fibrosis.

Multiphoton microscopy has been widely used for imaging structure and dynamic interactions in biological cells and tissues with higher sub-micron resolution (Chen et al., 2012). Among these methods, SHG imaging method shares many of the features of multiphoton excitation fluorescence microscopy. SHG permits, in unstained samples, the assessment of supramolecules with high crystalline triple-helix structures deprived of centrosymmetry at microscopic and mesoscopic scales as fibrillar collagen (Campagnola et al., 2002; Gauderon et al., 2001a, 2001b; König, 2000; Zipfel et al., 2003). As illustrated, figures 1A and 1B show 2D and/or 3D images of collagen I gels of 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 and 2 mg/ml. These images show highly uniform and smooth, randomly oriented, nanofibers. The collagen fibrils are typically not closely packed and are spaced in loose areas between fibrils. We were able to detect smaller pores and higher fiber lengths in more concentrated gels, as might be expected when a given volume contains a higher number of fibers (figure 1C). Fiber diameter did not change with the gel concentration, however, fiber length increased. Gel rigidity was further characterized by rheometry (Figure 1D). A direct proportional relation was found between collagen concentrations and the elastic ( $G'$ ) and viscous modulus ( $G''$ ) with an exponential curve ( $Y=0.1411 e^{2.346x}$ ;  $R^2=0.9441$  for  $G'$  and  $Y=0.03853e^{2.222x}$ ;  $R^2=0.9303$  for  $G''$ ). As expected, rigidity highly increased with the collagen concentrations, consistent with other reports showing mechanical properties of nanofibrous scaffolds to be highly dependent on nanofiber concentration (see figure 1D and table in supplemental figure 1A). This fold which increased rigidity by 3.5x between collagen gels of 0.75 and 1.5 mg/ml is very close to the one measured in the liver in vivo during fibrosis development (Lupsor Platon et al., 2013). A comparison between compliant and rigid gels seems to be a good model to mimic the effect variations of stiffness have on the morphology and phenotype of hepatic cells allowed to grow and survive in the matrix. According to these observations, we choose to work with two collagen concentrations which reproduce and well defined working gels i.e. 0.75 mg/ml (1 Pa = compliant gel) and 1.5 mg/ml (3.5 Pa = rigid gel).

## **2. Matrix rigidity influences spheroid formation of human hepatoma cells.**

To explore whether matrix rigidity influences cellular behaviors, we seeded transformed human hepatocarcinoma cells (Huh7) in compliant 1 Pa and rigid 3.5 Pa gels. Cells were cultured during 10 days and observed first by Two-Photons Excitation Fluorescence (TPEF) microscopy at day 3, 6 and 10. Huh7 cells cultured in 3D collagen gels exhibited drastic differences in morphology as a function of substrate compliance (figure 2A). Huh7 cells appeared well-spread in soft compliant collagen gels (1 Pa) and formed monolayer-like structures with flattened shapes. In contrast, in rigid gels (3.5 Pa) cells were non-spread and formed rapidly spherical clusters along the culture time. Differences in cellular spreading, as a function of support stiffness is already observed, at higher magnification, one day after seeding (figure 2B). Cells did not spread in rigid matrices and this typical morphology of round cells was strengthened during the culture period, becoming multi-cellular spheroids between day 3 and 6 in 3.5 Pa gels. In order to look at the cluster organisation of these spheroids, we performed 3D confocal imaging (figure 2C) and Hematoxylin-Eosin staining of thick sections (figure 2D) of embedded spheroids in collagen gels. Z-stack reconstructions of spheroids in the three dimensions (xyz) show acini-like structures with hollow lumen. This particular organisation is also clearly visible on Hematoxylin-Eosin thick sections of spheroids (figure 2D). Between day 1 and 8 of culture, cell surface areas decreased by 50% in 3.5 Pa cultures, whereas the area of the nucleus remained unchanged (supplemental figure 1B).

## **3. Rigidity increases survival and proliferation.**

It has been described that matrix variations in stiffness could greatly modulate HCC survival and proliferation of cells cultured in collagen gels (Assoian and Klein, 2008). In our 3D cultured models, we first quantified cell survival, by an MTT test in a compliant and rigid 3D matrix. Our results show a significant increase of cell survival in rigid collagen gels which could correspond to an increase in survival and/or proliferation (figure 3A). Afterwards, we studied the proliferation capability of these 3D cultured cells using methyl-thymidine H<sup>3</sup> incorporation. Throughout the entire process, the proliferation of Huh7 cells in rigid matrix is higher compared to compliant gels and 2D cultures (figure 3B). We confirmed the positive role of 3D stiffness on cell proliferation using normal rat hepatocytes in 3D collagen matrix stimulated with EGF (figure 3C). Our results demonstrate that EGF-stimulated hepatocytes in 3D gels proliferated at higher level than cells cultured in 2D. Moreover, stiffness clearly increases the proliferative capabilities of normal hepatocytes.

Because the MEK-ERK pathway is required for cell proliferation, we next investigated ERK phosphorylation and inhibition in our models. As already shown in 2D cultures, phosphorylation of ERK1/2 was induced by FCS+EGF in gels. This activation was rapid and transient, peaking at 15-30 min and decreasing thereafter one hour after stimulation. No difference could be detected with gel stiffness variations (supplemental figure 2A). As expected, MEK inhibitor U0126 completely abolished ERK1/2 phosphorylation and greatly decreased cell proliferation/viability in compliant and rigid gels (figure 3D). In addition, the specific silencing of ERK1 and/or ERK2 in the 3D models (supplemental figure 2B) confirms that replication was under an ERK2-dependent mechanism in HCC cells. ERK1 silencing did not affect the replication level of the cells, as previously described (Fremin et al. 2009, Guegan et al, 2012, 2013).

The balance of proliferation/apoptosis plays an important role in HCC development. Here, we thought to characterize the effect of 3D mechanical forces in cell death. As shown in figure 4A and 4B, only basal levels of necrotic and apoptotic cells can be detected in 3D cultures. As expected, caspase 3/7 activities increased after cisplatin treatment at 1 and 10 mg/ml. However, no difference could be obtained between cells in compliant and rigid gels as compared to 2D cultures (figure 4C). Only a partial protection could be detected in rigid gels after cisplatin treatment at a high concentration (figure 4D). Cleaved caspase 3 can be detected in both 1 and 3.5 Pa cells after cisplatin treatment with no particular localization (results not shown). These apoptotic increases were highly prevented by ERK1/2 inhibition (Figure 4E), as observed after 24 hours of co-treatment with cisplatin and U0126. However, the protection was independent of matrix fitness. We recently demonstrated that ERK1 silencing could protect cells from cisplatin-induced apoptosis (Guégan et al., 2013) but no difference could be detected in cisplatin toxicity at 2, 5 10 µg/ml in ERK1 inhibited cells (result not shown). Note that, only at a higher concentration of cisplatin (40µg/ml), independent of stiffness, apoptosis can be partially prevented by ERK1 inhibition, as compared to shControl and shERK2 cells (supplemental figure 2C). This protection was previously linked to the proapoptotic induction of Noxa (Guégan et al., 2013) by ERK1 in ERK2 inhibited cells. In our culture conditions, we were also able to show a high induction of Noxa in ERK2 inhibited cells where ERK1 is over activated, confirming the previous result obtained in 2D cultured cells (supplemental figure 2D, Guegan et al, 2013). However, ERK1 Inhibition did not down-regulate the Noxa pro-apoptotic factor and a slight increase could be observed in the ERK1 inhibited cells whereas Bid was not affected.

#### **4. Increasing matrix stiffness is associated with mesenchymal-epithelial transition (MET) and differentiation of liver cells.**

Because cell phenotypes are highly dependent on mechanical force variations, we analyzed the epithelial and/or mesenchymal “like status” of Huh7 cells cultured in soft and stiff gels. Examination of some EMT markers by QPCR and western blotting indicated that 3D cells express higher levels of epithelial markers than mesenchymal markers, as compared to 2D cultured cells (Figure 5). N-cadherin and vimentin mRNA expressions are lower in 3D cells between compliant and rigid gels. The same results were obtained at the protein level for vimentin. (figure 5B) Conversely, E-cadherin expressions at the mRNA and protein levels were more highly expressed in 3D cells cultured in rigid gels, as compared to these levels in compliant gels (and 2D cultures), thus indicating a more epithelial status of cells in stiff matrix environments. Immunolocalisations of N and E-cadherins between cells and/or around the lumen confirmed the epithelial status of the Huh7 cells in 3D rigid matrix (figure 5C). As control, cytokeratin 8 and 18 expressions, which are highly induced during 2D liver cell cultures (Moll et al., 1982), were highly reduced in cells cultured in 3D gels as compared to 2D (Figure 5A).

To confirm the role of 3D collagen environment on epithelial marker expression, we established 3D primary cultures of normal rat hepatocytes, a well established model system for studying differentiation/proliferation, in vitro. Rat hepatocytes were cultured in compliant and rigid 3D collagen gels for seven days. First, we confirmed the spreading of the cells in compliant gels and showed that hepatocytes stayed non-spread (round) in rigid gels (figure 5D). Note that rat hepatocytes, a non motile cell, never form spherical clusters in 3.5 pa gels. Clearly, albumin, aldolaseB and GST a2 mRNA expression were highly expressed in 3D compliant and rigid gels as compared to 2D cultures confirming that 3D environment of the hepatocytes is determinant for keeping hepatocytes in a differentiated state (figure 5D). Moreover, albumin is more expressed in cells cultured in 3.5 Pa than in 1 Pa gels, thus showing a better differentiated status in rigid matrix than in compliant gels. This status in 3,5 gels has been confirmed in hUH7 cells where a higher induction of Cyto P450 activity is obtained in cells cultured in rigid gels after 3-methyl cholentrene (3-MC) induction (figure 5E).

Overall, our results concerning the morphology, MET and differentiation markers in 3D matrix showed remarkable differences with previous studies of hepatic cells cultured on collagen gels (Godoy et al., 2009; Schrader et al., 2011). Together, our data demonstrated that in 3D gels, rigidity increases the epithelial state and expressions of differentiated markers of hepatic cells, whereas compliance induces a more mesenchymal or dedifferentiated state.

## **5. Collagen signatures and matrix reorganisation during culture time.**

Following our examination, we provide evidences for collagen I reorganizations/signatures in the microenvironment of spheroids in rigid matrix. Different collagen organizations have been characterized in vivo, such as tumor-associated collagen signatures TACS1-2-3 which depend on breast tumor development. At a distance from the cells, collagen fibers appear relaxed in 1 Pa gels with smooth randomly oriented nanofibers [TACS-1] (figure 6A). However, these fibers appear more concentrated in the close microenvironment of the spheroids and also stretched around, thereby constraining the spheroid volume as described in tumor-associated collagen signature [TACS-2]. Moreover, parallel bundles of collagen fibers [TACS-3] are distributed perpendicular to closed spheroids (figure 6A). We further characterized this organization by analyzing the translocation and distribution of fluorescent microspheres embedded in the collagen gel (supplemental figure 3A). A higher density of the fluorescent beads was detected in the aligned and parallel zonal area, indicating that cells could remodel the ECM microenvironment by stretching the gel between two spheroids. Such TACS-3 distribution of collagen fibers could be reorganized by physical stress applied by cell clusters at regions close to two adjacent spheroids, in the absence of newly synthesized collagen analyzed by qPCR (results not shown). Furthermore, we were also able to use SHG microscopy to visualize distinct collagen organizations, in vivo, in hepatocellular carcinoma (HCC) with liver cirrhosis (Figure 7). These organizations correspond to smooth, randomly oriented nanofibers between cells (TACS1); collagen stretched around tumor nodules (TACS2); and perpendicular fibrils between nodules, and/or emerging from major fibers, which are close to a TACS-3 organization.

We extend our results to another highly motile transformed liver cell line, the F1 biliary epithelial cells, and our data shows that cell spheroid organisation and collagen signatures in rigid gels are not limited to Huh7. In 3.5Pa gels, F1 cells also grow in spheroids, whereas cells are flattened and spread out in 1Pa gels (figure 8A). Collagen fibers were aligned with parallel organization between adjacent clusters (TACS3). Fibers stretched around spheroids (TACS2) were less developed than in Huh7 cells and also located between the cells of the spheroids (figure 8B).

## **6. Radially aligned 3D collagen organisation and contact guidance cell localization are under a MEK-ERK and MLCK dependent mechanisms.**

In this work, we used SHG microscopy to evidence collagen I reorganization in the microenvironment surrounding spherical clusters of Huh7 and F1 cells in rigid matrix which were

described, *in vivo*, to be tumor-associated collagen signatures TACS1-2-3 (Provenzano et al., 2006). Moreover, the F1 cells which are highly motile cells, are able to form bridges between developments of spheroid clusters (see z images of TPEF, SHG microscopy and merge, figure 9A and supplemental figure 3B). These bridges are precisely localized on the parallel dense collagen organizations (TACS3) visualized by SHG microscopy (which could serve as “guidelines” for local invasion).

Moreover, ECM matrix orientation mediates tension-dependent cell migration and these force-dependent processes could involve many signaling pathways, particularly RhoK, MLCK and MEK-ERK. In order to look at the signaling pathways involvement in the local invasion of cells on TACS3 fibers, we inhibited the RhoK, MLCK and MEK1/2-ERK1/2 pathways in the presence of Y27, ML7 and U0126 inhibitor respectively and looked at F1 cell morphology, proliferation and migration (figure 8C-E, 9B). Cell number determination which were objectivised by actin-phalloidin area and quantification of nucleus, show a high inhibition of cell proliferation after MLCK and MEK-ERK targeting, whereas RhoK inhibition did not influence the proliferative response (figure 8D). Western blotting analysis of p-MLC and p-ERK confirm the specificity of the inhibitions (figure 8E). Finally, we look at cells’ localisation/migration and TACS3 organisation in the 3D inhibited cell cultures. As already demonstrated in control, collagen fibers were aligned with parallel organizations between adjacent clusters (TACS3) and F1 cells formed bridges between spheroids (see control in figure 9A). No difference could be noticed after RhoK inhibition (Y27), even after 72h of treatment. Interestingly, no cell bridges could be detected after MLCK and MEK inhibitions (figure 9B). Moreover, ML7 totally inhibited TACS3 fibers formation whereas U0126 and Y27 did not, showing that the two pathways MEK-ERK and MLCK could be involved in the regulation of TACS3 fiber formations (MLCK dependent) and cells motility (MEK-ERK and MLCK-dependent)

## **Discussion:**

In this study, we determined that modulations of 3D mechanical forces, in a constant chemical environment, drive important phenotypic alterations of liver cells embedded in the matrix, including MET transition, proliferation and differentiation. Inversely, in the case of cultures on collagen gel, increasing forces on 3D culture models induced spheroid formation, proliferation and a more epithelial like phenotype of transformed liver cells while maintaining long term differentiation of normal hepatocytes. In this well controlled and tunable 3D culture model, cells are able to reorganize collagen I matrix, leading to fibers stretched around spheroids (TACS2) and parallel dense collagen organizations (TACS3). In addition, we demonstrated that proliferation and contact guidance cell migration of motile transformed liver cells on TACS3 collagen are under MLCK and MAPK dependent mechanisms.

Increased evidence has shown that the mechanical forces of the extracellular matrix are critical for liver cells' growth, multi-cellular organisation and motility (Wang et al., 2000; Lutolf and Hubbell, 2005; Grinnell and Petroll, 2010). In vivo studies reported that liver fibrosis stimulates tumour development in implanted hepatoma cells (Kornek et al., 2008; Yang et al., 2010). Many studies have been done to understand this process using cell culture systems on collagen films and gels. These systems, and particularly the mechanically-tunable coated PA gels, bring forth important information about the mechanisms involved in mesenchymal shift and in the regulation of HCC proliferation. On collagen coated PA gels, soft substrates resulted in the reduction of proliferation where the cells appeared rounded in contrast to the well-spread and flattened cells on stiff supports (Schrader et al., 2011). Hepatocytes cultured on collagen film or stiff supports have increased DNA synthesis with reduced differentiated functions, whereas cells on soft gels exhibited higher levels of differentiated functions and were less proliferative. Nevertheless, hepatic cells cultures on collagen coated PA gels do not represent the complex 3D structure of liver in vivo and cells did not account for the 3D complex organisation of cellular clusters. Many 3D models have been developed which show that three-dimensional cultures of tumour cells could be an attractive tool for toxicological studies showing high cell differentiation and long term survival (Darnell et al., 2012; Gómez-Lechón et al., 1998; Gunness et al., 2013; Kostadinova et al., 2013; Leite et al., 2012; Meli et al., 2012). Within these models, collagen gels show highly uniform and smooth randomly oriented nanofibers, spaced with loose areas between fibrils which allow hepatic cells to be embedded in the gels and to survive for several weeks. Here, we demonstrated that increasing 3D mechanical forces promoted the proliferation of hepatic cells within collagen

gels. This effect is associated with spheroid formations in stiff gel while transformed hepatic cells appear flattened and spread in soft matrices and show a more mesenchymal like phenotype and less proliferation. Hepatocytes also are more proliferating and highly differentiated in stiff gels showing that normal hepatic cells can proliferate and differentiate if 3D interactions between cells and matrix are still maintained. 3D cultures and spheroid formations are also accompanied by a mesenchymal to epithelial like transition (switch): a decreased expression of cytokeratin 8 and 18, N-cadherin, vimentin, and an increase of E-cadherin. Expressions of N- and E-cadherin showed membrane polarity at the inner/lumen and apical/lateral cell-cell domains of spheroids. Moreover, 3D reconstruction of spheroids in stiff matrices showed that Huh7 assembled in acini of one or two cell layers, with large lumens which increased with time. Our results point to drastically different 3D cell behaviours between stiff and soft matrices, which can be obtained with a 3,5 fold increase in force variations (between 1Pa to 3,5 Pa) showing the strong capacity of this model to modulate hepatic cell phenotypes. Note that this elastic moduli fold increase is close to the fold increase (x4) measured in liver during fibrosis progression in rat model, from 400 Pa (normal liver) to 1600 Pa (after CCl<sub>4</sub> treatment) (Georges et al., 2007) and during fibrotic-cirrhotic human liver progression (from 1 KPa to 4 KPa) (Lupsor Platon et al., 2013).

Cells embedded in a 3D collagen matrix are a very powerful model to study the mechano-biological signals which could drive matrix remodeling, proliferation and local cell invasion. SHG and TPEF microscopy can be applied to 3D collagen gels to define changes in the 3D matrix matched with tumor-associated collagen signatures (TACS) and to characterize local invasion that cannot be easily identified in 2D histology (Provenzano et al., 2009). Our results clearly demonstrated that Huh7 and F1 spheroids growth in stiff collagen matrix promotes SHG tumor-associated collagen signatures as described in vivo in mammary tumors. Specifically, TACS1, characterized by an increase of collagen concentrations surrounding tumors spheroids; TACS2, collagen fibers stretched around the tumor; and TACS3, radially aligned collagen fibers that could facilitate local invasion. SHG microscopy is also able to detect TACS 1, 2 and 3 signatures in human cirrhotic liver with HCC. Previous studies described the use of collagen alignments to quantify possible local invasion depending on the level of TACS, providing a novel quantitative assessment of tumor progression, in vivo (Provenzano et al., 2008). Our data shows that TACS3 seems to be associated with cell local invasion between spheroids in stiff gels as highly motile hepatic cells (the biliary epithelial F1) can be visualized on the collagen fibers aligned with parallel organization between adjacent clusters.

Cell shape, motility and proliferation are highly dependent on different intracellular pathways and several signaling cascades, including MEK-ERK, RhoK and MLCK which transmit the tensional signals and growth factors stimulations to pathways controlling cell cycle and motility. Our data shows that MLCK inhibitions totally repressed the formation of TACS3 fibers whereas MEK and RhoK inhibitions did not. MEK-ERK or MLCK inhibitions completely blocked cell proliferation and motility whereas RhoK inhibition did not influence cell proliferation and migration between adjacent spheroids. Studies show that the inhibition of MLCK via MLC2 phosphorylation can abrogate hepatoma HepG2 cell polarization and migration (Ren et al., 2008, p. -1) and an MLCK-dependent window in late G1 phase controls S phase entry of proliferating normal hepatocytes (Bessard et al., 2006). The MEK/ERK pathway is required for proliferation, motility and invasion of hepatocarcinoma cells and this regulation in hepatic tumoral cells could occur via an ERK2 dependent mechanism. As already demonstrated in normal and transformed hepatic cells, our data in 3D ended cells confirmed that ERK2 is mostly involved in the regulation of proliferation, whereas ERK1 could be a regulator of apoptosis induced by cisplatin. The strict specificity of action of the MAPKs is still debated and the different levels of expression of ERK1 and ERK2 could take into account the apparent specificity of the MAPK (Lefloch et al., 2008). Data could suggest specialized functions of ERK1 and ERK2 in the regulation of biological tasks in differentiated cells such as hepatic cells. We recently demonstrated, using the livers of ERK1-deficient mice, that ERK1 silencing alone is sufficient to protect cells from induced death both in vitro, in ERK1-/- normal hepatocytes, and in vivo. (Guégan et al., 2013). In wt cell, this regulation could be also highly influenced by ERK2 inhibition, since a balance of phosphorylation between the two MAPK has been reported in many cell types and silencing ERK2 are accompanied by an increased level of ERK1 phosphorylation.

Cells embedded in collagen matrix are a powerful model for studying in vitro the dynamic response to stiffness variations in well differentiated and proliferating liver cells in a 3D environment. Overall, regulators of MLC activity/phosphorylation, MEK-ERK and MLCK, might be potential targets for cancer therapy, inhibiting cell motility and proliferation. TACS3 fiber formations between two adjacent spheroids seem to only be MLCK dependent. 3D collagen gels with varying forces and SHG microscopy will be useful and pertinent models and strategy to screen therapeutic agents which could interfere with the regulation of proliferation-motility of tumoral hepatic cells.

## **Acknowledgements :**

The authors thank Transant (Lyon, France) and the “Ligue Nationale Contre le Cancer” for providing human shRNAs. We thank Dr Christophe Lanos for rhéométrie assays and Marc Le Vee for rat hepatocytes isolation by perfusion.

Grant sponsors: Supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université de Rennes 1, Ligue contre le cancer du Grand Ouest, ANSES National EST-13-166 program and Région Bretagne; JB is a recipient of a fellowship from the Région Bretagne.

## Bibliography:

- Bessard, A., Coutant, A., Rescan, C., Ezan, F., Frémin, C., Courselaud, B., Ilyin, G., Baffet, G., 2006. An MLCK-dependent window in late G1 controls S phase entry of proliferating rodent hepatocytes via ERK-p70S6K pathway. *Hepatology*. Baltimore, Md 44, 152–163. doi:10.1002/hep.21222
- Burke, M.D., Mayer, R.T., 1983. Differential effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome P-450-binding of phenoxazone and a homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins). *Chem. Biol. Interact.* 45, 243–258.
- Campagnola, P.J., Millard, A.C., Terasaki, M., Hoppe, P.E., Malone, C.J., Mohler, W.A., 2002. Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophys. J.* 82, 493–508. doi:10.1016/S0006-3495(02)75414-3
- Chen, X., Nadiarynk, O., Plotnikov, S., Campagnola, P.J., 2012. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat. Protoc.* 7, 654–669. doi:10.1038/nprot.2012.009
- Darnell, M., Ulvestad, M., Ellis, E., Weidolf, L., Andersson, T.B., 2012. In vitro evaluation of major in vivo drug metabolic pathways using primary human hepatocytes and HepaRG cells in suspension and a dynamic three-dimensional bioreactor system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 134–144. doi:10.1124/jpet.112.195834
- Frémin, C., Ezan, F., Guegan, J.-P., Gailhouse, L., Trotard, M., Le Seyec, J., Rageul, J., Theret, N., Langouët, S., Baffet, G., 2012. The complexity of ERK1 and ERK2 MAPKs in multiple hepatocyte fate responses. *J. Cell. Physiol.* 227, 59–69. doi:10.1002/jcp.22742
- Gauderon, R., Lukins, P.B., Sheppard, C.J., 2001a. Optimization of second-harmonic generation microscopy. *Micron Oxf. Engl.* 1993 32, 691–700.
- Gauderon, R., Lukins, P.B., Sheppard, C.J., 2001b. Simultaneous multichannel nonlinear imaging: combined two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation microscopy. *Micron Oxf. Engl.* 1993 32, 685–689.
- Georges, P.C., Hui, J.-J., Gombos, Z., McCormick, M.E., Wang, A.Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E.E., Wells, R.G., 2007. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G1147–1154. doi:10.1152/ajpgi.00032.2007
- Godoy, P., Hengstler, J.G., Ilkavets, I., Meyer, C., Bachmann, A., Müller, A., Tuschl, G., Mueller, S.O., Dooley, S., 2009. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology*. Baltimore, Md 49, 2031–2043. doi:10.1002/hep.22880
- Gómez-Lechón, M.J., Jover, R., Donato, T., Ponsoda, X., Rodriguez, C., Stenzel, K.G., Klocke, R., Paul, D., Guillén, I., Bort, R., Castell, J.V., 1998. Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *J. Cell. Physiol.* 177, 553–562. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199812)177:4<553::AID-JCP6>3.0.CO;2-F
- Grinnell, F., Petroll, W.M., 2010. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 335–361. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113318
- Guégan, J.-P., Ezan, F., Théret, N., Langouët, S., Baffet, G., 2013. MAPK signaling in cisplatin-induced death: predominant role of ERK1 over ERK2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* 34, 38–47. doi:10.1093/carcin/bgs317
- Guguen-Guillouzo, C., 2002. Isolation and Culture of Animal and Human Hepatocytes, in: Freshney, R.I., Freshney, R.G. (Eds.), *Culture of Epithelial Cells*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 337–379.

- Gunness, P., Mueller, D., Shevchenko, V., Heinzle, E., Ingelman-Sundberg, M., Noor, F., 2013. 3D organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for in vitro toxicity studies. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 133, 67–78. doi:10.1093/toxsci/kft021
- Hansen, L.K., Albrecht, J.H., 1999. Regulation of the hepatocyte cell cycle by type I collagen matrix: role of cyclin D1. *J. Cell Sci.* 112, 2971–2981.
- Kholodenko, B.N., Hancock, J.F., Kolch, W., 2010. Signalling ballet in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 414–426. doi:10.1038/nrm2901
- König, K., 2000. Multiphoton microscopy in life sciences. *J. Microsc.* 200, 83–104.
- Kornek, M., Raskopf, E., Tolba, R., Becker, U., Klöckner, M., Sauerbruch, T., Schmitz, V., 2008. Accelerated orthotopic hepatocellular carcinomas growth is linked to increased expression of pro-angiogenic and prometastatic factors in murine liver fibrosis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 28, 509–518. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01670.x
- Kostadinova, R., Boess, F., Applegate, D., Suter, L., Weiser, T., Singer, T., Naughton, B., Roth, A., 2013. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 1–16. doi:10.1016/j.taap.2013.01.012
- Lee, U.E., Friedman, S.L., 2011. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25, 195–206. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.005
- Lefloch, R., Pouysségur, J., Lenormand, P., 2008. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol. Cell. Biol.* 28, 511–527. doi:10.1128/MCB.00800-07
- Leite, S.B., Wilk-Zasadna, I., Zaldivar, J.M., Airola, E., Reis-Fernandes, M.A., Menecozzi, M., Guguen-Guillouzo, C., Chesne, C., Guillou, C., Alves, P.M., Coecke, S., 2012. Three-dimensional HepaRG model as an attractive tool for toxicity testing. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 130, 106–116. doi:10.1093/toxsci/kfs232
- Lupsor Platon, M., Stefanescu, H., Feier, D., Maniu, A., Badea, R., 2013. Performance of unidimensional transient elastography in staging chronic hepatitis C. Results from a cohort of 1,202 biopsied patients from one single center. *J. Gastrointest. Liver Dis. JGLD* 22, 157–166.
- Lutolf, M.P., Hubbell, J.A., 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 23, 47–55. doi:10.1038/nbt1055
- Masuzaki, R., Tateishi, R., Yoshida, H., Goto, E., Sato, T., Ohki, T., Imamura, J., Goto, T., Kanai, F., Kato, N., Ikeda, H., Shiina, S., Kawabe, T., Omata, M., 2009. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 49, 1954–1961. doi:10.1002/hep.22870
- Meli, L., Jordan, E.T., Clark, D.S., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., 2012. Influence of a three-dimensional, microarray environment on human cell culture in drug screening systems. *Biomaterials* 33, 9087–9096. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.065
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11–24.
- Morel-Chany, E., Guillouzo, C., Trincal, G., Szajnert, M.F., 1978. “Spontaneous” neoplastic transformation in vitro of epithelial cell strains of rat liver: cytology, growth and enzymatic activities. *Eur. J. Cancer* 14, 1341–1352.
- Paszek, M.J., Weaver, V.M., 2004. The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 9, 325–342. doi:10.1007/s10911-004-1404-x
- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D.A., Weaver, V.M., 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241–254. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.010

- Provenzano, P.P., Eliceiri, K.W., Campbell, J.M., Inman, D.R., White, J.G., Keely, P.J., 2006. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* 4, 38. doi:10.1186/1741-7015-4-38
- Provenzano, P.P., Eliceiri, K.W., Keely, P.J., 2009. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 357–370. doi:10.1007/s10585-008-9204-0
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Knittel, J.G., Yan, L., Rueden, C.T., White, J.G., Keely, P.J., 2008. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* 6, 11. doi:10.1186/1741-7015-6-11
- Ren, K., Jin, H., Bian, C., He, H., Liu, X., Zhang, S., Wang, Y., Shao, R., 2008. MR-1 modulates proliferation and migration of human hepatoma HepG2 cells through myosin light chains-2 (MLC2)/focal adhesion kinase (FAK)/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 283, 35598–35605. doi:10.1074/jbc.M802253200
- Schrader, J., Gordon-Walker, T.T., Aucott, R.L., van Deemter, M., Quaas, A., Walsh, S., Benten, D., Forbes, S.J., Wells, R.G., Iredale, J.P., 2011. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53, 1192–1205. doi:10.1002/hep.24108
- Wallace, K., Burt, A.D., Wright, M.C., 2008. Liver fibrosis. *Biochem. J.* 411, 1–18. doi:10.1042/BJ20071570
- Wang, H.B., Dembo, M., Wang, Y.L., 2000. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1345–1350.
- Yang, M.-C., Chang, C.-P., Lei, H.-Y., 2010. Induction of liver fibrosis in a murine hepatoma model by thioacetamide is associated with enhanced tumor growth and suppressed antitumor immunity. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 90, 1782–1793. doi:10.1038/labinvest.2010.139
- Zipfel, W.R., Williams, R.M., Webb, W.W., 2003. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* 21, 1369–1377. doi:10.1038/nbt899

## Figure Legends

**Figure 1: Increased collagen gel concentration induces 3D stiffness.** **A.** Visualization of collagen network for gels from 0.25 to 2 mg/ml of collagen. (scale bar: 50 $\mu$ m). **B.** 3D representation of 1 and 1.5mg/ml collagen gels. **C.** SHG image analysis: collagen area (percentage), pore area, fiber length and fiber diameter. **D.** Collagen gel stiffness measured by rheometry with an oscillatory frequency of 0.1Hz and a strain from 0.02 to 2 Pa and the graphical representation of the viscous and elastic modulus as a function of the collagen concentration with an exponential fit. (Mean  $\pm$  SD)

**Figure 2: Matrix rigidity influences spheroid formation of human hepatoma cells.** **A.** Phase contrast micrographs of Huh7 after 3 days of culture in 1Pa and 3.5Pa gels. TPEF images after DiA staining of cells at 3, 6 or 10 days of culture. **B.** Confocal images after staining with Phalloidin and Hoechst, at 1 and 8 days of culture. 2D pictures in association with 3D reconstructions. (Scale bar: 50 $\mu$ m) **C.** 3D reconstruction after Hoechst and Paxillin staining of cells after 6 days of culture in 3.5 Pa gel and merge image **D.** Hematoxylin-Eosin staining after paraffin inclusion and observation with slide scanner.

**Figure 3: Rigidity increases proliferation.** **A.** Kinetics of MTT assay and **B.** thymidine incorporations in Huh7 cells. **C.** Thymidine incorporation, at the indicated times (Day3 and 4), of rat hepatocytes cultured in 1 Pa and 3.5 Pa gels. **D.** Study of cell viability by MTT normalized with 2D culture conditions. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by treatment with U0126 (20 $\mu$ M) is confirmed by the Phospho-ERK Western Blot. (Mean  $\pm$  SD ; P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*))

**Figure 4: Cell viability in 3D cultures.** **A.** Study of Huh7 necrosis in 3D cultures: cells are stained with Hoechst and Propidium Iodide, after 1 and 8 days of culture in 1 and 3.5 Pa gels. **B.** Apoptosis of Huh7 is determined by caspase 3/7 activity by DEVD-AMC assay after 1, 4 and 8 days of 3D cultures. (2D D8+Cis) is a 2D control cells treated with cisplatin (10 $\mu$ g/ml). **C.** Caspase 3/7 activity in 2D and 3D Huh7 cells treated with 1 or 10 $\mu$ g/ml of cisplatin after 1, 4 and 8 days of cultures. **D.** caspase 3/7 activity in 3D Huh7 after 8 days of culture treated with a concentration range of cisplatin (5 to 30 $\mu$ g/ml) during 24h. **E.** Caspase 3/7 activity: after 8 days of culture, Huh7 are treated or not with U0126 and two concentrations of cisplatin (10 and 20 $\mu$ g/ml) during 24h. (Mean  $\pm$  SD ; P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*))

**Figure 5: Matrix stiffness induces mesenchymal-to-epithelial transition and cells differentiation.** **A.** qPCR analysis of N-cadherin, E-cadherin, Vimentin, Cytokeratin 8 and

Cytokeratin-18 RNA expression by Huh7 cells after 4 and 8 days of 3D cultures. **B.** Western Blot analysis of Vimentin and E-cadherin production by Huh7 cells after 4 and 8 days of 3D cultures. **C.** Immunostaining of Vimentin, E-cadherin and N-cadherin in Huh7 cells after 6 days of 3D cultures. **D.** Rat hepatocyte cultured in 3D collagen gels: the left panel represents phase contrast micrographs and TPEF images. The right panel represents the Albumin, Aldolase and GSTa2 RNA expression after 4 days of culture in 3D collagen gels. **E.** EROD-CYP1 activity of Huh7 cells after induction with 3-MC (0.5 $\mu$ M or 1 $\mu$ M) during 24h after 4 days of culture (Mean  $\pm$  SD ; P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*)).

**Figure 6: Collagen signatures and matrix reorganisation during culture time.** TPEF ( ) and SHG ( ) images of Huh7 cells in 1 Pa gels (top panel) and 3.5 Pa gels (middle and bottom panel) after 6 days of culture. The middle panel is a Z-stack on a spheroid with 4.2 $\mu$ m step. (scale bar: 10 $\mu$ m for top and bottom panel, 20 $\mu$ m for middle panel)

**Figure 7: TACS signatures in Human HCC.** SHG (top) and merge images with TPEF (bottom) obtained from Human HCC livers (3 different biopsies for each TACS): TACS 1: images a-c; TACS 2: images d-f and TACS 3: images g-i.

**Figure 8: Cell proliferation is ERK and MLCK dependent.** **A.** confocal images of F1 cells after 7 days of culture in 3,5 Pa gels (Phalloidin/Hoechst staining). **B.** SHG images of collagen matrix after 7 days of F1 culture (3,5 Pa gels). **C.** F1 cell morphology by confocal microscopy after Phalloïdin and Hoechst staining: after 3 days of culture in 1Pa and 3.5 Pa gels, F1 are treated by ML7 (20 $\mu$ M), Y-27632 (10 $\mu$ M) and U0126 (20 $\mu$ M) for 4 days. **D.** Quantification of cell surface (phalloïdine area) and nuclei number. **E.** Phospho-MLC and Phospho-ERK Western Blotting confirm the inhibitions of the signaling pathways. (Mean  $\pm$  SD ; P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*))

**Figure 9: Cell localization on TACS3 and matrix reorganization are ERK and MLCK dependent.** **A.** TPEF, SHG and merge images of F1 cells on TACS 3. **B.** Cell migration and reorganization of collagen are studied with TPEF and SHG. After 3 days of culture, cells are treated with the inhibitors for 4 days and analyzed to determine cell localization and TACS3 formation.

**Supplemental Figure 1: A.** Values of elastic and viscous moduli in function of collagen concentration. **B.** Quantification of Huh7 area (phalloïdin area) normalized by nuclei numbers, and quantification of nuclei area after 1 and 8 days of culture in 1 and 3.5 Pa gels.

**Supplemental Figure 2: A.** Phospho-ERK activation in Huh7 cells stimulated by SVF (10%) and EGF (100 ng/ml) and analyzed at the indicated times after stimulation. **B.** Phospho-

ERK1 and Phospho-ERK2 western blot confirms the specific inhibitions by shRNAs against ERK1 or ERK2. Studies of cell viability by WST-1 assay have been done 4 days after shRNA transfections. **C.** Caspase 3/7 activities in Huh7 cells transfected with sh-RNA against ERK1 or ERK2 and treated or not with 40µg/ml of cisplatin, 4 days after transfections. **D.** Western blot of the pro-apoptotic proteins Noxa, Bid, Bak and Bax. Huh7 cells were transfected with sh-RNA directed against ERK1 or ERK2 and treated or not with 10µM of cisplatin for 24 hours, 4 days after transfections.

**Supplemental Figure 3:** **A.** Fluorescent beads are observed by TPEF, while matrix organization is imaged by SHG after 7 days of culture. **B.** SHG and TPEF merge of Z-stack of F1 cells after 7 days of culture, between 2 spheroids (TACS3).

Figure 1, Bomo et al.

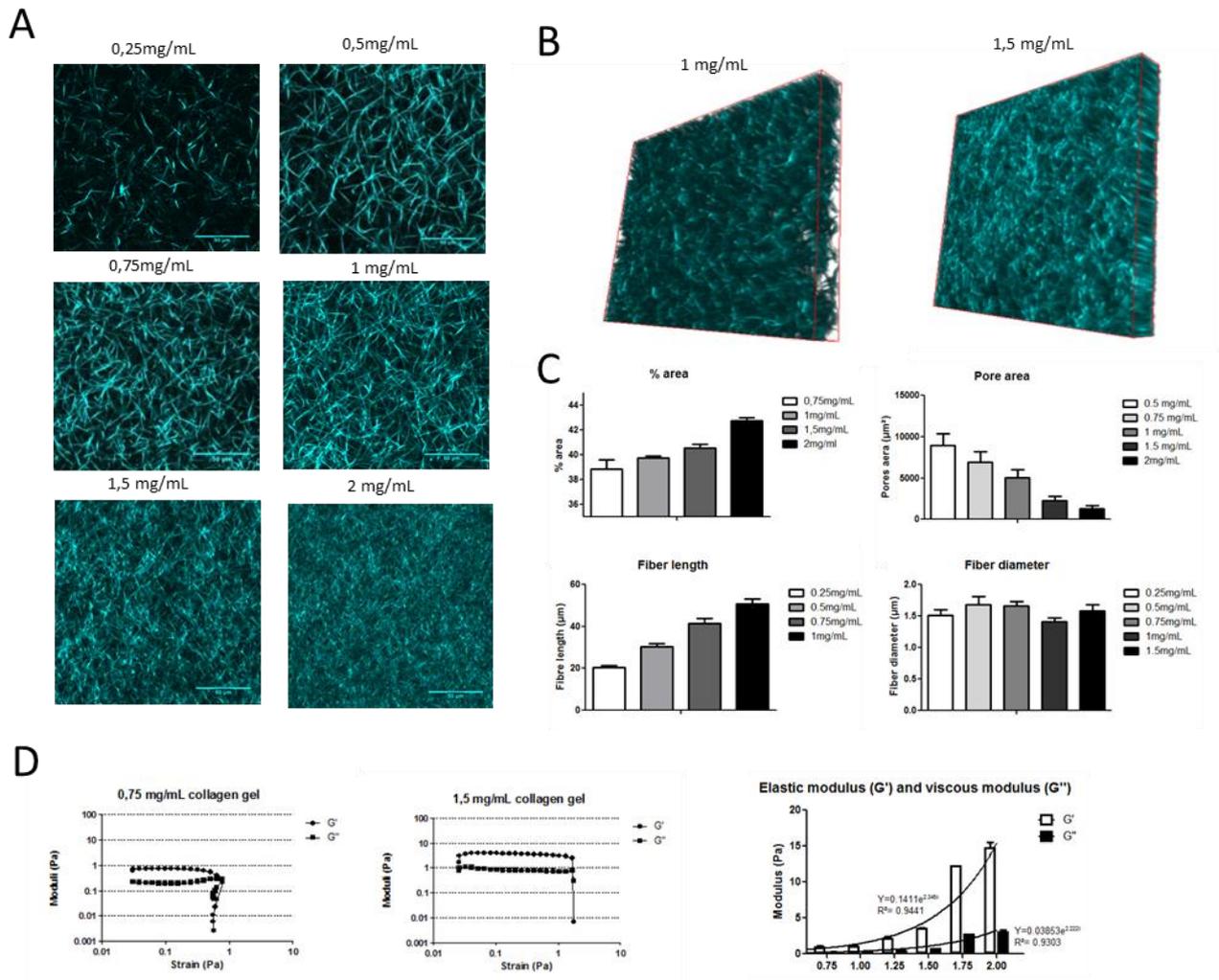


Figure 2, Bomo et al.

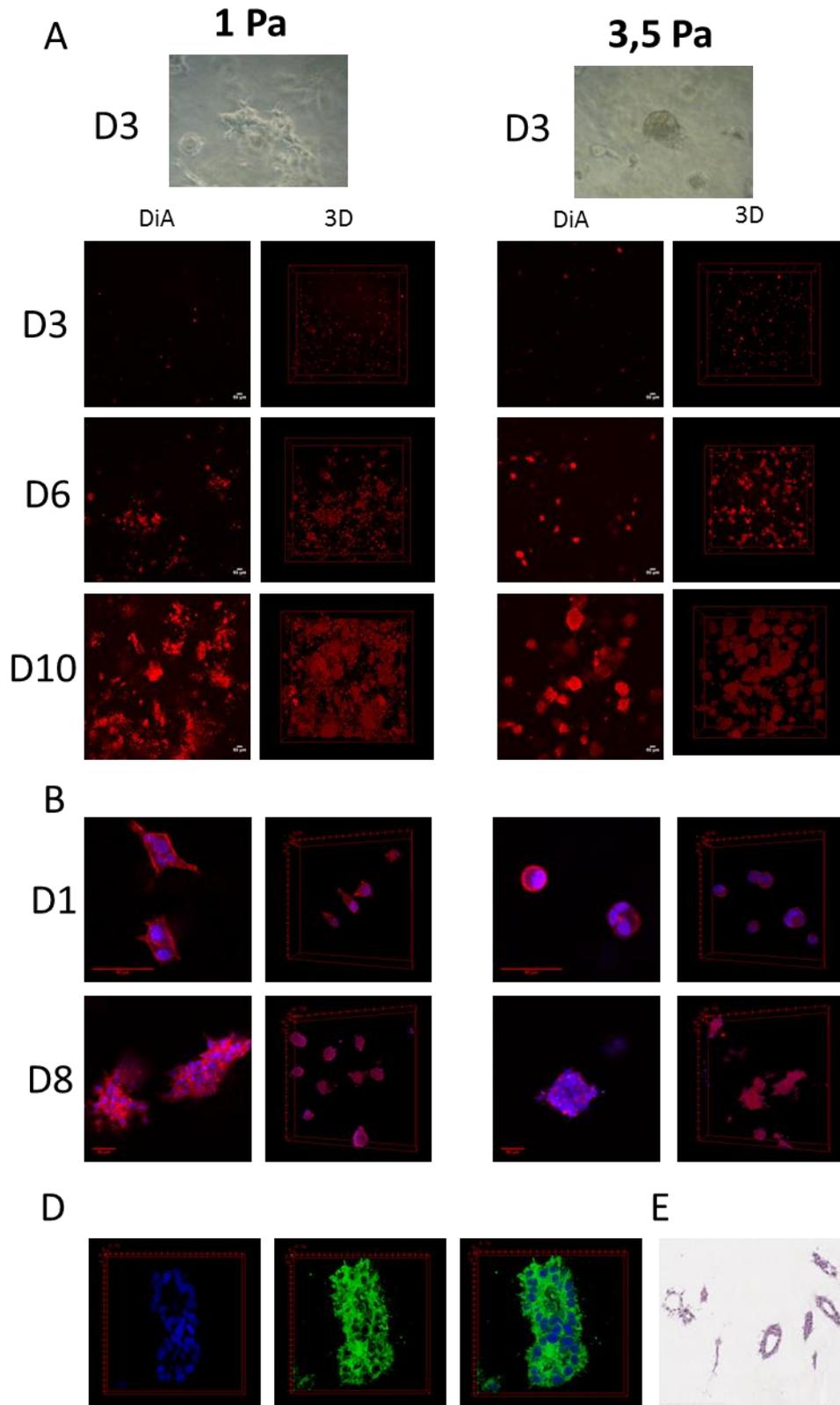


Figure 3, Bomo et al.

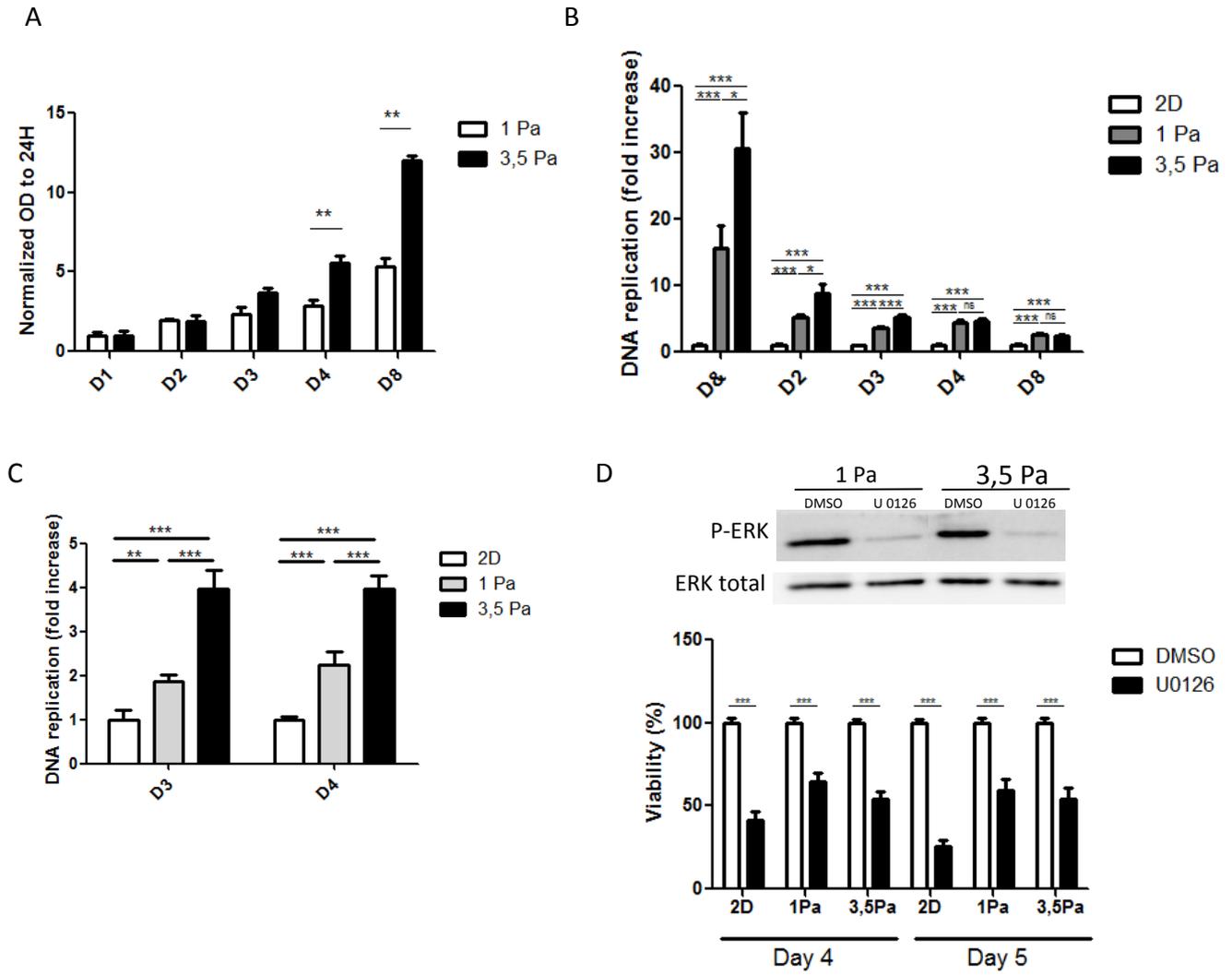
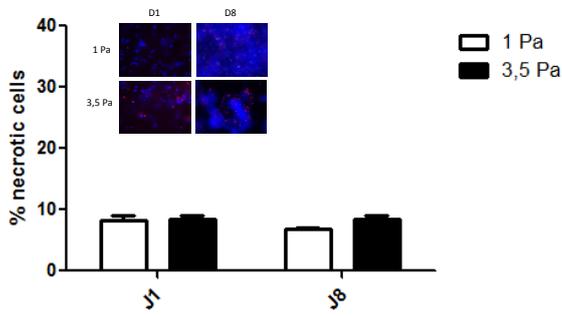
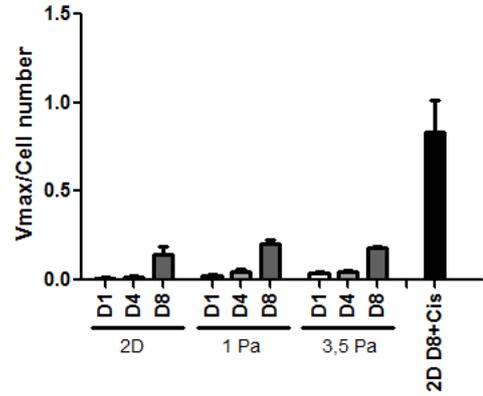


Figure 4, Bomo et al.

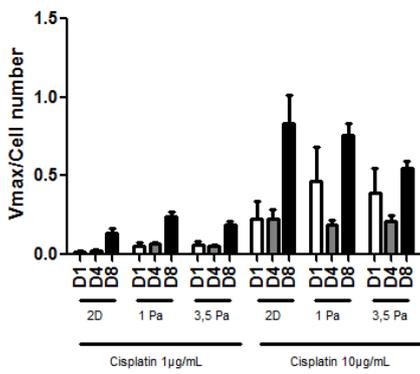
A



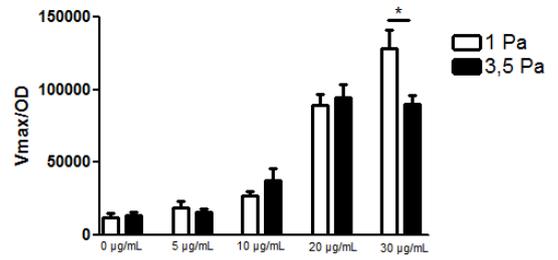
B



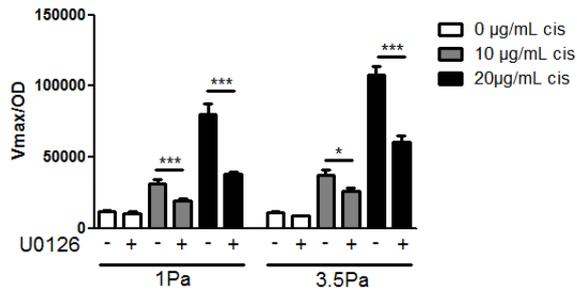
C



D

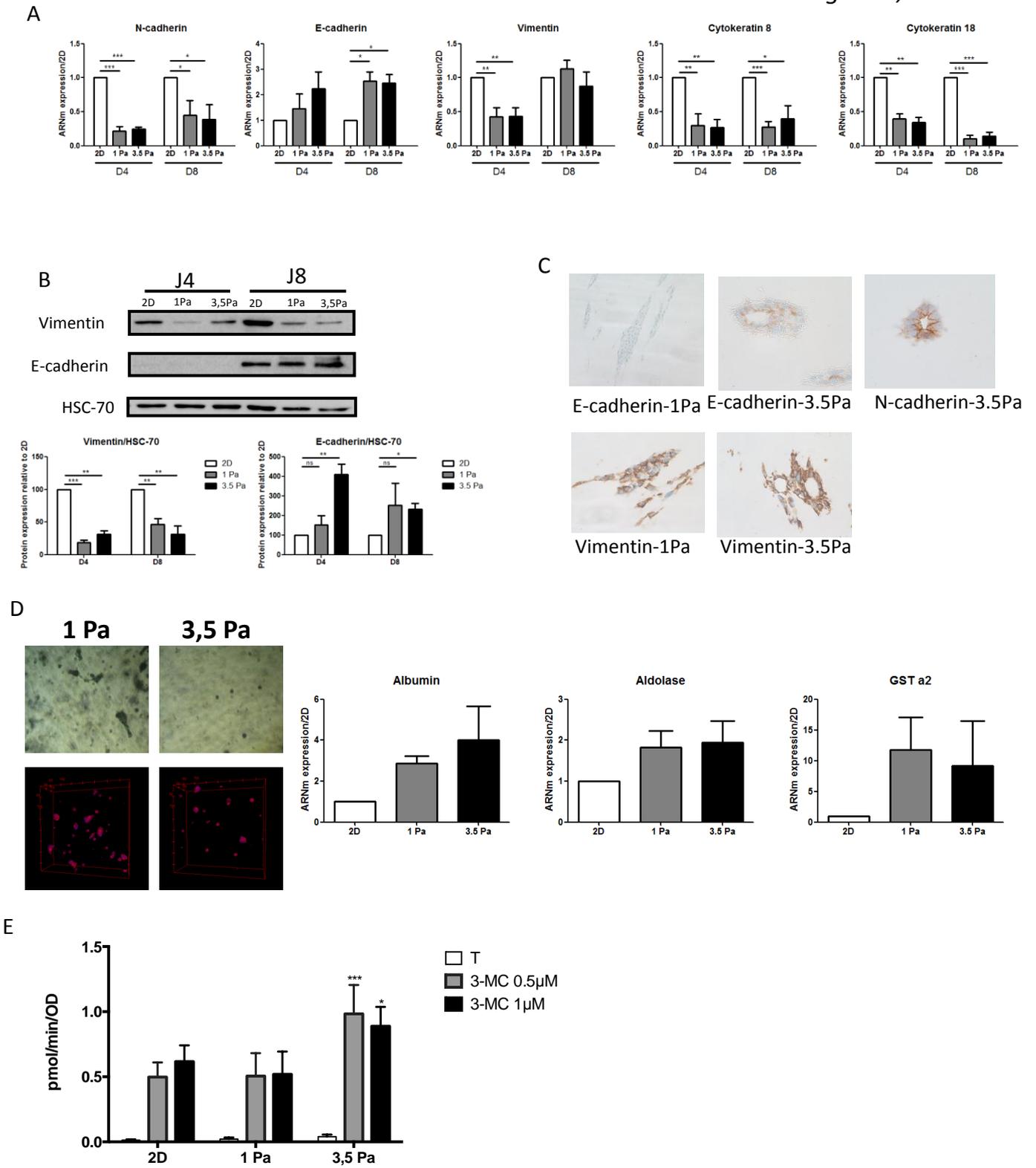


E



F

Figure 5, Bomo et al.



A

Figure 6, Bomo et al.

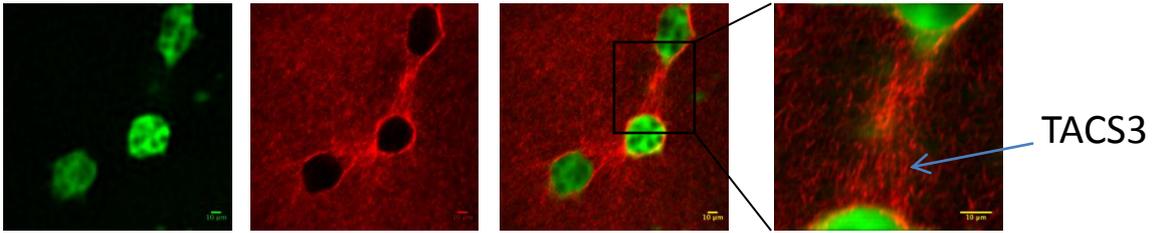
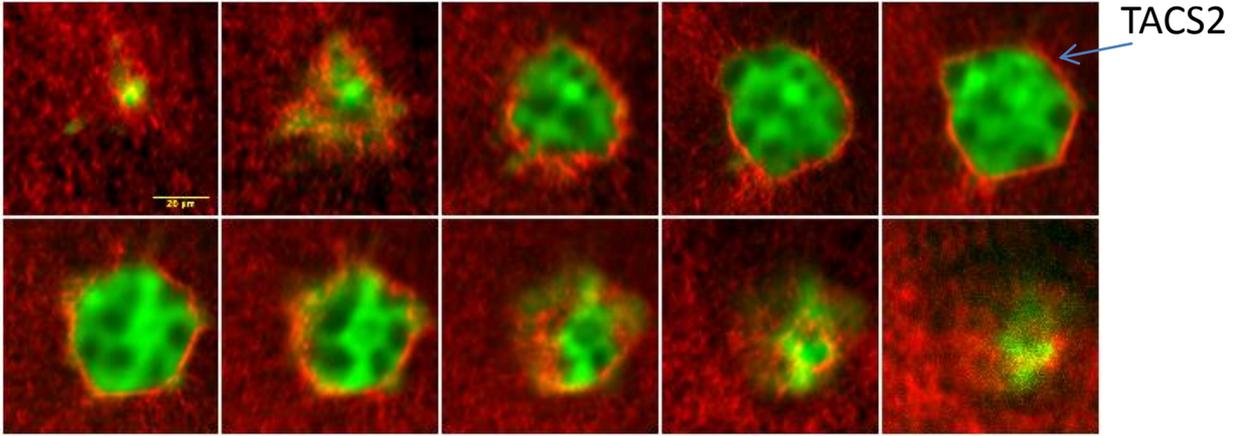
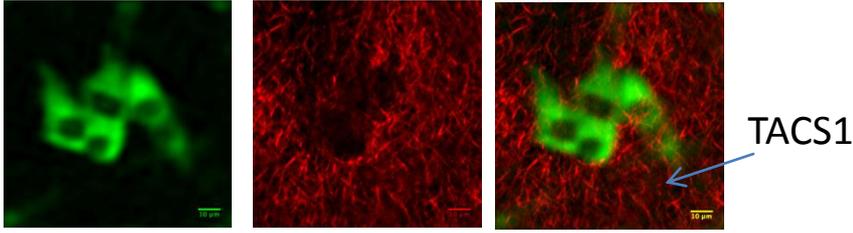


Figure 7, Bomo et al.

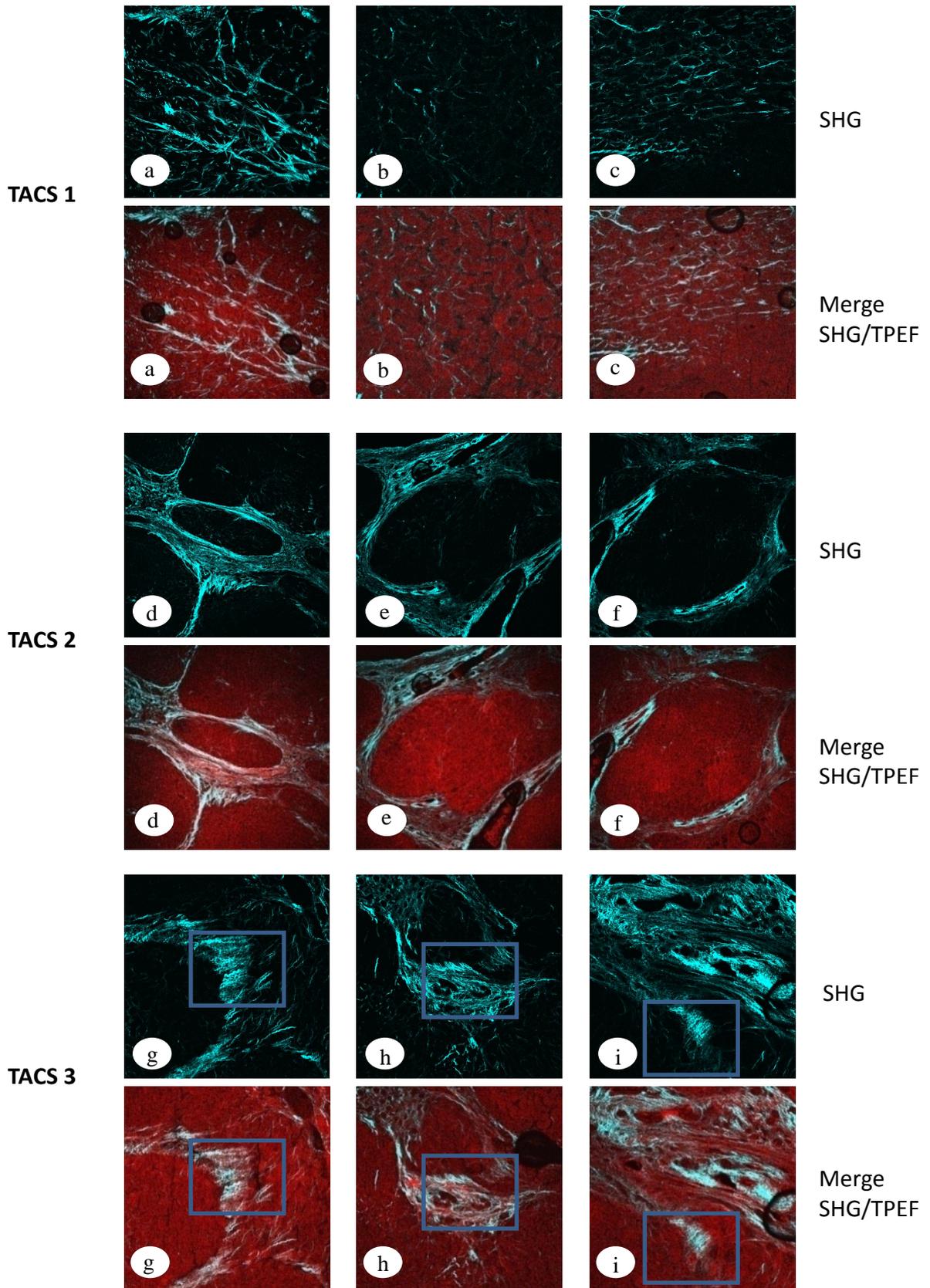


Figure 8, Bomo et al.

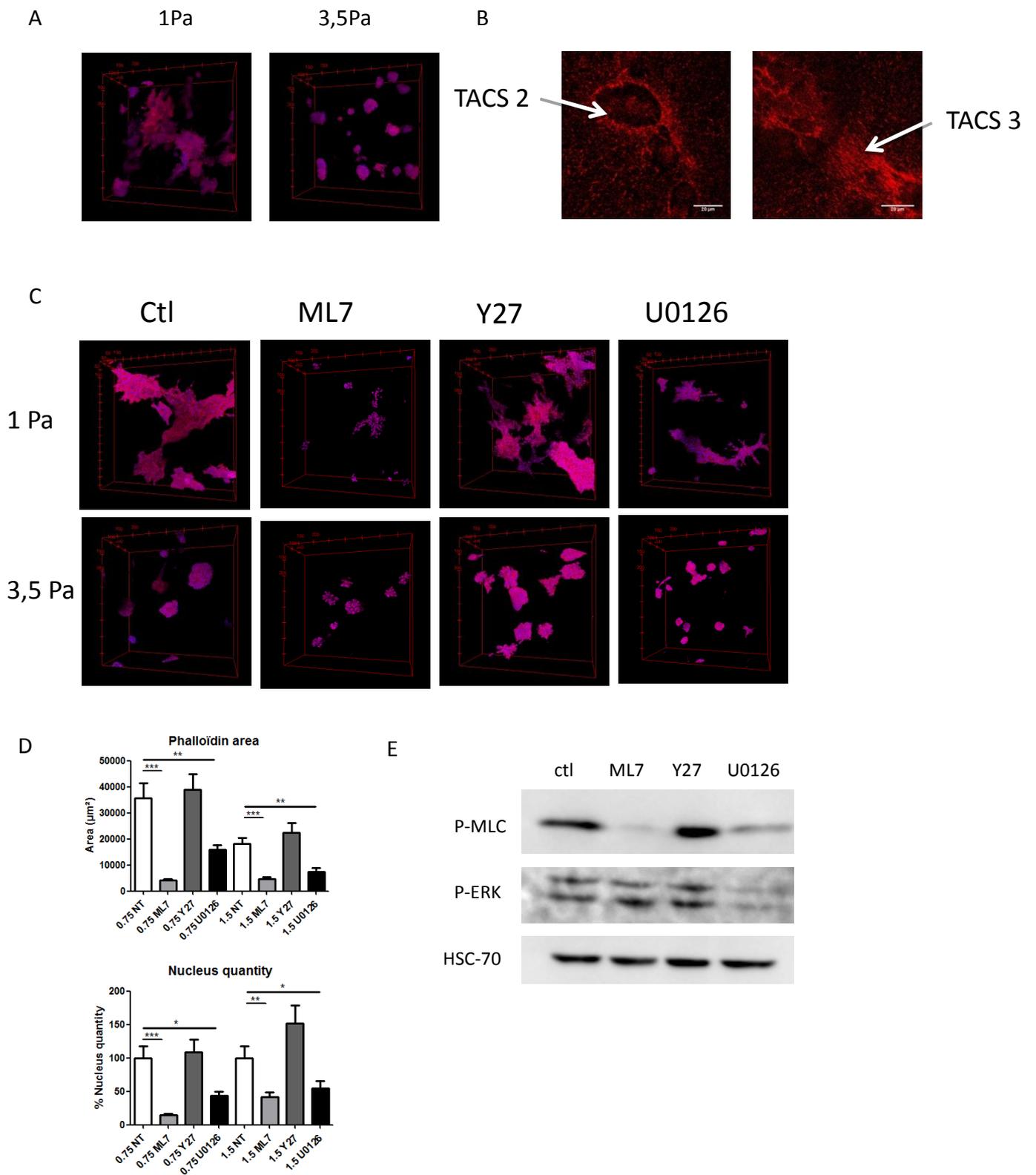
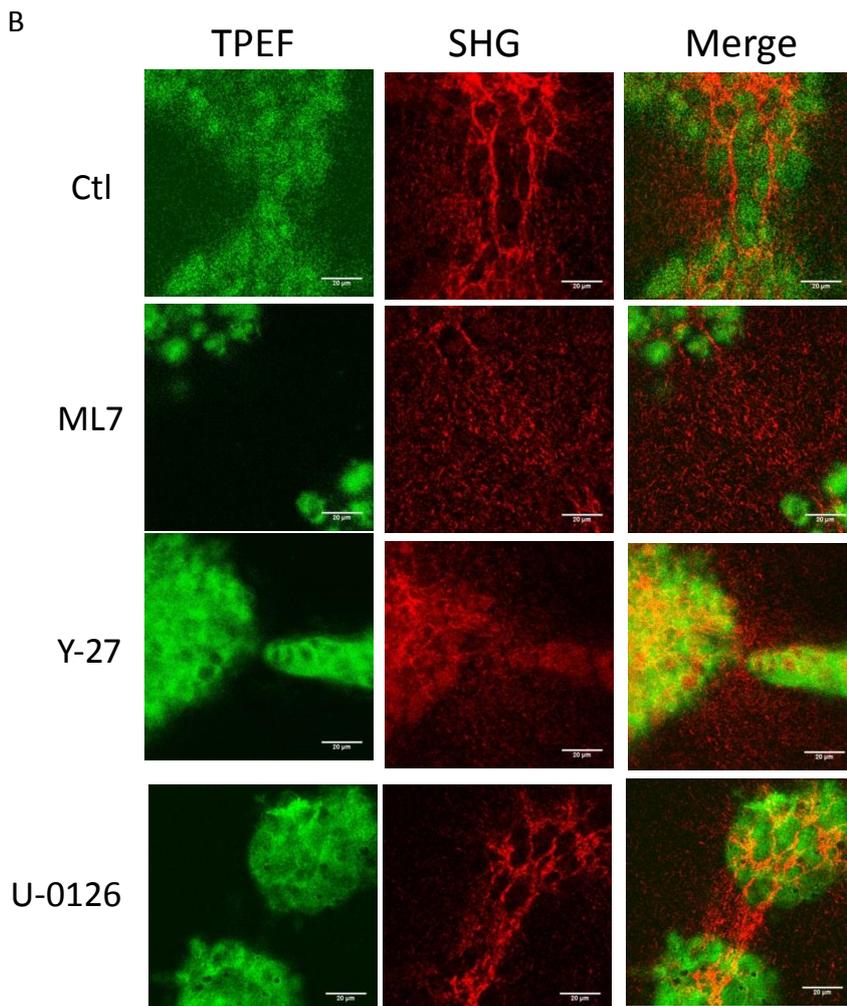
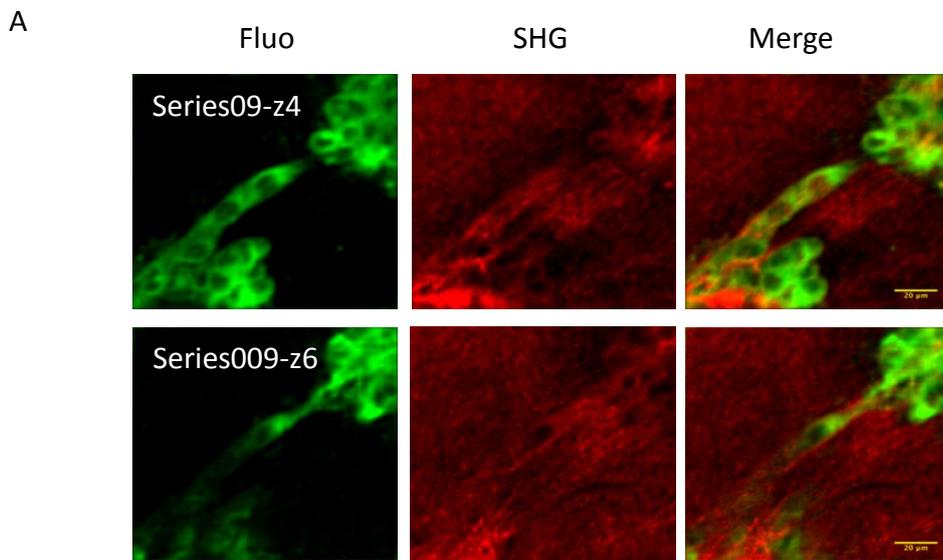


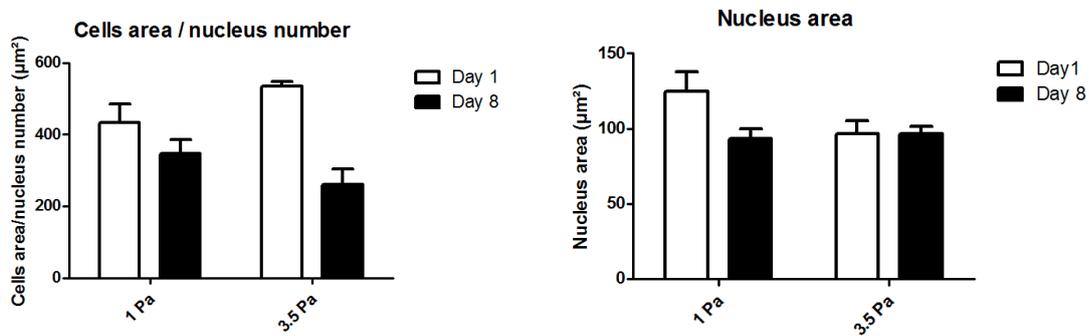
Figure 9, Bomo et al.

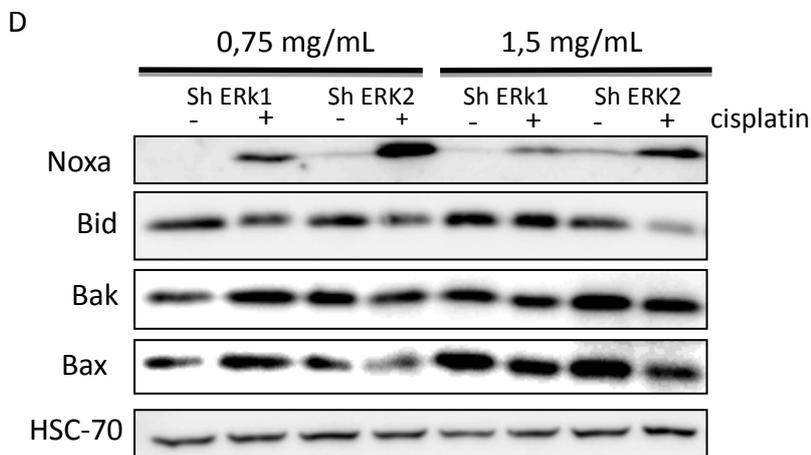
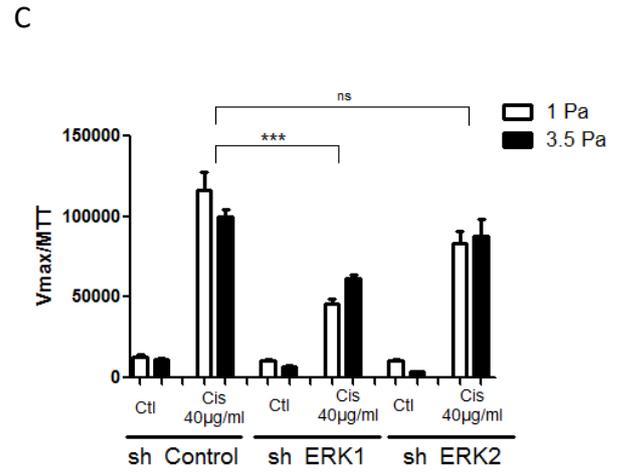
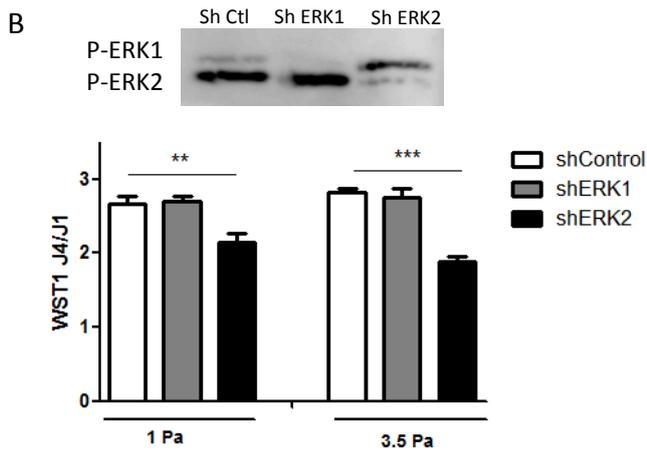
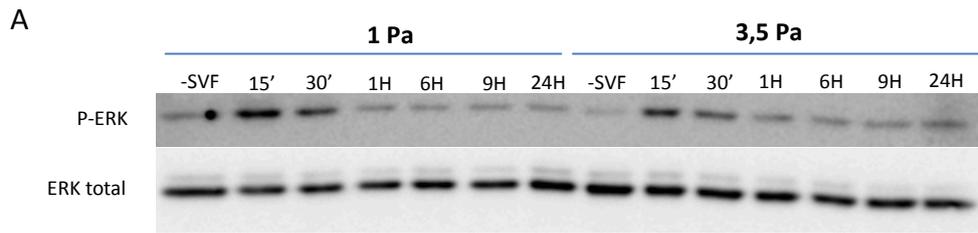


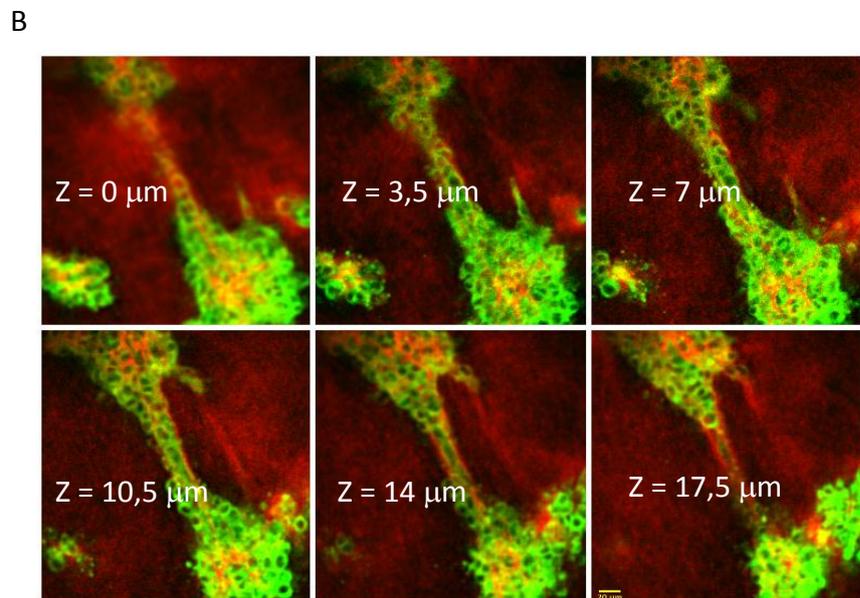
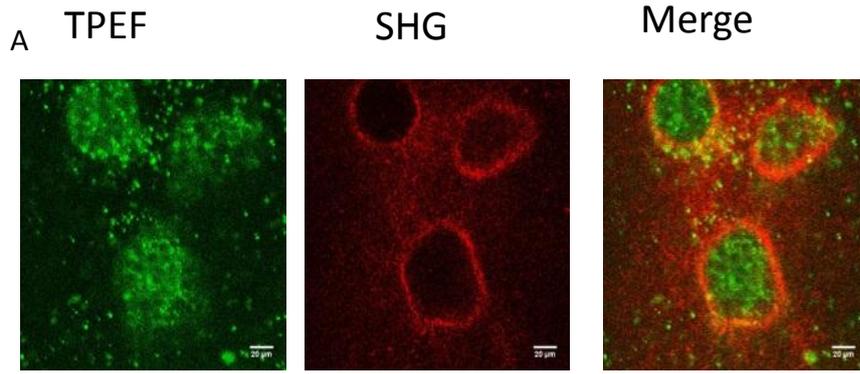
A

Collagen concentration	Elastic modulus (G') (Pa)	Viscous modulus (G'') (Pa)
0,75 mg/mL	0,972	0,253
1 mg/mL	1,137	0,270
1,25 mg/mL	2,240	0,515
1,5 mg/mL	3,605	0,825
1,75 mg/mL	12,350	2,790
2 mg/mL	14,780	3,135

B









## **Partie 2 : Caractérisation du collagène par microscopie SHG dans la fibrose hépatique**

### **Introduction**

La fibrose hépatique se développe suite à des agressions chroniques du foie, aboutissant au remplacement de parenchyme par du tissu fibreux, principalement du collagène I et III. Un diagnostic précoce de la fibrose permet une prise en charge des patients plus efficace avec une probabilité plus importante de réversion. Cependant, 40% des fibroses sont asymptomatiques, et peuvent mettre des années à se développer et aboutir à des complications (Lim and Kim 2008). Différents tests non invasifs ont été développés pour diagnostiquer la fibrose, tels que le dosage sanguin de marqueurs indiquant une perte de fonction hépatique (aminotransférases, prothrombine, protéines de la phase aigüe...). Des techniques d'imageries non invasives sont également développées, telles que l'ultrasonographie, la tomographie, l'IRM ou le Fibroscan (Materne *et al.* 2002, Fraquelli *et al.* 2007, Chan *et al.* 2009, Friedrich-Rust *et al.* 2009, Sandrasegaran *et al.* 2009). Ces techniques permettent de détecter des stades avancés de fibrose, et sont peu adaptées au suivi de l'évolution de la pathologie. La technique de référence pour diagnostiquer la fibrose, ainsi que son stade d'évolution, reste la biopsie hépatique. Elle est basée sur le marquage de la MEC qui permet d'estimer son accumulation par l'observation/quantification par un anatomopathologiste. Cette technique permet non seulement d'estimer la quantité de matrice, mais aussi la morphologie cellulaire/tissulaire et le stade inflammatoire. Cette méthode est d'une grande efficacité, mais peut être limitée par différentes causes : un marquage de la MEC hétérogène induisant des erreurs de lecture, ainsi qu'une certaine subjectivité et des variations de diagnostics intra- et inter-individuelles (Bedossa 1994). De plus, cette technique est consommatrice de temps, avec le marquage des lames puis l'analyse microscopique. Pour pallier à certains de ces défauts notre équipe a développé, en collaboration avec les médecins, une méthode basée sur la microscopie SHG, ne nécessitant aucun marquage pour la détection du collagène dans les foies fibrotiques chez l'homme (Gailhouste *et al.* 2010). Mes travaux ont permis de caractériser la sensibilité de cette technique, en étudiant un modèle murin de fibrose hépatique induite par administration de CCl<sub>4</sub>.

Avant de présenter nos résultats, nous ferons une brève introduction de la technique de microscopie SHG.

## ***A) Introduction à la microscopie biphotonique et des applications pour le collagène***

La microscopie de fluorescence basée sur l'absorption de lumière par des colorants intrinsèques ou extrinsèques a beaucoup été développée durant le XX<sup>ème</sup> siècle. Plus récemment, depuis 25 ans, la microscopie biphotonique, basée sur des interactions non linéaires entre la lumière et le chromophore, a été développée et permet d'imager à plusieurs centaines de micromètres en profondeur (Fig.17). Cette introduction a pour but d'exposer, assez rapidement, les deux différentes modalités d'imagerie biphotonique : TPEF et SHG.

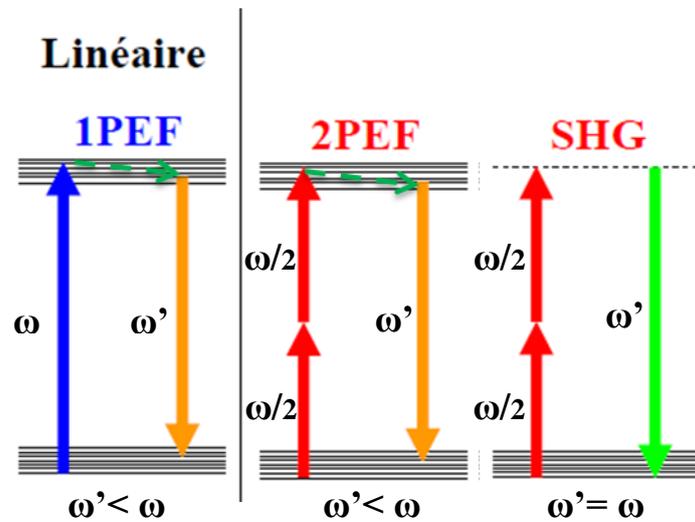
### ***B) La microscopie biphotonique***

#### **1) Two Photon Excitation Fluorescence (TPEF)**

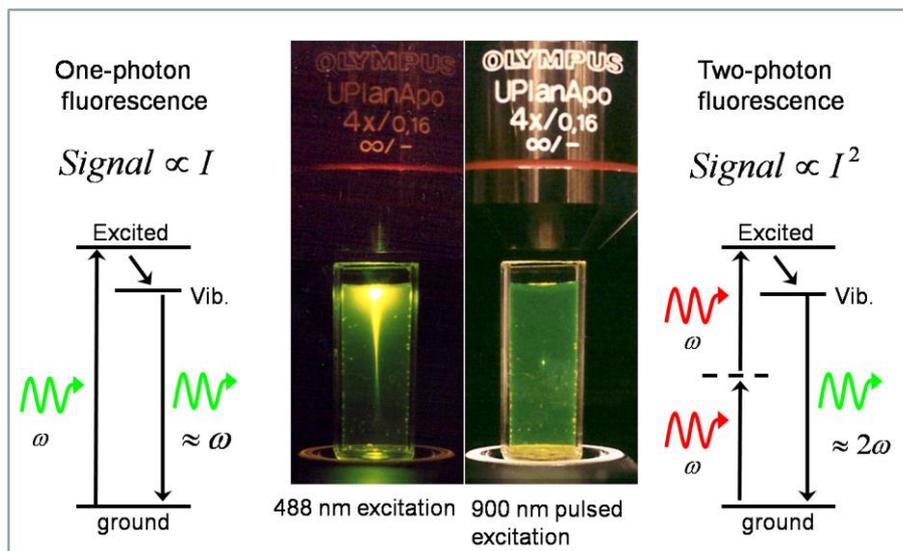
En 1931, Maria Göppert Mayer a prédit la théorie de l'absorption simultanée de 2 photons, et ce n'est que suite au développement des sources laser à impulsions, dans les années 1990, que la microscopie biphotonique a pu être développée. Ses applications sont en continuel essor. En effet, la microscopie biphotonique possède de nombreux avantages par rapport à la microscopie dite « classique » à un photon. Tout d'abord, les longueurs d'ondes utilisées se situent dans l'infra-rouge, aux alentours de 800-1000nm. Cette longueur d'onde, dans l'infra-rouge, limite la diffusion et l'absorption par les tissus, ce qui permet une plus grande pénétration dans les tissus biologiques et donc d'imager plus en profondeur (Ruggieri *et al.* 2010).

Un autre avantage de l'excitation biphotonique est le confinement de l'excitation dans un volume focal très petit. En effet, la probabilité d'excitation biphotonique varie en fonction du carré de l'intensité incidente, ce qui la rend très sensible à la distribution spatiale. Lorsqu'un laser de faible puissance est focalisé par un objectif, l'intensité est telle que l'excitation biphotonique ne se produit de manière significative que dans un petit volume autour du point focal (considéré comme un « pixel » en trois dimensions, ou voxel). La taille de ce voxel dépend alors de la capacité de focalisation de l'objectif, et sera d'autant plus petit que l'ouverture numérique de l'objectif sera grande. Typiquement il est de l'ordre de 0.5  $\mu\text{m}$  latéralement et 2  $\mu\text{m}$  axialement. Cette résolution tridimensionnelle permet d'augmenter fortement le rapport signal/bruit. En effet, avec une excitation à un photon, la fluorescence est générée sur tout le trajet de l'illumination (fig.18), engendrant un signal de fluorescence au focus noyé dans le bruit de fond constitué par la fluorescence hors focus.

L'excitation limitée à un petit volume permet de diminuer certains problèmes d'endommagements de l'échantillon : le photoblanchiment des colorants (destruction du colorant suite à de nombreux cycles excitations-fluorescences) et la diminution de la libération des radicaux libres toxiques pour le tissu.



**Figure 17: Diagramme de Jablonski des transitions énergétiques illustrant les phénomènes d'absorption.** Pour l'excitation à 1 photon (1PEF), la molécule fluorescente absorbe un photon d'énergie  $\omega$ , qu'elle restituera avec environ la même énergie. Pour l'absorption à 2 photons (2PEF) la molécule fluorescente absorbe simultanément 2 photons d'énergie  $\omega/2$ , qu'elle restituera sous la forme d'un photon d'énergie environ égale à  $\omega$ . Pour les mécanismes de SHG, les deux photons incidents ( $\omega/2$ ) sont à l'origine d'un photon dont l'énergie est exactement égale à  $\omega$ , d'où l'appellation de phénomène cohérent (l'état excité est virtuel, c'est pourquoi il est représenté en pointillés).



**Figure 18 : Visualisation des phénomènes de focalisation et de diffusion des phénomènes d'absorption à 1 et 2 photons.** La partie de gauche représente les mécanismes d'absorption à 1 photon, où la fluorescéine aura un cône d'excitation au-dessus et en dessous du plan focal. En ce qui concerne les mécanismes d'absorption de 2 photons, l'excitation se retrouve focalisée uniquement au point focal. (<http://cleoqels2010.blogspot.fr/2010/05/expo-idea-generation-and-multiphoton.html>)

Enfin, l'absorption biphotonique se caractérise par la capacité à exciter des protéines endogènes (NADH, FAD, riboflavines...) et rend visible, sans marquage, le tissu ou les cellules. Pour avoir un meilleur rendement, il est également possible d'utiliser des molécules fluorophores exogènes.

### **1) Second Harmonique Generation (SHG)**

Une autre interaction non linéaire permettant d'imager des chromophores asymétriques est possible et aboutit à la génération de seconde harmonique (SHG). Elle consiste en la sommation cohérente des diffusions hyper-Rayleigh de deux photons incidents en un seul réémis. On considère que les deux phénomènes, absorption et diffusion de deux photons se produisent simultanément. Les photons diffusés ont alors une énergie exactement égale au double de celle des deux photons incidents. De même que dans l'absorption biphotonique, la probabilité d'une telle diffusion est proportionnelle au carré de l'intensité incidente. Il en résulte une excitation focalisée au volume focal, avec la même résolution tridimensionnelle que la fluorescence biphotonique. Ceci nous permet de pouvoir obtenir de manière simultanée le TPEF et la SHG.

Il est à noter que ce phénomène de SHG est dit « cohérent ». En effet les phénomènes de fluorescence (dont le TPEF) nécessitent l'absorption des photons qui seront libérés après un temps indéterminé sous la forme d'un photon de fluorescence. La phase de ce photon est donc aléatoire, d'où l'appellation de « incohérent » pour la fluorescence. Pour générer un photon par interaction SHG, la molécule n'absorbe pas l'énergie incidente, mais aura un effet de diffusion de manière non linéaire et convertit deux photons en un. Cette diffusion est quasi instantanée, et donc la phase de l'émission est conservée, d'où l'appellation de « cohérent ». Ainsi, les champs électriques diffusés par chacun des harmonophores (élément polarisable modifiant l'onde électromagnétique de la lumière) vont interférer entre eux. D'autre part, la parité du processus est telle que la génération de SHG est interdite pour une répartition centro-symétrique des harmonophores. Au final, la fluorescence nous renseigne sur le nombre total d'harmonophores excités, alors que la SHG donne une information complémentaire sur le degré d'asymétrie des harmonophores. En effet, l'émission de deux harmonophores sans centre de symétrie sera maximale lorsque ceux-ci seront orientés parallèlement (interaction constructive), alors qu'aucun signal ne sera généré si ces deux harmonophores sont orientés antiparallèlement (interaction destructive).

Cette nécessité d'avoir une protéine asymétrique avec une organisation supramoléculaire telle qu'aucun centre de symétrie ne soit présent, permet la génération d'un signal SHG par trois protéines principalement: le collagène, les microtubules et la myosine.

## ***C) Signal SHG du collagène***

Comme décrit dans la partie III, la triple hélice du collagène possède une structure bien organisée et orientée permettant une source importante de signal SHG. C'est en 1971 que le collagène d'un tissu est observé pour la première fois par microscopie SHG (Sorensen *et al.* 2012). Seuls les collagènes fibrillaires génèrent un signal SHG, comme montré par des études comparatives par immunomarquages (Tatematsu *et al.* 1985, Strupler *et al.* 2007, Gailhouste *et al.* 2010). Dans l'organisme on retrouve principalement deux collagènes à l'origine du signal SHG : le collagène de type I (le plus abondant) et le collagène de type III. Le collagène de type IV, non fibrillaire et formant les lames basales, ne produit aucun signal SHG.

L'origine du signal SHG doit être considérée à deux niveaux. Le premier est l'identification de l'entité chimique entraînant la réponse non linéaire dans la triple hélice de collagène, et la seconde est la construction du signal SHG au niveau macromoléculaire, à l'échelle du volume focal.

### **1) Origine moléculaire de la réponse non linéaire**

A l'échelle moléculaire, la présence d'électrons polarisables dans un environnement non-centrosymétrique (classiquement entre un groupe chimique donneur et accepteur d'électrons) est à l'origine du signal SHG. La polarisation de ces électrons par un champ électrique (présent en microscopie multiphotonique) produit un comportement non linéaire. Quels sont les harmonophores dans la molécule de collagène ? Il a été démontré que les acides aminés aromatiques possèdent la capacité de produire un signal SHG (Tatsuta *et al.* 1985). Cependant, le collagène n'en contient que très peu, étant principalement constitué de glycine, proline et hydroxyproline. Il a donc été proposé que le signal SHG proviendrait des liaisons peptidiques elles-mêmes (Tiaho *et al.* 2007). En effet, la liaison non-centrosymétrique de la séquence peptidique du collagène présente une délocalisation d'un électron  $\pi$  entre les groupes C=O et N-H, se comportant comme de faibles donneurs et accepteurs d'électrons respectivement.

### **2) Construction du signal SHG à l'échelle macroscopique**

La SHG est un processus non linéaire de second ordre, cohérent. Cela indique que son signal correspond à la somme des radiations de seconde harmonique des harmonophores dans le volume focal. Pour avoir une forte réponse SHG, les harmonophores doivent être alignés dans la même direction. En ce qui concerne le collagène, toutes les liaisons peptidiques sont alignées dans la même direction, conduisant à des interactions constructives. De plus, la triple hélice de collagène fait que c'est une structure peptidique très dense, amplifiant ainsi le signal généré. Cependant, au niveau macroscopique supérieur, les fibrilles de collagènes s'organisent en fibres, avec la possibilité de

compacter des fibrilles en sens contraire, aboutissant donc à l'extinction du signal SHG. Cela indique que l'organisation macroscopique du collagène est également une donnée importante à prendre en considération, et que l'absence de signal SHG ne reflète pas nécessairement l'absence de collagène. Le signal SHG du collagène observé doit donc être considéré comme une somme complexe des interférences de toutes les fibrilles dans le volume focal (Campagnola and Loew 2003).

### 3) Microscopie SHG et quantification fibrose

Le potentiel de la microscopie SHG pour l'étude de la fibrose a été suggéré pour la première fois en 2003 (Blaner *et al.* 2009). Des techniques de quantification et de scores de fibrose ont ensuite été développées par plusieurs groupes dans des modèles animaux de fibrose, ou sur des biopsies humaines (Strupler *et al.* 2007, Sun *et al.* 2008, Tai *et al.* 2009, Gailhouste *et al.* 2010), démontrant que la SHG est adaptée à la quantification du collagène. De plus, combinée à la microscopie TPEF, des informations sur le tissu sont collectées grâce à l'autofluorescence des cellules. En ce qui concerne la fibrose hépatique ces deux approches permettent de voir les changements de distribution du collagène au cours de la pathologie : accumulation autour des espaces portes, puis extensions dans le parenchyme pour former des septa, qui formeront au final des « ponts » dans les modèles murins (Sun *et al.* 2008), mais également chez l'humain (Gailhouste *et al.* 2010).

En résumé, l'utilisation de cette technique pour l'étude de la fibrose présente plusieurs intérêts :

- La forte spécificité du signal SHG pour le collagène fibrillaire.
- La capacité d'obtenir des images en 3D du tissu sur plusieurs centaines de microns.
- La forte sensibilité : en effet l'intensité du signal évolue de manière quadratique en fonction de la quantité de collagène, permettant d'avoir un rapport signal/bruit optimal.
- L'absence de marquage du collagène fibrillaire avec un anticorps ou un colorant.
- De nombreux procédés de conservation de tissus sont compatibles avec cette microscopie: congélation, fixation à l'éthanol, acétone, paraformaldéhyde..., inclusion en paraffine.
- L'observation en microscopie TPEF simultanément à la SHG permet de visualiser la fibrose et l'organisation cellulaire du tissu.

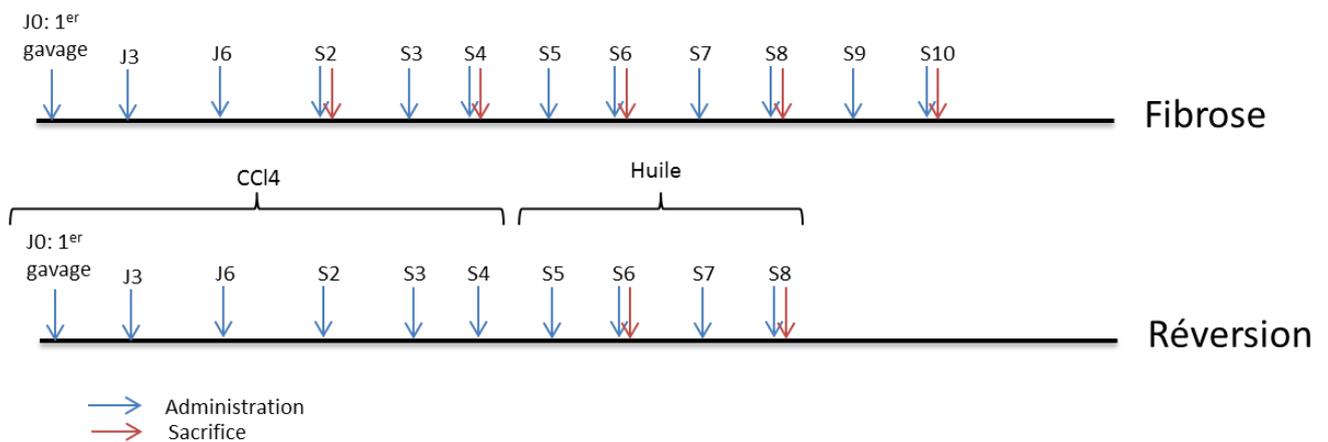
## Résultats

### 1) Visualisation du collagène par microscopie SHG des foies fibrotiques de souris

Nous avons mis en place le protocole le plus couramment utilisé pour le développement d'une fibrose hépatique chez la souris: l'administration périodique de tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ) dont le plan expérimental est représenté en figure 19. Le  $\text{CCl}_4$  a été administré à des doses de 1,6g/kg du poids corporel par gavage de manière hebdomadaire. Ce protocole permet un développement de fibrose à partir de 2 à 4 semaines de traitement. Le mode d'action du  $\text{CCl}_4$  se fait par sa métabolisation par les hépatocytes formant le radical toxique trichlorométhyle ( $\text{CCl}_3$ ) qui provoque l'effet cytotoxique avec notamment une nécrose centrolobulaire (Slater *et al.* 1985). De plus, le  $\text{CCl}_4$  semble également induire l'apoptose des hépatocytes (Shi *et al.* 1998). Ce modèle est très fréquemment utilisé car il mime la majorité des caractéristiques de la fibrose chez l'homme, avec une étape d'inflammation, puis la formation de fibres de MEC. Une régression de la fibrose est visualisée lors de l'arrêt du traitement par le  $\text{CCl}_4$ .

Après la récupération des foies de souris aux différents temps de traitements, des coupes de  $20\mu\text{m}$  sont effectuées et analysées par microscopie SHG dont les paramètres expérimentaux sont les suivants :

Le dispositif expérimental d'imagerie multiphoton est basé sur la modification d'un microscope confocal inversé LEICA SP2 DMIRE2 (Leica Microsystems) développé sur la plateforme PIXEL-mRIC SHG à Rennes par F.Tiaho, D.Rouède et E.Schaub. La source d'excitation est un laser femtoseconde Titane-Saphir MAITAI HP (Spectra Physics). Pour que les échantillons soient excités de manière isotrope, c'est-à-dire pour que l'excitation soit indépendante de l'orientation des fluorophores non linéaires à l'origine des signaux générés, une lame quart-d'onde est utilisée. Ainsi aucune sélection de polarisation n'est faite, permettant d'obtenir un signal indépendant de l'orientation des harmonophores. Les objectifs utilisés sont : 10X à sec ( $\text{NA}=0.4$  ; Leica Microsystems) et 60X immersion à eau ( $\text{NA}=1.1$  ; Olympus) pour appliquer une excitation à 820 nm. Les signaux de génération de seconde harmonique (SHG) et de fluorescence à deux photons (TPEF) sont collectés simultanément par deux voies indépendantes du microscope, avec la SHG en transmission et la TPEF en épifluorescence. Le signal SHG est récupéré en transmission, puisque le signal SHG se produit préférentiellement dans la direction du faisceau laser. Le condenseur permettant la collecte des signaux SHG possède une ouverture numérique adaptée à l'objectif utilisé. La SHG est détectée par un photomultiplicateur après un filtre IRSP715 bloquant l'infra-rouge et d'un filtre interférentiel à bande étroite d'une largeur de 10 nm centré sur la longueur d'onde 410 nm, permettant de ne conserver que les signaux SHG en éliminant la fluorescence parasite. Le signal TPEF est par nature incohérent, et



**Figure 19 : plan expérimental du modèle murin de fibrose hépatique par administration de CCl<sub>4</sub>.** Trois injections de CCl<sub>4</sub>, ou d'huile pour les contrôles, sont effectuées la première semaine, puis les injections sont effectuées une fois par semaine (flèches bleues). Les souris sont sacrifiées toutes les deux semaines (flèches rouges) à partir de la deuxième semaine de traitement. Pour la réversion, le traitement au CCl<sub>4</sub> est arrêté après 4 semaines, et remplacé par de l'huile. Les souris sont sacrifiées deux et quatre semaines après le début de la réversion (S6 et S8) (flèches rouges).

donc généré de façon isotrope dans toutes les directions, ce qui permet de le détecter par épifluorescence (c'est-à-dire par l'objectif exciteur). Les images sont acquises par le logiciel LEICA Confocal Software. Les images sont enregistrées en 8 bit au format TIFF. Elles sont ensuite analysées et traitées avec le logiciel imageJ (National Institutes of health;<http://rsb.info.nih.gov/gate2.inist.fr/ij/>).

Le signal SHG observé en microscopie multiphotonique provient d'une interaction non linéaire avec des protéines fibrillaires asymétriques. Dans le foie, il correspond au collagène de type I et III. Nous avons tout d'abord confirmé la possibilité de détecter le collagène dans des souris non traitées, avec principalement une localisation périvasculaire du collagène (Fig.1-A). Il est également possible simultanément d'obtenir l'image TPEF (Fig.1-A), qui provient de l'autofluorescence cellulaire, donnant ainsi une image de l'architecture hépatique. L'un des avantages de la microscopie SHG est sa capacité à imager des tissus en profondeur. Des piles d'images (stacks) du collagène sont ainsi réalisées, permettant de reconstituer le réseau en 3D (Fig.1-B). Il est à noter que la technique est également assez sensible pour suivre le cheminement d'une fibre de collagène à l'intérieur du parenchyme hépatique (Fig.1C).

## **2) Quantification de l'accumulation de collagène lors de l'évolution de la fibrose**

L'acquisition des images SHG permet la visualisation de l'augmentation de la quantité de collagène dans les souris traitées par le CCl<sub>4</sub>, et ce dès la 2<sup>ème</sup> semaine de traitement (Fig.2-A). Dans les souris contrôles, le collagène conserve une localisation périvasculaire, alors que pour les souris traitées, de plus grandes quantités de collagène sont détectées autour des vaisseaux. On note une progression du collagène dans le parenchyme, faisant le lien entre les zones vasculaires. Les stacks 3D montrent également une quantité plus importante de collagène avec le temps de traitement par le CCl<sub>4</sub> (Fig.2-B). Nous nous sommes ensuite intéressés à la quantification du collagène automatisée après seuillage de l'image à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ. Le seuillage de l'image permet de ne conserver que le signal provenant du collagène, sans le bruit de fond. Pour cela, les valeurs de niveaux de gris conservées sont celles dont les valeurs sont comprises entre 64 et 255. Les quantifications sont exprimées en pourcentage de surface de collagène par rapport à la taille totale de l'image (Fig.2-C). Nos résultats indiquent une augmentation significative de quantité de collagène entre les souris contrôles et les souris traitées dès la 2<sup>ème</sup> semaine et jusqu'à la semaine 10. L'augmentation de la quantité de collagène est bien nette à la semaine 6 puis diminue légèrement aux semaines 8 et 10, pour cependant rester significativement plus importante que les foies contrôles. Après l'arrêt du traitement à 4 semaines, lors de la réversion, une diminution de quantité de collagène par rapport aux souris traitées est quantifiée, avec une différence significative pour les réversions de 2 semaines. Les réversions à 4 semaines ne donnent pas de résultats significatifs du fait de la diminution du collagène dans les foies traités après 8 et 10 semaines au CCl<sub>4</sub>. Nos résultats confirment que la technique de microscopie SHG est assez sensible pour détecter et permettre une quantification

automatique de la quantité de collagène accumulée au cours d'une fibrose hépatique murine, une fibrose beaucoup moins prononcée que chez l'homme.

### **3) Caractéristiques du collagène lors de la fibrose hépatique chez la souris**

En collaboration avec la société Histo-Index (Singapour), des analyses d'images plus approfondies ont été réalisées dans le but de déterminer certaines caractéristiques du collagène. Pour cela, les images SHG obtenues ont été analysées par Histo-Index à l'aide du logiciel HistoHepa™, qui permet de déterminer 17 paramètres. Ces paramètres sont divisés en deux catégories : l'analyse des fibres de collagène et l'analyse des intersections entre les fibres de collagène. Pour l'analyse des fibres de collagène, une fois la détection d'une fibre de collagène par le logiciel, celui-ci délimite ses contours permettant d'en déduire les différentes caractéristiques. Il est ainsi possible de déterminer différents paramètres comme la longueur des fibres, le nombre de fibres de collagène distribué ou agrégé... Cette étude nous permet également de déterminer des relations entre les fibres, avec par exemple la détermination du nombre de fibres se croisant, l'angle des intersections...

Cette analyse nous a permis de faire la discrimination entre le collagène agrégé (amas de collagène se retrouvant principalement autour des vaisseaux) et le collagène distribué (fibres de collagène plus ou moins indépendantes dans le parenchyme) (Fig.3-A). Nous avons ainsi déterminé que le collagène distribué n'est que très peu modifié au cours de la progression de la fibrose, et que seul le collagène agrégé semble s'accumuler. En effet, le collagène distribué ne varie que très peu entre les souris traitées CCl<sub>4</sub> et les souris contrôles avec une petite diminution de quantité pour les semaines 8 et 10 pour les souris traitées au CCl<sub>4</sub>. Le collagène agrégé quant à lui subit de fortes modifications au cours de la cinétique, avec une augmentation d'un facteur 4 dès la 2<sup>ème</sup> semaine pour les souris traitées au CCl<sub>4</sub> et atteignant un facteur d'augmentation d'un facteur 12 en fin de cinétique à la semaine 10. Ces résultats sont en adéquation et complètent nos observations et quantifications du collagène total, montrant une accumulation importante de collagène autour des vaisseaux sanguins, ou reliant les vaisseaux sanguins entre eux, avec très peu de modifications du collagène dans le parenchyme.

Le nombre de fibres de collagène a également été déterminé à l'aide du logiciel HistoHepa™. Ce nombre n'est pas significativement modifié entre les souris contrôles et traitées et se situe autour de 100-150 fibres par image. A l'inverse, la longueur des fibres de collagène doublées dans les foies des souris traitées à partir de 6 semaines est à mettre en parallèle avec l'augmentation d'un facteur deux du collagène total au cours du développement de la fibrose.

Les autres paramètres déterminées par cette étude par le logiciel HistoHepa™ de Histo-Index ne sont pas significatifs du fait de la forte hétérogénéité des résultats, rendant impossible leur interprétation. Seul le nombre d'intersections entre les fibres de collagènes augmente pour les souris

traitées CCl<sub>4</sub> (résultat non montré). Cependant ce résultat est difficilement interprétable et ne donne aucune indication sur les liaisons entre les fibres. En effet, les souris CCl<sub>4</sub> ont une accumulation de collagène agrégé, des fibres proches les unes des autres, et donc une plus forte probabilité de se croiser.

#### **4) Analyse des paramètres de textures du collagène dans la fibrose hépatique chez la souris**

Nous avons ensuite recherché, par analyses d'images, s'il était possible de trouver des paramètres de textures discriminants dans les images SHG obtenues entre les souris traitées par le CCl<sub>4</sub>, les contrôles et les réversions. Pour cette étude, nous avons analysé la texture du collagène par des paramètres de « first-order statistics » (FOS), et de « second-order statistics » que sont les « gray level co-occurrence matrix » (GLCM) (Fig.4-A et tableau II). En effet, une étude récente a montré que ces paramètres pourraient permettre de caractériser certains paramètres morphologiques du collagène dans des pathologies liées à la réorganisation du collagène (exemple : athérosclérose, pathologies de la peau...) (Mostaco-Guidolin *et al.* 2013). Les paramètres FOS prennent en considération la distribution générale des niveaux de gris dans l'image, sans prendre en considération les corrélations inter-pixels, alors que les GLCM prennent en compte l'arrangement spatial des pixels de différentes intensités. Les GLCM mesurent la probabilité de l'apparition d'une certaine valeur d'intensité entre une paire de pixels sur une certaine distance. En d'autres termes, les FOS sont obtenus directement à partir de l'image brut, alors que les GLCM sont dérivés d'une matrice conçue à partir des interconnexions entre les pixels.

Dans un premier temps, nos résultats montrent que les tests statistiques, effectués à partir uniquement des quantifications des aires représentées par le collagène, permettent de discriminer de manière significative les quantifications de la semaine 2 de celle de la semaine 4 (S2/S4), S4 de S6, ainsi que la réversion à la semaine 6 (Fig.4-B et C - % normalized area). Les 5 paramètres FOS analysés ensuite, permettent également la discrimination de manière significative des différents temps (S2/S4, S4/S6 et réversion S6), mais également entre S6/S8 et la réversion à la semaine 8 (Fig.4-B et C). Ces paramètres semblent donc plus fortement discriminants que la simple quantification de collagène par SHG. On peut noter également que le Kurtosis semble être le plus puissant des paramètres, car il est le seul qui peut différencier les semaines S8 de S10.

En ce qui concerne les paramètres GLCM utilisés, les résultats sont très hétérogènes. En effet, chaque paramètre pouvant être faiblement discriminant entre certains temps, mais jamais de manière aussi forte que les paramètres FOS (Fig.Suppl-1).

**Tableau II : Paramètres de texture et leurs expressions mathématiques**

Paramètre	Interprétation	Expression mathématique
<b>First Order Statistics</b>		
Mean	Valeur moyenne des niveaux de gris	$\mu = \sum_{i=0}^{N-1} i \sum_{j=0}^{N-1} P_{i,j} = \sum_{j=0}^{N-1} j \sum_{i=0}^{N-1} P_{i,j}$
Standard Deviation	Déviation standard des valeurs de gris utilisées pour effectuer la moyenne	$\Sigma = \sum_{i=0}^{N-1} (i - \mu)^2 \sum_{j=0}^{N-1} P_{i,j}$
Integrated Density	Produit de l'aire de l'image par la valeur moyenne des niveaux de gris	$I = \sum_{i=0}^{N-1} n(Ni)$
Skewness	Quantification de l'asymétrie de la distribution des valeurs de gris	$\mu_3 = \sigma^{-3} \sum_{i=0}^{N-1} (i - \mu)^3 P_i$
Kurtosis	Quantification du regroupement plus ou moins proche du centre de probabilité	$\mu_4 = \sigma^{-4} \sum_{i=0}^{N-1} (i - \mu)^4 P_i - 3$
<b>Second Order Statistics - Gray Level Co-occurrence Matrix</b>		
Energy	Uniformité de l'image. Valeur faible lorsqu'il n'y a pas de valeur de gris dominant	$\sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j}^2$
Correlation	Dépendance des valeurs de gris entre deux pixels séparés d'une distance $d$	$- \sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j} \left[ \frac{(i - \mu)(j - \mu)}{\sigma^2} \right]$
Inertia	Représentatif des pixels identiques avec leurs voisins. Valeurs élevées pour images avec un fort contraste	$\sum_{i,j=0}^{N-1} (i - j)^2 P_{i,j}$
Inverse Difference Moment (IDM)	Mesure la similarité des valeurs de niveaux de gris dans l'image	$\sum_{i,j=0}^{N-1} \frac{P_{i,j}^2}{1 + (i - j)^2}$
Entropy	Mesure l'absence d'organisation spatiale dans l'image	$- \sum_{i,j=0}^{N-1} P_{i,j} \log P_{i,j}$

Nous avons également souhaité déterminer si ces paramètres d'ordre 1 et 2 pourraient apporter des informations supplémentaires dans la comparaison des groupes où la quantification en collagène sont identiques (pour des temps de cinétiques différents). C'est le cas des groupes de souris des semaines 4, 8 et 10. Nous avons ainsi mis en évidence que deux paramètres de premier ordre (Mean et Integrated Density) et trois de second ordre (Energy, IDM et Entropy) permettent une discrimination entre ces différents groupes (données non montrées). Des mesures et déterminations sur un nombre plus élevé de foies fibrotiques pourra permettre de confirmer et consolider ces résultats.

### **5) Analyse des paramètres de textures du collagène dans la fibrose hépatique humaine**

L'équipe a démontré en 2010 que l'approche biphotonique SHG permettait de discriminer chez l'homme les stades F0/F1, F2/F3 et F3/F4 de fibroses établis selon la classification Métavir (Gailhouste *et al.* 2010). Seuls les stades F1 et F2 restent difficiles à être distingués par l'index SHG. Les images SHG des différents stades de fibrose chez l'homme (Fig.5-A) confirme une accumulation très importante de collagène à partir du stade F2, et des différences peu significatives entre les stades F1 et F2. Cependant, les résultats obtenus chez la souris ont montré que des analyses des textures du collagène d'ordre 1 peuvent permettre une meilleure discrimination entre les différents stades fibrotiques et notamment dans des conditions où la fibrose est peu développée. Nous avons donc appliqué cette méthode d'analyse de textures aux tissus humains fibrotiques. L'analyse des paramètres de textures de premier ordre (FOS) permet de faire la discrimination entre les stades F0-F1, F2-F3 et F3-F4 (Fig.5-B). Seuls les stades F1-F2 ne peuvent être différenciés par cette approche. Comme dans la fibrose murine, les paramètres de second ordre (GLCM) sont peu ou pas discriminants avec une très grande variabilité (Fig.Suppl-2). Nos résultats chez l'homme, comme chez la souris, confirment que les paramètres de premier ordre renforcent la quantification du collagène (index SHG). Cependant la discrimination entre les foies fibrotiques F1 et F2, selon la classification Métavir, n'est pas améliorée par la détermination de ces paramètres.

## Légende des figures :

**Figure 1 : Visualisation du collagène par microscopie SHG.** **A.** Détection du collagène dans un foie normal de souris par microscopie SHG et microscopie TPEF (barre d'échelle : 50µm). **B.** Z-stack d'images SHG sur une épaisseur de 20µm. **C.** Représentation 3D du Z-stack : d'images SHG, TPEF et fusions des deux images. 2 zooms successifs sur une zone peu développée en collagène.

**Figure 2 : Accumulation de collagène dans le foie fibrotique de souris.** **A.** Images SHG représentatives du collagène des foies de souris après 2, 4 et 8 semaines de traitement au CCl<sub>4</sub>. **B.** Représentation 3D du collagène des foies de souris après 4 et 8 semaines plus ou moins traitées au CCl<sub>4</sub>. **C.** Quantification du collagène : représentation du pourcentage de l'aire du collagène (haut) et quantité de collagène normalisée par rapport aux contrôles non traités (oil) (bas). Pour les expériences de réversion, le traitement a été arrêté à la semaine 4. (Mean ± SD ; P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*)).

**Figure 3 : Analyse du collagène par le logiciel HistoHepa™.** **A.** Le collagène agrégé est figuré en jaune et le distribué en bleu, après analyse à partir d'images de foies de souris traitées ou non au CCl<sub>4</sub>, 2 ou 10 semaines. **B.** Quantification par le logiciel Histo-Hepa™ du collagène agrégé et distribué, du nombre total de fibres et de la longueur des fibres normalisées par rapport aux contrôles non traités (oil). (Mean ± SD)

**Figure 4 : Détermination des paramètres statistiques de premier ordre (FOS) du collagène murin.** **A.** Représentation graphique des différents paramètres statistiques de premier ordre d'images SHG des foies murins traités ou non au CCl<sub>4</sub>. (Mean ± SD) **B.** Etude statistique des FOS par le test Mann-Whitney entre les différents groupes de souris traitées au CCl<sub>4</sub> (P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*)). **C.** Etude statistique des FOS par le test Mann-Whitney entre les groupes de souris traitées au CCl<sub>4</sub> et les réversions, aux semaines 6 et 8.

**Figure 5 : Détermination des paramètres statistiques de premier ordre (FOS) du collagène humain.** **A.** Images SHG du collagène de foies humains du stade F0 au stade F5. **B.** Représentation graphique des paramètres statistiques de premier ordre des images SHG des foies fibrotiques humains. (Mean ± SD) **C.** Etude statistique des FOS par le test Mann-Whitney entre les différents stades fibrotiques. (P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*))

**Figure Supplemental 1 : Détermination des paramètres statistiques de second ordre (GLCM) du collagène murin** **A.** Représentation graphique des paramètres de second ordre des images SHG des foies murins traités ou non au CCl<sub>4</sub> (GLCM). (Mean ± SD) **B.** Etude statistique des GLCM par le test Mann-Whitney entre les différents groupes de souris traitées au CCl<sub>4</sub>. (P<0.05(\*),

P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*)) C. Etude statistique des GLCM par le test Mann-Whitney entre les groupes de souris traités et en réversion, aux semaines 6 et 8. (P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*))

**Figure Supplemental 2 : Détermination des paramètres statistiques de second ordre (GLCM) du collagène humain.** A. Représentation graphique des paramètres de second ordre des foies humains aux stades F0, F1, F2, F3 et F4 (GLCM). (Mean  $\pm$  SD) B. Etude statistique des GLCM par le test Mann-Whitney entre les différents stades fibrotiques. (P<0.05(\*), P<0.01(\*\*), P<0.005(\*\*\*))

Figure 1

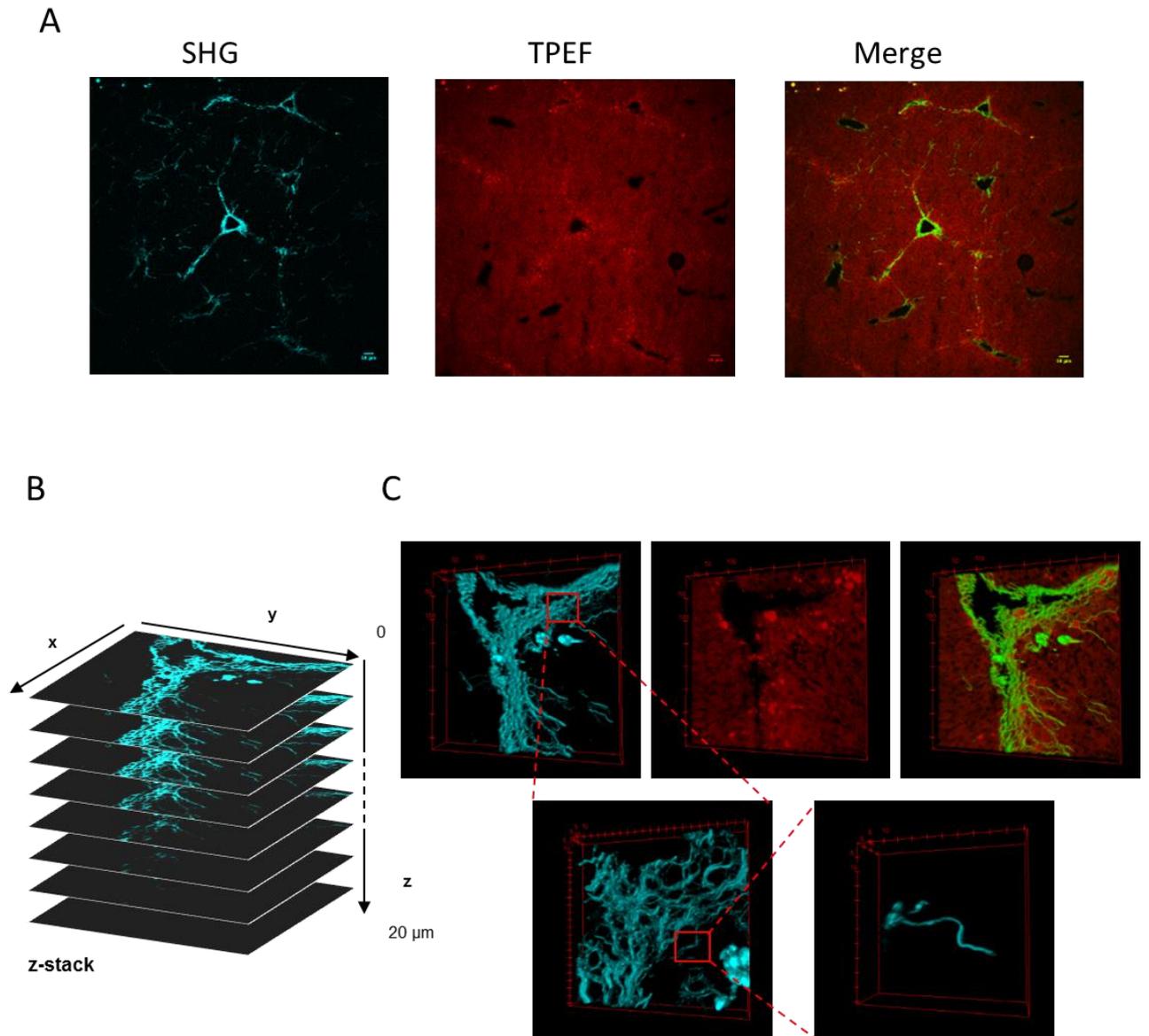


Figure 2

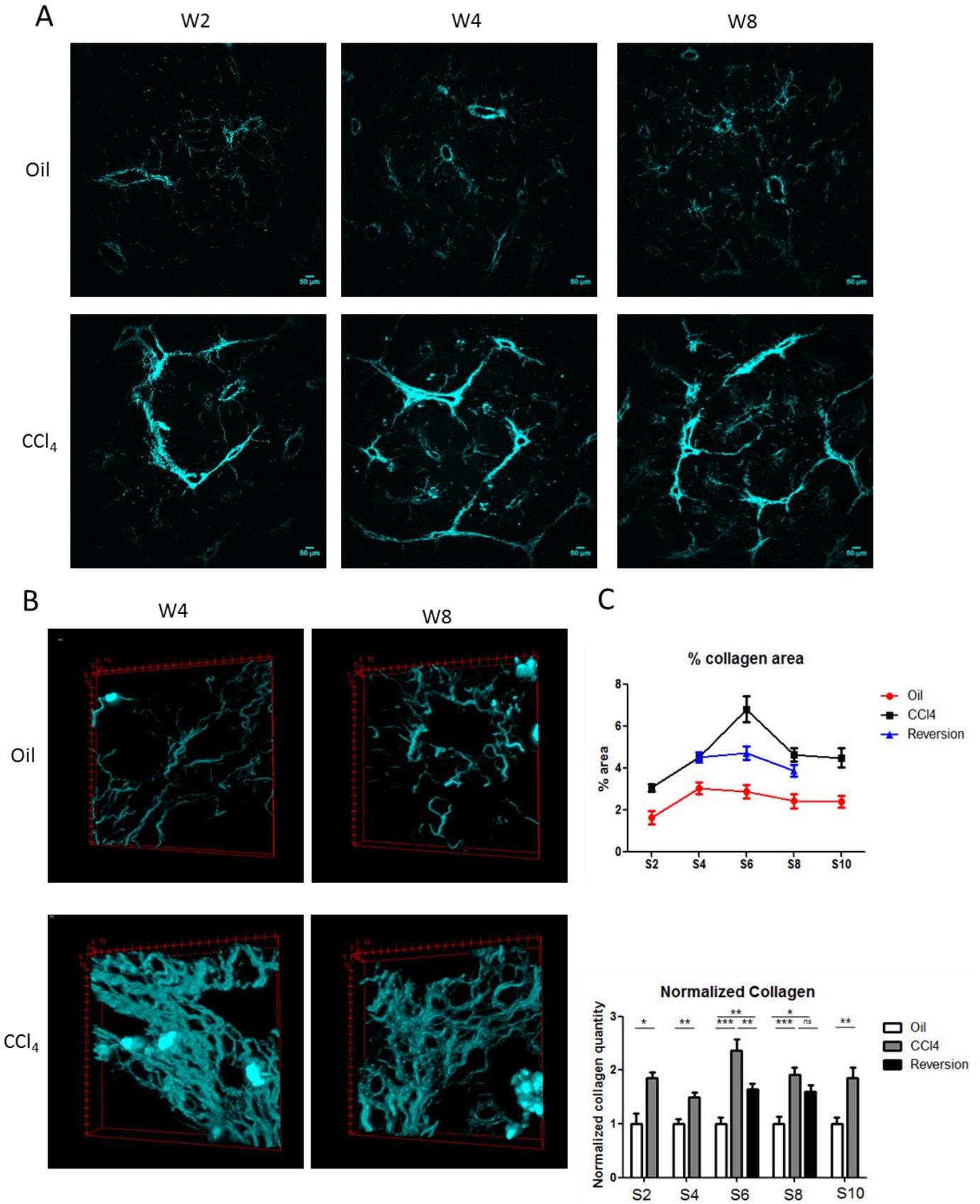


Figure 3

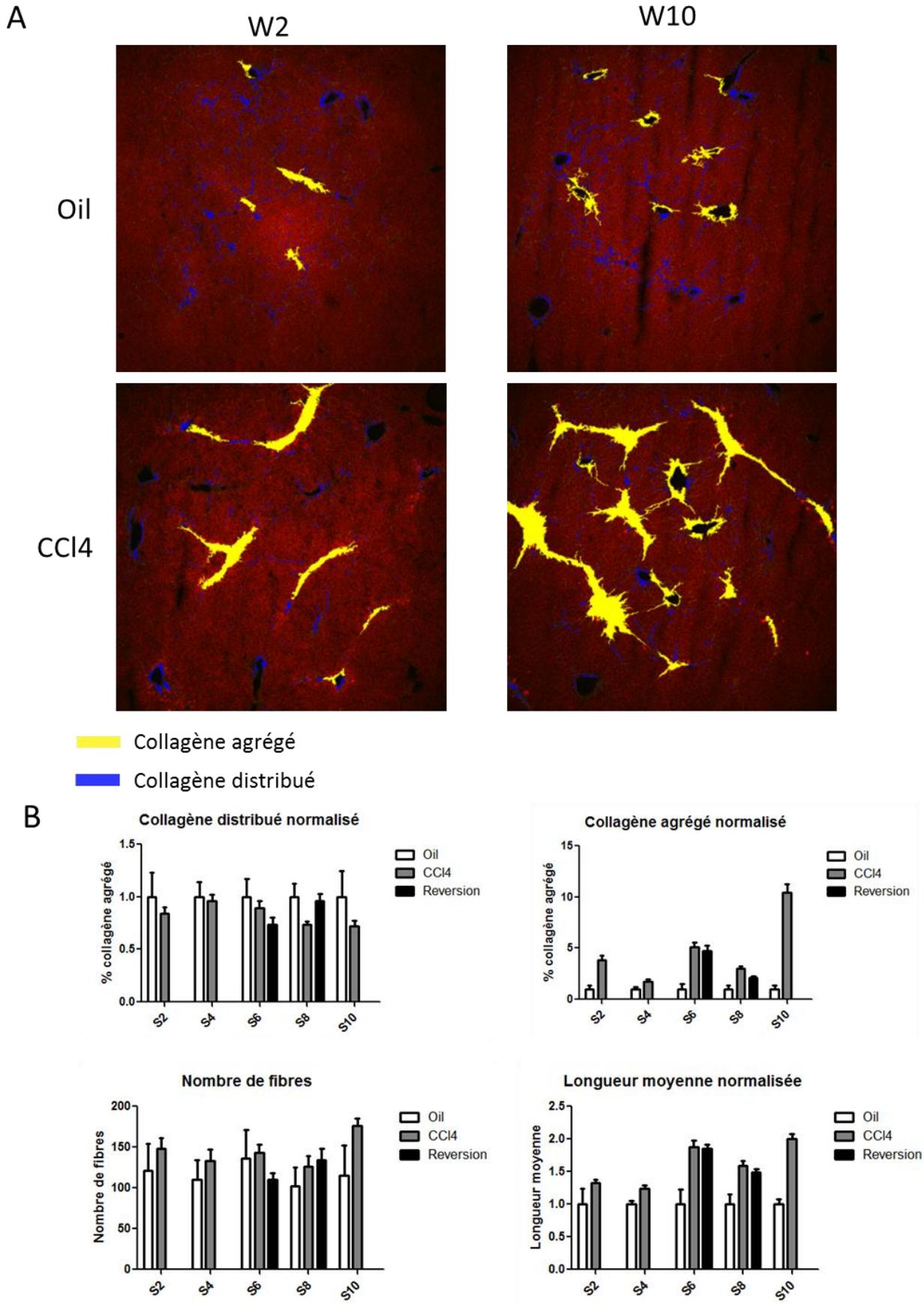
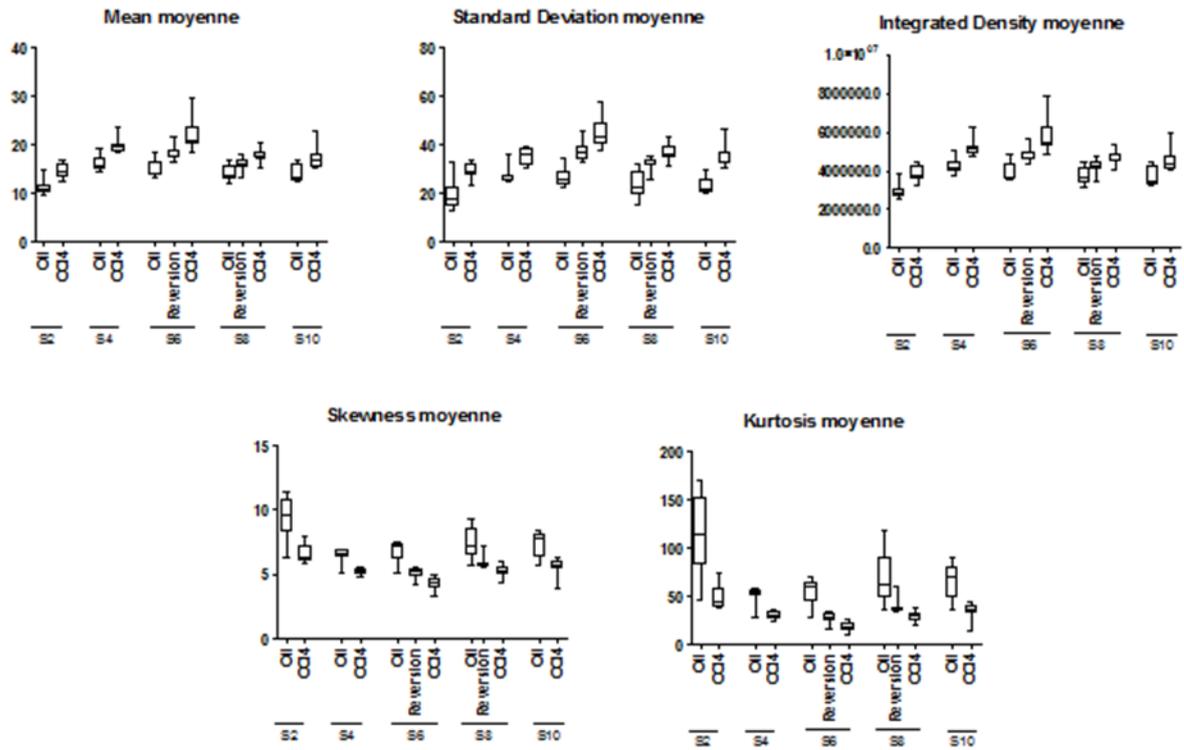


Figure 4

A



B

p value	S2-S4	S4-S6	S6-S8	S8-S10
% normalized area	0,0379 *	0,0006 ***	0,1049	0,5054

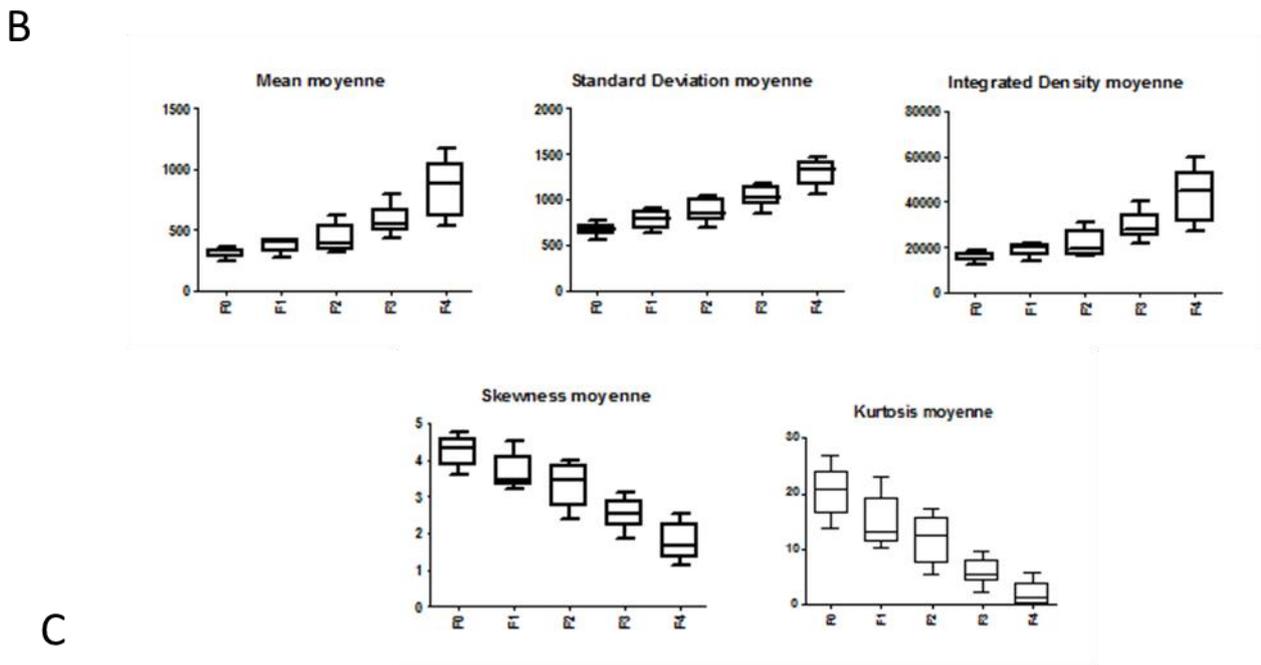
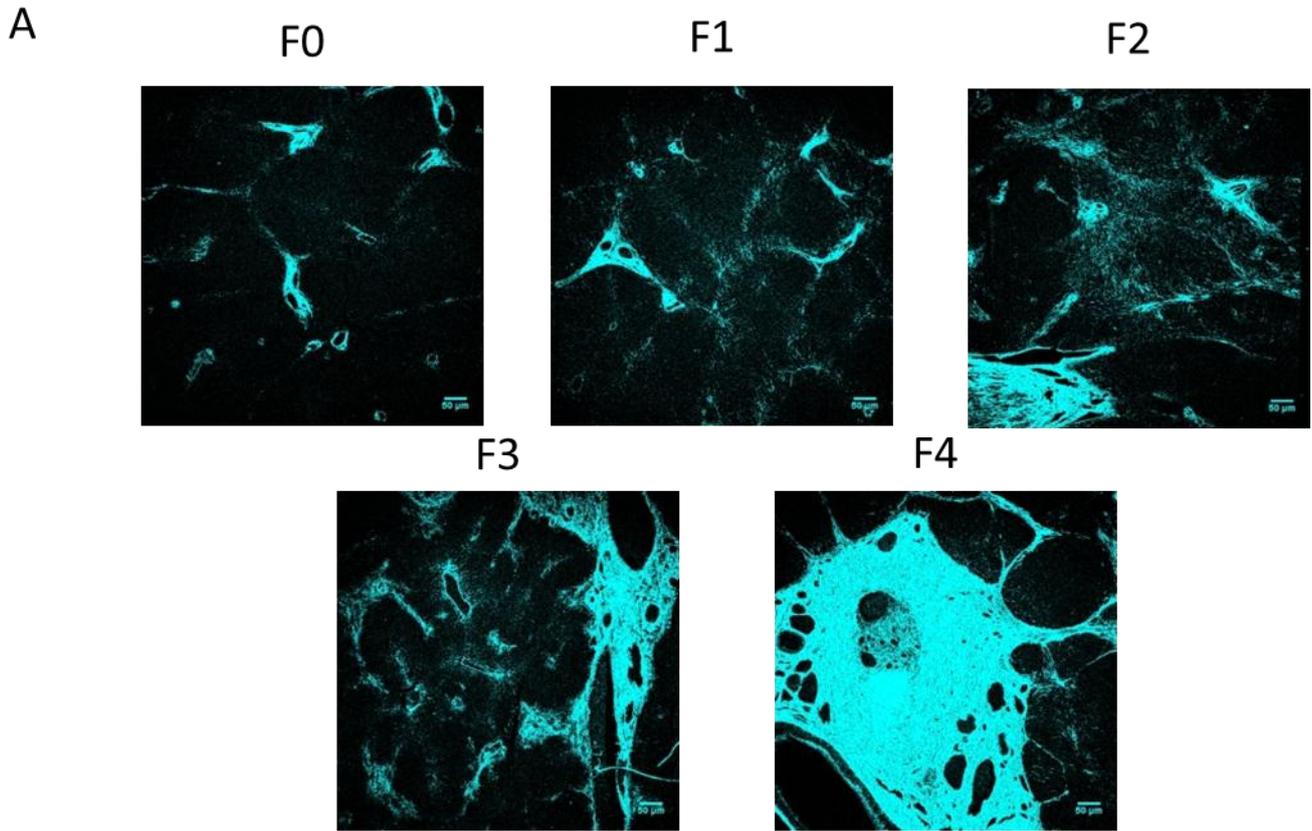
p value	S2-S4	S4-S6	S6-S8	S8-S10
Mean	0,0002 ***	0,0499 *	0,0011 **	0,2345
Standard Deviation	0,007 **	0,0011 **	0,007 **	0,1949
Integrated Density	0,0002 ***	0,0499 *	0,0011 **	0,2345
Skewness	0,0002 ***	0,0006 ***	0,0019 **	0,1049
Kurtosis	0,0002 ***	0,0003 ***	0,0019 **	0,0499 *

C

p value	CCl4 S6-Reversion S6	CCl4 S8-Reversion S8
% normalized area	0,0047 **	0,0827

p value	CCl4 S6-Reversion S6	CCl4 S8-Reversion S8
Mean	0,0047 **	0,0379 *
Standard Deviation	0,0104 *	0,0148 *
Integrated Density	0,0047 **	0,0379 *
Skewness	0,0047 **	0,007 **
Kurtosis	0,0104 *	0,007 **

Figure 5

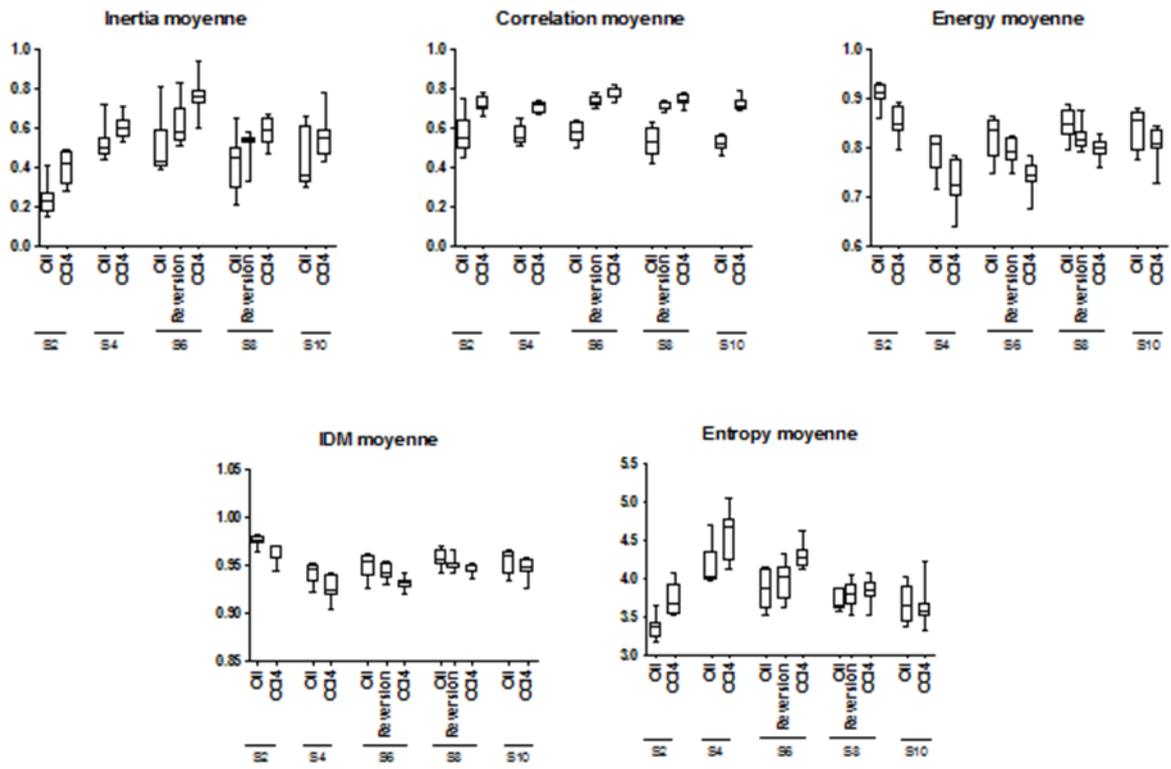


C

P value	F0-F1	F1-F2	F2-F3	F3-F4
Mean	0,0133 *	0,3401	0,022 *	0,0039 **
Standard Deviation	0,0172 *	0,2224	0,0101 *	0,0005 ***
Integrated Density	0,0133 *	0,3401	0,022 *	0,0039 **
Skewness	0,0279 *	0,2973	0,0133 *	0,0029 **
Kurtosis	0,022 *	0,2973	0,0057 **	0,0011 **

Figure S1

A



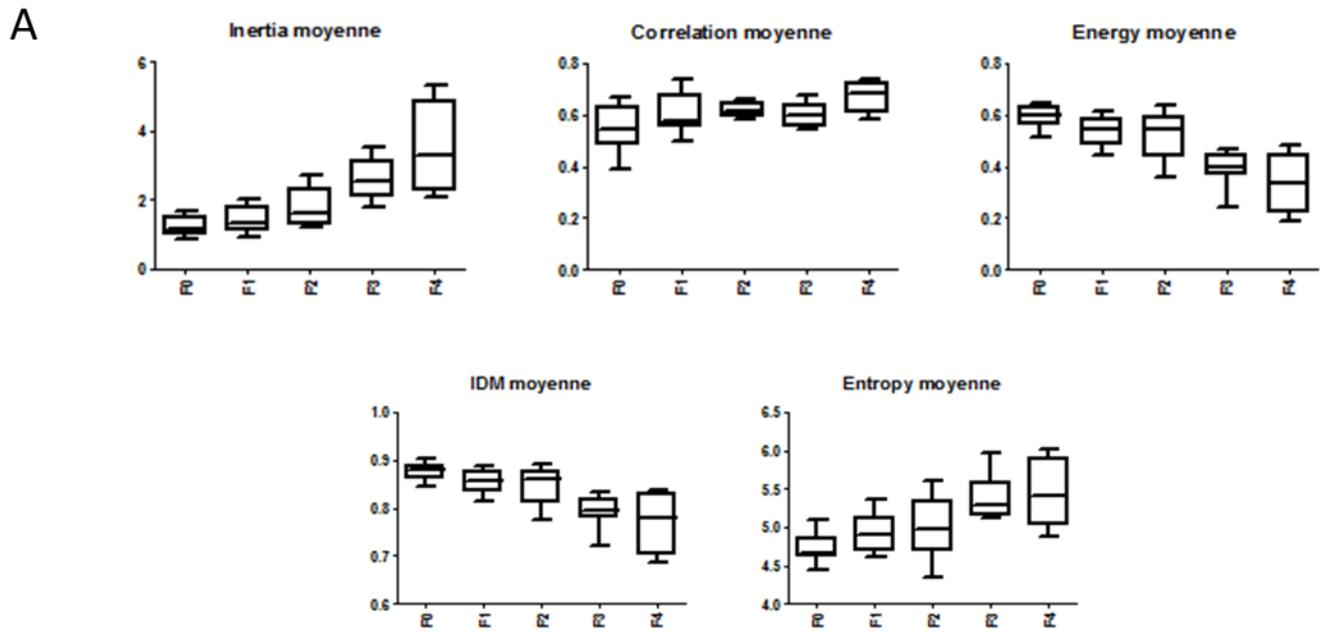
B

P value	S2-S4	S4-S6	S6-S8	S8-S10
Inertia	0,0002 ***	0,0019 **	0,0019 **	0,4418
Correlation	0,7209	0,0003 ***	0,1949	0,2786
Energy	0,0002 ***	0,5737	0,0006 ***	0,3282
IDM	0,0002 ***	0,5054	0,0006 ***	0,3823
Entropy	0,0002 ***	0,083	0,0002 ***	0,0499 *

C

P value	CCl4 S6-Reversion S6	CCl4 S8-Reversion S8
Inertia	0,0207 *	0,1605
Correlation	0,083	0,0281 *
Energy	0,003 **	0,1049
IDM	0,0104 *	0,1304
Entropy	0,007 **	0,5054

Figure S2



**B**

P value	F0-F1	F1-F2	F2-F3	F3-F4
Inertia	0,1823	0,2973	0,0133 *	0,1051
Correlation	0,1823	0,1903	0,447	0,0185 *
Energy	0,0535	0,5457	0,0172 *	0,123
IDM	0,0947	0,5457	0,022 *	0,315
Entropy	0,1128	0,7304	0,0789	0,6842





# **DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**



## Partie I : Impacts des forces de tensions sur le phénotype hépatocytaire

Ces dernières années, l'utilisation de cultures 3D dans des biomatériaux s'est énormément développée. En effet, ces cultures permettent de nombreuses applications en médecine régénérative et ingénierie tissulaire. Différentes approches expérimentales sont actuellement développées dans le but de mimer un environnement 3D le plus proche de celui des cellules *in vivo* : bioréacteurs, gels d'agarose, d'acrylamide, de collagène... Ces modèles 3D ont pour objectif de se rapprocher de l'environnement cellulaire *in vivo*. Ils ont des applications en biotechnologies avec par exemple la recherche de nouveaux traitements thérapeutiques ou l'obtention de cellules différenciées à des fins de transplantation. Ils peuvent également servir à l'analyse des propriétés cellulaires dans un environnement 3D modulable. Ils sont d'un grand intérêt pour mieux comprendre les modifications et régulations phénotypiques induites, notamment, durant la fibrose, caractérisée par une très forte accumulation de collagène, et principalement de type I et III. Pour étudier l'implication des forces engendrées par cette accumulation de collagène sur le phénotype des hépatocytes, notre choix s'est porté sur un modèle 3D de cellules hépatiques dans des gels de collagène I. Les forces appliquées sur les cellules peuvent être modulées en faisant varier la concentration en collagène.

Dans la littérature, deux stratégies différentes de culture 3D sont principalement développées: la culture de cellules sur des matrices 3D de rigidité variable, et la culture de cellules dans les matrices 3D. La culture des cellules dans les matrices permet de se rapprocher au maximum des conditions physiologiques où les cellules sont entourées et en contact avec d'autres cellules et des composants de la MEC. L'utilisation de cette technique permet d'obtenir des informations sur les modifications phénotypiques dans un environnement 3D de forces variables par rapport à la culture dite classique en 2D sur plastique ou film de collagène, ainsi que sur matrices 3D. En effet, la majorité des études qui étudient l'impact des tensions sur le phénotype des hépatocytes cultivent les cellules sur des substrats 3D de rigidités variables, coatés ou non avec des composants de la MEC (Hansen *et al.* 2006, Schrader *et al.* 2011). Ces études montrent que les hépatocytes cultivées sur des substrats rigides adoptent une morphologie cellulaire très étalée, et présentent une augmentation de la prolifération corrélée à une dédifférenciation hépatocytaire. Nos travaux, à partir de cellules hépatiques cultivées dans les gels de collagène, indiquent également une prolifération stimulée pour les fortes rigidités. *In vivo*, des études chez la souris ont rapporté que la croissance tumorale des cellules hépatiques transformées était également favorisée par un environnement fibrotique (Kornek *et al.* 2008, Yang *et al.* 2010). La rigidité de la matrice et les forces engendrées semblent donc être des éléments favorables à la croissance des cellules hépatiques normales (hépatocytes de rat) et transformées (Huh-7 et F1), *in vitro* et *in vivo* (Hepa129 et ML1). Nos résultats concernant l'augmentation de la prolifération dans un environnement rigide ainsi que la dépendance vis-à-vis de la voie de signalisation MEK/ERK pour progresser dans le cycle cellulaire sont en adéquation avec la littérature. Une relation entre la rigidité

de la MEC et l'activation de la voie MEK/ERK dans la régulation de la prolifération cellulaire a été rapportée par Assoian et collaborateurs (Assoian and Schwartz 2001). Cette étude a montré que la fixation des cellules via les intégrines à la MEC induit l'expression de cycline D1, et l'activation de la voie MEK/ERK. Cette synthèse de cycline D1 permet, après association avec cdk4 et cdk 6, de phosphoryler Rb et ainsi de libérer E2F pour pouvoir progresser dans le cycle cellulaire et passer la transition G1/S. Cette activation de la voie MEK/ERK et la progression dans le cycle cellulaire semblent dépendante des tensions appliquées sur les cellules (Schrader *et al.* 2011). De plus, les hépatocytes cultivés sur des gels de collagène ont une expression de cycline D1 et une prolifération réduite comparés à des hépatocytes cultivés sur un film de collagène, un substrat beaucoup plus rigide (Hansen and Albrecht 1999). Ces observations et nos résultats montrent que les tensions engendrées par des variations de la rigidité de la MEC peuvent réguler la progression du cycle cellulaire (pour revue (Assoian and Klein 2008)).

Des études précédentes au sein de l'équipe ont démontré l'importance de la voie MEK/ERK dans le contrôle du phénotype des hépatocytes, et notamment dans la prolifération et l'induction d'apoptose des hépatocytes (Fremin *et al.* 2009, Fremin *et al.* 2012, Guegan *et al.* 2012, Guegan *et al.* 2013). Nous avons confirmé l'importance de cette voie de signalisation pour des hépatocytes cultivés en 3D, ainsi que la spécificité de fonction des isoformes ERK1 et ERK2. Ces spécificités de fonctions entre les deux isoformes sont indépendantes des tensions appliquées sur les cellules. Nous avons pu ainsi confirmer que l'inhibition de la voie MEK/ERK par inhibiteur chimique (U0126) bloque la prolifération cellulaire, et que cette inhibition est dépendante de l'inhibition de ERK2 mais pas de ERK1. La spécificité stricte de l'action des MAPKs ERK1/ERK2 fait débat. En effet, le niveau relatif d'expression des formes pourrait être responsable des différents effets obtenus pour ERK1 et ERK2 dans les différents types cellulaires analysés. Nous avons également établi que l'inhibition de ERK1 entraîne une diminution de l'induction d'apoptose par le cisplatine et aurait donc un effet négatif sur l'apoptose induite par cette drogue lorsque la voie est inhibée par l'U0126, confirmant les résultats obtenus en 2D (Fremin *et al.* 2012). Les stratégies thérapeutiques visant à inhiber de manière spécifique la forme ERK2 seraient donc à privilégier. Le ciblage de ERK2 inhibe la prolifération cellulaire en n'augmentant pas la capacité de survie des cellules hépatiques et en conservant l'apoptose induite par le cisplatine dépendante, au moins en partie, de ERK1.

Dans les gels rigides, les cellules adoptent une morphologie arrondie, se regroupent sous forme de sphéroïdes et expriment des fonctions hépatocytaires différenciées. Le microenvironnement 3D des cellules hépatiques dès la mise en culture est primordial pour le regroupement et le développement des sphéroïdes. En effet, les cellules hépatiques cultivées en sandwich entre deux gels de collagène (à 1.5mg/ml - 3 Pa) s'étalent fortement et ne forment jamais de sphéroïdes quel que soit le temps de culture. Il est classiquement admis que la différenciation et la prolifération sont deux

phénomènes antagonistes et que des cellules hépatiques proliférantes se dédifférencient transitoirement, tandis que les cellules hépatiques différenciées ont une prolifération réduite. Cependant, les hépatocytes peuvent lors de la régénération hépatique, avoir une forte activité prolifératrice pour combler la perte tissulaire, tout en maintenant des capacités de détoxification, et en maintenant donc un état différencié (Michalopoulos and DeFrances 1997), montrant que prolifération et différenciation ne sont pas incompatibles. Il est toutefois décrit un basculement de certaines isoformes enzymatiques vers une forme fœtale et une diminution transitoire de l'expression de certaines fonctions hépatiques, telles que l'albumine, lors de la prolifération des hépatocytes *in vivo* et *in vitro*.

En ce qui concerne l'influence de la rigidité sur la différenciation, nos résultats sont en opposition avec les résultats de la littérature se rapportant aux cellules cultivées sur gels de collagène. Ainsi, Godoy et collaborateurs ont démontré que la culture d'hépatocytes sur des gels rigides active FAK puis ensuite ERK et Akt, aboutissant à l'EMT (Godoy *et al.* 2009). L'effet inverse est obtenu pour des cultures sur gels lâches, où FAK est inactivée sans EMT. Il a été également démontré que les mécanismes de dédifférenciation hépatocytaires impliquent des mécanismes de l'EMT. En effet, les hépatocytes cultivés sur un coating de collagène se dédifférencient pendant les trois premiers jours de culture (Godoy *et al.* 2009). Cette dédifférenciation possède les caractéristiques de l'EMT, avec l'adoption d'une morphologie fibroblastique, la formation de fibres de stress, la perte de la localisation membranaire de l'E-cadhérine, l'augmentation d'expression de la vimentine et de Snail et la diminution d'expression de Claudine-1. En contrepartie, les hépatocytes cultivés en sandwich entre deux gels de collagènes restent différenciés et conserveraient leur phénotype épithélial, confirmant la relation entre dédifférenciation et EMT. Cependant, des cellules hépatiques cultivées dans les gels rigides adoptent une morphologie complètement différente des cellules sur gels. Elles sont rondes, non étalées et se regroupent en sphéroïdes. Dans ces conditions, les cellules Huh-7 expriment des marqueurs épithéliaux, tandis que les hépatocytes sont plus différenciés. D'autres études ont montré l'avantage des cultures 3D pour le maintien de l'état différencié des hépatocytes. Par exemple la différenciation est augmentée pour les cellules HepaRG et HepG2 dans des hydrogels de cellulose (Bhattacharya *et al.* 2012) ; les cellules hépatiques et les cellules souches embryonnaires de souris dans des bioréacteurs (Langsch and Bader 2001, Wang *et al.* 2012) ; les Huh-7 et HepG2 dans des gels constitués d'un mélange de poly(ethylene glycol)-tetra-norbornene (PEG4NB) et dithiothreitol (DTT) (Lin *et al.* 2014) ; ainsi que pour les cellules souches embryonnaires dans des gels de collagène (Baharvand *et al.* 2006)... A l'inverse, une étude de la lignée C3A dans des hydrogels d'alginate a montré que les fortes rigidités inhibent la prolifération tout en induisant la dédifférenciation (Huang *et al.* 2013). Cela met en évidence que la réponse des cellules hépatiques semble fortement dépendante

du type de substrat et que l'alginate ne semble pas favoriser la prolifération et différenciation des cellules en 3D.

Les mécanismes de migration cellulaires sont fondamentaux dans le développement tumoral et à l'origine de l'apparition de métastases intra et/ou extra-organe. Il a longtemps été pensé que le collagène fibrillaire s'accumulant dans les cancers constituait une barrière physique pour empêcher les métastases. Des études ont plus récemment démontré que le collagène pourrait jouer aussi un rôle important dans les mécanismes métastatiques en favorisant la migration cellulaire (Peyton and Putnam 2005, Provenzano *et al.* 2008, Ulrich *et al.* 2009). *In vivo*, des signatures particulières du collagène ont été décrites et associées aux cancers mammaires. Ce sont les TACS (Tumor Associated Collagen Signature) (Provenzano *et al.* 2006, Provenzano *et al.* 2008) subdivisés en 3 groupes : TACS 1, TACS 2 et TACS 3. Nous avons retrouvé *in vitro* des organisations similaires dans les cultures en gels rigides. Les TACS 1 correspondent à du collagène s'accumulant principalement entre les zones tumorales *in vivo*, sans aucune organisation particulière. Une structure correspondant au TACS 1 est retrouvée dans les gels entre les sphéroïdes, constituant un réseau de fibres de collagène orientées aléatoirement. Les TACS 2 correspondent à des accumulations de collagène autour de la tumeur *in vivo*, retrouvé également dans les gels rigides autour des sphéroïdes. Enfin, les signatures qui semblent les plus importantes pour la migration cellulaire sont les TACS 3 (Provenzano *et al.* 2006). Dans les gels rigides, la prolifération des cellules en sphéroïdes est associée à l'apparition de faisceaux de collagène alignés entre deux sphéroïdes. La lignée cellulaire F1, hautement invasive, a permis de montrer des cellules co-localisées sur ces signatures TACS 3. Les cellules pourraient utiliser ces faisceaux comme support pour leur migration, et mimer ainsi des mécanismes observés *in vivo*. Une analyse des voies de signalisation impliquées dans la formation des TACS 3 nous a permis de déterminer que deux voies principalement sont importantes dans ces mécanismes, la voie MEK/ERK et la voie MLCK. En effet, les inhibitions de MEK ou MLCK permettent d'inhiber la mise en place de ces structures. La voie MLCK semble également contrôler la formation des faisceaux de collagène de type TACS 3. La voie ROCK ne semble pas impliquée dans ces phénomènes. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Totsukawa et collaborateurs (Totsukawa *et al.* 2004) qui ont analysé les conséquences de l'inhibition spécifique des voies MLCK et ROCK sur la migration de fibroblastes. Une inhibition quasi complète de la migration est obtenue lors de l'inhibition de MLCK, alors que les cellules où ROCK est inhibé conservent leur capacité migratoire, et migrent même plus vite que les cellules contrôles. Une explication pourrait se trouver dans la localisation cellulaire du MLC phosphorylé par ces deux protéines kinases. En effet, lors de l'inhibition de MLCK, les P-MLC sont localisés uniquement au centre de la cellule, en périnucléaire, alors qu'après inhibition de ROCK, les P-MLC sont retrouvés en périphérie cellulaire. Ces localisations de P-MLC seraient à l'origine des différences dans la migration. Les cellules inhibées pour MLCK forment des protrusions tout autour

de la cellule empêchant ainsi sa migration, alors que celles inhibées par ROCK forment des extensions cellulaires, avec une perte de vinculine, entraînant une diminution de la fixation de la cellule au support et favorisant ainsi la migration. L'inhibition de la migration par l'inhibition de la voie MEK/ERK est également en accord avec les résultats précédents de l'équipe (Bessard *et al.* 2007). En effet, l'U0126 bloque la migration cellulaire des Huh-7 en 2D analysée par « wound-healing » ou à travers une membrane poreuse. Cette migration dépend plus spécifiquement de ERK2. Ces résultats montrent que les voies MEK/ERK et MLCK pourraient donc être des cibles privilégiées pour agir sur la motilité des cellules hépatiques transformées. Le modèle 3D est également intéressant pour l'étude de la réponse des cellules tumorales à des traitements anti-cancéreux cytotoxiques, pour estimer leurs potentiels sur des cellules en sphéroïdes. A forte tensions, nous avons observé une protection partielle de l'induction de l'apoptose suite à un traitement au cisplatine. Ce résultat qui demande à être conforté et confirmé, serait en accord avec d'autres études démontrant une moindre induction d'apoptose dans des cellules cultivées sur des substrats rigides (Schrader *et al.* 2011). De plus, Bourbonnais et collaborateurs (Bourbonnais *et al.* 2012) ont décrit une hépato protection partielle dans les foies fibrotiques de souris médiée par la signalisation dépendante de ERK1.

La culture 3D en gel de collagène semble être un excellent modèle pour tester des inhibiteurs potentiels spécifiques de la prolifération et migration avant une étude *in vivo* chez l'animal et l'homme. La microscopie SHG permet l'étude de la restructuration du réseau de collagène, étape indispensable à la migration cellulaire lors de la croissance tumorale. Enfin, le bon maintien des fonctions différenciées et de biotransformation des xénobiotiques font des cultures 3D en gel de collagène un modèle de choix pour des applications en biotechnologie. Nous avons confirmé l'avantage des cultures 3D pour le métabolisme des xénobiotiques, avec une activité des CYP plus importante et maintenue sur une période plus longue dans les cultures 3D par rapport aux 2D, ainsi que les capacités d'induction de ces enzymes plus importantes.

Dans un contexte d'augmentation des forces, durant la progression de la fibrose, la susceptibilité des hépatocytes envers les composés chimiques génotoxiques pourrait être fortement altérée et intervenir comme un élément majeur de la progression tumorale (Sato *et al.* 2000, Katzenellenbogen *et al.* 2007, Merle and Trepo 2009). Une suite de mon travail de thèse vise à caractériser l'impact de la rigidité sur la génotoxicité de certains polluants environnementaux et alimentaires. En effet, il est de plus en plus admis que certains contaminants influencent fortement la fréquence des atteintes hépatiques chez l'homme et sont soupçonnés de jouer un rôle majeur dans l'incidence des cancers du foie. Jusqu'à 80% des cancers chez l'homme sont suspectés d'être dus, en partie, par des contaminants de l'environnement et de l'alimentation (Budhu *et al.* 2006). Il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus chez les rongeurs à l'homme en raison des différences très importantes d'expressions et d'affinités des enzymes de biotransformation entre les espèces (Flamant

*et al.* 2006, Matsuyama *et al.* 2007, Yoshida and Teramoto 2007, Aravalli *et al.* 2008). Pour cette raison, nous déterminerons l'activation métabolique des contaminants d'intérêts dans des hépatocytes humains primaires en culture 3D dans les gels de collagène. Nos résultats ont montré que ce modèle de culture 3D favorise la survie, prolifération et différenciation des hépatocytes normaux de rat. Dans ces conditions de rigidités variables, nous identifierons les adduits à l'ADN et le potentiel génotoxique des contaminants de l'environnement et de l'alimentation dans les hépatocytes humains afin de définir s'il existe des fenêtrés de susceptibilité augmentée lors du développement de la fibrose.

## Partie II : Etude du collagène par microscopie multiphotonique

Les pathologies hépatiques sont un grand problème de santé publique. La majorité des cancers hépatiques se développe sur un foie fibrotique ou cirrhotique, mécanisme de cicatrisation exagéré lors d'agressions chroniques du foie. Ces pathologies, à l'évolution très lente, sont souvent asymptomatiques pendant plusieurs années. Un des challenges dans la prévention de ces atteintes est de pouvoir les diagnostiquer le plus tôt possible, permettant ainsi de prendre en charge le patient avant que l'accumulation de MEC ne se soit trop excessive. La technique de référence pour le diagnostic est l'analyse d'une biopsie hépatique après coloration de la matrice extra-cellulaire (score Métavir, Ishak, Scheuer...). La biopsie doit présenter une longueur d'environ 25mm et contenir au moins 11 espaces portes (quantité minimale pour avoir une bonne estimation du stade fibrotique du foie) (Bedossa *et al.* 2003). Notre équipe, ainsi que d'autres, ont démontré l'avantage d'utiliser la microscopie SHG, qui permet de détecter le collagène sans aucun marquage, et d'une quantification automatisée et standardisée du collagène sur biopsie hépatique. Cette méthodologie permet une discrimination entre les différents stades fibrotiques (Sun *et al.* 2008, Gailhouste *et al.* 2010). Le but de mon travail a été de quantifier l'accumulation de collagène dans un modèle murin de fibrose hépatique induite par CCl<sub>4</sub> par microscopie SHG. En effet, dans ce modèle, la quantité de collagène déposée est beaucoup plus faible que chez l'homme pendant le développement de la fibrose. Notre étude a permis de démontrer que cette technique est assez sensible pour détecter de faibles modifications de quantité de collagène. Nous nous sommes ensuite intéressés à rechercher par analyse d'images si certains paramètres de texture pouvaient apporter des informations supplémentaires sur la caractérisation et le développement fibrotique, et ainsi permettre une meilleure discrimination entre les stades fibrotiques, en plus de la quantification du collagène. Le but dans les fibroses/cirrhoses humaines sera, en plus d'une discrimination entre les 5 stades fibrotiques de la classification Métavir, de caractériser des marqueurs/signatures d'évolution qualitative de la fibrose.

La quantification de l'aire correspondant au collagène des images SHG nous a permis de détecter une augmentation de celui-ci dès la 2ème semaine de traitement au CCl<sub>4</sub>. Le collagène s'accumule jusqu'à la sixième semaine de traitement, temps pour lequel la différence entre les souris contrôles et les souris traitées est la plus importante. Ensuite, la quantité de collagène diminue légèrement pour les souris traitées, tout en restant plus importante que les contrôles (d'un facteur 2). Cette approche permet également de détecter la réversion de la fibrose, 2 semaines après l'arrêt du traitement au CCl<sub>4</sub>. La microscopie SHG couplée à une quantification automatisée de l'aire du collagène est donc assez sensible pour détecter le développement fibrotique dans le modèle murin dès les stades précoces (après 2 semaines de traitement) et lors de la réversion suite à l'arrêt du traitement CCl<sub>4</sub>. Ces résultats obtenus sans aucune coloration au préalable, ni par analyse subjective éliminent donc plusieurs possibles biais de l'analyse classique.

Nous avons ensuite caractérisé plus précisément le collagène accumulé lors de la fibrose à l'aide du logiciel HistoHepa, un logiciel d'analyse d'images développé par Histoindex. Il permet de différencier le collagène distribué du collagène agrégé. Le collagène distribué correspond aux petites fibres de collagènes dans les régions sinusoides, tandis que le collagène agrégé est caractéristique des gros faisceaux de collagènes, se retrouvant principalement dans les espaces portes et autour des vaisseaux (Sun *et al.* 2008). Nous avons ainsi démontré que le collagène distribué est peu modifié lors de la fibrose, avec uniquement une légère diminution, dont la significativité sera à confirmer, pour les souris traitées CCl<sub>4</sub> dans les stades les plus tardifs. Le collagène agrégé est lui nettement plus abondant dans les souris traitées par rapport aux contrôles, en accord avec une étude de Sun et collaborateurs (Sun *et al.* 2008) ayant également décrit une légère baisse du collagène distribué et une forte augmentation du collagène agrégé dans le modèle CCl<sub>4</sub>. De plus, nos résultats démontrent que le nombre de fibres de collagène ne semble pas augmenter pour les souris traitées CCl<sub>4</sub>, mais que c'est principalement une augmentation de la longueur des fibres qui serait responsable de la fibrose quantifiée par microscopie SHG. Ces observations demanderont à être confirmées et validées sur d'autres foies fibrotiques de souris après traitement par le CCl<sub>4</sub>.

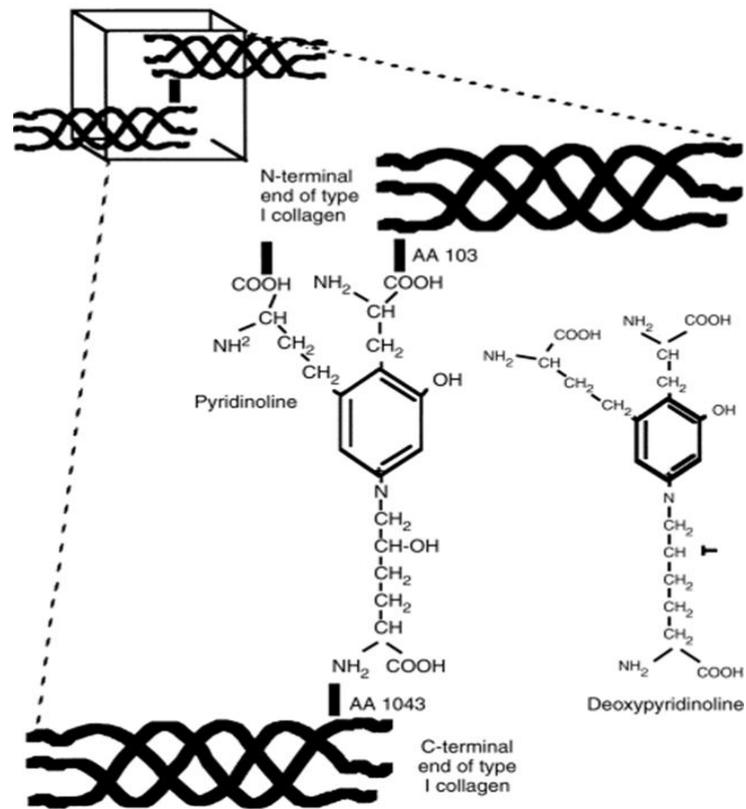
De nouveaux paramètres permettant de renforcer la discrimination entre les différents stades fibrotiques ont été ensuite recherchés. Nous nous sommes basés sur les travaux de Mostaco-Guidolin et collaborateurs (Mostaco-Guidolin *et al.* 2013) montrant la possibilité, par l'analyse de textures de collagène, de quantifier des changements morphologiques et/ou d'organisation du collagène dans des conditions pathologiques, dont les infarctus du cœur et les plaques d'athérosclérose chez le rat. Pour cela, deux méthodes d'analyses statistiques ont été utilisées à partir des images SHG: les First Order Statistics (FOS), qui correspondent à une analyse globale de l'image, et les Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM), qui analysent les relations entre les valeurs de niveaux de gris des pixels de l'image. Nous avons ainsi démontré que l'utilisation des paramètres de 1<sup>er</sup> ordre FOS permet de confirmer les résultats obtenus par la quantification de l'aire correspondante au collagène, renforçant ainsi la discrimination entre différents stades de fibrose, que ce soit chez la souris ou chez l'homme. Les GLCM, quant à eux, fournissent peu d'informations significatives, avec une forte hétérogénéité des résultats entre les différents temps de la cinétique et de la fibrose. Toutefois, chez la souris, l'utilisation de ces paramètres GLCM, pour une quantité identique de collagène, entre une fibrose à 2 semaines par rapport à un stade plus tardif à 8 et 10 semaines, a mis en évidence 3 paramètres qui pourraient être discriminants. Cependant, ces paramètres ne sont pas retrouvés lors de la réversion de la fibrose par CCl<sub>4</sub>. Des analyses complémentaires chez la souris et l'homme seront nécessaires pour valider ces paramètres comme des marqueurs possibles de l'évolution de la fibrose.

En plus des avantages cités précédemment, la technique de microscopie SHG, couplée à des fibres optiques, est en développement. Cela pourrait permettre d'obtenir des images SHG du foie des

patients sans avoir à effectuer une biopsie hépatique, opération lourde et pouvant entraîner des souffrances et des complications suite à l'acte chirurgical. Il serait ainsi possible de détecter des fibres peu développées, ainsi que de suivre plus aisément l'évolution de la pathologie dans plusieurs lobes du foie. En effet, une étude de Regev et collaborateurs (Regev *et al.* 2002) a démontré qu'entre 2 lobes le diagnostic du stade fibrotique peut être différent d'au moins un grade. L'utilisation de la fibre optique sera un complément fort utile par rapport aux techniques non invasives actuellement utilisées pour estimer la fibrose, telles que les marqueurs sanguins, l'IRM ou les ultrasons.

Un paramètre important pour apprécier qualitativement le collagène lors de la fibrose hépatique est la présence de cross-links. Dans le foie, les deux principaux cross-links sont la Pyridinoline et la Déoxypyridinoline (Fig.20). Ces cross-links semblent, en grande partie, responsables de la faible réversibilité de la fibrose chez certains patients, rendant le collagène moins sensible aux MMPs (Issa *et al.* 2004). Il est donc important de pouvoir avoir des informations sur le degré de cross-links du collagène d'un patient pour apprécier la possible réversibilité de sa fibrose. La technique standard pour déterminer la quantité de cross-links est le dosage par HPLC après hydrolyse acide (Deyl and Miksik 1997, Chen *et al.* 2000). Cette méthode est assez lourde à mettre en œuvre, nécessitant des étapes d'hydrolyse, de purification des échantillons sur une première colonne, de concentration des échantillons puis une analyse par HPLC. L'analyse du signal SHG du collagène pourrait permettre de détecter la présence de ces cross-links sous forme de signature SHG pour une détection plus facile et rapide. Dans ce but, nous avons initié, dans une première étape au laboratoire, la quantification des cross-links par HPLC (Fig.21). La quantification à partir de coupes de foies fibrotiques humains est possible. Nous nous sommes heurté à un problème de sensibilité avec les foies murins qui possèdent moins de collagène et donc certainement moins de cross-links. Pour la suite de notre étude, nous souhaitons doser les cross-links dans un large panel de foie fibrotique humain, qui pourrait permettre de constituer 2 groupes de foies fibrotiques : fortement ou faiblement cross-linkés. A partir de ces quantifications en HPLC, en collaboration avec F.Tiaho (MC dans l'équipe) et les physiciens de l'Institut de Physique de Rennes (D.Rouède et E.Schaub) nous nous proposons :

i) d'étudier la polarisation du collagène. En effet, la susceptibilité non-linéaire de second ordre  $\chi^{(2)}$  dépend à la fois de la composition moléculaire dans le volume focal, mais également de l'organisation spatiale des macromolécules. En conséquence, la polarisation du signal SHG est directement liée à l'orientation locale des molécules non linéaires dans le volume focal. Nous espérons ainsi que la présence de cross-links puisse avoir une incidence mesurable sur l'orientation des molécules de collagène. La puissance de cet outil réside dans la possibilité d'analyser l'image pixel par pixel, permettant de détecter les modifications de polarité dans ce volume.

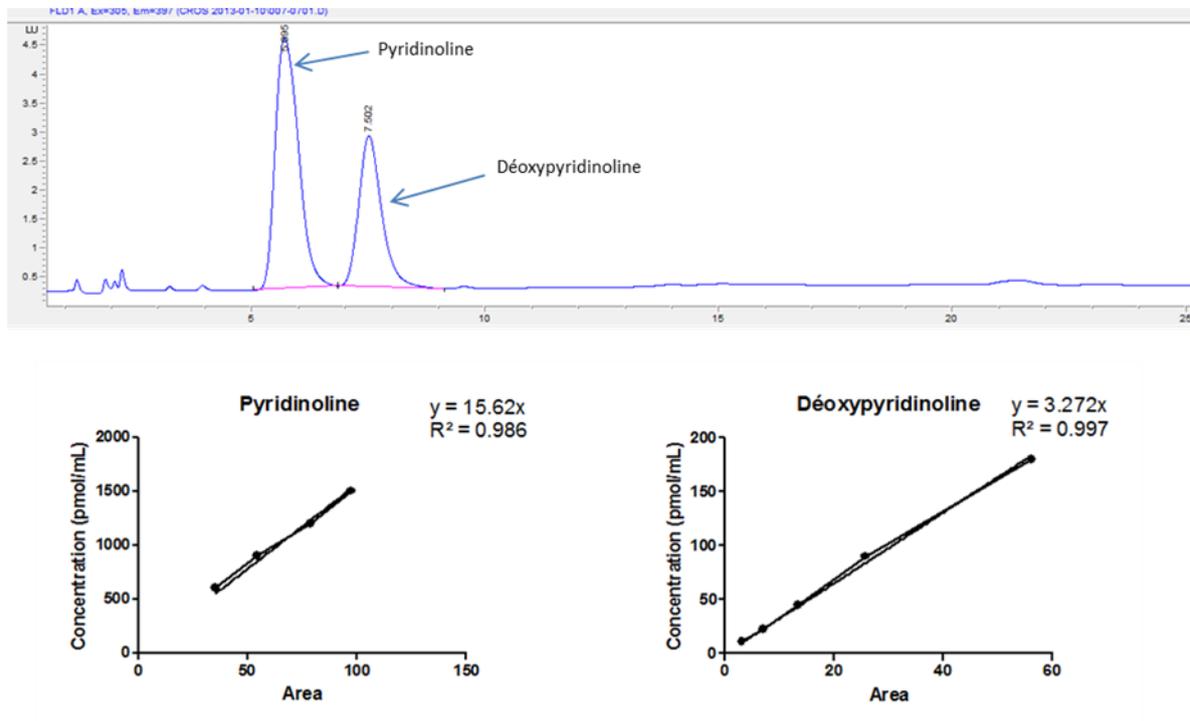
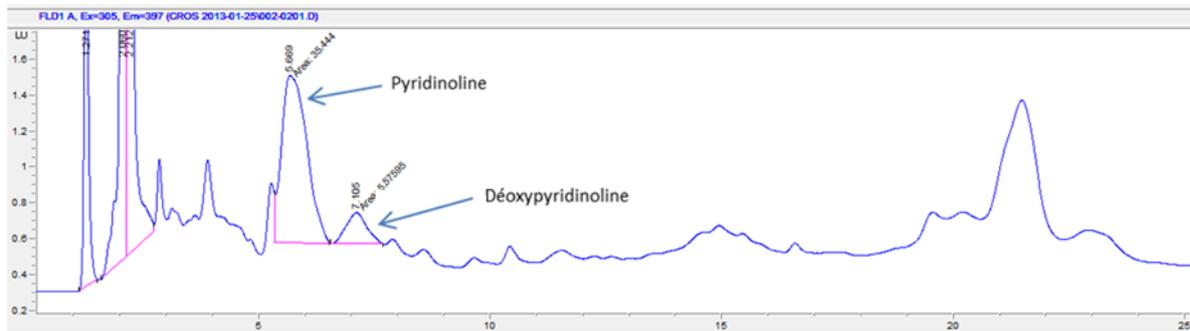


**Figure 20 : Structure chimique des cross-links de Pyridinoline et Déoxypyridinoline.**  
 Représentation de la structure chimique de la Pyridinoline obtenue lors d'une réaction entre deux hydroxylysine-aldéhydes de deux télopeptides et une hydroxylysine d'une triple hélice, et de la Déoxypyridinoline obtenu lors d'une réaction entre deux hydroxylysine-aldéhydes de deux télopeptides et une lysine d'une triple hélice.

ii) de visualiser et quantifier les cross-links à l'aide de leurs propriétés de fluorescence. En effet, de par leur noyau aromatique, les cross-links Pyridinolines et Déoxyypyridinolines émettent une fluorescence à 397nm après excitation à 305nm. Cette fluorescence, proche de l'infra-rouge, est difficile à collecter, car ne se trouvant pas dans la fenêtre spectrale de la majorité des photomultiplicateurs commerciaux. Pour améliorer la collection de ces photons, l'utilisation de photocathodes ultra bialkali est donc nécessaire. Ces photocathodes ont une haute sensibilité aux alentours de 400nm (Nakamura *et al.* 2010). De plus, un microscope 4 Pi est développé au sein de l'Institut de Physique de Rennes. Ce microscope consiste en un montage associant deux microscopes, qui permet une double illumination par les deux côtés, ainsi que la collecte des signaux sur les deux faces. Ce dispositif devrait améliorer nettement la résolution axiale, pour obtenir une résolution de l'ordre de 150 nm (Hell and Stelzer 1992). Cette stratégie devrait permettre de détecter la fluorescence des cross-links, et cela malgré leur faible quantité, et obtenir simultanément une image SHG pour confirmer la co-localisation de la fluorescence avec la fibre de collagène.

iii) de réaliser une analyse par la technique de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). En effet, une étude de Lutz et collaborateurs ont récemment montré, sur un modèle *in vitro*, que la présence de cross-links augmenterait la durée de fluorescence du collagène (Lutz *et al.* 2012). Pour cette étude, des cultures de fibroblastes dans des gels de collagènes dans 3 conditions ont été réalisées: en conditions classiques sans aucun traitement (control), après traitement par le BAPN (inhibiteur des lysyl oxydases, donc de la formation de cross-links), et après traitement par le TGF $\beta$  qui induit la formation de cross-links. Dans ces conditions, la durée de vie de fluorescence est plus importante pour les gels de collagène où les cellules ont été traitées par du TGF $\beta$  par rapport aux cellules inhibées par le BAPN. Nous recherchons si cette variation de durée de vie de fluorescence peut être détectée *in vivo* dans des tissus fibrotiques humains après dosage des cross-links par HPLC. Le microscope 4Pi permettra également d'effectuer des mesures de FLIM dans le but de maximiser la collecte de la fluorescence du collagène.

Ce travail a pour but de quantifier plus facilement et rapidement les cross-links présents dans le collagène d'un patient, permettant ainsi d'adapter le traitement anti-fibrotique. Le couplage de ces quantifications avec les scores Métavir mesurés actuellement, mais aussi la possibilité dans un avenir plus ou moins proche d'obtenir des images SHG par microscopie endoscopique, laissent entrevoir un diagnostic plus rapide de la fibrose hépatique, ainsi que d'obtenir des informations sur le profil en cross-links du collagène.

**A****B**

**Figure 21 : Quantification de Pyridinoline et Déoxyypyridinoline par HPLC.** A) Détection et quantification des cross-links de Pyridinoline et Déoxyypyridinoline par HPLC (excitation à 305nm et émission à 397nm) à partir de molécules pures. Obtention de gammes étalons par HPLC, en utilisant des concentrations croissantes des standards pures, et en déterminant l'aire sous la courbe. B) Quantification des cross-links d'un foie fibrotique humain après hydrolyse acide pendant 24h, puis purification par colonne Sephadex C-25 et analyse HPLC.





# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**



## **A) Culture cellulaire en 3D**

### **1) Isolation des hépatocytes et culture ex vivo**

Les hépatocytes sont isolés à partir de foies de rat Sprague-Dawley âgés de 2 mois. Les rats sont anesthésiés par une solution de penthotal (0.1mL/100g). De l'héparine (0.2mL/200g) est également administré, étant un anticoagulant cela permettra une meilleure élimination des cellules sanguines lors des lavages. Le rat est ensuite incisé au niveau de l'abdomen pour atteindre le foie, la veine porte est ensuite canulée puis perfusé par une solution d'HEPES pH 7.65 (NaCl 0.16M ; KCl 3.15mM ; NaHPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O 0.7mM ; acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique 33mM) maintenu à 37°C. La perfusion est réalisée à raison de 30ml/min pendant 20 minutes. Le foie est ensuite perfusé par une solution de collagénase (solution contenant de la Libérase® préparé à 0.025% dans le tampon HEPES additionné de 5mM de CaCl<sub>2</sub>) à un débit de 15ml/min pendant 7 minutes. Après une désagrégation du tissu hépatique, le foie est délicatement prélevé et placé dans une boîte de pétri contenant 30mL d'un mélange de milieu MEM (Minimal Essential Medium) et de milieu 199 (rapport respectif 3/4-1/4). La capsule de Glisson est ensuite dissociée mécaniquement, les hépatocytes étant ainsi libérés. Après filtration sur une membrane de nylon, la suspension cellulaire est laissée à décanter pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires et les cellules non parenchymateuses. Les hépatocytes sont ensuite purifiés par trois centrifugations successives d'1 minute à 700rpm dans du milieu MEM-199 (3/4-1/4). Les cellules sont ensuite comptées par surcellules de Nageotte, en estimant la viabilité cellulaire.

Les hépatocytes murins sont cultivés dans un mélange de milieu MEM-199(3/4-1/4) supplémenté de 5% de SVF, 5µg/ml d'insuline, 1mg/ml d'albumine bovine, 2mM de glutamine, 100 IU/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2) Lignées cellulaires**

Les cellules sont cultivées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire une atmosphère en chambre humide à 37°C contenant 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>. Les milieux de culture sont renouvelés tous les 2 jours et les cellules repiquées à confluence, 2 fois par semaine par utilisation de trypsine.

La lignée Huh-7.D12, isolée à partir d'un carcinome hépatocellulaire humain, provient de la collection européenne de lignées cellulaires (ECACC). Elles sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 4.5g/l de glucose et supplémenté par 10% de SVF ; 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

La lignée cellulaire F1, générée à partir d'un foie de rat Fischer âgé de 10 jours ayant subi une transformation néoplasique spontanée de cellule hépatique *in vitro*. Elles sont cultivés dans du milieu Williams'E supplémenté par 7.5% de SVF, 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

### **3) Traitement des cellules**

Les inhibiteurs chimiques U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene), ML7 et Y-27632 sont dissous dans du DMSO et additionné au milieu de culture aux concentrations et temps indiqués. Les cultures controles sont donc supplémentés par du DMSO seule et ajouté aux mêmes moment que les traitements.

La puromycine, un antibiotique utilisé pour les sélections eucaryotes, est ajouté au milieu de culture à raison de 4.5g/ml pendant 24h pour les sélections transitoires, ou 2µg/ml en continue pour les transfections stables.

Le cisplatine, agent génotoxique utilisé en chimiothérapie, est ajouté au milieu de culture aux concentration et temps indiqués. Le milieu supplémenté en cisplatine est renouvelé toutes les 24h.

## **B) Culture cellulaire en 3D**

### **1) Synthèse de gels de collagène**

Pour les cultures cellulaires en 3D, les cellules doivent être incluses dans les gels de collagène. Pour cela, une solution de collagène de peu bovine (Sigma) est utilisée. Pour cela, le collagène est dilué par du milieu de culture pour atteindre la concentration souhaitée. Puis, pour que le collagène puisse polymériser, le pH est ajusté à 7.4 à l'aide de NaOH. Très rapidement les cellules à la concentration souhaitée sont ajouté, puis le mix est distribué dans les boites de culture et très rapidement mis à 37°C. En effet, les 2 conditions nécessaires à la polymérisation de ces gels et le pH qui doit être de 7.4 et la température de 37°C. Ainsi les gels polymérisent rapidement (environ 5 minutes), ce qui permet d'avoir les cellules « emprisonnées » à l'intérieur. Puis du milieu de culture est ajouté dessus et renouvelé toutes les 48h.

### **2) Détermination de la rigidité des gels par rhéométrie**

La rhéométrie est utilisé pour déterminer la rigidité des gels de collagène à l'aide d'un appareil Kinexus. Pour cela, des gels de 1.2ml sont polymérisés dans des plaques de culture 12 puits (gels de 3mm d'épaisseur). Les gels sont ensuite détachés de la paroi pour que les analyses soient reproductibles. Un plateau rotatif rond de 2cm de diamètre descend ensuite jusqu'à 0.5cm de hauteur, et comprime donc le gel de collagène entre le plateau fixe en dessous et ce plateau rotatif. Ce plateau rotatif appliquera ensuite une contrainte d'oscillation sur le gel, avec 2 variables contrôlables : la fréquence d'oscillation et l'intensité de la contrainte. Dans notre cas, on utilise une fréquence

d'oscillation fixe à 0.1Hz, et une contrainte allant de 0.02Pa à 2Pa. Cela nous permet d'obtenir 2 paramètres du gel de collagène : son module élastique ( $G'$ ) correspondant à sa capacité à emmagasiner de l'énergie, et son module visqueux ( $G''$ ) correspondant à sa capacité à dissiper l'énergie. Plus ces modules ont des valeurs importantes et plus les gels sont rigides.

### **3) Inclusion des gels en paraffine**

Pour pouvoir réaliser des immunomarquages des cellules dans les gels, une inclusion en bloc de paraffine après fixation est utilisée. Pour cela, les gels sont fixés par du formol 4% pendant 20 minutes, puis déshydratés par des bains successifs d'alcool de concentration croissante puis de xylène avant d'être imprégnés de paraffine. Les gels sont ensuite inclus dans des blocs de paraffines, ce qui nous permet d'en réaliser des coupes de 4 $\mu$ m d'épaisseur à l'aide du microtome, et ainsi de pouvoir effectuer des immunomarquages.

### **4) Marquages cellulaire**

Deux types de marquages sont effectués pour les cellules en 3D. Lorsque le but est uniquement de visualiser les cellules, ainsi que leur morphologie, les cellules sont directement marquées dans les gels après fixation. Mais lorsque le but est de faire un immun marquage pour détecter la présence d'une protéine particulière, cela se fait sur les coupes après inclusion en bloc de paraffine.

Pour les cellules marquées dans les gels, 2 marquages sont utilisées après la fixation au formol 4% pendant 20 minutes. Soit l'utilisation du DiA, un intercalant des membranes qui s'intercalera entre les lipides membranaires, marquant ainsi les cellules. L'autre possibilité est un marquage par la phalloïdine du cytosquelette d'actine. Pour cela les cellules sont perméabilisées par utilisation de PBS/triton 0.1% pendant 20 minutes, puis blocage par du PBS/BSA 2% pendant 1H à température ambiante. Enfin marquage de l'actine par incubation avec la Phalloïdine couplée au Fluoroprobe 457 nm à 66 nmol/ml pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite observées par microscopie confocal.

Pour les coupes sur lame, les marquages sont effectués par l'automate Ventana Discovery XT avec le kit de détection Ventana DABMap (Ventana Medical Systems). Pour cela les coupes sont déparaffinées par une solution EZ Prep, puis les antigènes sont démasqués par la solution Cell Conditioning 1. Ensuite les peroxydases endogènes sont dégradées par l'inhibiteur D. Enfin les lames sont incubées avec l'anticorps primaire, puis le secondaire. Une contre coloration à l'hématoxyline est effectuée pour marquer les noyaux.

## **C) Transfection**

### **Transfection transitoire de vecteurs d'expression**

Les plasmides pCMV encodant pour les constructions MEK1 et MEK2 constitutivement actives (MEK1/2-DD) nous ont gracieusement été fournis par le Dr Sylvain Meloche (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, Canada). Ce sont les plasmides S218D/S222D (MEK1-DD) et S222D/S226D (MEK2-DD).

Les Huh-7 sont transfectées à l'aide de l'agent de transfection lipofectamine RNAi max. Pour cela, les Huh-7 sontensemencées dans une boîte de pétri de 35mm de diamètre, à raison de 0.8 millions de cellules par boîte. Pour conserver la possibilité de sélection, les cellules sont transfectées par un mélange de shRNA et d'ADN plasmidique (respectivement 2.7µg et 1µg). Mais pour que ce ne soit que l'expression de la construction qui soit produite dans la cellule, le shRNA utilisé est un contrôle ne ciblant aucune séquence cellulaire connue. Pour réaliser la transfection, pour chaque boîte de pétri, 100µl de milieu OptiMEM est mélangé à 5µl de Lipofectamine RNAi max. Après une attente de 10 minutes, les plasmides et shRNA sont ajoutés à ce mélange. Après une incubation de 20 minutes, ce mix est ajouté à 1ml de milieu sans antibiotiques et déposé sur les cellules. La transfections est maintenue pendant la nuit, puis la sélection est réalisée. Pour cela, après un lavage des cellules, celles-ci sont sélectionnés pendant 24h par 4,5µg/ml de puromycine et 5µM de Cyclosporine A.

## **D) Etude de la prolifération**

### **1) Test MTT**

La viabilité cellulaire à un moment donné est estimée par test MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Cette technique repose sur la conversion des sels de tetrazolium en cristaux de formazan par les succinates déhydrogénases mitochondriales, reflétant l'activité enzymatique des cellules viables.

Pour cela, les cellules sont incubées en présence de MTT à 0.5mg/ml pendant 2H. Pour les conditions en 3D, les gels de collagènes sont digérés par de la libérase (8µg/ml) à 37°C pendant 20 minutes. La suspension est alors récupérée en eppendorf, puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes afin de culoter les cristaux de formazan. Ensuite, que ce soit en 2D ou 3D, le milieu de culture est retiré, et les cristaux de formazan resuspendu dans du DMSO, permettant une lecture de l'absorbance (DO) à 540nm.

Ce test nous a donc permis d'estimer la quantité de cellules vivantes à un temps donné, mais également de suivre la prolifération des cellules en effectuant ce MTT à différents temps, et en se référant au MTT à J0 (nombre de cellules initiales).

## **2) Test WST-1**

Le test WST-1 est un autre test de viabilité cellulaire. Le principe est similaire à celui du MTT, avec l'utilisation du WST-1 (4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3 benzène disulfonate) comme substrat des oxydo-réductases de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules vivantes. L'avantage de cette technique est que le substrat est directement relargué dans le milieu extra-cellulaire, ce qui permet par une lecture de l'absorbance à 430nm d'avoir directement le résultat.

Pour effectuer ce test, les cellules sont cultivées exactement de la même manière que pour le MTT, puis les cellules sont incubées avec la solution de WST-1 diluée au 1/10ème pendant 2h, puis l'absorbance est lue à 430nm, reflétant le nombre de cellules viables.

## **3) Mesure de la synthèse d'ADN**

La synthèse d'ADN est déterminée par l'incorporation de [méthyl-3H]-thymidine (activité spécifique : 5 Ci/mmol). Pour cela, les cellules sontensemencées en plaque 24 puits à raison de 50 000 cellules par puits (et dans 400µL de gels pour les cultures 3D). Aux différents temps indiqués, 0.3µCi de thymidine est ajouté par puits. Après 24h d'incubation, les gels de collagènes sont récupérés dans du PBS, et les cellules 2D sont récupérés en les grattant avec un volume final de 1ml. Les cellules sont ensuite soniquées pendant 30 minutes. Puis la fraction acido-insoluble est précipitée par 1ml de TCA 30% (TrichloroAcetic Acid) pendant une nuit à 4°C, suivie d'une centrifugation à 3500rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 200µl d'acide formique puis compté dans un compteur à scintillation après l'ajout de 2ml de solution de scintillation. La radioactivité incorporée est ensuite rapportée au MTT effectué en parallèle sur une autre plaque.

# **E) Etude de la mort cellulaire**

## **1) Mesure de l'activité des caspases effectrices**

Pour mesurer l'induction de l'apoptose par le cisplatine, l'activité des caspases 3 et 7 (caspases effectrices et terminales de la voie apoptotique) est mesurée grâce au kit « SensoLyte Homogeneous AMC Caspase 3/7 Assay » (Anaspec). Ce test consiste en l'utilisation d'un substrat spécifique des caspases 3 et 7, le DEVD. Ce DEVD est couplé à un fluorochrome : l'AMC. Ce fluorochrome sera donc relargué qu'en présence de caspases actives, et sera détecté par sa fluorescence à 440nm après excitation à 380nm.

Pour les expériences, pour les cultures 3D en plaque de 96 puits, les gels sont au préalable digérés par la libérase à 37°C pendant 20 minutes, puis la plaque est centrifugée pendant 10 minutes à 2500rpm pour culoter les cellules. Ensuite, les cellules en 2D et 3D sont traitées de la même manière, c'est-à-dire que les cellules sont lysées directement dans la plaque, puis incubées avec le substrat DEVD-AMC pendant 1h à 37°C. Le clivage du substrat est suivi par spectrofluorimétrie permettant

d'obtenir l'activité des caspases au cours du temps en Vmax. En parallèle est effectué un test MTT pour rapporter l'activité des caspases par cellules vivantes.

## **2) Etude de la nécrose par marquage Hoechst/Iodure de Propidium**

Pour étudier la nécrose des cellules dans les gels de collagènes, un test par double marquage Hoechst/Iodure de Propidium est réalisé. Ce sont tous les deux des marqueurs de l'ADN cellulaire, mais le Hoechst est peut traverser les membranes, et pourra ainsi marquer tous les noyaux (avec une fluorescence dans le bleu), alors que l'Iodure de Propidium ne peut pas traverser les membranes, ne pouvant alors marquer que les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (caractéristique des cellules nécrotiques).

Pour les expériences, aux temps indiqués les cellules sont marquées par l'Hoechst à 5µg/ml et l'IP à 5µg/ml pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Puis les cellules sont passés au microscope à fluorescence et un comptage cellulaire est effectué en rapportant le nombre de cellules nécrotiques (double marquées Hoechst/IP) par le nombre de cellules totales (simple marquage Hoechst). En contrôle positif est utilisé des cellules préalablement traitées avec du triton 0.1% pendant 20 minutes (permettant de faire des pores dans les membranes) et ainsi obtenir 100% de cellules doublements marquées.

## **F) Mesure de l'activité des cytochromes P450**

L'activité des cytochromes P450 est mesurée par la technique EROD et MROD. En effet, l'éthoxyrésorufine (EROD) et la méthoxyrésorufine (MROD) sont transformés en résorufine (un produit fluorescent) par les cytochromes P450 avec des spécificités de réactions. L'EROD est transformé par les CYP1A1, 1A2 et 1B1 alors que MROD par les CYP1A2. Pour notre étude, l'expression de ces CYP doit être induite par un traitement au 3-MéthylCholanthrène (3-MC). Après l'induction des CYP, les cellules sont traitées par le salicylamide pour inhiber les enzymes de phases II, puis l'EROD ou MROD est ajouté sur les cellules. La transformation de ces composés est suivie au cours du temps par spectrofluorimétrie (Spectra Max Gemini) avec une excitation à 544nm et une émission à 584nm pendant 20 minutes. L'activité enzymatique est ensuite normalisée par les valeurs d'absorbance d'un test de viabilité WST-1.

## **G) Western Blot**

Les culots secs de cellules sont lysées et soniqués dans un tampon composé de 15mM de p-nitrophenylphosphate, 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 25mM de MOPS p 7.2, 15mM de EGTA, 60mM de β-glycerophosphate, 2mM de DTT, 1mM d'orthovanadate, 1mM de NaF, 1mM de phenylphosphate, 100mM de benzamidine, 100µM de PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases.

Les lysats cellulaires sont dosés par la technique de Bradford. Puis les échantillons sont réduits et dénaturés par un tampon Laemmli (0.125mM Tris-HCl pH 6,8 ; 4% de SDS ; 10% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 20% de glycérol et 0.1% de bleu de bromophénol), puis chauffés pendant 10 minutes à 95°C. Ensuite 10-20 $\mu$ g de protéines sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS de 10 à 15% selon la taille des protéines à séparer. L'électrophorèse se fait dans un tampon de migration composé de : Tris 50mM ; glycine 400mM pH 8,3 et SDS 0.1%). Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose dans un tampon de transfert (25mM Tris-HCl, glycine 192mM, éthanol 10%) pendant 1h à 100 Volts. La vérification de l'efficacité de transfert se fait par coloration au rouge Ponceau (0.01% ; acide acétique 5%). La membrane de nitrocellulose est ensuite saturée par une solution de TBS (Tris 50mM pH8 ; NaCl 150mM) contenant 5% de lait, pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) est incubé pendant 1h à température ambiante. La membrane est finalement révélée par chimioluminescence à l'aide du système d'imagerie Fujifilm LAS-3000.

## H) PCR quantitative en temps réel

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel), puis la qualité et la concentration en ARN est déterminé à 260nm sur le NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies). 1 $\mu$ g d'ARN est utilisé comme matrice pour la synthèse d'ADN complémentaire par rétro-transcription à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) à 37°C pendant 1h30, terminé par une étape d'élongation à 85°C pendant 5 minutes.

La réaction de Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative en temps réel est effectuée avec le thermocycleur ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Brièvement, 6 $\mu$ l d'ADNc dilué au 1/10<sup>ème</sup> sont mélangé avec 2 $\mu$ L d'amorces (sens et antisens) à 3 $\mu$ M, ainsi que 10 $\mu$ l de milieu réactionnel 1X (contenant la Taq polymérase, le SYBR Green, des dNTPs et du MgCl<sub>2</sub>). Ce mix est ensuite soumis aux cycles de PCR, c'est-à-dire une étape de dénaturation et de linéarisation de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles (95°C pendant 20 secondes puis 60°C pendant 1 minute). Les résultats sont analysés avec le logiciel ABI Prism 7700. La quantification des ARNm a été normalisée par rapport à l'ARN 18S, puis exprimé en quantité relative par rapport à la condition 2D.

## I) Modèle de fibrose murin par CCl<sub>4</sub>

Le modèle d'induction de fibrose murin est l'administration de CCl<sub>4</sub>. Pour cela, 139 souris C57BL/6 de 7 semaines ont été utilisées pour cette étude. Une première administration de CCl<sub>4</sub> à 2.4g/kg par gavage a été effectuée. Les autres administrations ont été faites au 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour, puis une fois par semaine à la concentration de 1.6g/kg de CCl<sub>4</sub>. Les souris sont sacrifiées à partir de la semaine 2, jusqu'à la 10. Pour étudier la réversion, des souris ont subi un arrêt du traitement par le CCl<sub>4</sub> après 4 semaines de traitements, et sont sacrifiées aux semaines 6 et 8 (donc après 2 et 4 semaines de réversions). Après sacrifice, les foies sont récupérés et directement congelés dans l'azote liquide en présence d'isopentane comme cryoprotectant. Ensuite, pour chaque prélèvement, des coupes sériées de 20µm d'épaisseur sont effectuées par cryostat pour être observées par microscopie SHG.

## J) Microscopie Multiphotonique

Le dispositif expérimental d'imagerie multiphoton est basé sur la modification d'un microscope confocal inversé LEICA SP2 DMIRE2 (Leica Microsystems) développé sur la plateforme PIXEL à Rennes. La source d'excitation est un laser femtoseconde Titane-Saphir MAITAI HP (Spectra Physics). Pour que les échantillons soient excités de manière isotrope, c'est-à-dire pour que l'excitation soit indépendante de l'orientation des fluorophores non linéaires à l'origine des signaux générés, une lame quart-d'onde est utilisée. Ainsi aucune sélection de polarisation n'est sélectionnée, permettant d'obtenir un signal indépendant de l'orientation des fluorophores. Les objectifs utilisés sont : 10X à sec (NA=0.4 ; Leica Microsystems) et 60X immersion à eau (NA=1.1 ; Olympus) pour appliquer une excitation à 820 nm. Les signaux de génération de seconde harmonique (SHG) et de fluorescence à deux photons (TPEF) sont collectés simultanément par deux voies indépendantes du microscope, avec la SHG en transmission et la TPEF en épifluorescence. Le signal SHG est récupéré en transmission, puisque le signal SHG se produit préférentiellement dans la direction du faisceau laser. Le condenseur permettant la collecte des signaux SHG possède une ouverture numérique adaptée à l'objectif utilisé. La SHG est détectée par un photomultiplicateur après un filtre IRSP715 bloquant l'infra-rouge et d'un filtre interférentiel à bande étroite d'une largeur de 10 nm centré sur la longueur d'onde 410nm, permettant de ne conserver que les signaux SHG en éliminant la fluorescence parasite. Le signal TPEF est par nature incohérent, et donc généré de façon isotrope dans toutes les directions, ce qui permet de le détecter par épifluorescence (c'est-à-dire par l'objectif exciteur). Les images sont acquises par le logiciel LEICA Confocal Software. Les images sont enregistrées en 8bit au format TIFF. Elles sont ensuite analysées et traitées avec le logiciel imageJ (National Institutes of health;<http://rsb.info.nih.gov/gate2.inist.fr/ij/>).

## **K) Analyse des cross-links**

### **1) Purification des cross-links**

Les cross-links nous intéressant, dont nous souhaitons déterminer la concentration dans des biopsies hépatiques murines ou humaines sont la Pyridinoline (Pyr) et Déoxypyridinoline (Dpyr). Les cross-links des tissus hépatiques sont isolées à partir de 5 coupes d'une dizaine de micromètres récupérés en eppendorf (environ 20mg de tissus). Ces tissus sont ensuite hydrolysés par une solution d'HCl 6N à 110°C pendant 24h. Une pré-purification est effectuée en passant les hydrolysats sur une colonne SP-Sephadex C-25 (forme H<sup>+</sup>), un échangeur de cations. Après élution, l'HCl est évaporé et l'hydrolysat repris dans 400µl de l'eau pour une détermination de la concentration par HPLC.

### **2) Quantification par HPLC des cross-links**

Pour séparer les différents constituants des hydrolysats, une colonne Zorbax C18 Eclipse Plus 4.6x150mm est utilisée avec des pores de 5µm. Les tampons utilisés est un mélange de tampon phosphate 20mM et acétonitrile. La détection des Pyr et Dpyr se fait par fluorescence avec une excitation à 305nm et une émission à 397nm. A l'aide de ce protocole, la bonne séparation des 2 cross-links est vérifié grâce à des produits pures, puis une gamme étalon est réalisée pour permettre de déterminer une concentration exacte des cross-links dans les tissus.



# **BIBLIOGRAPHIE**

- Afdhal, N. H. and D. Nunes (2004). "Evaluation of liver fibrosis: a concise review." Am J Gastroenterol **99**(6): 1160-1174.
- Aravalli, R. N., C. J. Steer and E. N. Cressman (2008). "Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma." Hepatology **48**(6): 2047-2063.
- Arthur, M. J. (2000). "Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(2): G245-249.
- Arthur, M. J. (2002). "Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C." Gastroenterology **122**(5): 1525-1528.
- Ascha, M. S., I. A. Hanouneh, R. Lopez, T. A. Tamimi, A. F. Feldstein and N. N. Zein (2010). "The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **51**(6): 1972-1978.
- Assoian, R. K. and E. A. Klein (2008). "Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness." Trends Cell Biol **18**(7): 347-352.
- Assoian, R. K. and M. A. Schwartz (2001). "Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 48-53.
- Auger, J. M., M. J. Kuijpers, Y. A. Senis, S. P. Watson and J. W. Heemskerk (2005). "Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model." FASEB J **19**(7): 825-827.
- Avery, N. C. and A. J. Bailey (2005). "Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: relevance to aging and exercise." Scand J Med Sci Sports **15**(4): 231-240.
- Avery, N. C. and A. J. Bailey (2008). Restraining Cross-Links Responsible for the Mechanical Properties of Collagen Fibers: Natural and Artificial. Collagen. P. Fratzl, Springer US: 81-110.
- Baharvand, H., S. M. Hashemi, S. Kazemi Ashtiani and A. Farrokhi (2006). "Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro." Int J Dev Biol **50**(7): 645-652.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2001). "Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis." Semin Liver Dis **21**(3): 437-451.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." J Clin Invest **115**(2): 209-218.
- Bataller, R., Y. H. Paik, J. N. Lindquist, J. J. Lemasters and D. A. Brenner (2004). "Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells." Gastroenterology **126**(2): 529-540.
- Baumgartner, S., K. Hofmann, R. Chiquet-Ehrismann and P. Bucher (1998). "The discoidin domain family revisited: new members from prokaryotes and a homology-based fold prediction." Protein Sci **7**(7): 1626-1631.
- Bedossa, P. (1994). "Intraobserver and Interobserver Variations in Liver Biopsy Interpretation in Patients with Chronic Hepatitis C." Hepatology **20**(1): 15-20.
- Bedossa, P., D. Dargere and V. Paradis (2003). "Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C." Hepatology **38**(6): 1449-1457.
- Benyon, R. C., J. P. Iredale, S. Goddard, P. J. Winwood and M. J. Arthur (1996). "Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver." Gastroenterology **110**(3): 821-831.
- Bessard, A., C. Fremin, F. Ezan, A. Coutant and G. Baffet (2007). "MEK/ERK-dependent uPAR expression is required for motility via phosphorylation of P70S6K in human hepatocarcinoma cells." J Cell Physiol **212**(2): 526-536.
- Bhattacharya, M., M. M. Malinen, P. Lauren, Y. R. Lou, S. W. Kuisma, L. Kanninen, M. Lille, A. Corlu, C. GuGuen-Guillouzo, O. Ikkala, A. Laukkanen, A. Urtti and M. Yliperttula (2012). "Nanofibrillar

- cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture." J Control Release **164**(3): 291-298.
- Bilzer, M., F. Roggel and A. L. Gerbes (2006). "Role of Kupffer cells in host defense and liver disease." Liver Int **26**(10): 1175-1186.
- Blaner, W. S., S. M. O'Byrne, N. Wongsiriroj, J. Kluwe, D. M. D'Ambrosio, H. Jiang, R. F. Schwabe, E. M. Hillman, R. Piantedosi and J. Libien (2009). "Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 467-473.
- Blum, H. E. (2005). "Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention." World J Gastroenterol **11**(47): 7391-7400.
- Blumenthal, D. K. and J. T. Stull (1980). "Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by calcium(2+) and calmodulin." Biochemistry **19**(24): 5608-5614.
- Bode, C. and J. C. Bode (2005). "Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol?" Alcohol Clin Exp Res **29**(11 Suppl): 166S-171S.
- Bourbonnais, E., V. A. Raymond, C. Ethier, B. N. Nguyen, M. S. El-Leil, S. Meloche and M. Bilodeau (2012). "Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury." Gastroenterology **142**(1): 130-139 e134.
- Breitkopf, K., S. Haas, E. Wiercinska, M. V. Singer and S. Dooley (2005). "Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease." Alcohol Clin Exp Res **29**(11 Suppl): 121S-131S.
- Brinkman, W. T., K. Nagapudi, B. S. Thomas and E. L. Chaikof (2003). "Photo-cross-linking of type I collagen gels in the presence of smooth muscle cells: mechanical properties, cell viability, and function." Biomacromolecules **4**(4): 890-895.
- Brown, R. A., Wiseman, M., Chuo, CB., Cheema, U., Nazhat, N. (2005). "Ultrarapid Engineering of biomimetic Materials and Tissues: Fabrication of Nano- and Microstructures by Plastic Compression." Adv. Funct. Mater. **15**: 1762-1770.
- Budhu, A., M. Forgues, Q. H. Ye, H. L. Jia, P. He, K. A. Zanetti, U. S. Kammula, Y. Chen, L. X. Qin, Z. Y. Tang and X. W. Wang (2006). "Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment." Cancer Cell **10**(2): 99-111.
- Busse, B. and J. C. Gerlach (1999). "Bioreactors for hybrid liver support: historical aspects and novel designs." Ann N Y Acad Sci **875**: 326-339.
- Campagnola, P. J. and L. M. Loew (2003). "Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms." Nat Biotechnol **21**(11): 1356-1360.
- Camper, L., K. Holmvall, C. Wangnerud, A. Aszodi and E. Lundgren-Akerlund (2001). "Distribution of the collagen-binding integrin alpha10beta1 during mouse development." Cell Tissue Res **306**(1): 107-116.
- Canty, E. G. and K. E. Kadler (2005). "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis." J Cell Sci **118**(Pt 7): 1341-1353.
- Chan, H. L., G. L. Wong, P. C. Choi, A. W. Chan, A. M. Chim, K. K. Yiu, F. K. Chan, J. J. Sung and V. W. Wong (2009). "Alanine aminotransferase-based algorithms of liver stiffness measurement by transient elastography (Fibroscan) for liver fibrosis in chronic hepatitis B." J Viral Hepat **16**(1): 36-44.
- Chen, J. R., M. Takahashi, K. Kushida, M. Suzuki, K. Suzuki, K. Horiuchi and A. Nagano (2000). "Direct detection of crosslinks of collagen and elastin in the hydrolysates of human yellow ligament using single-column high performance liquid chromatography." Anal Biochem **278**(2): 99-105.
- Choquet, D., D. P. Felsenfeld and M. P. Sheetz (1997). "Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages." Cell **88**(1): 39-48.
- Chua, M. S. and L. Wang (2011). "Recent advances into the molecular mechanisms and therapeutic targeting of hepatocellular carcinoma." Anticancer Agents Med Chem **11**(6): 491-492.

- Chun, Y. S. and G. Zimmiti (2013). "Fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma." Recent Results Cancer Res **190**: 101-110.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-524.
- Cogger, V. C., G. P. Mc Nerney, T. Nyunt, L. D. DeLeve, P. McCourt, B. Smedsrod, D. G. Le Couteur and T. R. Huser (2010). "Three-dimensional structured illumination microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations." J Struct Biol **171**(3): 382-388.
- Cornillon, J., L. Campos and D. Guyotat (2003). "[Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 743-752.
- Cox, D., M. Brennan and N. Moran (2010). "Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities." Nat Rev Drug Discov **9**(10): 804-820.
- Cukierman, E., R. Pankov and K. M. Yamada (2002). "Cell interactions with three-dimensional matrices." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 633-639.
- Danen, E. H. and K. M. Yamada (2001). "Fibronectin, integrins, and growth control." J Cell Physiol **189**(1): 1-13.
- Dare, E. V., M. Griffith, P. Poitras, J. A. Kaupp, S. D. Waldman, D. J. Carlsson, G. Dervin, C. Mayoux and M. T. Hincke (2009). "Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue-engineered regeneration." Cells Tissues Organs **190**(6): 313-325.
- de Smet, K., A. Callaerts, A. Vercruyssen and V. Rogiers (1997). "Effect of phenobarbital on 7-Ethoxycoumarin-O-deethylase and microsomal epoxide hydrase activities in collagen gel cultures of rat hepatocytes." Toxicol In Vitro **11**(5): 459-463.
- Defilippi, P., P. Di Stefano and S. Cabodi (2006). "p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks." Trends Cell Biol **16**(5): 257-263.
- DeLeve, L. D., X. Wang, L. Hu, M. K. McCuskey and R. S. McCuskey (2004). "Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(4): G757-763.
- Deyl, Z. and I. Miksik (1997). "Post-translational non-enzymatic modification of proteins. I. Chromatography of marker adducts with special emphasis to glycation reactions." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **699**(1-2): 287-309.
- Dixon, J. B., P. S. Bhathal, N. R. Hughes and P. E. O'Brien (2004). "Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss." Hepatology **39**(6): 1647-1654.
- Dugina, V., L. Fontao, C. Chaponnier, J. Vasiliev and G. Gabbiani (2001). "Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors." J Cell Sci **114**(Pt 18): 3285-3296.
- Dunn, J. C., R. G. Tompkins and M. L. Yarmush (1991). "Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration." Biotechnol Prog **7**(3): 237-245.
- Duret, C., S. Gerbal-Chaloin, J. Ramos, J. M. Fabre, E. Jacquet, F. Navarro, P. Blanc, A. Sa-Cunha, P. Maurel and M. Daujat-Chavanieu (2007). "Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver." Stem Cells **25**(7): 1779-1790.
- East, L. and C. M. Isacke (2002). "The mannose receptor family." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 364-386.
- El-Serag, H. B. (2012). "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **142**(6): 1264-1273 e1261.
- Engelholm, L. H., K. List, S. Netzel-Arnett, E. Cukierman, D. J. Mitola, H. Aaronson, L. Kjoller, J. K. Larsen, K. M. Yamada, D. K. Strickland, K. Holmbeck, K. Dano, H. Birkedal-Hansen, N. Behrendt and T. H. Bugge (2003). "uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion." J Cell Biol **160**(7): 1009-1015.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell **126**(4): 677-689.

- Evans, N. D., C. Minelli, E. Gentleman, V. LaPointe, S. N. Patankar, M. Kallivretaki, X. Chen, C. J. Roberts and M. M. Stevens (2009). "Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells." *Eur Cell Mater* **18**: 1-13; discussion 13-14.
- Faktor, V. M., I. V. Uryvaeva, A. S. Sokolova, V. A. Chernov and W. Y. Brodsky (1980). "Kinetics of cellular proliferation in regenerating mouse liver pretreated with the alkylating drug dipin." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **33**(2): 187-197.
- Fattovich, G., T. Stroffolini, I. Zagni and F. Donato (2004). "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors." *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S35-50.
- Fausto, N., J. S. Campbell and K. J. Riehle (2006). "Liver regeneration." *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S45-53.
- Ferlay J, S. I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. (2013). "Cancer Incidence and Mortality Worldwide." *IARC CancerBase No. 11*
- Flamant, M., S. Placier, A. Rodenas, C. A. Curat, W. F. Vogel, C. Chatziantoniou and J. C. Dussaule (2006). "Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertension-induced renal disease." *J Am Soc Nephrol* **17**(12): 3374-3381.
- Follonier, L., S. Schaub, J. J. Meister and B. Hinz (2008). "Myofibroblast communication is controlled by intercellular mechanical coupling." *J Cell Sci* **121**(Pt 20): 3305-3316.
- Forns, X., S. Ampurdanes, J. M. Llovet, J. Aponte, L. Quinto, E. Martinez-Bauer, M. Bruguera, J. M. Sanchez-Tapias and J. Rodes (2002). "Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model." *Hepatology* **36**(4 Pt 1): 986-992.
- Fraquelli, M., C. Rigamonti, G. Casazza, D. Conte, M. F. Donato, G. Ronchi and M. Colombo (2007). "Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease." *Gut* **56**(7): 968-973.
- Fremin, C., A. Bessard, F. Ezan, L. Gailhouste, M. Regeard, J. Le Seyec, D. Gilot, G. Pages, J. Pouyssegur, S. Langouet and G. Baffet (2009). "Multiple division cycles and long-term survival of hepatocytes are distinctly regulated by extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2." *Hepatology* **49**(3): 930-939.
- Fremin, C., F. Ezan, J. P. Guegan, L. Gailhouste, M. Trotard, J. Le Seyec, J. Rageul, N. Theret, S. Langouet and G. Baffet (2012). "The complexity of ERK1 and ERK2 MAPKs in multiple hepatocyte fate responses." *J Cell Physiol* **227**(1): 59-69.
- Friedl, P. and E. B. Brocker (2000). "The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix." *Cell Mol Life Sci* **57**(1): 41-64.
- Friedman, S. L. (2008). "Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver." *Physiol Rev* **88**(1): 125-172.
- Friedrich-Rust, M., K. Wunder, S. Kriener, F. Sotoudeh, S. Richter, J. Bojunga, E. Herrmann, T. Poynard, C. F. Dietrich, J. Vermehren, S. Zeuzem and C. Sarrazin (2009). "Liver fibrosis in viral hepatitis: noninvasive assessment with acoustic radiation force impulse imaging versus transient elastography." *Radiology* **252**(2): 595-604.
- Gailhouste, L., Y. Le Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Desille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Fremin, N. Theret and G. Baffet (2010). "Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis." *J Hepatol* **52**(3): 398-406.
- Geerts, A. (2001). "History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells." *Semin Liver Dis* **21**(3): 311-335.
- Geiger, B. (2006). "A role for p130Cas in mechanotransduction." *Cell* **127**(5): 879-881.
- Gelse, K., E. Poschl and T. Aigner (2003). "Collagens--structure, function, and biosynthesis." *Adv Drug Deliv Rev* **55**(12): 1531-1546.
- Georges, P. C., J. J. Hui, Z. Gombos, M. E. McCormick, A. Y. Wang, M. Uemura, R. Mick, P. A. Janmey, E. E. Furth and R. G. Wells (2007). "Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**(6): G1147-1154.

- Gerbal-Chaloin, S., C. Duret, E. Raulet, F. Navarro, P. Blanc, J. Ramos, P. Maurel and M. Daujat-Chavanieu (2010). "Isolation and culture of adult human liver progenitor cells: in vitro differentiation to hepatocyte-like cells." *Methods Mol Biol* **640**: 247-260.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." *Science* **285**(5430): 1028-1032.
- Giannone, G. and M. P. Sheetz (2006). "Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways." *Trends Cell Biol* **16**(4): 213-223.
- Godoy, P., J. G. Hengstler, I. Ilkavets, C. Meyer, A. Bachmann, A. Muller, G. Tuschl, S. O. Mueller and S. Dooley (2009). "Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis." *Hepatology* **49**(6): 2031-2043.
- Gomez-Lechon, M. J., R. Jover, T. Donato, X. Ponsoda, C. Rodriguez, K. G. Stenzel, R. Klocke, D. Paul, I. Guillen, R. Bort and J. V. Castell (1998). "Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix." *J Cell Physiol* **177**(4): 553-562.
- Gressner, A. M., R. Weiskirchen, K. Breitkopf and S. Dooley (2002). "Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis." *Front Biosci* **7**: d793-807.
- Gronbaek, K., P. B. Christensen, S. Hamilton-Dutoit, B. H. Federspiel, E. Hage, O. J. Jensen and M. Vyberg (2002). "Interobserver variation in interpretation of serial liver biopsies from patients with chronic hepatitis C." *J Viral Hepat* **9**(6): 443-449.
- Guegan, J. P., F. Ezan, N. Theret, S. Langouet and G. Baffet (2013). "MAPK signaling in cisplatin-induced death: predominant role of ERK1 over ERK2 in human hepatocellular carcinoma cells." *Carcinogenesis* **34**(1): 38-47.
- Guegan, J. P., C. Fremin and G. Baffet (2012). "The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control." *Int J Hepatol* **2012**: 328372.
- Guguen-Guillouzo, C., B. Clement, G. Baffet, C. Beaumont, E. Morel-Chany, D. Glaise and A. Guillouzo (1983). "Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type." *Exp Cell Res* **143**(1): 47-54.
- Hamamoto, R., M. Kamihira and S. Iijima (1999). "Intermittent addition of HGF and TGF-beta1 in rat primary hepatocyte culture." *Cytotechnology* **31**(1-2): 111-121.
- Hamill, O. P. and D. W. McBride, Jr. (1996). "A supramolecular complex underlying touch sensitivity." *Trends Neurosci* **19**(7): 258-261.
- Hammel, P., A. Couvelard, D. O'Toole, A. Ratouis, A. Sauvanet, J. F. Flejou, C. Degott, J. Belghiti, P. Bernades, D. Valla, P. Ruszniewski and P. Levy (2001). "Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct." *N Engl J Med* **344**(6): 418-423.
- Han, D. C. and J. L. Guan (1999). "Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration." *J Biol Chem* **274**(34): 24425-24430.
- Hansen, L. K. and J. H. Albrecht (1999). "Regulation of the hepatocyte cell cycle by type I collagen matrix: role of cyclin D1." *J Cell Sci* **112 ( Pt 17)**: 2971-2981.
- Hansen, L. K., J. Wilhelm and J. T. Fassett (2006). "Regulation of hepatocyte cell cycle progression and differentiation by type I collagen structure." *Curr Top Dev Biol* **72**: 205-236.
- Hell, S. and E. H. K. Stelzer (1992). "Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation." *Optics Communications* **93**(5-6): 277-282.
- Hezode, C., C. Cazeneuve, O. Coue, F. Roudot-Thoraval, I. Lonjon, A. Bastie, C. Duvoux, J. M. Pawlotsky, E. S. Zafrani, S. Amselem and D. Dhumeaux (1999). "Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions." *J Hepatol* **31**(6): 979-984.
- Hirata, M., S. M. Akbar, N. Horiike and M. Onji (2001). "Noninvasive diagnosis of the degree of hepatic fibrosis using ultrasonography in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus." *Eur J Clin Invest* **31**(6): 528-535.

- Huang, X., R. Hang, X. Wang, N. Lin, X. Zhang and B. Tang (2013). "Matrix stiffness in three-dimensional systems effects on the behavior of C3A cells." *Artif Organs* **37**(2): 166-174.
- Hulmes, D. J. (2002). "Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures." *J Struct Biol* **137**(1-2): 2-10.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-687.
- Imbert-Bismut, F., V. Ratziu, L. Pieroni, F. Charlotte, Y. Benhamou, T. Poynard and M. Group (2001). "Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study." *Lancet* **357**(9262): 1069-1075.
- Ingber, D. (1991). "Integrins as mechanochemical transducers." *Curr Opin Cell Biol* **3**(5): 841-848.
- Iozzo, R. V. and A. D. Murdoch (1996). "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function." *FASEB J* **10**(5): 598-614.
- Isom, H. C., T. Secott, I. Georgoff, C. Woodworth and J. Mummaw (1985). "Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(10): 3252-3256.
- Isom, I., I. Georgoff, M. Salditt-Georgieff and J. E. Darnell, Jr. (1987). "Persistence of liver-specific messenger RNA in cultured hepatocytes: different regulatory events for different genes." *J Cell Biol* **105**(6 Pt 2): 2877-2885.
- Issa, R., X. Zhou, C. M. Constandinou, J. Fallowfield, H. Millward-Sadler, M. D. Gaca, E. Sands, I. Suliman, N. Trim, A. Knorr, M. J. Arthur, R. C. Benyon and J. P. Iredale (2004). "Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking." *Gastroenterology* **126**(7): 1795-1808.
- Jaeschke, H. and T. Hasegawa (2006). "Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury." *Liver Int* **26**(8): 912-919.
- Jarvelainen, H., A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight and R. Penttinen (2009). "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." *Pharmacol Rev* **61**(2): 198-223.
- Johnson, C. P., H. Y. Tang, C. Carag, D. W. Speicher and D. E. Discher (2007). "Forced unfolding of proteins within cells." *Science* **317**(5838): 663-666.
- Kadler, K. E., D. F. Holmes, J. A. Trotter and J. A. Chapman (1996). "Collagen fibril formation." *Biochem J* **316** ( Pt 1): 1-11.
- Kamel, P. I., X. Qu, A. M. Geiszler, D. Nagrath, R. Harmancey, H. Taegtmeier and K. J. Grande-Allen (2014). "Metabolic regulation of collagen gel contraction by porcine aortic valvular interstitial cells." *J R Soc Interface* **11**(101).
- Kang, Y. B., S. Rawat, J. Cirillo, M. Bouchard and H. M. Noh (2013). "Layered long-term co-culture of hepatocytes and endothelial cells on a transwell membrane: toward engineering the liver sinusoid." *Biofabrication* **5**(4): 045008.
- Katzenellenbogen, M., L. Mizrahi, O. Pappo, N. Klopstock, D. Olam, H. Barash, E. Domany, E. Galun and D. Goldenberg (2007). "Molecular mechanisms of the chemopreventive effect on hepatocellular carcinoma development in Mdr2 knockout mice." *Mol Cancer Ther* **6**(4): 1283-1291.
- Kew, M. C. (2002). "Epidemiology of hepatocellular carcinoma." *Toxicology* **181-182**: 35-38.
- Khan, S. A., H. C. Thomas, B. R. Davidson and S. D. Taylor-Robinson (2005). "Cholangiocarcinoma." *Lancet* **366**(9493): 1303-1314.
- Khatiwala, C. B., P. D. Kim, S. R. Peyton and A. J. Putnam (2009). "ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK." *J Bone Miner Res* **24**(5): 886-898.
- Khatiwala, C. B., S. R. Peyton, M. Metzke and A. J. Putnam (2007). "The regulation of osteogenesis by ECM rigidity in MC3T3-E1 cells requires MAPK activation." *J Cell Physiol* **211**(3): 661-672.
- Kirsch, K. H., M. M. Georgescu and H. Hanafusa (1998). "Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G." *J Biol Chem* **273**(40): 25673-25679.

- Klein, E. A., L. Yin, D. Kothapalli, P. Castagnino, F. J. Byfield, T. Xu, I. Levental, E. Hawthorne, P. A. Janmey and R. K. Assoian (2009). "Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening." *Curr Biol* **19**(18): 1511-1518.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie and G. R. Martin (1986). "Basement membrane complexes with biological activity." *Biochemistry* **25**(2): 312-318.
- Klekotka, P. A., S. A. Santoro, H. Wang and M. M. Zutter (2001). "Specific residues within the alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain regulate migration and cell cycle progression via distinct MAPK pathways." *J Biol Chem* **276**(34): 32353-32361.
- Klemke, R. L., J. Leng, R. Molander, P. C. Brooks, K. Vuori and D. A. Cheresh (1998). "CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration." *J Cell Biol* **140**(4): 961-972.
- Kobayashi, T. and M. Sokabe (2010). "Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions." *Curr Opin Cell Biol* **22**(5): 669-676.
- Koide, N., K. Sakaguchi, Y. Koide, K. Asano, M. Kawaguchi, H. Matsushima, T. Takenami, T. Shinji, M. Mori and T. Tsuji (1990). "Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments." *Exp Cell Res* **186**(2): 227-235.
- Kolacna, L., J. Bakesova, F. Varga, E. Kostakova, L. Planka, A. Necas, D. Lukas, E. Amler and V. Pelouch (2007). "Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix." *Physiol Res* **56 Suppl 1**: S51-60.
- Koniaris, L. G., I. H. McKillop, S. I. Schwartz and T. A. Zimmers (2003). "Liver regeneration." *J Am Coll Surg* **197**(4): 634-659.
- Kornek, M., E. Raskopf, R. Tolba, U. Becker, M. Klockner, T. Sauerbruch and V. Schmitz (2008). "Accelerated orthotopic hepatocellular carcinomas growth is linked to increased expression of pro-angiogenic and prometastatic factors in murine liver fibrosis." *Liver Int* **28**(4): 509-518.
- Kowdley, K. V. (2004). "Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **127**(5 Suppl 1): S79-86.
- Lai, K. K., S. Shang, N. Lohia, G. C. Booth, D. J. Masse, N. Fausto, J. S. Campbell and L. Beretta (2011). "Extracellular matrix dynamics in hepatocarcinogenesis: a comparative proteomics study of PDGFC transgenic and Pten null mouse models." *PLoS Genet* **7**(6): e1002147.
- Lamande, S. R. and J. F. Bateman (1999). "Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones." *Semin Cell Dev Biol* **10**(5): 455-464.
- Landry, J., D. Bernier, C. Ouellet, R. Goyette and N. Marceau (1985). "Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities." *J Cell Biol* **101**(3): 914-923.
- Langsch, A. and A. Bader (2001). "Longterm stability of phase I and phase II enzymes of porcine liver cells in flat membrane bioreactors." *Biotechnol Bioeng* **76**(2): 115-125.
- Lebbink, R. J., T. de Ruiter, J. Adelmeijer, A. B. Brenkman, J. M. van Helvoort, M. Koch, R. W. Farndale, T. Lisman, A. Sonnenberg, P. J. Lenting and L. Meyaard (2006). "Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1." *J Exp Med* **203**(6): 1419-1425.
- Lee, H. J., J. E. Yeon, S. J. Suh, S. J. Lee, E. L. Yoon, K. Kang, Y. J. Yoo, J. H. Kim, Y. S. Seo, H. J. Yim and K. S. Byun (2014). "Clinical utility of plasma glypican-3 and osteopontin as biomarkers of hepatocellular carcinoma." *Gut Liver* **8**(2): 177-185.
- Lee, J., A. Ishihara, G. Oxford, B. Johnson and K. Jacobson (1999). "Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels." *Nature* **400**(6742): 382-386.
- Lee, U. E. and S. L. Friedman (2011). "Mechanisms of hepatic fibrogenesis." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **25**(2): 195-206.
- Leitinger, B. and E. Hohenester (2007). "Mammalian collagen receptors." *Matrix Biol* **26**(3): 146-155.
- Leitinger, B. and A. P. Kwan (2006). "The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen." *Matrix Biol* **25**(6): 355-364.

- Leitinger, B., A. Steplewski and A. Fertala (2004). "The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, DDR2." *J Mol Biol* **344**(4): 993-1003.
- Liang, Y., J. Jeong, R. J. DeVolder, C. Cha, F. Wang, Y. W. Tong and H. Kong (2011). "A cell-instructive hydrogel to regulate malignancy of 3D tumor spheroids with matrix rigidity." *Biomaterials* **32**(35): 9308-9315.
- Libbrecht, L. and T. Roskams (2002). "Hepatic progenitor cells in human liver diseases." *Semin Cell Dev Biol* **13**(6): 389-396.
- Lim, Y. S. and W. R. Kim (2008). "The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease." *Clin Liver Dis* **12**(4): 733-746, vii.
- Lin, T., L. Zeng, Y. Liu, K. DeFea, M. A. Schwartz, S. Chien and J. Y. Shyy (2003). "Rho-ROCK-LIMK-cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins." *Circ Res* **92**(12): 1296-1304.
- Lin, T. Y., C. S. Ki and C. C. Lin (2014). "Manipulating hepatocellular carcinoma cell fate in orthogonally cross-linked hydrogels." *Biomaterials* **35**(25): 6898-6906.
- Lin, X. Z., M. H. Horng, Y. N. Sun, S. C. Shiesh, N. H. Chow and X. Z. Guo (1998). "Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports." *J Gastroenterol Hepatol* **13**(1): 75-80.
- Liu, S., D. A. Calderwood and M. H. Ginsberg (2000). "Integrin cytoplasmic domain-binding proteins." *J Cell Sci* **113** ( Pt 20): 3563-3571.
- Liu, S., L. Wierod, E. Skarpen, H. Grosvik, G. Duan and H. S. Huitfeldt (2013). "EGF activates autocrine TGFalpha to induce prolonged egf receptor signaling and hepatocyte proliferation." *Cell Physiol Biochem* **32**(3): 511-522.
- Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo and Y. L. Wang (2000). "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." *Biophys J* **79**(1): 144-152.
- Lok, A. S., L. B. Seeff, T. R. Morgan, A. M. di Bisceglie, R. K. Sterling, T. M. Curto, G. T. Everson, K. L. Lindsay, W. M. Lee, H. L. Bonkovsky, J. L. Dienstag, M. G. Ghany, C. Morishima, Z. D. Goodman and H.-C. T. Group (2009). "Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease." *Gastroenterology* **136**(1): 138-148.
- Lutz, V., M. Sattler, S. Gallinat, H. Wenck, R. Poertner and F. Fischer (2012). "Impact of collagen crosslinking on the second harmonic generation signal and the fluorescence lifetime of collagen autofluorescence." *Skin Res Technol* **18**(2): 168-179.
- Manns, M. P. and A. Vogel (2006). "Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy." *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S132-144.
- Marrero, J. A., Z. Feng, Y. Wang, M. H. Nguyen, A. S. Befeler, L. R. Roberts, K. R. Reddy, D. Harnois, J. M. Llovet, D. Normolle, J. Dalhgren, D. Chia, A. S. Lok, P. D. Wagner, S. Srivastava and M. Schwartz (2009). "Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma." *Gastroenterology* **137**(1): 110-118.
- Martinez-Hernandez, A. (1984). "The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver." *Lab Invest* **51**(1): 57-74.
- Mason, B. N., A. Starchenko, R. M. Williams, L. J. Bonassar and C. A. Reinhart-King (2013). "Tuning three-dimensional collagen matrix stiffness independently of collagen concentration modulates endothelial cell behavior." *Acta Biomater* **9**(1): 4635-4644.
- Masseroli, M., T. Caballero, F. O'Valle, R. M. Del Moral, A. Perez-Milena and R. G. Del Moral (2000). "Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis." *J Hepatol* **32**(3): 453-464.
- Masuzaki, R., R. Tateishi, H. Yoshida, E. Goto, T. Sato, T. Ohki, J. Imamura, T. Goto, F. Kanai, N. Kato, H. Ikeda, S. Shiina, T. Kawabe and M. Omata (2009). "Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography." *Hepatology* **49**(6): 1954-1961.

- Masuzaki, R., R. Tateishi, H. Yoshida, H. Yoshida, S. Sato, N. Kato, F. Kanai, Y. Sugioka, H. Ikeda, S. Shiina, T. Kawabe and M. Omata (2008). "Risk assessment of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients by transient elastography." J Clin Gastroenterol **42**(7): 839-843.
- Matalka, II, O. M. Al-Jarrah and T. M. Manasrah (2006). "Quantitative assessment of liver fibrosis: a novel automated image analysis method." Liver Int **26**(9): 1054-1064.
- Materne, R., L. Annet, S. Dechambre, C. Sempoux, A. M. Smith, C. Corot, Y. Horsmans and B. E. Van Beers (2002). "Dynamic computed tomography with low- and high-molecular-mass contrast agents to assess microvascular permeability modifications in a model of liver fibrosis." Clin Sci (Lond) **103**(2): 213-216.
- Matsuyama, W., H. Mitsuyama, M. Ono, Y. Shirahama, I. Higashimoto, M. Osame and K. Arimura (2007). "Discoidin domain receptor 1 contributes to eosinophil survival in an NF-kappaB-dependent manner in Churg-Strauss syndrome." Blood **109**(1): 22-30.
- McBeath, R., D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju and C. S. Chen (2004). "Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment." Dev Cell **6**(4): 483-495.
- Merle, P. and C. Trepo (2009). "Molecular mechanisms underlying hepatocellular carcinoma." Viruses **1**(3): 852-872.
- Meyaard, L. (2008). "The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305)." J Leukoc Biol **83**(4): 799-803.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." Science **276**(5309): 60-66.
- Miron-Mendoza, M., J. Seemann and F. Grinnell (2010). "The differential regulation of cell motile activity through matrix stiffness and porosity in three dimensional collagen matrices." Biomaterials **31**(25): 6425-6435.
- Moghe, P. V., R. N. Cogger, M. Toner and M. L. Yarmush (1997). "Cell-cell interactions are essential for maintenance of hepatocyte function in collagen gel but not on matrigel." Biotechnol Bioeng **56**(6): 706-711.
- Moroi, M. and S. M. Jung (2004). "Platelet glycoprotein VI: its structure and function." Thromb Res **114**(4): 221-233.
- Mostaco-Guidolin, L. B., A. C. Ko, F. Wang, B. Xiang, M. Hewko, G. Tian, A. Major, M. Shiomi and M. G. Sowa (2013). "Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification." Sci Rep **3**: 2190.
- Muller, C. (2006). "Hepatocellular carcinoma--rising incidence, changing therapeutic strategies." Wien Med Wochenschr **156**(13-14): 404-409.
- Myllyla, R., C. Wang, J. Heikkinen, A. Juffer, O. Lampela, M. Risteli, H. Ruotsalainen, A. Salo and L. Sipila (2007). "Expanding the lysyl hydroxylase toolbox: new insights into the localization and activities of lysyl hydroxylase 3 (LH3)." J Cell Physiol **212**(2): 323-329.
- Nakamura, K., Y. Hamana, Y. Ishigami and T. Matsui (2010). "Latest bialkali photocathode with ultra high sensitivity." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment **623**(1): 276-278.
- Neshiwat, L. F., M. L. Friedland, B. Schorr-Lesnick, S. Feldman, W. J. Glucksman and R. D. Russo, Jr. (1992). "Hepatic angiosarcoma." Am J Med **93**(2): 219-222.
- Nieswandt, B. and S. P. Watson (2003). "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?" Blood **102**(2): 449-461.
- Orgel, J. P., A. Miller, T. C. Irving, R. F. Fischetti, A. P. Hammersley and T. J. Wess (2001). "The in situ supermolecular structure of type I collagen." Structure **9**(11): 1061-1069.
- Pares, A., J. Caballeria, M. Bruguera, M. Torres and J. Rodes (1986). "Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage." J Hepatol **2**(1): 33-42.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Passoja, K., K. Rautavuoma, L. Ala-Kokko, T. Kosonen and K. I. Kivirikko (1998). "Cloning and characterization of a third human lysyl hydroxylase isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10482-10486.

- Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer and V. M. Weaver (2005). "Tensional homeostasis and the malignant phenotype." *Cancer Cell* **8**(3): 241-254.
- Paul, R. G. and A. J. Bailey (1996). "Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes." *Int J Biochem Cell Biol* **28**(12): 1297-1310.
- Peyton, S. R. and A. J. Putnam (2005). "Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion." *J Cell Physiol* **204**(1): 198-209.
- Pinzani, M., L. Gesualdo, G. M. Sabbah and H. E. Abboud (1989). "Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells." *J Clin Invest* **84**(6): 1786-1793.
- Polte, T. R. and S. K. Hanks (1995). "Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23): 10678-10682.
- Poynard, T., P. Lebray, P. Ingiliz, A. Varaut, B. Varsat, Y. Ngo, P. Norha, M. Munteanu, F. Drane, D. Messous, F. I. Bismut, J. P. Carrau, J. Massard, V. Ratzu and J. P. Giordanella (2010). "Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest)." *BMC Gastroenterol* **10**: 40.
- Poynard, T., J. McHutchison, M. Manns, C. Trepo, K. Lindsay, Z. Goodman, M. H. Ling and J. Albrecht (2002). "Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C." *Gastroenterology* **122**(5): 1303-1313.
- Prestwich, G. D. (2008). "Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery." *Acc Chem Res* **41**(1): 139-148.
- Provenzano, P. P., K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White and P. J. Keely (2006). "Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion." *BMC Med* **4**(1): 38.
- Provenzano, P. P., D. R. Inman, K. W. Eliceiri, J. G. Knittel, L. Yan, C. T. Rueden, J. G. White and P. J. Keely (2008). "Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression." *BMC Med* **6**: 11.
- Puklin-Faucher, E., M. Gao, K. Schulten and V. Vogel (2006). "How the headpiece hinge angle is opened: New insights into the dynamics of integrin activation." *J Cell Biol* **175**(2): 349-360.
- Qu, K. Z., K. Zhang, H. Li, N. H. Afdhal and M. Albitar (2011). "Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma." *J Clin Gastroenterol* **45**(4): 355-360.
- Ratanasavanh, D., P. Beaune, F. Morel, J. P. Flinois, F. P. Guengerich and A. Guillouzo (1991). "Intralobular distribution and quantitation of cytochrome P-450 enzymes in human liver as a function of age." *Hepatology* **13**(6): 1142-1151.
- Regev, A., M. Berho, L. J. Jeffers, C. Milikowski, E. G. Molina, N. T. Pylsopoulos, Z. Z. Feng, K. R. Reddy and E. R. Schiff (2002). "Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection." *Am J Gastroenterol* **97**(10): 2614-2618.
- Ricard-Blum, S. (2011). "The collagen family." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(1): a004978.
- Ricard-Blum, S., G. Ville and J. A. Grimaud (1992). "Pyridinoline, a mature collagen cross-link, in fibrotic livers from *Schistosoma mansoni*-infected mice." *Am J Trop Med Hyg* **47**(6): 816-820.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." *Cell* **70**(3): 389-399.
- Rivera, C. A., B. U. Bradford, K. J. Hunt, Y. Adachi, L. W. Schrum, D. R. Koop, E. R. Burchardt, R. A. Rippe and R. G. Thurman (2001). "Attenuation of CCl(4)-induced hepatic fibrosis by GdCl(3) treatment or dietary glycine." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**(1): G200-207.
- Rockey, D. C. and D. M. Bissell (2006). "Noninvasive measures of liver fibrosis." *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S113-120.
- Roeder, B. A., K. Kokini, J. E. Sturgis, J. P. Robinson and S. L. Voytik-Harbin (2002). "Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure." *J Biomech Eng* **124**(2): 214-222.

- Rozario, T. and D. W. DeSimone (2010). "The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view." *Dev Biol* **341**(1): 126-140.
- Ruggieri, A., C. Barbati and W. Malorni (2010). "Cellular and molecular mechanisms involved in hepatocellular carcinoma gender disparity." *Int J Cancer* **127**(3): 499-504.
- Sandrasegaran, K., F. M. Akisik, C. Lin, B. Tahir, J. Rajan, R. Saxena and A. M. Aisen (2009). "Value of diffusion-weighted MRI for assessing liver fibrosis and cirrhosis." *AJR Am J Roentgenol* **193**(6): 1556-1560.
- Satoh, S., Y. Daigo, Y. Furukawa, T. Kato, N. Miwa, T. Nishiwaki, T. Kawasoe, H. Ishiguro, M. Fujita, T. Tokino, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano, Y. Yamaoka and Y. Nakamura (2000). "AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1." *Nat Genet* **24**(3): 245-250.
- Sawada, Y., M. Tamada, B. J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka and M. P. Sheetz (2006). "Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas." *Cell* **127**(5): 1015-1026.
- Schaefer, L. and R. M. Schaefer (2010). "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." *Cell Tissue Res* **339**(1): 237-246.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter and P. van der Geer (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." *Nature* **372**(6508): 786-791.
- Schmidt, S. and P. Friedl (2010). "Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms." *Cell Tissue Res* **339**(1): 83-92.
- Schrader, J., T. T. Gordon-Walker, R. L. Aucott, M. van Deemter, A. Quaas, S. Walsh, D. Benten, S. J. Forbes, R. G. Wells and J. P. Iredale (2011). "Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells." *Hepatology* **53**(4): 1192-1205.
- Schulze-Krebs, A., D. Preimel, Y. Popov, R. Bartenschlager, V. Lohmann, M. Pinzani and D. Schuppan (2005). "Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells." *Gastroenterology* **129**(1): 246-258.
- Schuppan, D. and N. H. Afdhal (2008). "Liver cirrhosis." *Lancet* **371**(9615): 838-851.
- Schwartz, M. A. (2010). "Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(12): a005066.
- Seglen, P. O. (1997). "DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival." *Cell Biol Toxicol* **13**(4-5): 301-315.
- Seitz, H. K. and F. Stickel (2006). "Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress." *Biol Chem* **387**(4): 349-360.
- Sell, S. (2001). "Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells." *Hepatology* **33**(3): 738-750.
- Semino, C. E., J. R. Merok, G. G. Crane, G. Panagiotakos and S. Zhang (2003). "Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds." *Differentiation* **71**(4-5): 262-270.
- Shek, F. W. and R. C. Benyon (2004). "How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis?" *Eur J Gastroenterol Hepatol* **16**(2): 123-126.
- Shepherd, R. D., S. M. Kos and K. D. Rinker (2009). "Long term shear stress leads to increased phosphorylation of multiple MAPK species in cultured human aortic endothelial cells." *Biorheology* **46**(6): 529-538.
- Shi, J., K. Aisaki, Y. Ikawa and K. Wake (1998). "Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride." *Am J Pathol* **153**(2): 515-525.
- Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T. E. Ryan, S. Davis, M. P. Goldfarb, D. J. Glass, G. Lemke and G. D. Yancopoulos (1997). "An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors." *Mol Cell* **1**(1): 25-34.

- Slater, T. F., K. H. Cheeseman and K. U. Ingold (1985). "Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 633-645.
- Smith, M. L., D. Gourdon, W. C. Little, K. E. Kubow, R. A. Eguiluz, S. Luna-Morris and V. Vogel (2007). "Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells." PLoS Biol **5**(10): e268.
- Song, B. C., Y. H. Chung, J. A. Kim, W. B. Choi, D. D. Suh, S. I. Pyo, J. W. Shin, H. C. Lee, Y. S. Lee and D. J. Suh (2002). "Transforming growth factor-beta1 as a useful serologic marker of small hepatocellular carcinoma." Cancer **94**(1): 175-180.
- Sonoda, Y., Y. Matsumoto, M. Funakoshi, D. Yamamoto, S. K. Hanks and T. Kasahara (2000). "Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60." J Biol Chem **275**(21): 16309-16315.
- Sorensen, K. K., P. McCourt, T. Berg, C. Crossley, D. Le Couteur, K. Wake and B. Smedsrod (2012). "The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **303**(12): R1217-1230.
- Strupler, M., A. M. Pena, M. Hernest, P. L. Tharoux, J. L. Martin, E. Beaurepaire and M. C. Schanne-Klein (2007). "Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues." Opt Express **15**(7): 4054-4065.
- Sun, T. L., Y. Liu, M. C. Sung, H. C. Chen, C. H. Yang, V. Hovhannisyan, W. C. Lin, Y. M. Jeng, W. L. Chen, L. L. Chiou, G. T. Huang, K. H. Kim, P. T. So, Y. F. Chen, H. S. Lee and C. Y. Dong (2010). "Ex vivo imaging and quantification of liver fibrosis using second-harmonic generation microscopy." J Biomed Opt **15**(3): 036002.
- Sun, W., S. Chang, D. C. Tai, N. Tan, G. Xiao, H. Tang and H. Yu (2008). "Nonlinear optical microscopy: use of second harmonic generation and two-photon microscopy for automated quantitative liver fibrosis studies." J Biomed Opt **13**(6): 064010.
- Tada, S., H. Iwamoto, M. Nakamuta, R. Sugimoto, M. Enjoji, Y. Nakashima and H. Nawata (2001). "A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats." J Hepatol **34**(4): 529-536.
- Tai, D. C., N. Tan, S. Xu, C. H. Kang, S. M. Chia, C. L. Cheng, A. Wee, C. L. Wei, A. M. Raja, G. Xiao, S. Chang, J. C. Rajapakse, P. T. So, H. H. Tang, C. S. Chen and H. Yu (2009). "Fibro-C-Index: comprehensive, morphology-based quantification of liver fibrosis using second harmonic generation and two-photon microscopy." J Biomed Opt **14**(4): 044013.
- Tatematsu, M., T. Kaku, A. Medline and E. Farber (1985). "Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene." Lab Invest **52**(4): 354-362.
- Tatsuta, M., H. Iishi, M. Ichii, S. Noguchi, S. Okuda and H. Taniguchi (1985). "Chromoendoscopic observations on extension and development of fundal gastritis and intestinal metaplasia." Gastroenterology **88**(1 Pt 1): 70-74.
- Thampanitchawong, P. and T. Piratvisuth (1999). "Liver biopsy: complications and risk factors." World J Gastroenterol **5**(4): 301-304.
- Theodossi, A., A. M. Skene, B. Portmann, R. P. Knill-Jones, R. S. Patrick, R. A. Tate, W. Kealey, K. J. Jarvis, D. J. O'Brian and R. Williams (1980). "Observer variation in assessment of liver biopsies including analysis by kappa statistics." Gastroenterology **79**(2): 232-241.
- Tiaho, F., G. Recher and D. Rouede (2007). "Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy." Opt Express **15**(19): 12286-12295.
- Tiger, C. F., F. Fougerousse, G. Grundstrom, T. Velling and D. Gullberg (2001). "alpha11beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells." Dev Biol **237**(1): 116-129.

- Totsukawa, G., Y. Wu, Y. Sasaki, D. J. Hartshorne, Y. Yamakita, S. Yamashiro and F. Matsumura (2004). "Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts." *J Cell Biol* **164**(3): 427-439.
- Tsang, K. Y., M. C. Cheung, D. Chan and K. S. Cheah (2010). "The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation." *Cell Tissue Res* **339**(1): 93-110.
- Ulrich, T. A., E. M. de Juan Pardo and S. Kumar (2009). "The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells." *Cancer Res* **69**(10): 4167-4174.
- Van De Water, L., S. Varney and J. J. Tomasek (2013). "Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention." *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**(4): 122-141.
- van Zijl, F., M. Mair, A. Csiszar, D. Schneller, G. Zulehner, H. Huber, R. Eferl, H. Beug, H. Dolznig and W. Mikulits (2009). "Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge." *Oncogene* **28**(45): 4022-4033.
- Vogel, V. (2006). "Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 459-488.
- Vogel, W., G. D. Gish, F. Alves and T. Pawson (1997). "The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen." *Mol Cell* **1**(1): 13-23.
- Vogel, W. F., R. Abdulhussein and C. E. Ford (2006). "Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function." *Cell Signal* **18**(8): 1108-1116.
- Voigt, S., R. Gossrau, O. Baum, K. Loster, W. Hofmann and W. Reutter (1995). "Distribution and quantification of alpha 1-integrin subunit in rat organs." *Histochem J* **27**(2): 123-132.
- Wang, X., G. Hu, C. Betts, E. Y. Harmon, R. S. Keller, L. Van De Water and J. Zhou (2011). "Transforming growth factor-beta1-induced transcript 1 protein, a novel marker for smooth muscle contractile phenotype, is regulated by serum response factor/myocardin protein." *J Biol Chem* **286**(48): 41589-41599.
- Wang, Y., Y. Zhang, S. Zhang, G. Peng, T. Liu, Y. Li, D. Xiang, M. J. Wassler, H. S. Shelat and Y. Geng (2012). "Rotating microgravity-bioreactor cultivation enhances the hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells on biodegradable polymer scaffolds." *Tissue Eng Part A* **18**(21-22): 2376-2385.
- Westin, J., L. M. Lagging, R. Wejstal, G. Norkrans and A. P. Dhillon (1999). "Interobserver study of liver histopathology using the Ishak score in patients with chronic hepatitis C virus infection." *Liver* **19**(3): 183-187.
- Wheeler, M. D., H. Kono, M. Yin, M. Nakagami, T. Uesugi, G. E. Arteel, E. Gabele, I. Rusyn, S. Yamashina, M. Froh, Y. Adachi, Y. Iimuro, B. U. Bradford, O. M. Smutney, H. D. Connor, R. P. Mason, S. M. Goyert, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, R. J. Samulski and R. G. Thurman (2001). "The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease." *Free Radic Biol Med* **31**(12): 1544-1549.
- Wipff, P. J., D. B. Rifkin, J. J. Meister and B. Hinz (2007). "Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix." *J Cell Biol* **179**(6): 1311-1323.
- Wise, S. G. and A. S. Weiss (2009). "Tropoelastin." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(3): 494-497.
- Wu, D. R. E. J.-J. (2005). "Collagen Cross-Links." *Top Curr Chem* **247**: 207-229.
- Xian, X., S. Gopal and J. R. Couchman (2010). "Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix." *Cell Tissue Res* **339**(1): 31-46.
- Yamasaki, S. (2003). "Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **10**(4): 288-291.
- Yang, M. C., C. P. Chang and H. Y. Lei (2010). "Induction of liver fibrosis in a murine hepatoma model by thioacetamide is associated with enhanced tumor growth and suppressed antitumor immunity." *Lab Invest* **90**(12): 1782-1793.

- Yeowell, H. N. and L. C. Walker (1999). "Tissue specificity of a new splice form of the human lysyl hydroxylase 2 gene." *Matrix Biol* **18**(2): 179-187.
- Yoshida, D. and A. Teramoto (2007). "Enhancement of pituitary adenoma cell invasion and adhesion is mediated by discoidin domain receptor-1." *J Neurooncol* **82**(1): 29-40.
- Yuen, M. F., Y. Tanaka, D. Y. Fong, J. Fung, D. K. Wong, J. C. Yuen, D. Y. But, A. O. Chan, B. C. Wong, M. Mizokami and C. L. Lai (2009). "Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B." *J Hepatol* **50**(1): 80-88.
- Zhang, X., A. Chattopadhyay, Q. S. Ji, J. D. Owen, P. J. Ruest, G. Carpenter and S. K. Hanks (1999). "Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9021-9026.
- Zhao, X. H., C. Laschinger, P. Arora, K. Szaszi, A. Kapus and C. A. McCulloch (2007). "Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway." *J Cell Sci* **120**(Pt 10): 1801-1809.
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, J. Brown, A. Shaub, A. M. Belkin and K. Burridge (1998). "Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly." *J Cell Biol* **141**(2): 539-551.
- Zutter, M. M. and S. A. Santoro (1990). "Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor." *Am J Pathol* **137**(1): 113-120.



# **ANNEXES**



### **Participations aux congrès :**

- 2<sup>nd</sup> European Doctoral College on Environment and Health à Rennes (4 au 6 Juin 2012)
- 1<sup>ère</sup> journée des jeunes chercheurs de l'IRSET (27 Novembre 2012). Présentation de poster.
- XXI<sup>ème</sup> Congrès Annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extra-Cellulaire à Strasbourg (21 au 23 Mars 2013). Présentation orale.
- XXVI<sup>ème</sup> congrès de l'Association Française d'Histologie à Rennes (13 et 14 Juin 2013). Présentation orale.
- Journée des doctorants et post-doctorants en Biologie Santé Bretagne à Brest (21 Juin 2013). Présentation de poster
- 2<sup>ème</sup> journée des jeunes chercheurs de l'IRSET (4 Février 2014). Présentation de poster.
- Atelier 226 des workshop INSERM : « The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue » à Bordeaux (12 au 14 Mars 2014). Présentation de poster
- 3<sup>ème</sup> European Doctoral College on Environment and Health à Rennes (23 au 25 Juin 2014). Présentation de poster.

### **Formations :**

- Microscopie photonique en biologie : principes et applications (12 au 16 Novembre 2012) organisée par la plateforme MRic-Photonics, à Rennes.
- Analyse d'image de microscopie optique (15 au 17 Avril 2013 + 16 Mai 2013) organisée par la plateforme MRic-Photonics, à Rennes.

### **Participation à l'encadrement :**

- Mme Hurault Lucile, Etude de l'influence des forces mécaniques sur le phénotype cellulaire : caractérisation des cellules hépatiques transformées (Huh7) cultivées en gel 3D de collagène, du 24 Juin 2013 au 28 Juillet 2013.
- Mme Bouthemy Maëlys, Bio-activation des contaminants de l'environnement au cours de la fibrose hépatique, de Janvier à Juin 2014.

### **Publications :**

**Rang B** : - Study of the involvement of mechanical forces on hepatocytes phenotype in liver fibrosis, J. BOMO; F. EZAN; N. THERET; G. BAFFET, XXI<sup>ème</sup> Congrès Annuel de la Société Française de Biologie de la Matrice Extra-Cellulaire

- Intérêts de la microscopie biphotonique pour la détection et quantification du collagène dans la fibrose hépatique, J. BOMO, XXVI<sup>ème</sup> congrès de l'Association Française d'Histologie

# Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42/Tuba pathway

Amélie Juin<sup>1,2#</sup>, Julie Di Martino<sup>1,2#</sup>, Birgit Leitinger<sup>3</sup>, Elodie Henriet<sup>1,2</sup>, Anne-Sophie Gary<sup>1,2</sup>, Lisa Paysan<sup>1,2</sup>, Jeremy Bomo<sup>4</sup>, Georges Baffet<sup>4</sup>, Cécile Gauthier-Rouvière<sup>5</sup>, Jean Rosenbaum<sup>1,2</sup>, Violaine Moreau<sup>1,2\*</sup> and Frédéric Saltel<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1053, F-33076 Bordeaux, France; <sup>2</sup>Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France; <sup>3</sup>National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, United Kingdom; <sup>4</sup>Inserm, U1085, Institut de Recherche sur la Santé l'Environnement et le Travail (IRSET), Université de Rennes 1, 35043 Rennes, France; <sup>5</sup>Universités Montpellier 2 et 1, CRBM, CNRS, UMR 5237,34293 Montpellier, France.

Revision submitted: 08/09/14

Number of characters: 40 767

Condensed title: DDR1 controls linear invadosome formation

Key words: invadosomes, discoidin domain receptor, Cdc42, Tuba, type I collagen.

\* Correspondence to VM or FS; [violaine.moreau@inserm.fr](mailto:violaine.moreau@inserm.fr), [frederic.saltel@inserm.fr](mailto:frederic.saltel@inserm.fr)

# authors contribute equally to this work

INSERM U1053

Université Bordeaux Segalen

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux cedex, France

Tel : +33 (0)5 57 57 17 71 Fax: +33 (0)5 56 51 40 77

## **Abstract**

Accumulation of type I collagen fibrils in tumors is associated with an increased risk of metastasis. Invadosomes are F-actin structures able to degrade the extracellular matrix. We previously found that collagen I fibrils induced the formation of peculiar linear invadosomes in an unexpected integrin-independent manner. Here, we show that Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), a collagen receptor overexpressed in cancer, co-localizes with linear invadosomes in tumor cells and is required for their formation and matrix degradation ability. Unexpectedly, DDR1 kinase activity is not required for invadosome formation or activity, nor is Src tyrosine kinase. We show that the RhoGTPase Cdc42 is activated on collagen in a DDR1-dependent manner. Cdc42 and its specific GEF, Tuba localize to linear invadosomes, and are both required for linear invadosome formation. Finally, DDR1 depletion blocks cell invasion in a collagen gel. Altogether, our data uncover the important role of DDR1, acting through Tuba and Cdc42, in proteolysis-based cell invasion in a collagen-rich environment.

## Introduction

Type I collagen fibrils are present in tumors where they were considered for a long time as a simple physical and structural barrier to inhibit tumor progression and metastasis. However, type I collagen is overexpressed in a large number of cancers and paradoxically a high expression is correlated with an increased risk of metastasis for instance in breast and lung cancers (Gilkes et al., 2013; Ramaswamy et al., 2003). Beyond expression, the size, the diameter, the morphology and the extent of fibril crosslinking of type I collagen impact on cancer evolution (Cox et al., 2013; Levental et al., 2009). Moreover type I collagen fibrils promote the activity of matrix metalloproteases (MMP) (Ruangpanit et al., 2001).

In a previous study, we discovered that type I collagen fibrils are powerful and physiological inducers of invadosomes, which are F-actin-rich structures able to degrade the extracellular matrix (ECM) (Juin et al., 2012). The term invadosomes refers to podosomes in normal cells as well as to invadopodia in cancer cells. Both are matrix-degrading structures allowing matrix remodeling and cell invasion due to the activity of MMP such as MMP2, MMP9 and MT1-MMP (Hoshino et al., 2013). It is now clearly established that the presence of invadosomes in cancer cells correlates with their ability to metastasize (Eckert et al., 2011). Moreover, invadosomes were recently involved in tumor cell extravasation and demonstrated to be a therapeutic target for metastasis (Leong et al., 2014). Invadosome formation, organization and activation are controlled by RhoGTPases such as RhoA, Rac1 and Cdc42 (Di Martino et al., 2014; Moreau et al., 2003). In addition to RhoGTPases, Src kinases are a key signal pathway that control invadosome formation (Hauck et al., 2002; Linder et al., 2000; Tarone et al., 1985). The invadosome basic module corresponds to a central F-actin core composed of actin-binding proteins like N-WASP, the Arp2/3 complex and cortactin, associated with scaffold proteins such as Tks5 (Destaing et al., 2011; Linder et al., 2011;

Murphy and Courtneidge, 2011). This actin core may be surrounded by a ring of regulating proteins like integrins, vinculin and talin. Invadosomes are found as individual items, aggregates, or organized into "rosettes" according to cellular models and context. Invadosomes are constitutive in various cancer cells and in osteoclasts but in most cell types they are absent in basal conditions, although inducible by various stimuli, including cytokines (PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ ), or various compounds (phorbol esters, cytotoxic necrotizing factor 1, sodium fluoride) (Albiges-Rizo et al., 2009). Our recent data demonstrated that type I collagen fibrils induce invadosome formation in most cell types tested such as endothelial cells and fibroblasts. Moreover, type I collagen fibrils promoted a linear re-organization of invadopodia in cancer cell lines, which was associated with an increase in ECM-degrading activity. Invadosomes induced or reorganized by collagen I aligned along the collagen fibers and we thus called them linear invadosomes. Two recent studies have confirmed the induction of linear invadosomes upon cell contact with collagen fibrils (Monteiro et al., 2013; Schachtner et al., 2013). Interestingly, although members of the  $\beta$ 1 integrin family are the major receptors for type I collagen (Leitinger, 2011), and are associated with classical invadosomes in many cell types, we demonstrated that they were not necessary for linear invadosome formation (Juin et al., 2012), raising the question about the ECM receptor involved.

Discoidin domain receptors (DDR) are a ubiquitously expressed family of receptors known to interact with collagens, in particular fibrillar collagens I-III (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). DDRs only bind collagens in their native physiological triple-helical conformation and do not recognize denatured collagens such as gelatin (Konitsiotis et al., 2008). The DDR receptor family belongs to the large group of receptor tyrosine kinases (RTKs) and is composed of two members, DDR1 and DDR2. Ligand interaction with DDRs promotes

tyrosine autophosphorylation as with classical RTKs, although with a very slow and persistent kinetics (Vogel et al., 1997). The DDRs are considered as collagen sensors and act on tissue homeostasis, but also on many cellular processes including cell proliferation and differentiation, cell adhesion, cell migration and invasion. These latter properties clearly connect them with cancer. Indeed, a number of recent studies shows that the DDRs are often upregulated in various cancers (For review, see Valiathan et al., 2012) (Valiathan et al., 2012). Notably, DDR1 was found overexpressed in lung and breast cancers (Barker et al., 1995; Ford et al., 2007) where a high expression level was correlated with a poor prognosis and metastasis formation (Miao et al., 2013; Valencia et al., 2012; Yang et al., 2010).

Because both DDR1 and collagen I are overexpressed in cancers and associated with metastasis development, and as type I collagen fibrils promote linear invadosome formation, we hypothesized that DDR1 could be the collagen I receptor involved in the formation of linear invadosomes and subsequent cellular invasion.

## Results:

### **DDR1 drives linear invadosome formation and activity.**

For this study, we selected lung and breast cancers cell lines with a high level expression of DDR1. We found that A549 and MDA-MB-231 cells, respectively derived from human lung and breast cancers, express DDR1 (Fig. S2A and 2B). We first analyzed the formation of invadopodia in these cells. As shown by dual F-actin/cortactin immunostaining on fluorescent gelatin, A549 cells do not form constitutive invadopodia, while MDA-MB-231 cells do (Fig. 1A). Consequently, only MDA-MB-231 cells degrade gelatin in the *in situ* zymography assay. However, when seeded on collagen I fibrils, both cell types were able to form linear invadosomes (Fig. 1B-D). These dynamic structures formed along collagen fibrils are composed of F-actin, cortactin and Tks5 that are classical markers for invadosomes (Fig. 1B-C and movie 1). These results confirm our previous data demonstrating that type I collagen fibrils reorganized invadopodia from MDA-MB-231 cells into linear invadosomes (Juin et al., 2012). In addition, we show that type I collagen fibrils strongly induced linear invadosomes in cancer cells that do not exhibit constitutive invadopodia (Fig. 1D). In MDA-MB-231 cells, the invadosome reorganization was also associated with an increase in the percentage of cells exhibiting these structures (Fig. 1D). This increase was correlated with an increase in the global degradation activity of cells (Supplementary Fig. S1A). Altogether, these data show that cancer cells expressing DDR1 can form linear invadosomes when plated on type I collagen fibrils and that contact with type I collagen fibrils increases the ability of the cells to degrade the ECM.

In order to investigate whether DDR1 played a role in linear invadosome formation, we analyzed DDR1 subcellular localization when cells were plated onto type I collagen fibrils. To this aim, we transfected or infected MDA-MB-231 cells with either a DDR1-Flag construct or a DDR1-GFP lentiviral construct. We found that DDR1-tagged proteins co-localized with linear invadosomes and type I collagen fibrils in MDA-MB-231 cells (Fig. 2A). This result was confirmed with endogenous DDR1 when using an antibody directed against DDR1 in MDA-MB-231 and A549 cells (Fig. sup 1B-C).

To determine DDR1 involvement in linear invadosome formation, we used an RNA interference strategy. Two to three distinct siRNAs were used to deplete DDR1 in both cell types (Fig. 2B-C and S2A-C), and linear invadosomes were quantified upon plating on type I collagen fibrils. We demonstrated that depletion of DDR1 promoted a significant decrease in the percentage of cells able to form linear invadosomes in both cell types (Fig. 2C-D, and Fig. S2B-C). Depletion of DDR1 also strongly decreased the number of linear invadosomes per cell (Fig. 2E), altogether highlighting a major role of DDR1 in linear invadosome formation. To confirm these data we performed a rescue experiment. After DDR1 depletion using a siRNA targeting its 3'UTR sequence, we infected cells with lentiviruses expressing DDR1-GFP. We demonstrated that DDR1 restored linear invadosome formation associated with a colocalization between Tks5 and DDR1 (Fig. S2D-E). We have previously shown that collagen I-induced linear invadosomes were able to degrade not only gelatin but also collagen I fibrils themselves (Juin et al., 2012). Using second harmonic generation (SHG) microscopy that allows collagen fibril visualization without any staining, we thus quantified the consequences of DDR1 depletion on collagen fibrils degradation (Gailhouste et al., 2010). As expected, the decrease of linear invadosome formation was correlated with a decrease in the cell capacity

to degrade type I collagen fibrils (Fig. 2F). Altogether, these results demonstrate the critical role of DDR1 in the formation and activity of type I collagen-induced invadosomes.

These results raised the question about a potential role of DDR1 in the formation and function of classical invadosomes. To address this point, we silenced DDR1 in MDA-MB-231 and Huh6 cells, both exhibiting constitutive invadopodia. Interestingly, whereas we were not able to localize DDR1 at invadopodia, we found that decreasing DDR1 expression using two different siRNAs altered invadosome formation and decreased cell degradation capacity in MDA-MB-231 and Huh6 cells (Fig. S3).

### **DDR1 kinase activity is not required for linear invadosome formation and activity.**

As DDR1 is a tyrosine kinase receptor, we further investigated the involvement of DDR1 kinase activity in linear invadosome formation and degradation function. To this end, we used nilotinib, initially developed as a Bcr-Abl kinase inhibitor, but later shown to inhibit DDR1 kinase activity highly efficiently (Day et al., 2008). We first confirmed using immunoprecipitation that type I collagen promoted DDR1 tyrosine phosphorylation and that nilotinib almost completely abrogated it (Fig. 3A). We thus tested the impact of nilotinib on linear invadosome formation. We found that nilotinib treatment did not affect linear invadosome formation (Fig. 3B-D). Indeed, type I collagen stimulation was still able to reorganize F-actin along fibrils, and Tks5 remained associated with the structures (Fig. 3B). As assessed by the quantification of the SHG (Fig. 3E) or of the cleaved collagen antibody signal (Fig. S4), we also found that nilotinib treatment did not affect linear invadosome degradation activity.

Moreover, we used monoclonal antibodies that block DDR1 autophosphorylation without interfering with collagen binding (Carafoli et al., 2012). Three independent antibodies were used and we obtained the same results (Fig. 3F), demonstrating that linear invadosome formation and activity are indeed independent of DDR1 kinase activity. In the next part of this study, we thus aimed at understanding which signaling pathway is responsible for the role of DDR1 in linear invadosome formation.

### **c-Src is not involved in linear invadosome formation and activity.**

c-Src is well known as a key molecule implicated in the formation and activity of classical invadosomes (Tarone et al., 1985). Src inhibition or depletion is sufficient to abolish classical invadosome formation. In addition, c-Src has been shown to be required in DDR signaling for full phosphorylation after ligand binding (Dejmek et al., 2003; Yang et al., 2005). This prompted us to examine c-Src involvement in DDR1-induced linear invadosome formation. As expected, the c-Src inhibitor PP2 abolished invadopodia formation and degradation activity in MDA-MB-231 cells plated on gelatin (Fig. 4A). Surprisingly, when MDA-MB-231 cells were seeded on type I collagen, or on a mixed matrix composed of gelatin associated with type I collagen fibrils, PP2 treatment had no impact on linear invadosome formation, on gelatin degradation (Fig. 4B and C), nor on type I collagen fibril degradation (Fig. 4C). This latter finding is supported by the fact that collagen cleaved signal was not modified upon PP2 treatment when compared with the control condition (Fig. S4).

Moreover, we demonstrated that DDR1 depletion did not either modify c-Src phosphorylation, whether cells were plated on gelatin or collagen I (Fig. 4D). The lack of involvement of c-Src was confirmed using SYF cells which do not express either Src, Yes or Fyn, three members of the Src kinase family and, as control, SYF-Src cells, which are the

same cells that stably express c-Src (Fig. 4E). We first confirmed that both cell lines express DDR1 (Fig. 4F). We found that control and SYF cells do not exhibit invadopodia on gelatin (Fig. 4G). However, when plated on a mixed matrix, SYF cells had the same potential as control cells to form linear invadosomes, and these invadosomes were fully active at degrading the matrix (Fig. 4H). All these results show that c-Src is not involved in the formation, nor in the degradation activity of type I collagen-induced linear invadosomes.

### **Cdc42 is the main RhoGTPase involved in the formation of linear invadosomes.**

It is well established that RhoGTPases, principally RhoA, Rac1 and Cdc42, control actin cytoskeleton remodeling and invadosome formation (Linder et al., 2011). Using siRNAs targeting these three members of the RhoGTPase family, we investigated their respective involvement in linear invadosome formation. We used two distinct siRNAs per GTPase and first checked their efficiency at specifically depleting their corresponding targets (Fig. 5A). We then measured their impact on linear invadosome formation. We found that only Cdc42 depletion had an impact on linear invadosome formation (Fig. 5B and C). We then expressed constitutively active and inactive forms of Cdc42 in MDA-MB-231 cells seeded on type I collagen fibrils. We found that the constitutively active form of Cdc42, GFP-V12Cdc42, co-localized with linear invadosomes (Fig. 6A) at the opposite of the dominant negative form, GFP-N17Cdc42 (Fig. 6B). Moreover, we found that expression of GFP-V12Cdc42 enhanced the ability of MDA-MB-231 cells to form linear invadosomes, whereas expression of GFP-N17Cdc42 had the opposite effect (Fig. 6C). It has been shown that type I collagen fibrils can promote Cdc42 activation (Sato et al., 2003). We thus analyzed the activity level of Cdc42 in cells plated on type I collagen fibrils with or without depletion of DDR1. We first confirmed

that type I collagen significantly promoted Cdc42 activation, and found that this effect of type I collagen was abolished in cells with DDR1 depletion (Fig. 6D). This result was strengthened by the colocalization of DDR1 with the active form of Cdc42 (Fig. 6E). In addition, using the Raichu Cdc42 biosensor (Itoh et al., 2002) on living cells seeded on type I collagen fibrils, we showed that a signal corresponding to activated Cdc42 (69 hits on 79 cells observed) (Fig. 6F). All these data show that Cdc42 is involved in relaying the collagen I signal through DDR1 for the formation of linear invadosomes.

### **Tuba, a Cdc42-specific GEF is required for linear invadosome formation.**

To go further concerning the link between DDR1 and Cdc42, we searched for a guanine nucleotide-exchange factor (GEF) involved in Cdc42 activation upon type I collagen fibrils induction. For this purpose, we performed a RNAi screen targeting fourteen Cdc42-specific GEFs (Table I) on cell ability to form linear invadosomes (Cook et al., 2014). Our screen revealed that the depletion of the GEF Tuba impacts on linear invadosome formation. Tuba is a Cdc42-specific GEF but also acts as a scaffold protein to link dynamin with actin regulatory proteins such as N-WASP. To confirm this result we used two distinct siRNAs to deplete Tuba expression in MDA-MB-231 and A549 cells (Fig. 7A-B). After quantification, we demonstrated that Tuba depletion induces a decrease in cell ability to form linear invadosomes in both cell types (Fig. 7A-C). In addition, we observed a colocalization between DDR1 and Tuba in linear invadosomes of DDR1-GFP expressing cells supporting a link between these two molecules (Fig. 7D). Thus, this is the first demonstration of the involvement of Tuba in invadosome formation. To address Tuba participation in classical invadopodia, we analyzed Tuba localization in MDA-MB-231 cells seeded on gelatin. Interestingly, Tuba didn't colocalize with classical invadosomes while it was present on linear

invadosomes (Fig. 7E). These data suggest that DDR1 can recruit Tuba that can specifically activate Cdc42 to induce linear invadosome formation.

### **DDR1 depletion decreases cancer cell invasion capacities.**

DDR1 is known to be involved in cancer cell invasion and metastasis induction (Valiathan et al., 2012). Because type I collagen fibrils are part of the tumor micro-environment, we studied whether DDR1 was involved in the invasion of a 3D collagen gel by linear invadosome-bearing tumor cells. We first demonstrated that MDA-MB-231 cells were able to form linear invadosomes in a 3D collagen gel (Fig. 8A). We further used an invasion assay (Lopez et al., 2005) consisting of a type I collagen gel polymerized into Boyden chambers. Gels were polymerized at a 1mg/ml of type I collagen at 37°C for one hour. In this condition cells need proteolysis to invade the gel accordingly with the study of Wolf et al. (Wolf et al., 2013). Cells were seeded on top of the collagen gel and fixed after 1hr and 3 days. We confirmed that DDR1 depletion remained constant over the studied time frame (Fig. 8B). Using quantitative confocal z-stack analysis (Fig. 8C), we found that DDR1 depletion blocked the cell ability to invade the collagen gel. In the control condition, approximately half of the cells were able to invade the gel (Fig. 8D). In contrast, DDR1 downregulation abolished cell invasion. Confocal analysis showed that after 3 days, most of the DDR1-silenced cells remained stacked at the gel surface and did not enter into the gel (Fig. 8E). To control that cells use proteolysis dependent mode of migration to invade the collagen gel, we used a MMP inhibitor, GM6001. We found that GM6001 totally blocked cell ability to penetrate the gel demonstrating the MMP involvement in this process (Fig. S5A-B). Consequently, GM6001 treatment abolish cleaved collagen signal observed in control condition (Fig. S5C). As PP2 and nilotinib treatments did not inhibit type I collagen degradation in 2D (Fig. S4), we also

checked for cell invasion in 3D in these conditions. If PP2 treatment did not impact on cell invasion in our conditions, we can notice a slight decrease in the cell capacity to invade in presence of nilotinib (Fig. S5A-B). These data demonstrate the crucial involvement of DDR1 in type I collagen matrix invasion, that we found MMP-dependent and Src -independent.

## Discussion

This study has revealed the link between the collagen receptor DDR1 associated with the development of metastasis, and invadosomes, which are protrusive F-actin structures used by tumor cells to degrade the ECM and promote invasion. Herein, we confirmed our previous findings showing the importance of type I collagen fibrils as powerful invadosome inducers (Juin et al., 2012) and extend them to cancer cells. Most cells types are able to form linear invadosomes, including endothelial cells, fibroblasts, cancer cells, Src-transformed cells (Juin et al., 2012), or as shown by another group, megakaryocytes (Schachtner et al., 2013). We demonstrated that the simple contact of cancer cells with type I collagen fibrils can promote formation of linear invadosomes and consequently activate their capacity to degrade the ECM. In the case of cancer cells constitutively exhibiting invadopodia, type I collagen fibrils induced their reorganization into linear invadosomes. Moreover, this reorganization was associated with an increase of the percentage of cells presenting linear invadosomes as compared to classical invadopodia and also in an increase in the capacity of the cells to degrade the ECM. Owing to their capacity to localize the degradation machinery along fibrils, linear invadosomes could be implicated in the proteolytic breakdown of the ECM that favors invasive migration, either in physiological conditions, such as angiogenesis, or in pathological situations such as cancer. Thus, there is a great interest to develop our understanding of the molecular pathways required for the formation and function of linear invadosomes.

Although there is evidence that integrins are required for the formation and activity of classical invadosomes (Beaty et al., 2013; Destaing et al., 2010), we demonstrated that they are not necessary for linear invadosome formation (Juin et al., 2012) thus raising the

question of the identity of the collagen receptor responsible for their formation. At this time, four major classes of vertebrate transmembrane receptors are known to interact directly with the native collagen triple helix: collagen-binding  $\beta$ 1 integrins, discoidin domain receptors (DDRs), glycoprotein VI (GPVI), and leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) (Hidalgo-Carcedo et al., 2011; Leitinger, 2011). Our own data eliminated  $\beta$ 1 integrins (Juin et al., 2012). Since GPVI is present only on platelets and LAIR-1 on leukocytes, we turned our attention to the DDRs, which are ubiquitously expressed.

We found that DDR1 co-localized within linear invadosomes, and using a RNAi approach we demonstrated that DDR1 was involved in linear invadosome formation and in their ability to degrade type I collagen fibrils. These results establish DDR1 as the collagen I receptor required for linear invadosome formation (Fig. 9) and raise the question about DDR1 role in classical invadosomes. We showed that DDR1 depletion decreased classical invadosome formation and activity. It is important to notice that DDR1 effect on classical invadosome was observed on gelatin, which is not known as a DDR1 substrate. Accordingly, we were unable to colocalize DDR1 with classical invadosomes. However, these data suggest an involvement of DDR1 in classical invadopodia. It was established that DDR1 controls integrin activation (Xu et al., 2012) and consequently DDR1 could modulate directly or indirectly invadosome formation and activation. Moreover, DDR1 and integrins present common signaling pathways suggesting a cooperative action to form classical invadosomes (Shintani et al., 2008).

Because DDR1 is a RTK, we investigated the role of its kinase activity in invadosome formation. We demonstrated, using nilotinib as an inhibitor as well as blocking antibodies that DDR1 kinase activity is not necessary for the formation of linear invadosomes. This

observation is in coherence with our previous observations. Indeed, we observed that linear invadosomes appear already within 10 minutes after cell seeding on type I collagen, a kinetics that is not compatible with DDR auto-phosphorylation that is a slow process requiring more than 30 minutes before being detectable (Juin et al., 2012; Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997). Interestingly, it was previously shown that the role of DDR1 in promoting collective migration was also independent of its kinase activity (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). In our hands, the lack of requirement for c-Src activity, demonstrated with both a pharmacological antagonist and the use of SYF cells, is also in line with these findings since it was shown that c-Src was necessary through its role on the completion of phosphorylation of the related DDRs (Dejmek et al., 2003; Yang et al., 2005). In addition, although the tyrosine kinase c-Src has been historically associated with invadosomes, our data show that collagen I-induced invadosomes are independent of c-Src activity. Thus, linear invadosomes are the first described c-Src kinase-independent invadosomes.

How thus does DDR1 signal for invadosome formation? As the RhoGTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 have been largely involved in invadosome formation and organization, we investigated their role in DDR1-dependent linear invadosome formation. We clearly determined that only Cdc42 is involved. This is supported by the drastic effect of Cdc42 silencing, by the blockage of collagen I-induced Cdc42 activation in cells transfected with DDR1 siRNAs, and by the localization of the active form of Cdc42 (GFP-V12Cdc42 protein and Cdc42 biosensor) at linear invadosomes. Conversely, the GFP-N17Cdc42 dominant negative form decreased the cells ability to form linear invadosomes on collagen and do not colocalize with linear invadosomes. Most invadosome models are controlled and regulated by several Rho-GTPases. Our results are thus important as only very few models have been described so far in which only Cdc42 and not RhoA or Rac1 are implicated in invadosome

formation. This specificity of linear invadosomes, together with their restricted molecular composition that we reported previously (Juin et al., 2012), supports the idea that collagen-induced invadosomes correspond to a minimal form of invadosomes (Di Martino et al., 2014). Intriguingly, another study showed that overexpression of tagged forms of DDR1 in MDCK cells did not increase but conversely decreased Cdc42 activation by collagen (Yeh et al., 2009). The reason for this discrepancy is unclear, but it may be of relevance to explain why MDCK cells are unable to form linear invadosomes and to degrade the ECM upon collagen stimulation (data not shown).

Altogether, our data demonstrated that collagen I-induced invadosomes rely on a DDR1, Cdc42-dependent pathway (Fig. 9). We further identified Tuba as the major Cdc42GEF involved in linear invadosome formation. Several other Cdc42GEFs such as FGD1 or Vav1 were previously shown to be involved in invadopodia formation (Ayala et al., 2009; Razidlo et al., 2014), but this is the first demonstration of the involvement of Tuba in invadosome formation. Moreover, Tuba colocalized with DDR1 into linear invadosomes but not with classical invadosomes, identifying Tuba in addition to DDR1 as a specific marker of linear invadosomes. Tuba is a 177kD protein containing four SH3 domains in N-terminal, a central GEF domain, followed by a BAR domain and two SH3 domains in C-terminus (Cestra et al., 2005; Xu et al., 2012). The involvement of Tuba is in line with the involvement of N-WASP in linear invadosomes as Tuba was previously shown to be involved in N-WASP-dependent cytoskeletal rearrangements (Kovacs et al., 2006; Salazar et al., 2003). Even if we described herein the involvement of Tuba in MDA-MB-231 and in A549 cells, it is now clear that each cancer cell expresses its own pattern of GEFs among the 70 RhoGEFs in the human genome, (Cook et al., 2013; Razidlo et al., 2014), suggesting that other GEFs may also be involved in linear invadosome formation according to the cell type. Further experiments are required to

address this point. In addition, the link between DDR1 and Tuba is probably not direct as we were not able to show an interaction between both proteins. Indeed, other DDR1 interacting proteins could also be involved. For instance, on one hand several studies have identified DDR1 partners previously linked to the invadosome machinery (Murphy and Courtneidge, 2011) like PYK2 (Shintani et al., 2008), Nck2 (Koo et al., 2006) and PI3K (Dejmek et al., 2003) while others found DDR1-interacting partners that bind DDR1 regardless of its phosphorylation status like Syk (Dejmek et al., 2005), E-cadherin (Hidalgo-Carcedo et al., 2011), and the Par3/Par6 cell polarity proteins (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Further studies will tell if these proteins are involved in the role of DDR1 on linear invadosome formation and activation.

In our study, we confirmed the role of DDR1 in cell invasion, however, interestingly we established that inhibition of Src with PP2 or of DDR1-kinase activity with nilotinib did not affect drastically type I collagen degradation and cell invasion. This differs from the findings from other reports showing an impact of PP2 treatment on cell invasion (Angers-Loustau et al., 2004). This point could be explained by the conditions used to perform these assays such as the use of a non-type I collagen matrix, the collagen source or the absence of serum starvation. It is clear that the kinase activity of the receptor is crucial for DDR1 signaling, promoting for example cell proliferation. But we demonstrated here, that cells can sense type I fibrils and start a degradation process independently of its kinase activity and in absence of c-Src requirement.

Thus, upon contact with type I fibers, DDR1 is able to recruit the actin machinery associated with a strong matrix degradation activity. Although the proteolytic mechanisms used by linear invadosomes are still under study, a recent study has shown that the Scar homolog

(WASH) and the exocyst complex are involved in delivering MT1-MMP-positive late endosomes focally to linear invadosomes (Monteiro et al., 2013). It is well known that MMPs, such as pro-MMP2 can be activated by the culture of cells on fibrillar collagen I (Azzam and Thompson, 1992; Ruangpanit et al., 2001) in a MT1-MMP-dependent manner (Takino et al., 2004). Thus, we propose that DDR1 is the sensor used by tumor cells to interact with fibrillar collagen I leading to the organization of invadosomes that concentrate the proteolytic machinery of the cells to facilitate invasiveness. Due to its capacities to stimulate cell invasion and its overexpression in different cancers, DDR1 should be a good target for the prevention of metastasis.

## Materials and Methods:

### Antibodies, reagents and constructs

Nilotinib, anti-Tks5 (M-300), anti-DDR1 (C-20), anti-GAPDH (FL-335), anti-myc (9E10), anti-RhoA (26C4) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA). Mouse anti-DDR1 monoclonal antibodies (1F7, 1F10, 3E3, 5D5) were provided by B. Leitinger and produced as described (Carafoli et al., 2012). Anti- $\beta$ -actin, anti-tubulin (T6074), anti-Flag (clone M2) antibodies were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). We also used anti-DDR1 (D1G6) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-cortactin (p80/85), anti-Rac1 (23A8), anti-Src CT (clone NL19), anti-phospho-Src (Tyr416), anti-phosphotyrosine (4G10) and GM60001 were purchased from Millipore (Billerica, MA). Anti-Cdc42 (clone 44/CDC42) was purchased from BD Biosciences (Bedford, MA). PP2 were from Abcam (Cambridge, MA). Anti-collagen type I cleavage site (Col1  $\frac{3}{4}$  short C) was purchased from immunoGlobe. Anti-Tuba was provided by P. De Camilli (Cestra et al., 2005; Salazar et al., 2003). Secondary antibodies FluoProbes<sup>®</sup> 488, 547H, 647H anti-rabbit and anti-mouse antibodies were purchased from Interchim (Montluçon, France). F-actin was stained with Phalloidin-FluoProbes<sup>®</sup> 647, 547H, 488 or 405 (Interchim, Karlsruhe, Germany). Hoechst 34580 (Invitrogen) was used to stain nuclei. To visualize the collagen I network, we labeled 0.4 mg/ml fibrillar collagen I with 10  $\mu$ g/ml alexa fluor 546 or 647 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen).

pDDR1-Flag construct was kindly provided by M. Bendeck (Laboratory Medecine and Pathobiology, Toronto, Ontario). pEGFP-Cdc42 WT, pEGFP-V12Cdc42, myc-V12-Cdc42 and pEGFP-N17Cdc42 were described previously (Moreau et al., 2003). pLVX-EF1 $\alpha$ -DDR1-acGFP was constructed from pcDNA 3.1/zeo-DDR1-myc gifted by G Longmore (Zhang & al, 2013) by subcloning DDR1 into pLVX-EF1 $\alpha$  – acGFP-C1 (Clontech) in AfeI and BamHI restriction sites. pRaichu-Cdc42 was provided by Matsuda (Kyoto, Japan) (Aoki and Matsuda, 2009). pLifeact-mRuby lentiviral vector was obtained by subcloning Lifeact-mRuby from pmRFPRuby-Lifeact, provided by R Wedlich-Soeldner (Riedl et al., 2010), with BglIII and SpeI restriction sites in pRRlsin-MND-MCS-WPRE lentiviral plasmid. pTks5-GFP was provided by SA Courtneidge (La Jolla, USA)

### Cell culture

MDA-MB-231 cells (human breast cancer cell line) were from ATCC and were maintained in L-15 Medium and Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicillin–streptomycin (Invitrogen). A549 (Human lung adenocarcinoma cell line) were provided by F. Delom (Laboratory of Respiratory Cellular Physiology, Bordeaux, France) and SYF and SYF c-Src fibroblasts by A. Wiedmann (INRA Val de Loire UMR Infectiologie et Santé, Tours, France) (Klinghoffer

et al., 1999). Huh6 cells (human hepatoblastoma cell line) were kindly provided by C. Perret (Cochin Institute, Paris, France). A549 and SYF cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/l glucose Glutamax-I (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (PAN BIOTECH GmbH) and 100 U/ml penicillin–streptomycin (Invitrogen). Huh6 cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 1 g/l glucose Glutamax-I (Invitrogen) supplemented as above.

### Transfections and infections

SiRNA oligonucleotides (100nM) were transfected with Lipofectamine™ RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The siRNA sequences for human DDR1 were as follows: DDR1#1: 5'-GAAUGUCGCUUCCGGCGUGUU-3'; DDR1#2: 5'-GAGCGUCUGUCUGCGGGUAAU-3' according to published sequences (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). DDR1#3 (SI05130706, Qiagen) targets the 3'UTR of DDR1 mRNA. The antisense strand siRNA was targeted against GTPases using 21-nucleotide sequences 5'-AAGAAGTCAGCATTCTGTC-3' for hRhoA#1, 5'-AAGTTCTTAATTTGCTTTTCC-3' for hRac1#1, and 5'-AAGATAACTCACCCTGTCCA-3' for hCdc42#1 according to published sequences (Deroanne et al., 2003); 5'-AAGGAGATTGGTGCTGTAAAA-3' for hRac1#2 as previously published (Grise et al., 2012); and 5'-AGGTGGATGGAAAGCAGGTA-3' for hRhoA#2 and 5'-GAGATGACCCCTACTATTG-3' for hCdc42#2. A control siRNA targeted against luciferase (CT) 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3' were purchased from Eurofins MWG Operons (Ebersberg, Germany). SiRNAs used for the GEF screen were purchased from Qiagen and are referenced in Table 1. The second siRNA sequence for human Tuba were as follows: Tuba#2 5'-GAGCUUGAGGGAACAUAACAAGAUUU-3' as previously published (Rajabian et al., 2009). For transient transfection of MDA-MB-231 cells, the Amaxa Nucleofector kit V (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD, USA) or JET PRIME (PolyPlus, Ozyme) or lipofectamine 2000 (Invitrogen) were used according to the manufacturer's protocols. Five µg of DNA were added per well of a six-well plate. Cells were allowed to grow 24hrs after transfection before use.

For the rescue experiment, cells were transfected with siRNA DDR1 #3 to silence endogenous DDR1 as described above. Two days after, siRNA DDR1 expressing cells were infected with lentivirus particles expressing DDR1-GFP at a multiplicity of infection of 2,5 and selected using puromycin antibiotic at a concentration of 1µg/ml. The rescue was observed comparing proportion of cells able to form linear invadosomes in cells receiving siRNA control to siRNA DDR1 only and siRNA DDR1 + DDR1-GFP. To generate the MDA-MB-231 cell line stably expressing Lifeact-mRuby, cells were transduced at a multiplicity of infection of 10.

### **Cdc42 activity assay**

Cdc42 activity assay was performed by using the G-LISA® Cdc42 Activation Assay Biochem Kit™ (Cytoskeleton Inc., CO, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **Gelatin degradation assay**

Coverslips were coated with Oregon green-gelatin (Invitrogen), fixed with 0.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) and washed three times with PBS (Invitrogen). Cells were seeded on coated coverslips and incubated overnight before fixation and staining.

### **Immunofluorescence and imaging**

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (pH 7.2) for 10 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, and incubated with various antibodies. Cells were imaged with a SP5 confocal microscope (Leica, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) by using a 63×/numerical aperture (NA) 1.4 Plan Neofluor objective. To prevent contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging.

### **Collagen polymerization and linear invadosome quantification**

Collagen polymerization and linear invadosome quantifications were made as previously described (Juin et al., 2012). Briefly, confocal images of isolated cells were obtained using an SP5 confocal microscope (Leica) by using a 63×/NA 1.4 Plan NeoFluor objective. Cell surface area was measured upon phalloidin staining, and Tks5 staining was used as a marker for linear invadosomes. We used a macro with ImageJ software (National Institute of Health) that allowed measurement of all required parameters of linear invadosomes: number, size (using the Feret diameter, the longest distance between any two points), and area (A.U.).

### **Second-harmonic generation imaging of collagen fibers and quantification**

The SHG imaging system consists of a confocal TCS SP2 scanning head (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) mounted on a DMIRE2 inverted microscope (Leica Microsystems) and equipped with a MAITAI femtosecond laser (Spectra Physics, Santa Clara, CA). A 10X dry objective (NA= 0.4; Leica Microsystems) was used for applying an 820-nm excitation to the sample. The SHG signal was collected in the forward direction using the condenser (S1, NA = 0.9–1.4; Leica Microsystems), and the TPEF was epi-collected in the backward direction. IRSP 715 bandpass and

410-nm infrared (IR) filters (10-nm full width at half-maximum, FWHM) were placed before the photomultiplier tube.

All image analysis was performed with the ImageJ software. For collagen quantification, SHG images were thresholded and the average pixels numbers corresponding to collagen were converted to  $\mu\text{m}^2$  multiplying by a factor of 8.583 taking into account the point spread function of the objective. For cell counts, the TPEF images were thresholded and watersheded before performing the “Analyze Particles” function.

### **Invasion assay**

The invasion assay was adapted from Lopez et al. (Lopez et al., 2005). 1 mg/mL type I rat tail collagen (BD Biosciences) was used. Costar Transwell inserts (Corning, Cambridge, MA, 8- $\mu\text{m}$  pore) and gels were allowed to polymerize at 37°C for 1 hour. Collagen gel matrices were then hydrated with DMEM (Life Technologies) supplemented with 50% fetal bovine serum (Biomedica) for 4 hours. Cells were washed twice in serum-free medium, trypsinized, counted, and placed in the upper chamber of the Transwell insert and allowed to invade for the indicated time points. After invasion, the Transwell inserts were removed from the plate and the quantity of invading cells into the gel matrix was determined by F-actin staining.

### **Western Blotting and immunoprecipitation**

Cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS), sonicated, incubated at 95°C for 5 min and loaded onto a 10% or 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Sigma), blocked with 5% bovine serum albumin and probed with primary antibody overnight. Membranes were then washed and incubated with the corresponding secondary antibody and signals were acquired and quantified with the Odyssey system (LI-COR® Biosciences).

### **Biosensor assay and FRET analysis**

Raichu-Cdc42 biosensor was used for FRET imaging to measure Cdc42 activity (Aoki & Matsuda, 2009). MDA-MB-231 cells transfected with the biosensor were plated in  $\mu$ -Dish 35 mm, high glass bottom (Ibidi) coated with type I collagen. Two hours later, living cells were imaged using an inverted microscope (Nikon TE Eclipse) equipped with motorized heated and CO<sub>2</sub>-regulated incubator. Images were taken using a Nikon 100X PL APO VC 1.4 oil objective and captured with an EMCCD Camera (C9100-13, Hamamatsu ImagEM) controlled by the Metamorph 7.0 software. A ratio image of YPF/CFP was created to represent FRET efficiency, which correlated with the activities of the G

proteins. Pseudocolored ratio images were generated from images from CFP and FRET channels as described previously (Hodgson et al., 2006). For quantification, frequency of co localization between active probe and collagen I fibrils were observed and presented as number of cells presenting active probe on collagen I fibrils on number of cells observed (two independent experiments).

### **Videomicroscopy**

MDA-MB-231 cells stably expressing Lifeact-mRuby were transfected with Tks5-GFP construction. The next day after transfection, cells were plated on 14mm glass bottom dishes No. 1.5 thickness (MatTek) beforehand coated with 633 fluorescent collagen type I. Cells were imaged two hours after seeding, with or without PP2 in DMEM 4.5g.L<sup>-1</sup> glucose, HEPES, no phenol red 10% fetal calf serum at 37°C without CO<sub>2</sub>. A picture was taken every four minutes for one hour with SP5 Leica confocal microscope.

### **Colocalization quantification**

For colocalization quantification, we used Colocalization Finder Version 1.2 from Christophe Laummonerie and Jerome Mutterer, (Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, Strasbourg, France) on image J version 1.48 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Results were presented as average of 10 fields quantified.

### **Statistical tests**

Data were reported as mean ± SEM of at least three experiments. Statistical significance ( $P < 0.05$  or less) was determined using a paired *t*-test or ANOVA as appropriate and performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Figure legends:

Figure 1. **DDR1-expressing cells form linear invadosomes.** (A) A549 (left) and MDA-MB-231 cells (right) were cultured on FITC-gelatin, fixed 24hrs after seeding and stained for F-actin (red) and cortactin (green) (degradation area: black). Scale bar: 5 $\mu$ m. (B) A549 cells were seeded for 4hrs on collagen I and were processed for immunofluorescence staining. Top panel, colocalization of cortactin (green) and F-actin (red) at linear invadosomes; the boxed region is magnified (3X) at right. Bottom panels represent confocal images of linear invadosomes (stained for cortactin, green) along collagen I fibrils labelled with 546-succinimidyl-ester (gray). Scale bars: top panel: 10 $\mu$ m, bottom panel: 2 $\mu$ m. (C) The same process was applied on MDA-MB-231 cells. Top panel, colocalization of Tks5 (green) and F-actin (red) at linear invadosomes; the boxed region is magnified (4X) at right. Bottom panels represent confocal images of linear invadosomes (stained for Tks5, green) along collagen I fibrils labelled with 546-succinimidyl-ester (gray and red in merge panel). Scale bars: top panel: 5 $\mu$ m, bottom panel: 2 $\mu$ m. Correlation coefficient of colocalization (collagen I/cortactin  $r=0.15$ ; collagen I/Tks5  $r=0.28$ ; actin/ cortactin  $r=0.30$ ; actin/ Tks5  $r=0.23$ ;  $n=10$ ). (D) Quantification of the percentage of A549 and MDA-MB-231 cells exhibiting invadopodia on gelatin versus linear invadosomes on collagen I. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared to plating on gelatin.

Figure 2. **DDR1 localizes at linear invadosomes and is required for their formation.** (A) Top panel, MDA-MB-231 cells transiently transfected with DDR1-Flag were cultured for 4hrs on collagen I and processed for immunofluorescence staining. All channels of the boxed region are shown magnified (3.5X). F-actin (red) co-localizes with DDR1 (green) and Tks5 (blue) at linear invadosomes. Scale bar: 5 $\mu$ m. Bottom panel, MDA-MB-231 cells stably expressing DDR1-GFP were cultured for 4hrs on collagen I fibrils labelled with 546-succinimidyl-ester and processed for immunofluorescence staining. Scale bar 5 $\mu$ m. The boxed region is magnified (3.5X) at right. Tks5 (red) co-localizes with DDR1 (green) and collagen I (blue). Correlation coefficient of colocalization (actin/DDR1  $r=0.29$ ; DDR1/Tks5  $r=0.11$ ;  $n=10$ ). (B) MDA-MB-231 cells were transfected with control (siCT) or three independent DDR1 siRNAs (DDR1 #1, #2 or #3). Protein extracts were analysed by immunoblotting to determine DDR1 protein expression (anti-DDR1, clone C-20, Santa-Cruz). GAPDH is used as loading control. (C) Cells transfected as described in (B) were seeded 4hrs on collagen I and fixed. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells stained for Tks5 (green) and F-actin (red). Panels on the right show 2.5x zoom of white squares. Scale bar: 5 $\mu$ m. Similar results were obtained

with siDDR1 #2 and #3. (D-F) Downregulation of DDR1 expression significantly decreases the formation of linear invadosomes and their degradation activity. (D) Quantification of the percentage of MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes. Error bars represent the standard error of mean,  $n > 1000$ , three independent experiments, \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared to the control siRNA condition. (E) Quantification of the number of linear invadosomes per cell. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $n > 500$ , three independent experiments, \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared to the control siRNA condition. (F) Bar graph shows the amount of collagen I degraded per cell over the time. Error bars represent the standard error of mean,  $n = 60$  fields, three independent experiments, ns (not statically significant), \*\*\*,  $P < 0.001$ , \*\*,  $P < 0.005$  as compared to the control siRNA condition. Left panel shows representative images of SHG collagen signals 4hrs after seeding of control (siCT) or siDDR1 #1 transfected MDA-MB-231 cells. Cells are stained for Tks5 (red). Scale bar: 100 $\mu$ m.

**Figure 3. DDR1 kinase activity is not necessary for linear invadosome formation and degradation activity.** (A) A549 cells were pre-treated for 1hr with DMSO or 1 $\mu$ M Nilotinib then seeded for 4hrs on collagen I. DDR1 was immunoprecipitated and its phosphorylation level was monitored by blotting with a phospho-tyrosine antibody. Nilotinib treatment efficiently reduced collagen-induced DDR1 phosphorylation (representative of three experiments) (anti-DDR1, clone C-20, Santa-Cruz). (B) MDA-MB-231 cells treated with DMSO or 1 $\mu$ M Nilotinib were seeded on collagen I and fixed 4hrs later. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells stained for Tks5 (green) and F-actin (red). Panels on the right show 3X zoom of white squares. Scale bar: 10 $\mu$ m. Correlation coefficient of colocalization (actin/Tks5 DMSO  $r=0.22$ ; nilotinib  $r=0.19$ ;  $n=10$ ). (C) Scatter plot represents average size of linear invadosomes in control and nilotinib conditions,  $n=15$  cells. There is no significant difference between the two conditions, ns (not statically significant). (D) Quantification of the percentage of cells forming linear invadosomes. Error bars represent the standard error of mean,  $n > 1000$ , three independent experiments. (E) Collagen degradation was monitored by SHG microscopy. Bar graph shows the amount of collagen I degraded per cell over the time. Error bars represent the standard error of mean,  $n = 60$  fields, three independent experiments. (F) MDA-MB-231 cells were pre-treated for 10 minutes with DMSO or the different blocking antibodies at 10 $\mu$ g/ml then cultured for 4hrs on collagen I. [They target the discoidin-like domain, which is outside the collagen-binding site but required for signaling.](#) Shown is the percentage of MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes after treatment. Values are means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

Figure 4. **Linear invadosome formation and activity is independent of Src activity.** (A,B) MDA-MB-231 cells were seeded on gelatin-FITC (top panel) or on a mixed matrix (collagen I/gelatin-FITC) matrix (bottom panel) and treated with 5 $\mu$ M PP2 (Src inhibitor) or DMSO (vehicle). Confocal images show fluorescent gelatin (grey), Tks5 (green) and F-actin (red). Inserts show zooms of white squares. Scale bars represent 10 $\mu$ m. (C) Quantification of the degradation capacity of MDA-MB-231 cells seeded on a mixed gelatin/collagen I matrix treated or not with PP2. The left graph represents the gelatin area degraded per cell after 24hrs. The right graph represents the amount of collagen degraded after 4hrs (n = 30 fields). Data are shown as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (D) MDA-MB-231 cells transfected with control (siCT) or two independent DDR1 siRNAs (DDR1 #1 and #2) were seeded on gelatin or collagen I and treated with PP2. Protein extracts were then analysed by immunoblotting to determine phospho-Src, total Src and DDR1 protein expression (representative of three experiments). (E,F) Western blots performed on SYF and SYF c-Src protein extracts representing respectively protein expression of Src (NL19, Millipore) and DDR1 (D1G6, Cell signalling) in these cells. GAPDH is used as loading control. (G,H) Confocal images of control cells (SYF c-Src) and SYF fibroblasts cultured on gelatin (G) or on a mixed matrix (gelatin/collagen I)(H) for 24hrs and processed for immunofluorescence staining (F-actin: red, Tks5: green, DAPI: blue). Scale bar: 10 $\mu$ m. Inserts on the top show 6.25X zoom of white squares. Bottom inserts represented gelatin degraded pictures.

Figure 5. **Cdc42 drives linear invadosome formation via DDR1.** (A) Western blot analysis of MDA-MB-231 cells transfected with siRNA control (siCT) or two independent siRNA targeting Rac1, Cdc42 or RhoA. GAPDH is used as loading control. Three independent experiments were realized and quantified demonstrating a specific effect on targeted RhoGTPase expression represented on bar graph on the right. (B-C) MDA-MB-231 cells transfected as in (A) were cultured on collagen I for 4hrs, fixed and processed for immunofluorescence staining. (B) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected as in (A) stained for Tks5 (green), F-actin (red). Right panels show 4x zoom of white squares. Scale bar: 10 $\mu$ m. (C) The percentage of siRNA transfected MDA-MB-231 cells able to form linear invadosomes was quantified. Error bars represent the SEM, n>1000, three independent experiments, \*\*\*, P < 0.001 as compared to the control siRNA condition (siCT).

Figure 6. **Activated Cdc42 colocalizes with linear invadosomes, DDR1 and collagen I fibrils.** (A-B) MDA-MB-231 cells transiently transfected with GFP-V12Cdc42 or GFP-N17Cdc42 were cultured for 4hrs on collagen I and processed for immunofluorescence staining. Tks5 (green) co-localizes with GFP-V12Cdc42 (red) at linear invadosomes while GFP-N17Cdc42 (red) does not. Right panels show 4x zoom of white squares. Scale bar: 5 $\mu$ m. Correlation coefficient of colocalization (Tks5/V12Cdc42 r=0.21; Tks5/N17Cdc42 r=-0.11; n=25). (C) Quantification of the percentage of GFP-WTCdc42, GFP-

V12Cdc42 and GFP-N17Cdc42-transfected cells able to form linear invadosomes. Data are means  $\pm$  SEM,  $n > 500$ , three independent experiments. \*\*\*,  $P < 0.001$ . (D) Active Cdc42 level was monitored in MDA-MB-231 cells treated as indicated. Data are means  $\pm$  SEM, three independent experiments. \*\*,  $P < 0.005$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ . (E) MDA-MB-231 stably expressing DDR1-GFP transiently transfected with myc-V12Cdc42 were seeded 4hrs on collagen I and processed for immunofluorescence (DDR1-GFP: green, myc-V12Cdc42: red). Right and bottom panels show 4x zoom of white squares. Scale bar:  $7\mu\text{m}$ . Correlation coefficient of colocalization (DDR1/mycV12Cdc42  $r=0.15$ ;  $n=10$ ). (F) MDA-MB-231 cells were transfected with Raichu-Cdc42 and seeded on 546-succinimidyl-ester-labelled collagen I. Shown are representative images: on the left, pseudocolored ratio image generated from YFP/CFP ratio images represents FRET ratio, which correlates with the Cdc42 activity (in yellow) and on the right collagen I image. Arrows represent co-localization of active probe and collagen I fibrils. Scale bar:  $3\mu\text{m}$ .

**Figure 7. The GEF Tuba is specifically implicated in linear invadosome formation.** (A-B) From left to right, MDA-MB-231 and A549 cells were transfected with control (siCT) or two independent Tuba siRNAs (Tuba #1, #2). Protein extracts were analysed by immunoblotting to determine Tuba protein expression. GAPDH is used as loading control. The graphs show quantification of the percentage of cells able to form linear invadosomes. Error bars represent the standard error of mean,  $n=900$ , three independent experiments, \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared to the control siRNA condition. (C) MDA-MB-231 cells were treated as in (A), seeded 4hrs on collagen I and fixed. Shown are representative confocal images of MDA-MB-231 cells stained for Tks5 (green) and F-actin (red). Panels on the right show 3.5x zoom of white squares. Scale bar:  $5\mu\text{m}$ . Similar results were obtained with siTuba #2. Tuba extinction decreases the capacity of cells to form linear invadosomes. (D) MDA-MB-231 cells stably expressing DDR1-GFP were seeded 4hrs on collagen I and fixed. Immunofluorescence with endogenous Tuba (green) and DDR1-GFP (red) was performed and reveals a co-localization of the GEF Tuba with DDR1. Right panels show 3.3x zoom of white squares. Scale bar:  $10\mu\text{m}$ . Correlation coefficient of colocalization (DDR1/Tuba  $r=0.15$ ;  $n=10$ ). (E) MDA-MB-231 cells were seeded on gelatin (top panel) or mixed matrix (collagen I/gelatin) for 24hrs and 4 hrs respectively, processed for immunofluorescence staining (cortactin: red, Tuba: green). While Tuba is not present on classical invadosomes, it colocalizes with cortactin on linear invadosomes. Scale bar:  $3\mu\text{m}$ .

**Figure 8. DDR1 is required for invasion of invadosome-bearing cells in 3D collagen matrix.** (A) MDA-MB-231 cells were placed for 4hrs into a 3D collagen gel labelled with 546-succinimidyl-ester (red), fixed and processed for immunofluorescence staining (Tks5: green). Scale bar:  $5\mu\text{m}$ . The Z-cut section

is shown at right. White dotted line on left-hand side panel corresponds to focal plane shown in Z-cut section. (B) DDR1 expression in MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siCT) or two siRNAs targeting DDR1 (siDDR1 #1 and #2) was monitored 3 days after cell seeding (anti-DDR1 (D1G6), Cell Signalling). (C-E) MDA-MB-231 cells transfected as in (B) were seeded for invasion assay and allowed to invade the collagen matrix during 1hr or 3 days. Z confocal optical sections were taken. (C) Assays were quantified by measuring an invasion index. The bar graph represents the ratio of the number of MDA-MB-231 cells penetrating the collagen gel/number of seeded cells. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, three independent experiments. \*\*\*,  $P < 0.001$  as compared with control siRNA (siCT). (D-E) Representative confocal images of MDA-MB-231 cells transfected with control siRNA (siCT) or siRNA targeting DDR1 (siDDR1 #1) seeded on collagen I fibrils labelled with 546-succinimidyl-ester. F-actin: green, collagen I fibrils: red. Images were taken 1hr (left-hand side panels) or 3 days after seeding (middle and right-hand side panels). Top panels correspond to focal planes whereas bottom panels represent matched z-cut sections. White dotted lines on the bottom panel correspond to focal planes. One hour after seeding, MDA-MB-231 cells transfected with control or siDDR1#1 are on the top of the gel. Three days later, control MDA-MB-231 cells deeply invaded the collagen plug (D, right panel) whereas DDR1 depleted cells were still on the top of the collagen plug (E, right panel). Scale bar: 50 $\mu$ m.

**Figure 9: Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via Tuba-dependent Cdc42 activation.** Schematic representation of linear invadosome architecture and molecular composition. When cells are seeded on fibrillar type I collagen, DDR1 is activated along the fibrils, leading to the activation of Cdc42 via Tuba GEF and recruiting classical components of invadopodia as N-WASP, cortactin and scaffold protein Tks5 to form linear invadosomes. Linear invadosomes are able to degrade extracellular matrix elements via MT1-MMP and MMP2 (Juin et al., 2012).

Table 1: List of siRNA tested to screen GEFs involved in linear invadosome formation.

**Movie 1:** MDA-MB-231-Lifeact were transfected with Tks5-GFP and seeded on collagen gel labelled with 633-succinimidyl-ester (grey) for 2hrs. Confocal images were taken every 4 min, and the movie was spitted in four channels, F-actin (red), Tks5-GFP (green) and type I collagen (grey), and a merge.

Supplementary Figure 1. (A) **Collagen I increases the degradation activity of cells.** MDA-MB-231 cells were seeded for 24hrs on gelatin or on a mixed gelatin/collagen I matrix. Shown are representative confocal images of gelatin (gray) after degradation. Scale bar: 50 $\mu$ m. Bar graph shows quantification of the gelatin degradation. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (n = 30 fields). \*\*\*\*, P < 0.0001. (B-C) **DDR1 localizes at linear invadosomes.** A549 (B) and MDA-MB-231 (C) cells were cultured for 4hrs on collagen I, fixed with MetOH and processed for immunofluorescence staining. DDR1 (green) (anti-DDR1, 1F10) co-localizes with beta-actin (red). Scale bar: 5 $\mu$ m. The boxed regions are magnified at right: 7.8x and 5x for B and C, respectively.

Supplementary Figure 2. **DDR1 is required for linear invadosome formation in A549 cells and its rescue restores cell capacity to form linear invadosomes.** (A) A549 cells were transfected with control siRNA (siCT) or two independent siRNA targeted against DDR1 (siDDR1 #1 and siDDR1 #2). DDR1 depletion was analysed by immunoblotting (anti-DDR1 (D1G6), Cell Signalling). Tubulin is used as a loading control. (B-C) Cells treated as in (A) were seeded 4hrs on collagen I, fixed and stained for Tks5 (green) and F-actin (red). The graph bar (B) represents the percentage of cells presenting linear invadosomes. Data are means  $\pm$  SEM, n>500, three independent experiments. \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control (siCT) condition. Shown are representative confocal images of A549 cells (C). Scale bars: 5 $\mu$ m. DDR1 depletion severely impairs linear invadosome formation in A549 cells. (D-E) Rescue experiment. MDA-MB-231 cells were transfected with control siRNA (siCT) or siDDR1#3. Two days after transfection, cells were infected with lentiviruses expressing DDR1-GFP in order to rescue DDR1 activity. Cells were seeded 4hrs on collagen I and processed for immunofluorescence stainings. The graph bar represents the percentage of cells able to form linear invadosomes, Error bars represent the standard error of mean, n= 900, three independent experiments, \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control (siCT) condition, \*\*\*, P < 0.001 as compared si DDR1#3 with the si DDR1#3 + DDR1-GFP condition. Shown are confocal images of cells stained for F-actin (red), Tks5 (green) (top panel) or DDR1-GFP (red), Tks5 (green) (bottom panel). Panels on the right show 3.5x zoom of white squares. Scale bars: 10 $\mu$ m.

Supplementary Figure 3. **DDR1 depletion induces a decrease in the number of cells forming invadopodia and associated degradation activity.** (A) MDA-MB-231 cells were transfected with control siRNA (siCT), siDDR1 #1 or siDDR1#2 and seeded 24hrs on fluorescent gelatin matrix. Shown are representative confocal images of degraded gelatin area. Scale bar: 30 $\mu$ m. Bar graph represents quantification of degradation area per nuclei (A.U.). Error bars represent the standard error of mean, n= 120 fields, three independent experiments, \*\*\*, P < 0.001 as compared with the control condition. (B) HuH6 cells were treated as in (A) and protein extracts were analysed by immunoblotting to determine DDR1 protein expression (anti-DDR1, cell signalling). GAPDH is used as

loading control. (C) HuH6 cells were transfected as in (A) seeded 24hrs on fluorescent gelatin matrix and processed for immunofluorescence staining (F-actin: red). Scale bar: 10 $\mu$ m. Bar graph on the right represents quantification of the percentage of Huh6 cells presenting invadopodia. Error bars represent the standard error of mean, n= 900 cells, three independent experiments, \*\*\*, P < 0.001 as compared to the control condition. (D) HuH6 cells were treated as in (A) and seeded 24hrs on fluorescent gelatin. Shown are representative confocal images of degraded gelatin area in each siRNA condition. Scale bar: 30 $\mu$ m. Bar graph represents quantification of degradation area per nuclei (A.U.). Error bars represent the standard error of mean, n= 120 fields, three independent experiments. (E) Huh6 cells stably expressing DDR1-GFP were seeded 24hrs on gelatin and processed for immunofluorescence staining, on left panels (F-actin: blue, Tks5: red and DDR1: green), with the 3x zoom of white square Scale bar: 2 $\mu$ m.

Supplementary Figure 4. **Impact of metalloprotease, DDR1 activity and Src inhibitors on degradation of collagen I.** (A) MDA-MB-231 cells were treated with 5 $\mu$ M GM6001, 1 $\mu$ M nilotinib (one hour of pretreatment with this inhibitor) or 5 $\mu$ M PP2 and seeded 4hrs on collagen I. Cells were fixed and stained with anti-collagen type I cleavage site (Col1  $\frac{3}{4}$  C) antibody. The graph bar represents the quantification of the degraded collagen area per cell (A.U.). Error bars represent the standard error of mean, n= 90 fields, three independent experiments, \*\*\*, P < 0.001 as compared to the control condition (DMSO treatment). (B) Shown are cells treated as in (A) with GM6001, (cleaved collagen: green, F-actin: grey). Scale bar: 20 $\mu$ m.

Supplementary Figure 5. **Effect of metalloprotease, Src and DDR1 kinase activity inhibitors on cell invasion in a 3D collagen matrix.** (A) MDA-MB-231 cells were seeded on the top of a 3D collagen gel labelled with 546-succinimidyl-ester (red). Indicated drugs were added one hour after seeding and cells were incubated for 3 days, fixed and processed for immunofluorescence staining (F-actin: green). Scale bar: 50 $\mu$ m. Top panel upper view of the gel, middle panel inside view and bottom panel z-cut. From left to right, DMSO treated cells (control, vehicle), GM6001 5 $\mu$ M, PP2 5 $\mu$ M and nilotinib 1 $\mu$ M. (B) Quantification of the cell invasion index of the experiment described in (A). The bar graph represents the ratio of the number of MDA-MB-231 cells penetrating the collagen gel/number of cells seeded. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, three independent experiments. \*\*\* P < 0.001, \* P < 0.05 as compared with the control condition (DMSO). (C) MDA-MB-231 cells were seeded on a 3D collagen gel labelled with 546-succinimidyl-ester (red) as in (A) treated with DMSO (control) or GM6001 and processed for immunofluorescence staining (cleaved collagen: green). Shown are representative confocal images of inside view on the top panel and zcut on the bottom panel. Note that in the control condition, the cleaved collagen staining shows the path generated by the cells

inside the collagen gel (visible on the z-cut), whereas no signal is found upon MMP inhibition. Scale bar: 50 $\mu$ m.

## **Acknowledgements:**

We are grateful to Dr. F. Delom (Bordeaux, France), Dr. A. Wiedmann (Tours, France) and Dr. C. Perret (Paris, France) for A549, SYF and Huh6 cell lines, respectively. We thank Drs. S. Courtneidge (La Jolla, USA), P. De Camilli (Yale University, USA), M. Bendeck (Totonto, Canada), R. Wedlich-Soeldner (Martinsried, Germany), G. Longmore (Washington, USA) and M. Matsuda (Kyoto, Japan) for constructs. We thank the Bordeaux Imaging Center for help in fluorescence quantification (BIC) and P. Chavrier and A. Blangy for helpful discussions. A.J. is supported by a predoctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. J.D.M. is supported by a PhD fellowship from INSERM/Région Aquitaine. L.P. is supported by a PhD fellowship from Région Aquitaine. E.H. is supported by a PhD from the Ministère de l'Enseignement Supérieur. This work was supported by grants from ANR-13-JJC-JSV1-0005, l'AFEF (Association Française pour l'Etude du Foie), La Ligue Nationale contre le Cancer and Association pour la Recherche sur le Cancer. V.M. and J.R. are supported by funding from "Equipe Labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2011" and Grant "Institut National du Cancer - Direction Générale de l'Offre de Soins - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 6046".

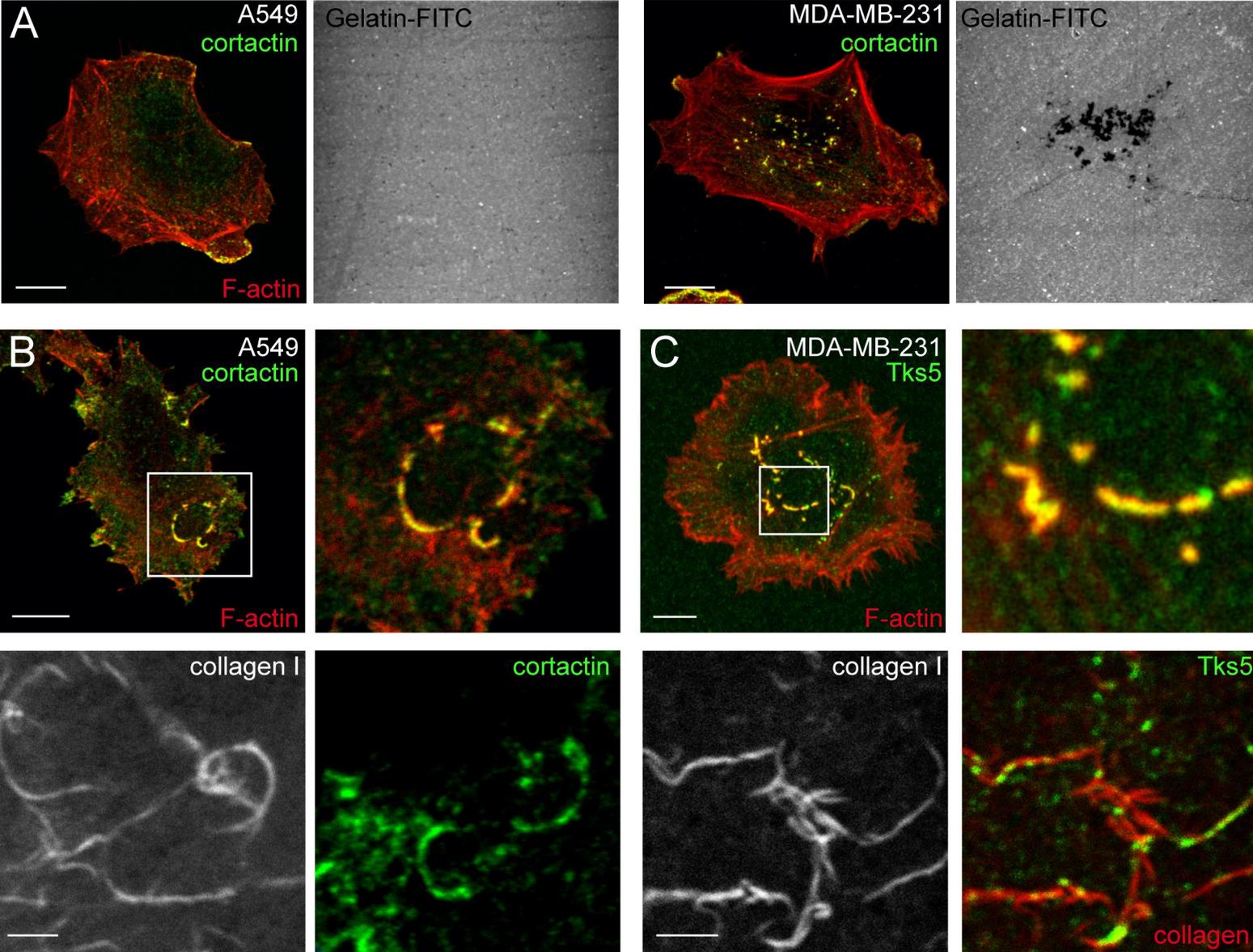
## References:

- Albiges-Rizo, C., O. Destaing, B. Fourcade, E. Planus, and M.R. Block. 2009. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of cell science*. 122:3037-3049.
- Angers-Loustau, A., R. Hering, T.E. Werbowetski, D.R. Kaplan, and R.F. Del Maestro. 2004. SRC regulates actin dynamics and invasion of malignant glial cells in three dimensions. *Molecular cancer research : MCR*. 2:595-605.
- Aoki, K., and M. Matsuda. 2009. Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nature protocols*. 4:1623-1631.
- Ayala, I., G. Giacchetti, G. Caldieri, F. Attanasio, S. Mariggio, S. Tete, R. Polishchuk, V. Castronovo, and R. Buccione. 2009. Faciogenital dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer. *Cancer research*. 69:747-752.
- Azzam, H.S., and E.W. Thompson. 1992. Collagen-induced activation of the M(r) 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer research*. 52:4540-4544.
- Barker, K.T., J.E. Martindale, P.J. Mitchell, T. Kamalati, M.J. Page, D.J. Phippard, T.C. Dale, B.A. Gusterson, and M.R. Crompton. 1995. Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene*. 10:569-575.
- Beaty, B.T., V.P. Sharma, J.J. Bravo-Cordero, M.A. Simpson, R.J. Eddy, A.J. Koleske, and J. Condeelis. 2013. beta1 integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. *Molecular biology of the cell*. 24:1661-1675, S1661-1611.
- Carafoli, F., M.C. Mayer, K. Shiraishi, M.A. Pecheva, L.Y. Chan, R. Nan, B. Leitinger, and E. Hohenester. 2012. Structure of the discoidin domain receptor 1 extracellular region bound to an inhibitory Fab fragment reveals features important for signaling. *Structure*. 20:688-697.
- Cestra, G., A. Kwiatkowski, M. Salazar, F. Gertler, and P. De Camilli. 2005. Tuba, a GEF for CDC42, links dynamin to actin regulatory proteins. *Methods in enzymology*. 404:537-545.
- Cook, D.R., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2013. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*.
- Cook, D.R., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2014. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*. 33:4021-4035.
- Cox, T.R., D. Bird, A.M. Baker, H.E. Barker, M.W. Ho, G. Lang, and J.T. Erler. 2013. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer research*. 73:1721-1732.
- Day, E., B. Waters, K. Spiegel, T. Alnadaf, P.W. Manley, E. Buchdunger, C. Walker, and G. Jarai. 2008. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *European journal of pharmacology*. 599:44-53.
- Dejmek, J., K. Dib, M. Jonsson, and T. Andersson. 2003. Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 103:344-351.
- Dejmek, J., K. Leandersson, J. Manjer, A. Bjartell, S.O. Emdin, W.F. Vogel, G. Landberg, and T. Andersson. 2005. Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 11:520-528.
- Deroanne, C., V. Vouret-Craviari, B. Wang, and J. Pouyssegur. 2003. EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway. *Journal of cell science*. 116:1367-1376.
- Destaing, O., M.R. Block, E. Planus, and C. Albiges-Rizo. 2011. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Current opinion in cell biology*. 23:597-606.

- Destaing, O., E. Planus, D. Bouvard, C. Oddou, C. Badowski, V. Bossy, A. Raducanu, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, and M.R. Block. 2010. beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function. *Molecular biology of the cell*. 21:4108-4119.
- Di Martino, J., L. Paysan, C. Gest, V. Lagree, A. Juin, F. Saltel, and V. Moreau. 2014. Cdc42 and Tks5: A minimal and universal molecular signature for functional invadosomes. *Cell adhesion & migration*. 8.
- Eckert, M.A., T.M. Lwin, A.T. Chang, J. Kim, E. Danis, L. Ohno-Machado, and J. Yang. 2011. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer cell*. 19:372-386.
- Ford, C.E., S.K. Lau, C.Q. Zhu, T. Andersson, M.S. Tsao, and W.F. Vogel. 2007. Expression and mutation analysis of the discoidin domain receptors 1 and 2 in non-small cell lung carcinoma. *British journal of cancer*. 96:808-814.
- Gailhouste, L., Y. Le Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Desille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Fremin, N. Theret, and G. Baffet. 2010. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis. *Journal of hepatology*. 52:398-406.
- Gilkes, D.M., P. Chaturvedi, S. Bajpai, C.C. Wong, H. Wei, S. Pitcairn, M.E. Hubbi, D. Wirtz, and G.L. Semenza. 2013. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer research*. 73:3285-3296.
- Grise, F., S. Sena, A. Bidaud-Meynard, J. Baud, J.B. Hiriart, K. Makki, N. Dugot-Senant, C. Staedel, P. Bioulac-Sage, J. Zucman-Rossi, J. Rosenbaum, and V. Moreau. 2012. Rnd3/RhoE Is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. *Hepatology*. 55:1766-1775.
- Hauck, C.R., D.A. Hsia, D. Ilic, and D.D. Schlaepfer. 2002. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *The Journal of biological chemistry*. 277:12487-12490.
- Hidalgo-Carcedo, C., S. Hooper, S.I. Chaudhry, P. Williamson, K. Harrington, B. Leitinger, and E. Sahai. 2011. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nature cell biology*. 13:49-58.
- Hoshino, D., K.M. Branch, and A.M. Weaver. 2013. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *Journal of cell science*. 126:2979-2989.
- Itoh, R.E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Molecular and cellular biology*. 22:6582-6591.
- Juin, A., C. Billottet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Genot, and F. Saltel. 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Molecular biology of the cell*. 23:297-309.
- Klinghoffer, R.A., C. Sachsenmaier, J.A. Cooper, and P. Soriano. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *The EMBO journal*. 18:2459-2471.
- Konitsiotis, A.D., N. Raynal, D. Bihan, E. Hohenester, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2008. Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. *The Journal of biological chemistry*. 283:6861-6868.
- Koo, D.H., C. McFadden, Y. Huang, R. Abdulhussein, M. Friese-Hamim, and W.F. Vogel. 2006. Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS letters*. 580:15-22.
- Kovacs, E.M., R.S. Makar, and F.B. Gertler. 2006. Tuba stimulates intracellular N-WASP-dependent actin assembly. *Journal of cell science*. 119:2715-2726.
- Leitinger, B. 2011. Transmembrane collagen receptors. *Annual review of cell and developmental biology*. 27:265-290.
- Leong, H.S., A.E. Robertson, K. Stoletov, S.J. Leith, C.A. Chin, A.E. Chien, M.N. Hague, A. Ablack, K. Carmine-Simmen, V.A. McPherson, C.O. Postenka, E.A. Turley, S.A. Courtneidge, A.F.

- Chambers, and J.D. Lewis. 2014. Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell reports*.
- Levental, K.R., H. Yu, L. Kass, J.N. Lakins, M. Egeblad, J.T. Erler, S.F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D.L. Gasser, and V.M. Weaver. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 139:891-906.
- Linder, S., K. Hufner, U. Wintergerst, and M. Aepfelbacher. 2000. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *Journal of cell science*. 113 Pt 23:4165-4176.
- Linder, S., C. Wiesner, and M. Himmel. 2011. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annual review of cell and developmental biology*. 27:185-211.
- Lopez, J.I., T.D. Camenisch, M.V. Stevens, B.J. Sands, J. McDonald, and J.A. Schroeder. 2005. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer research*. 65:6755-6763.
- Miao, L., S. Zhu, Y. Wang, Y. Li, J. Ding, J. Dai, H. Cai, D. Zhang, and Y. Song. 2013. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. *Medical oncology*. 30:626.
- Monteiro, P., C. Rosse, A. Castro-Castro, M. Irondelle, E. Lagoutte, P. Paul-Gilloteaux, C. Desnos, E. Formstecher, F. Darchen, D. Perrais, A. Gautreau, M. Hertzog, and P. Chavrier. 2013. Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *The Journal of cell biology*. 203:1063-1079.
- Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Genot. 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol*. 23:6809-6822.
- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:413-426.
- Rajabian, T., B. Gavicherla, M. Heisig, S. Muller-Altrock, W. Goebel, S.D. Gray-Owen, and K. Ireton. 2009. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nature cell biology*. 11:1212-1218.
- Ramaswamy, S., K.N. Ross, E.S. Lander, and T.R. Golub. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature genetics*. 33:49-54.
- Razidlo, G.L., B. Schroeder, J. Chen, D.D. Billadeau, and M.A. McNiven. 2014. Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly. *Current biology : CB*. 24:86-93.
- Riedl, J., K.C. Flynn, A. Raducanu, F. Gartner, G. Beck, M. Bosl, F. Bradke, S. Massberg, A. Aszodi, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. 2010. Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nature methods*. 7:168-169.
- Ruangpanit, N., D. Chan, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, J. Polarek, C. Yang, J.F. Bateman, and E.W. Thompson. 2001. Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 20:193-203.
- Salazar, M.A., A.V. Kwiatkowski, L. Pellegrini, G. Cestra, M.H. Butler, K.L. Rossman, D.M. Serna, J. Sondek, F.B. Gertler, and P. De Camilli. 2003. Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 278:49031-49043.
- Sato, K., S. Hattori, S. Irie, and S. Kawashima. 2003. Spike formation by fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *Cell structure and function*. 28:229-241.
- Schachtner, H., S.D. Calaminus, A. Sinclair, J. Monypenny, M.P. Blundell, C. Leon, T.L. Holyoake, A.J. Thrasher, A.M. Michie, M. Vukovic, C. Gachet, G.E. Jones, S.G. Thomas, S.P. Watson, and L.M. Machesky. 2013. Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. *Blood*. 121:2542-2552.
- Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2008. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *The Journal of cell biology*. 180:1277-1289.
- Shrivastava, A., C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, and G.D. Yancopoulos. 1997. An orphan receptor tyrosine

- kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Molecular cell*. 1:25-34.
- Takino, T., H. Miyamori, Y. Watanabe, K. Yoshioka, M. Seiki, and H. Sato. 2004. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer research*. 64:1044-1049.
- Tarone, G., D. Cirillo, F.G. Giancotti, P.M. Comoglio, and P.C. Marchisio. 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Experimental cell research*. 159:141-157.
- Valencia, K., C. Ormazabal, C. Zanduetta, D. Luis-Ravelo, I. Anton, M.J. Pajares, J. Agorreta, L.M. Montuenga, S. Martinez-Canarias, B. Leitinger, and F. Lecanda. 2012. Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces cell survival, homing, and colonization in lung cancer bone metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 18:969-980.
- Valiathan, R.R., M. Marco, B. Leitinger, C.G. Kleer, and R. Fridman. 2012. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer metastasis reviews*. 31:295-321.
- Vogel, W., G.D. Gish, F. Alves, and T. Pawson. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Molecular cell*. 1:13-23.
- Wolf, K., M. Te Lindert, M. Krause, S. Alexander, J. Te Riet, A.L. Willis, R.M. Hoffman, C.G. Figdor, S.J. Weiss, and P. Friedl. 2013. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *The Journal of cell biology*. 201:1069-1084.
- Xu, H., D. Bihan, F. Chang, P.H. Huang, R.W. Farndale, and B. Leitinger. 2012. Discoidin domain receptors promote alpha1beta1- and alpha2beta1-integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation. *PloS one*. 7:e52209.
- Yang, K., J.H. Kim, H.J. Kim, I.S. Park, I.Y. Kim, and B.S. Yang. 2005. Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular autophosphorylation and Shc signaling complex formation. *The Journal of biological chemistry*. 280:39058-39066.
- Yang, S.H., H.A. Baek, H.J. Lee, H.S. Park, K.Y. Jang, M.J. Kang, D.G. Lee, Y.C. Lee, W.S. Moon, and M.J. Chung. 2010. Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas. *Oncology reports*. 24:311-319.
- Yeh, Y.C., C.Z. Wang, and M.J. Tang. 2009. Discoidin domain receptor 1 activation suppresses alpha2beta1 integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity. *Journal of cellular physiology*. 218:146-156.



**D**

■ A549  
□ MDA-MB-231

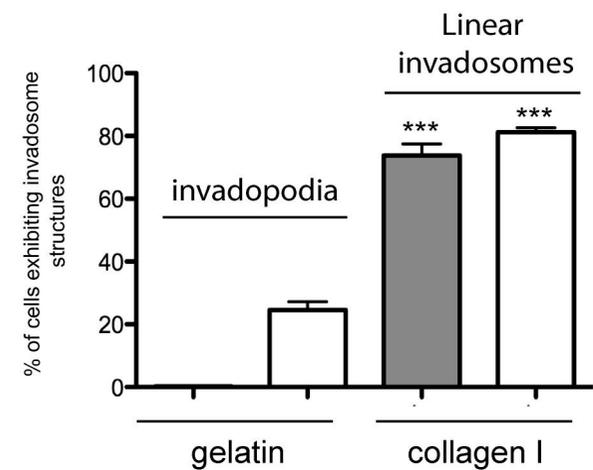


Fig. 1

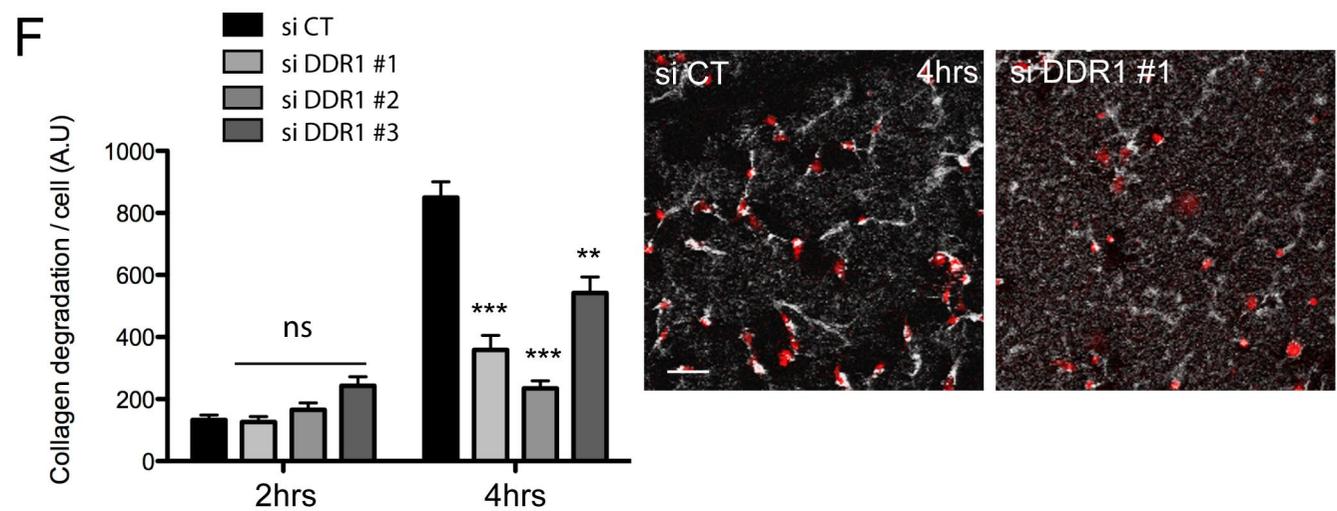
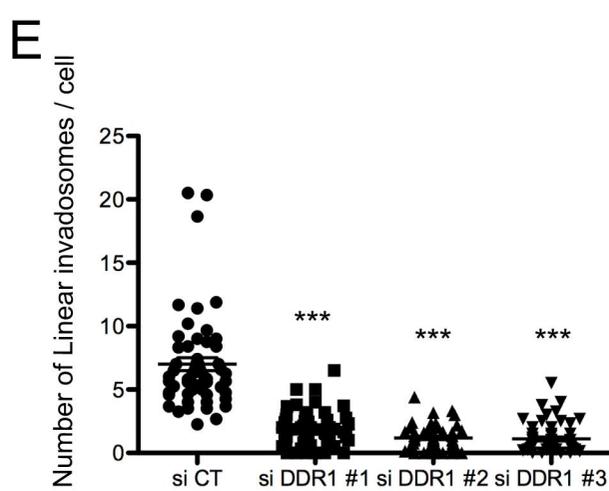
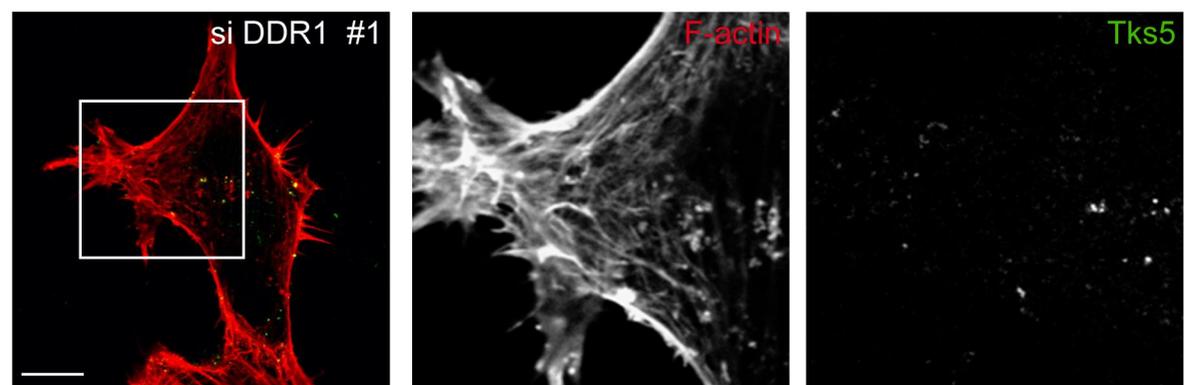
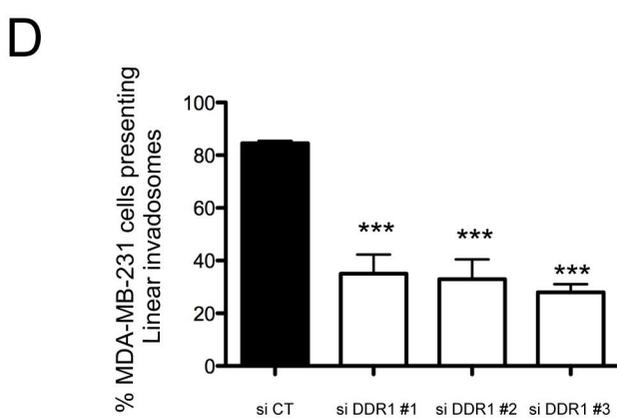
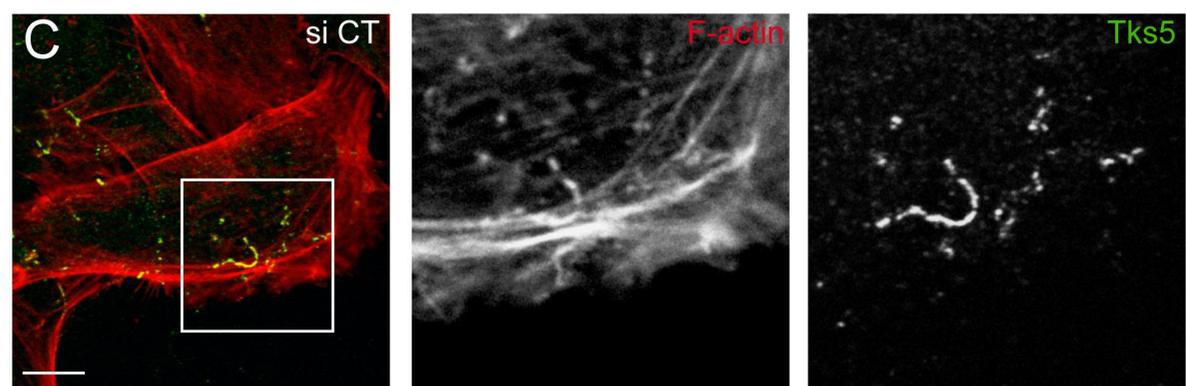
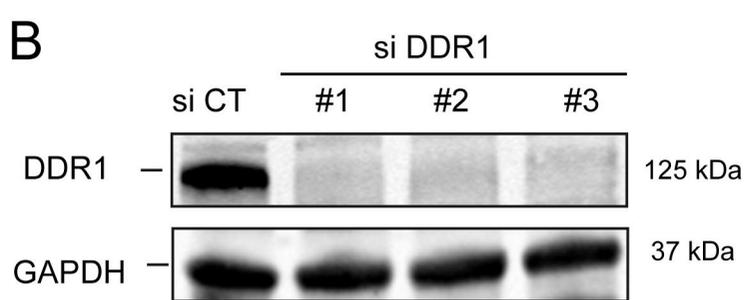
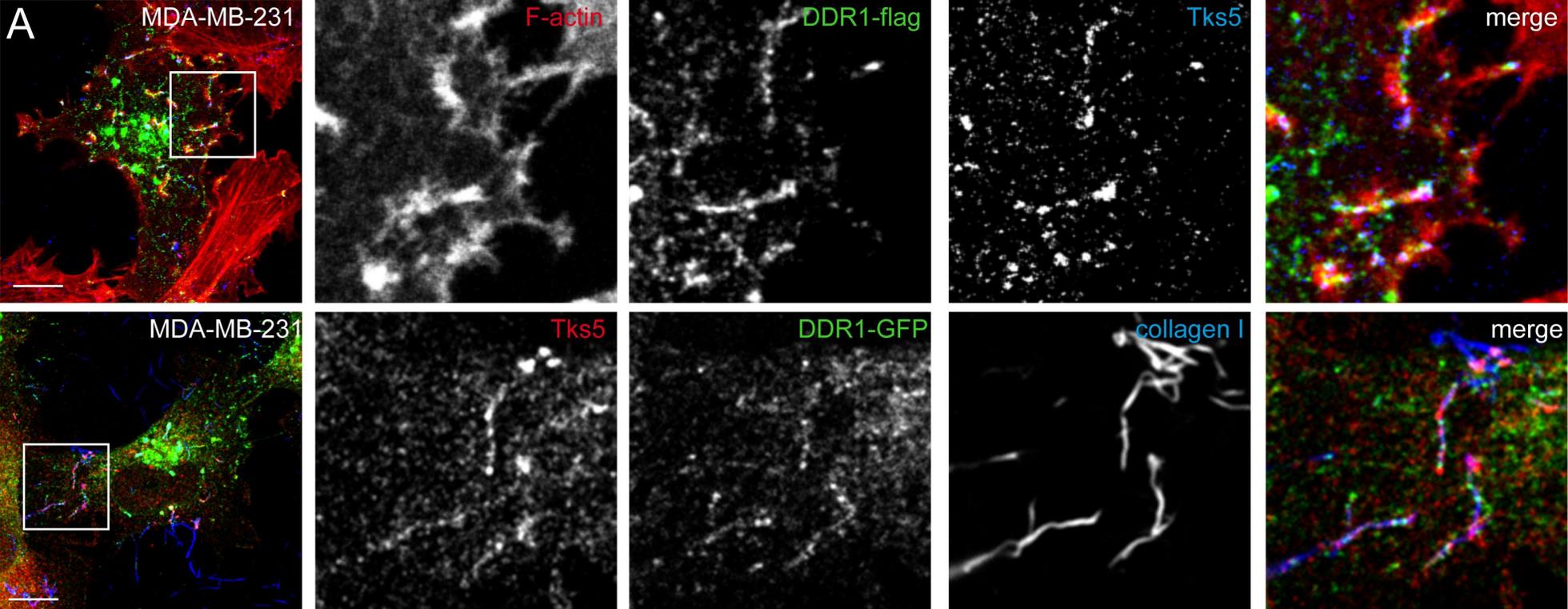


Fig. 2

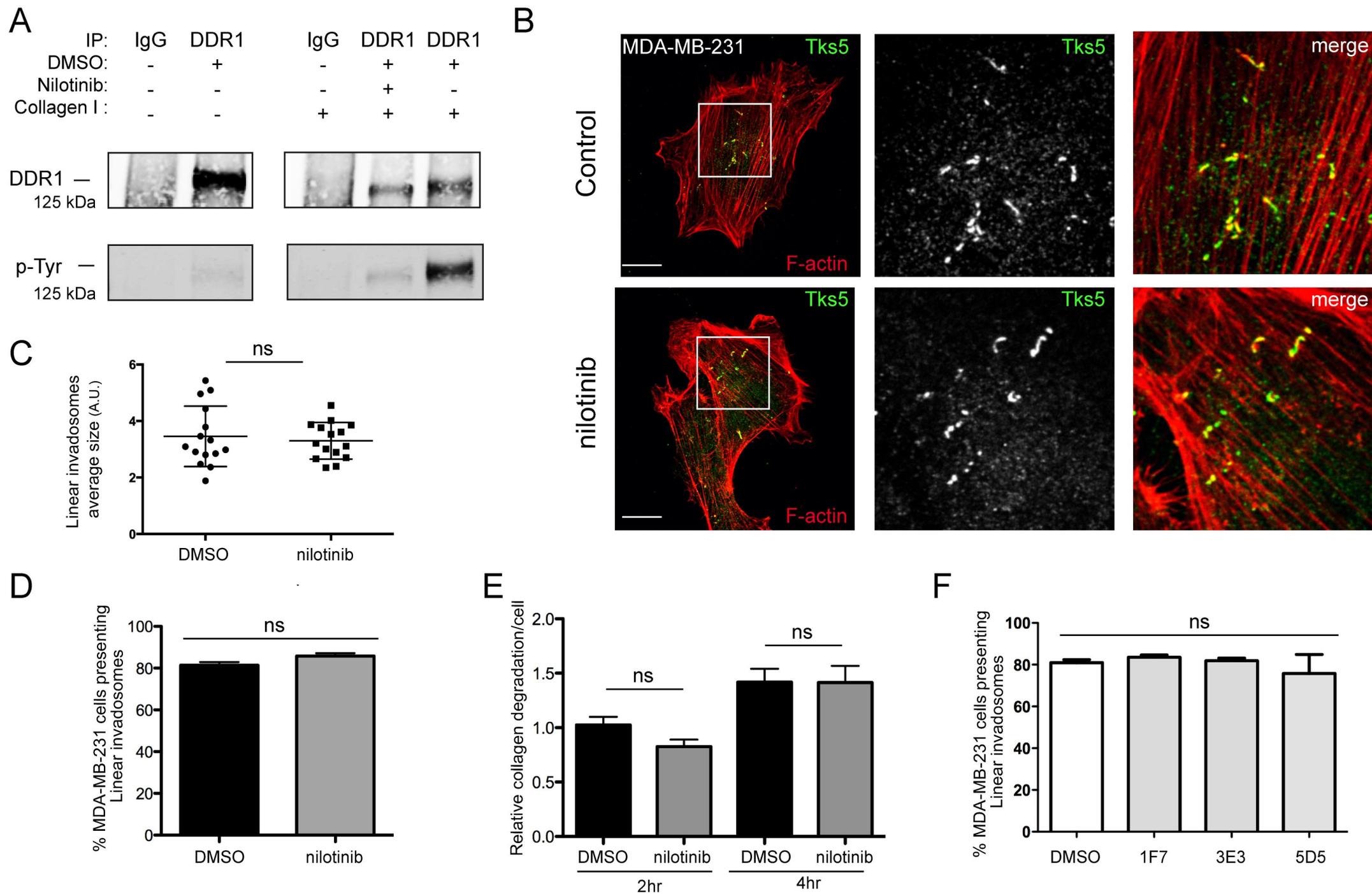


Fig. 3

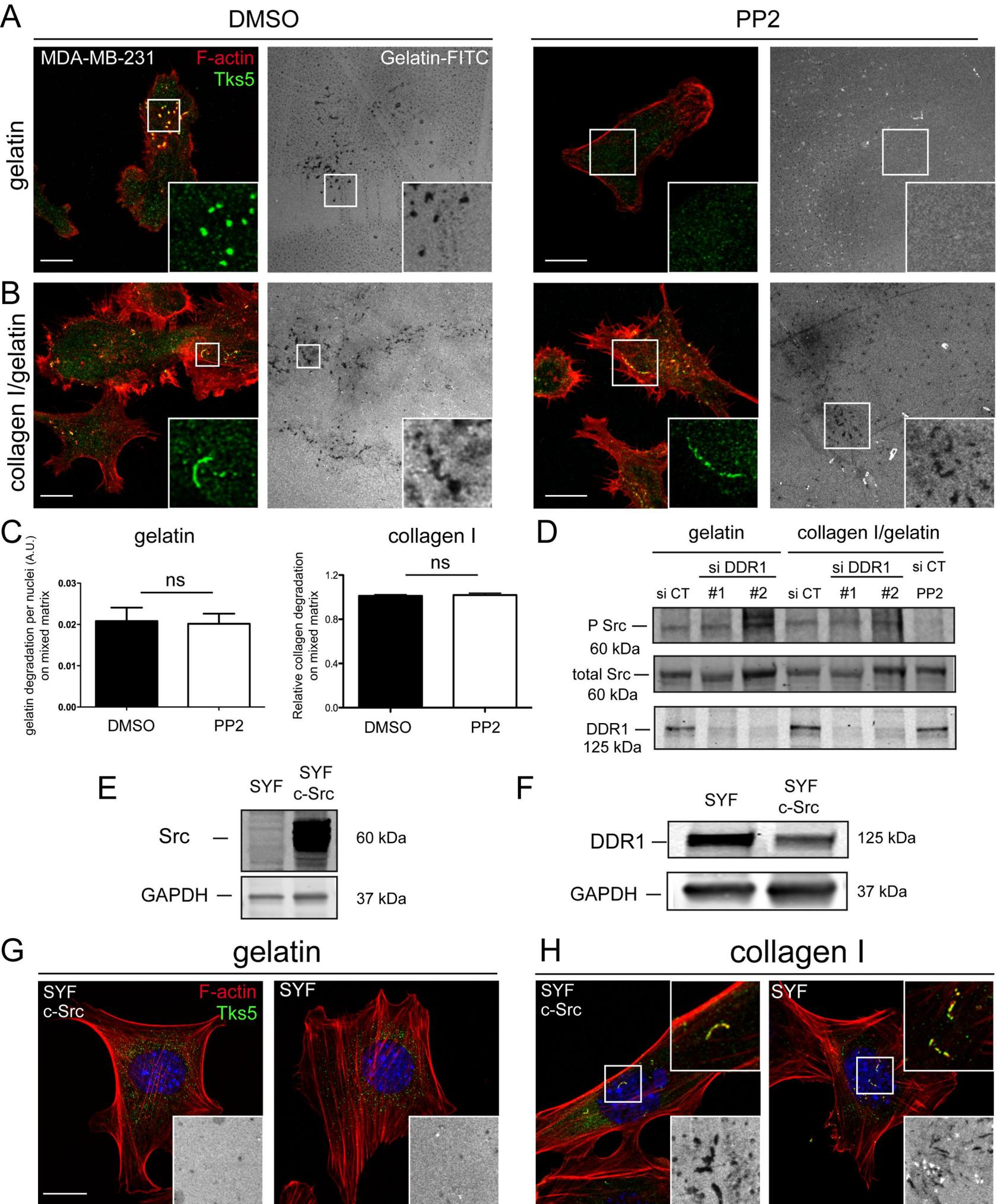


Fig. 4

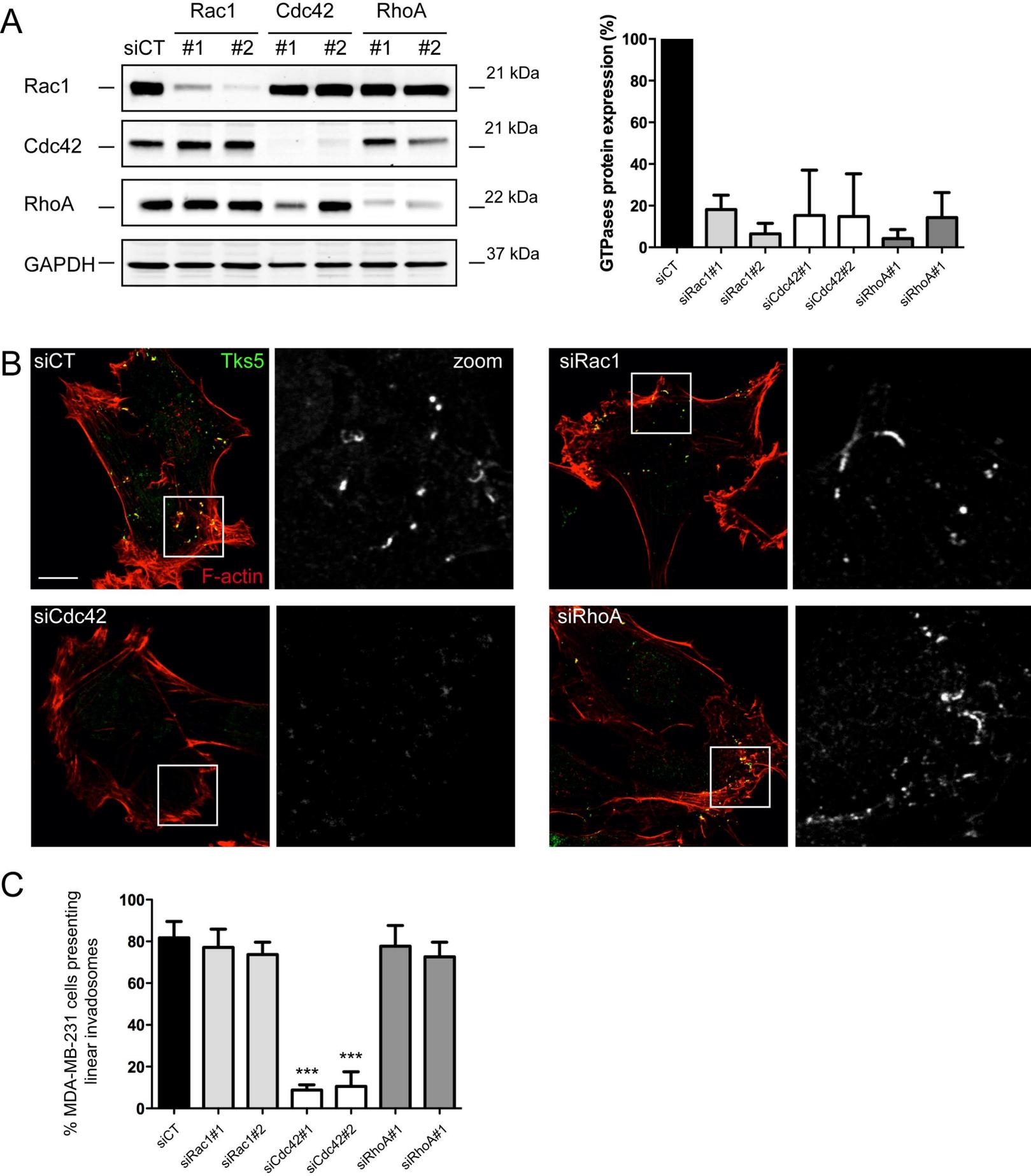


Fig. 5

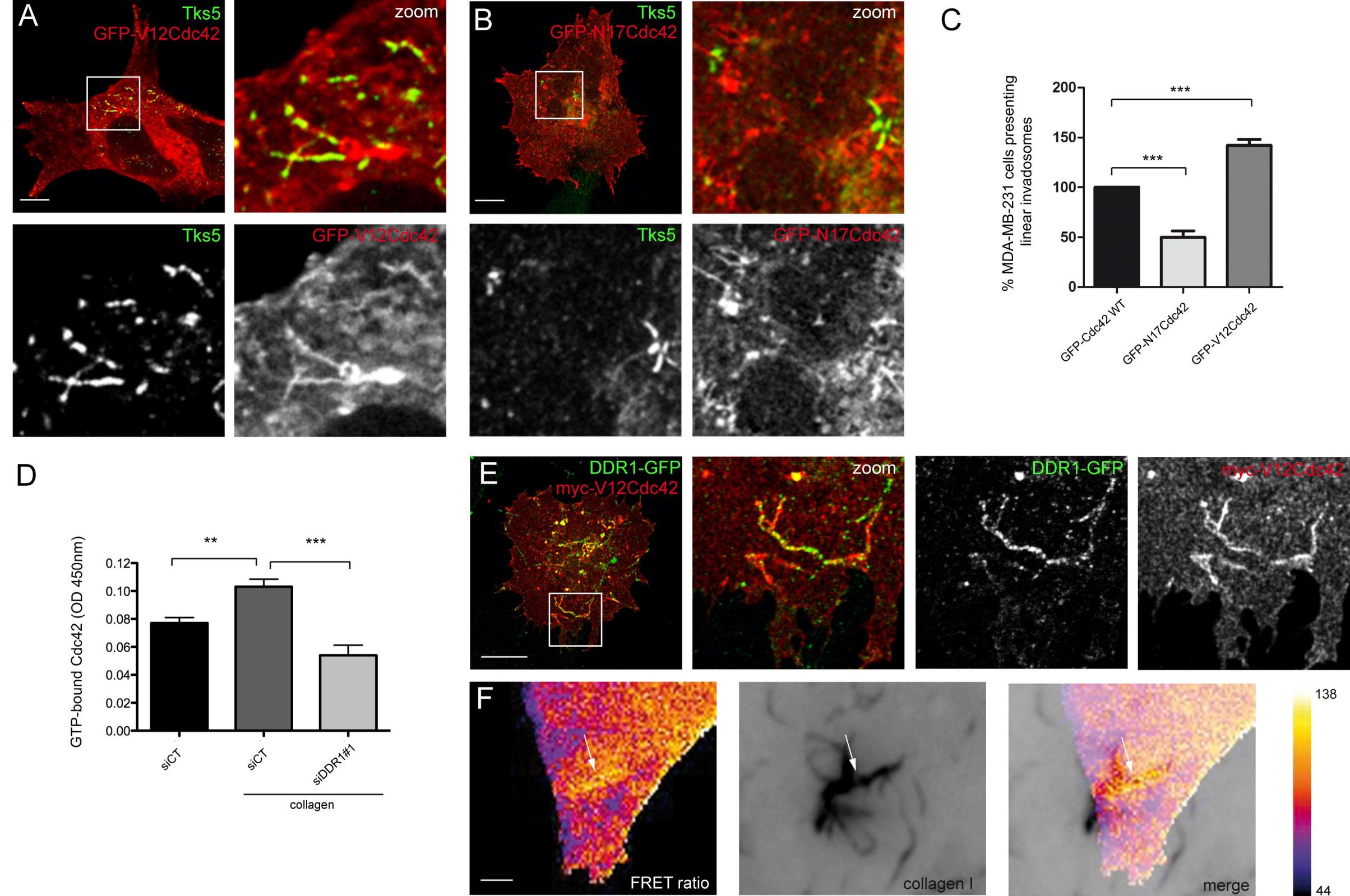
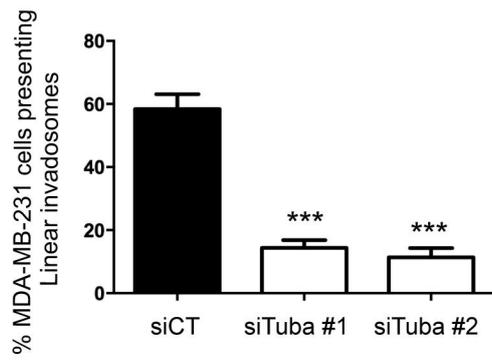
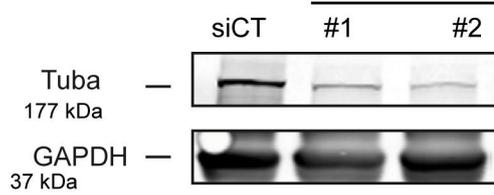


Fig. 6

**A**

MDA-MB-231

Tuba

**B**

A549

Tuba

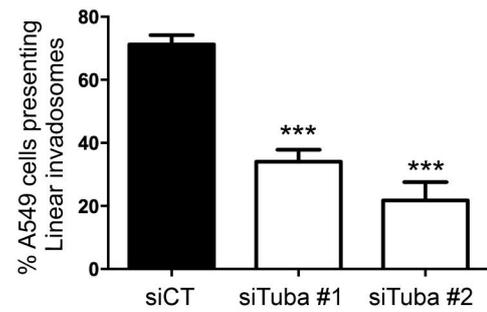
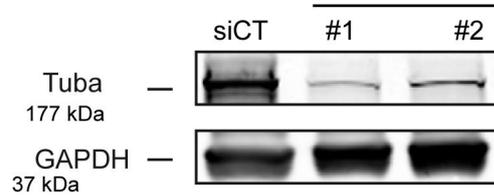
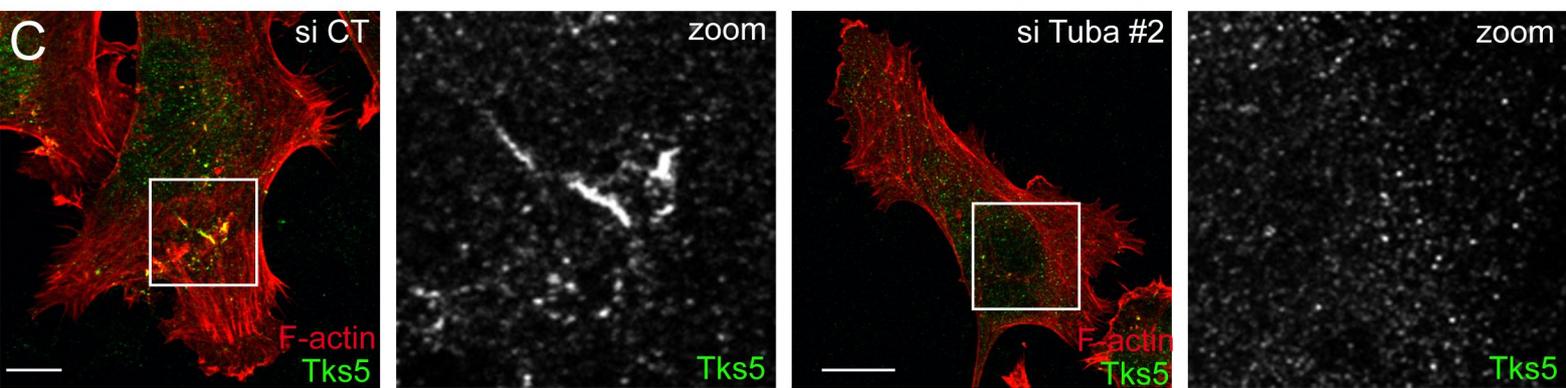
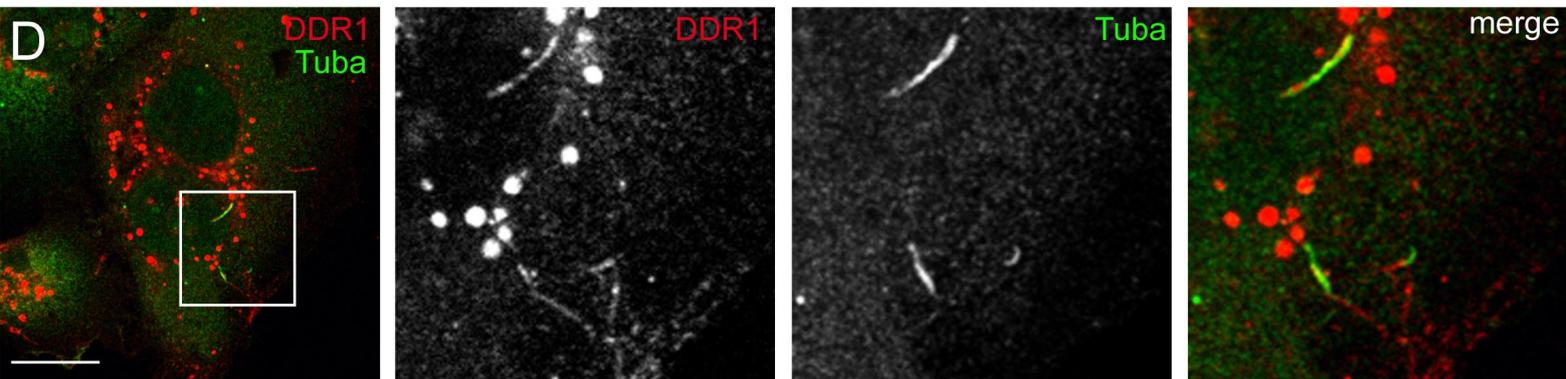
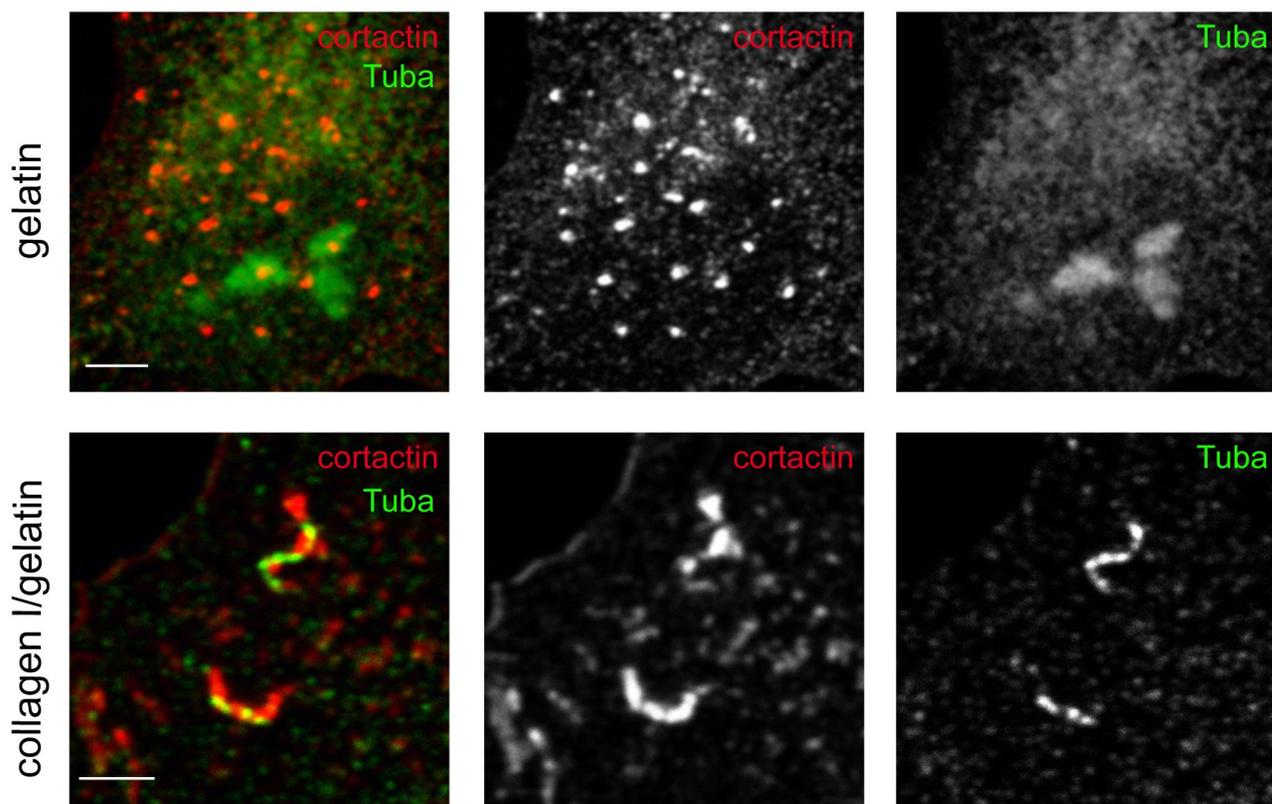
**C****D****E**

Fig. 7

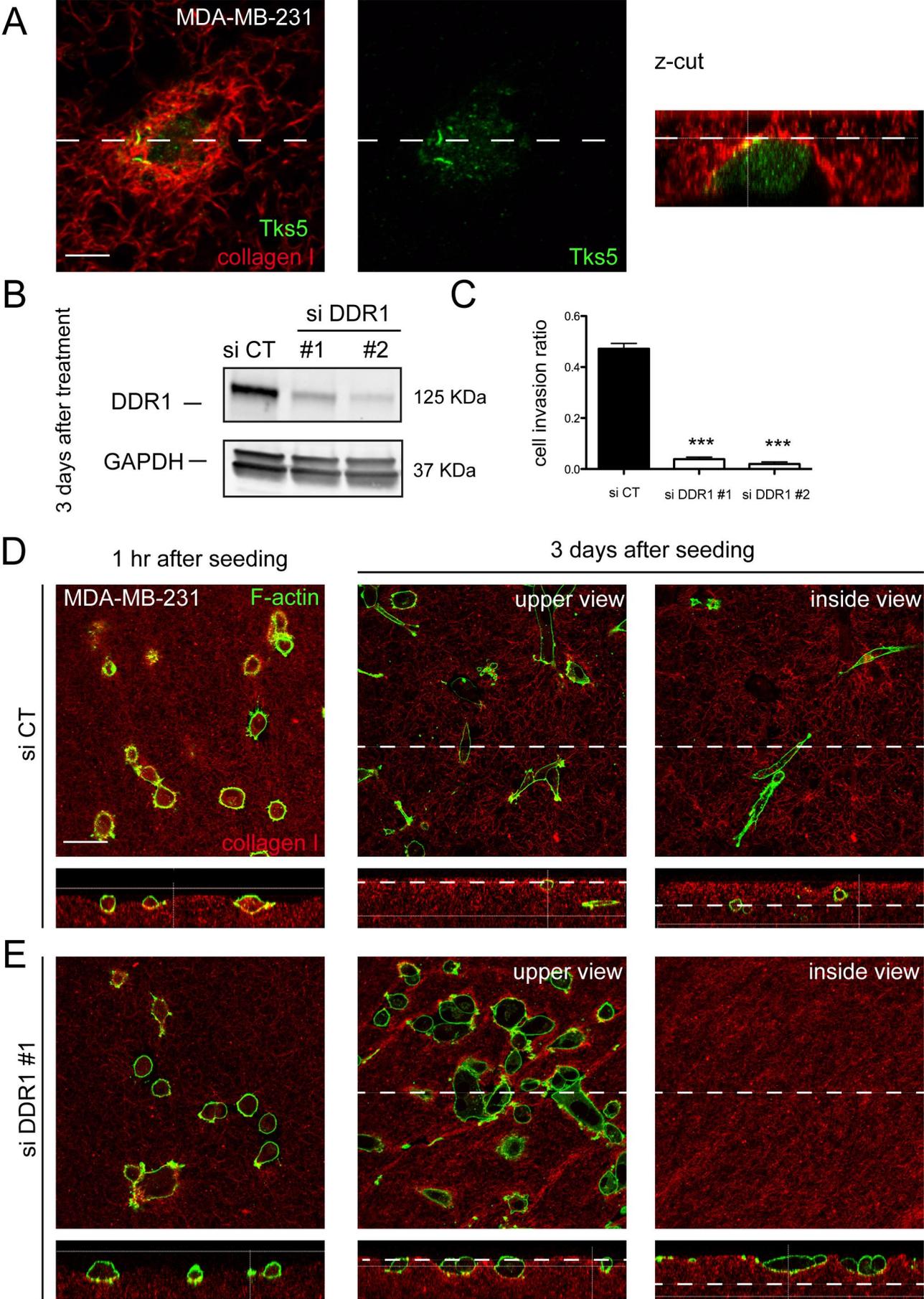
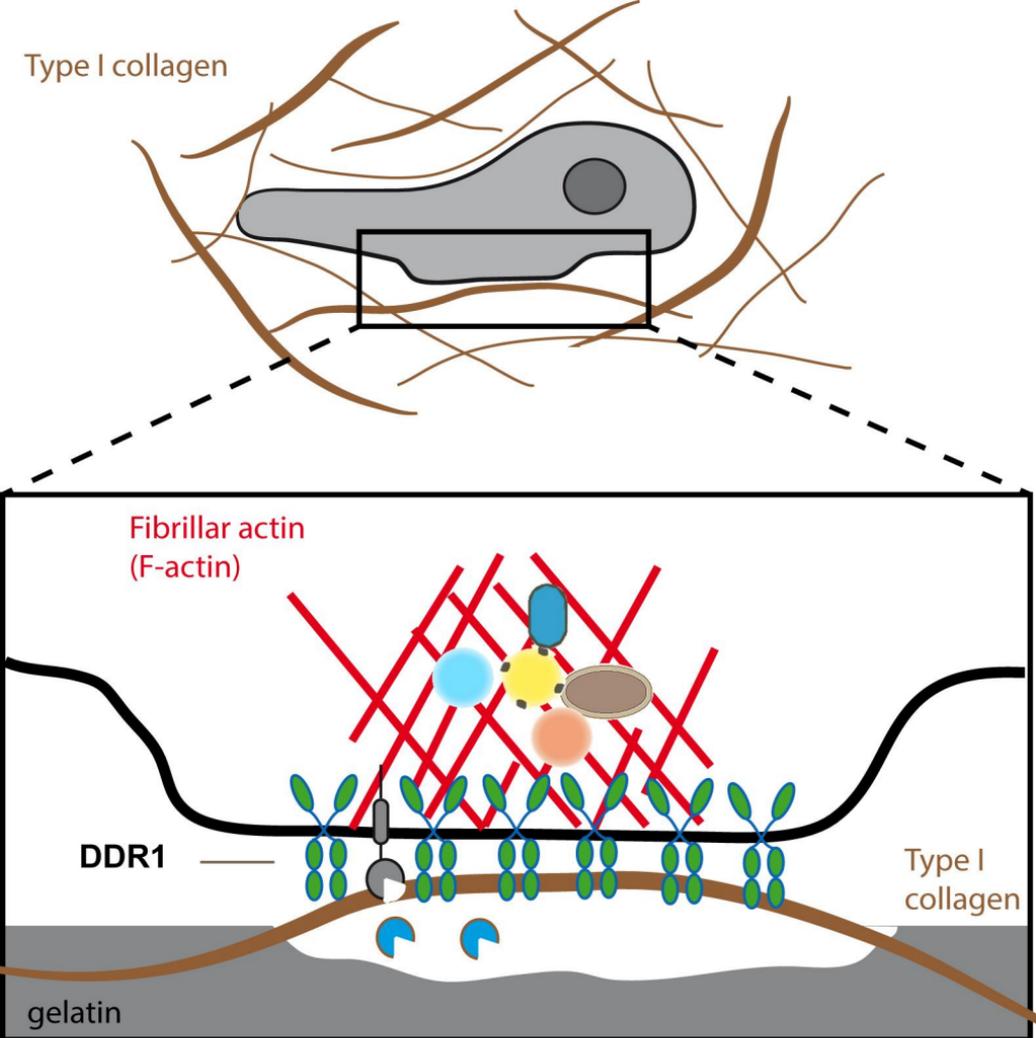


Fig. 8



**DDR1**



**MT1-MMP**



**MMP-2**



**Cdc42**



**Tks5**



**cortactin**



**N-WASP**



**Tuba**

**Fig. 9**

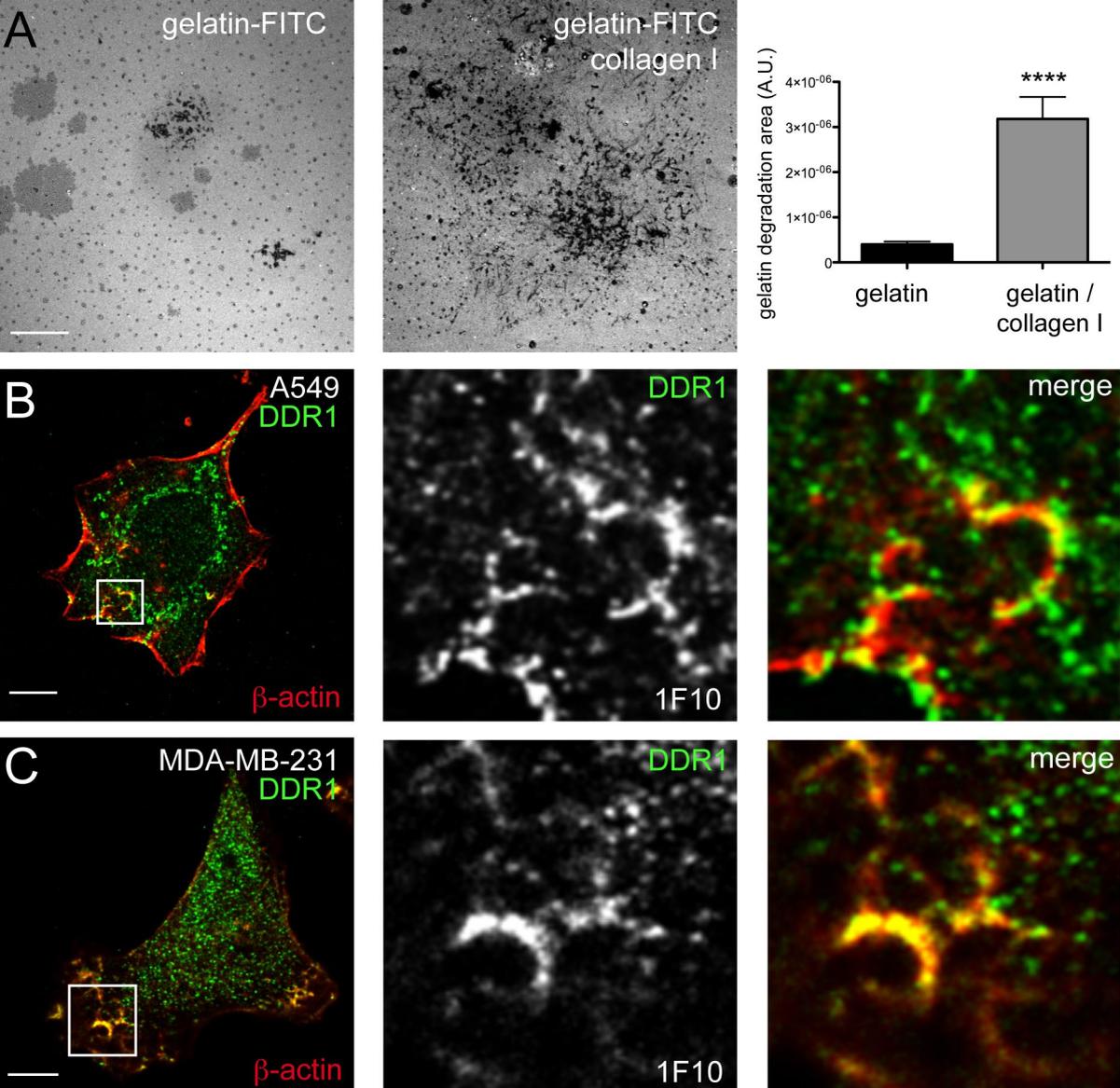


Fig. S1

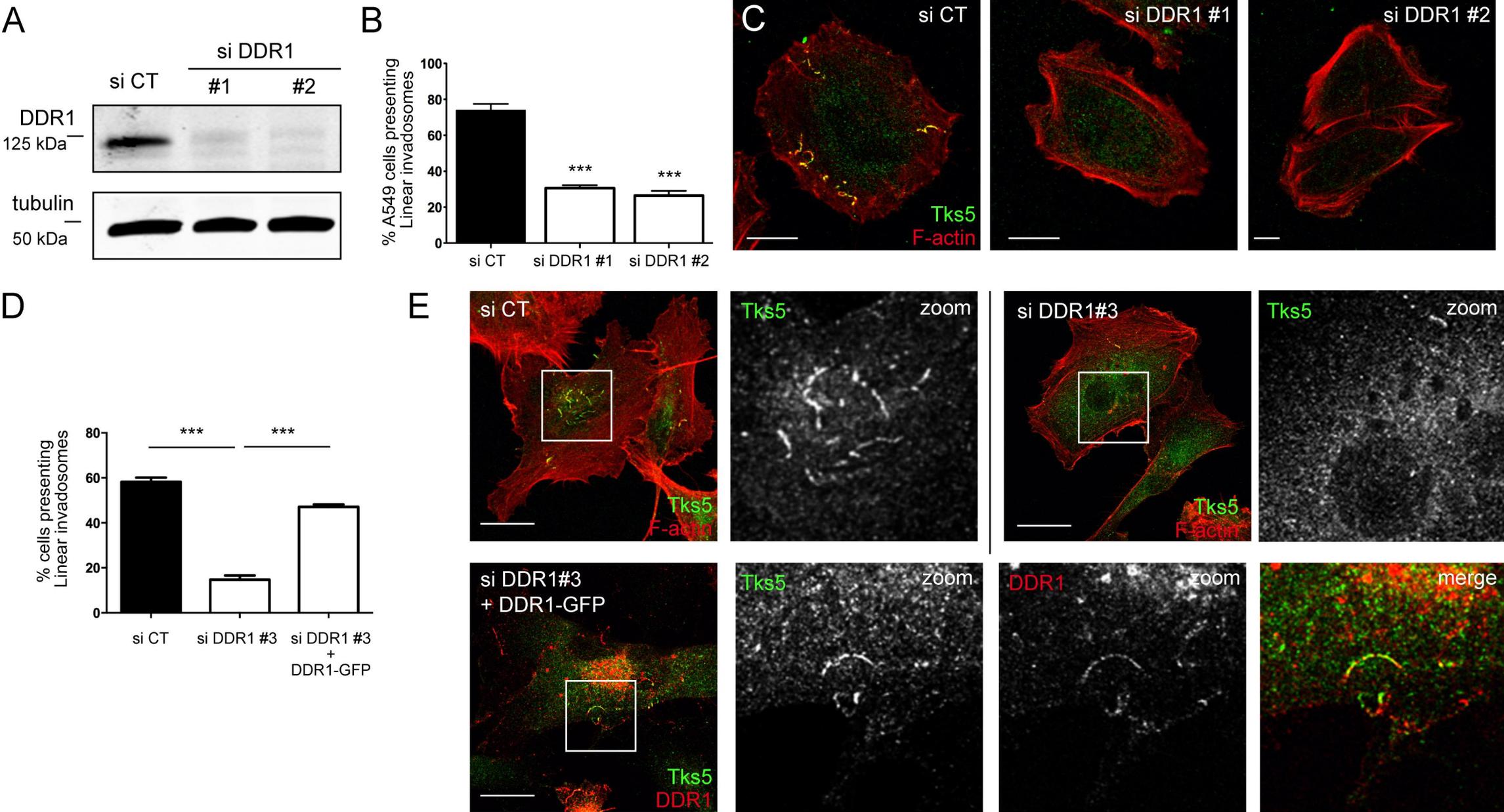


Fig. S2

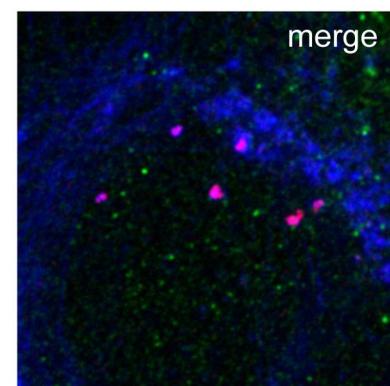
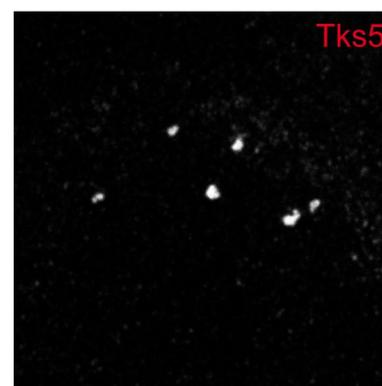
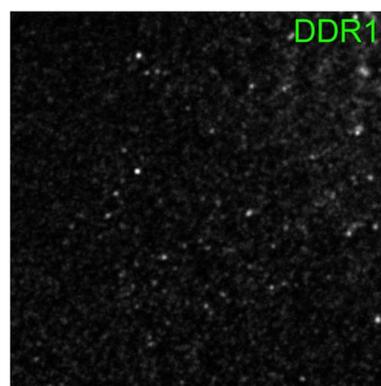
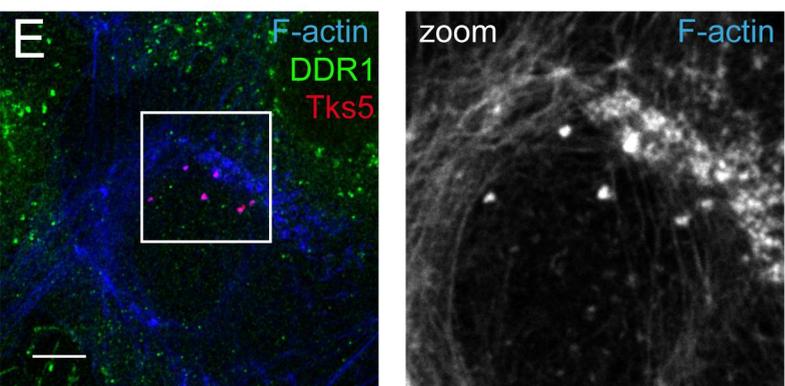
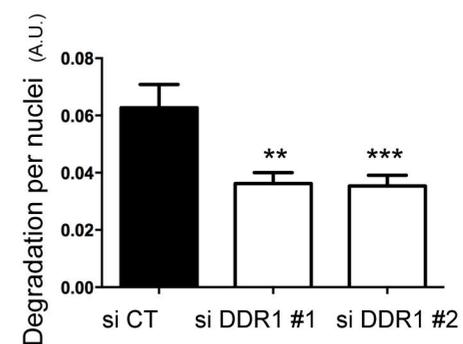
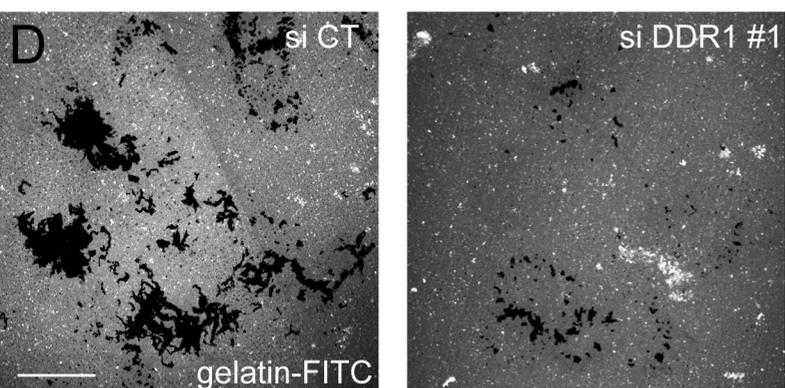
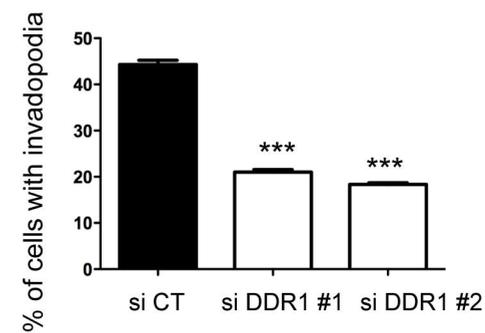
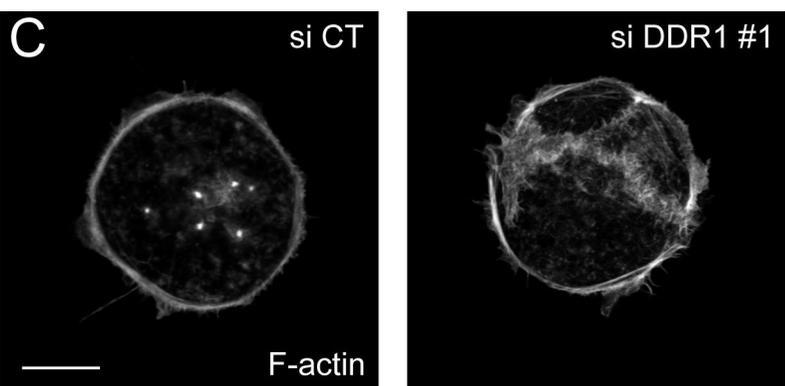
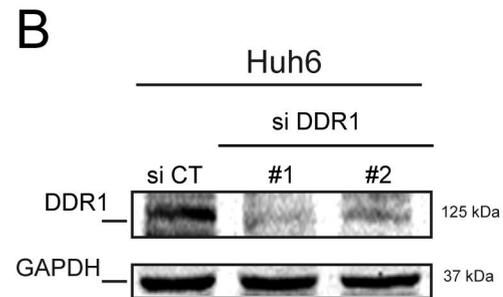
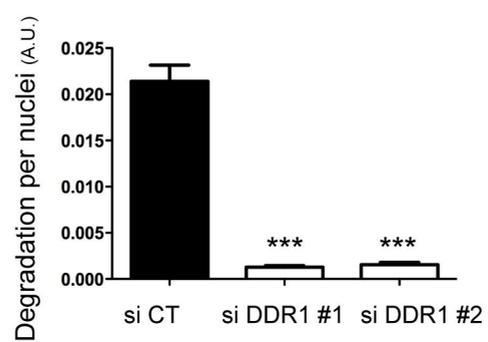
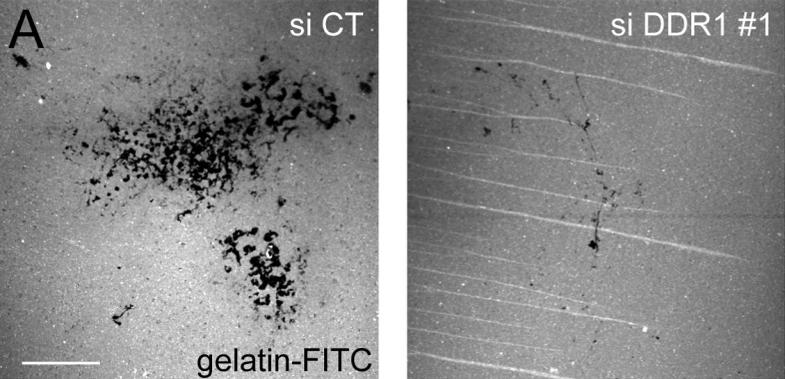


Fig. S3

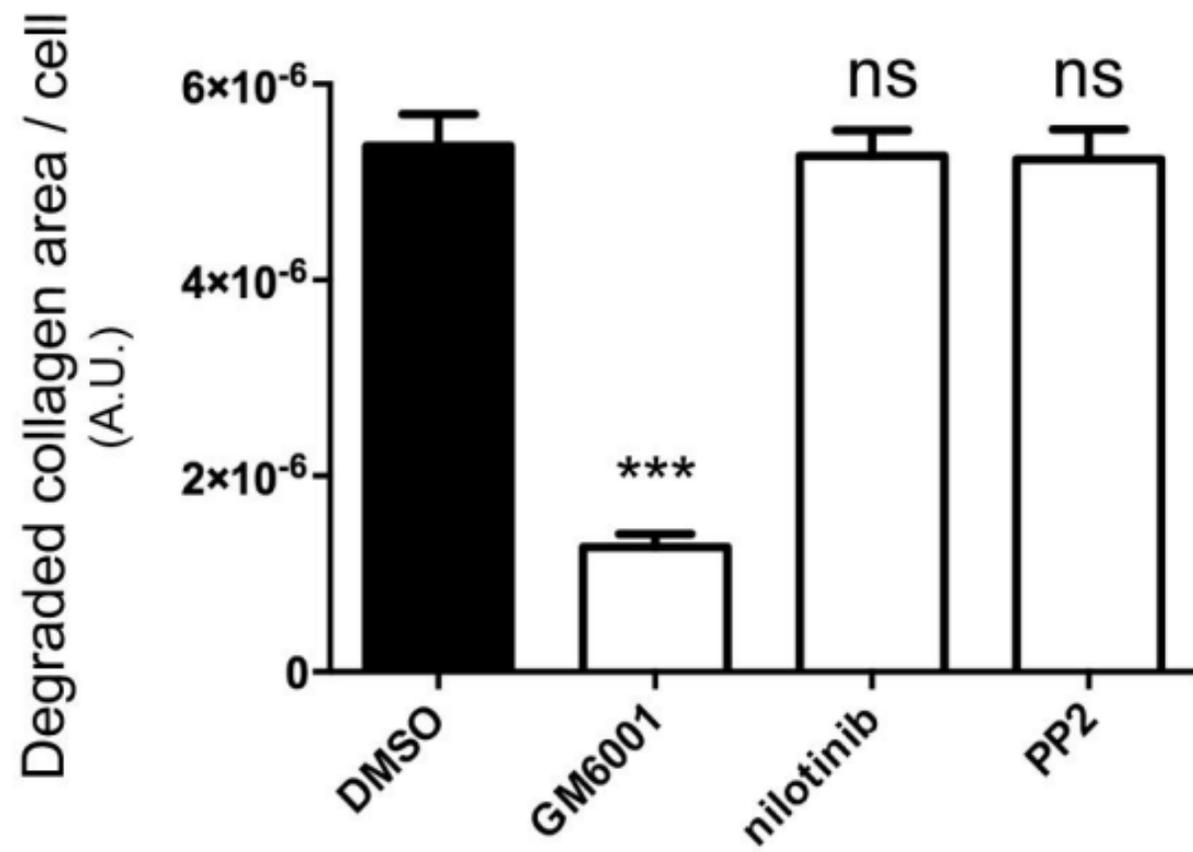
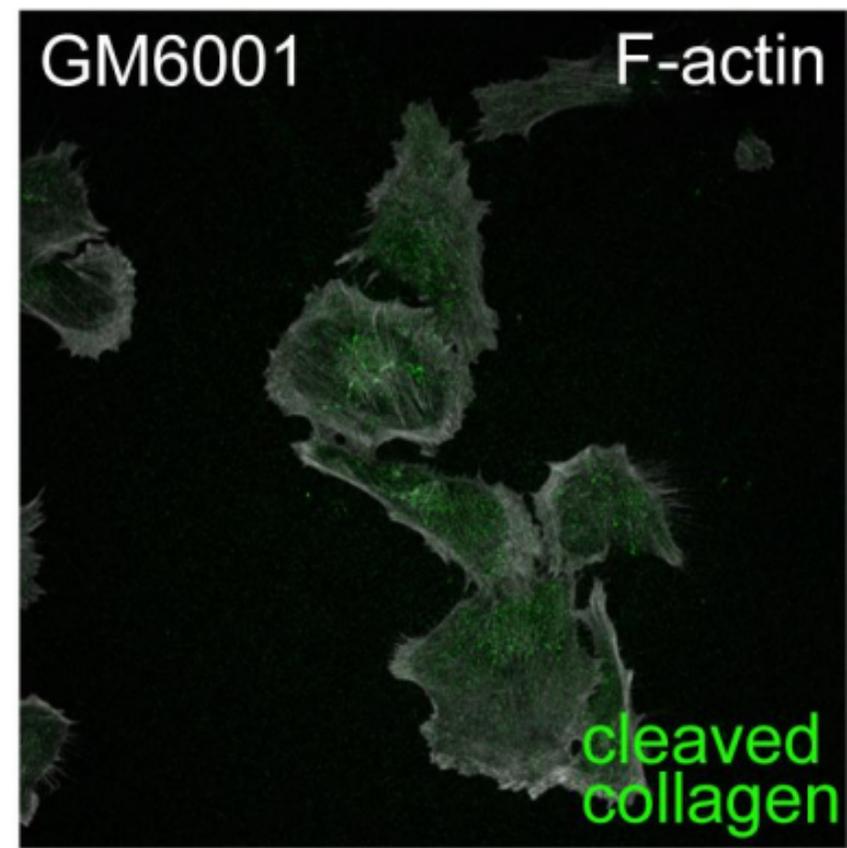
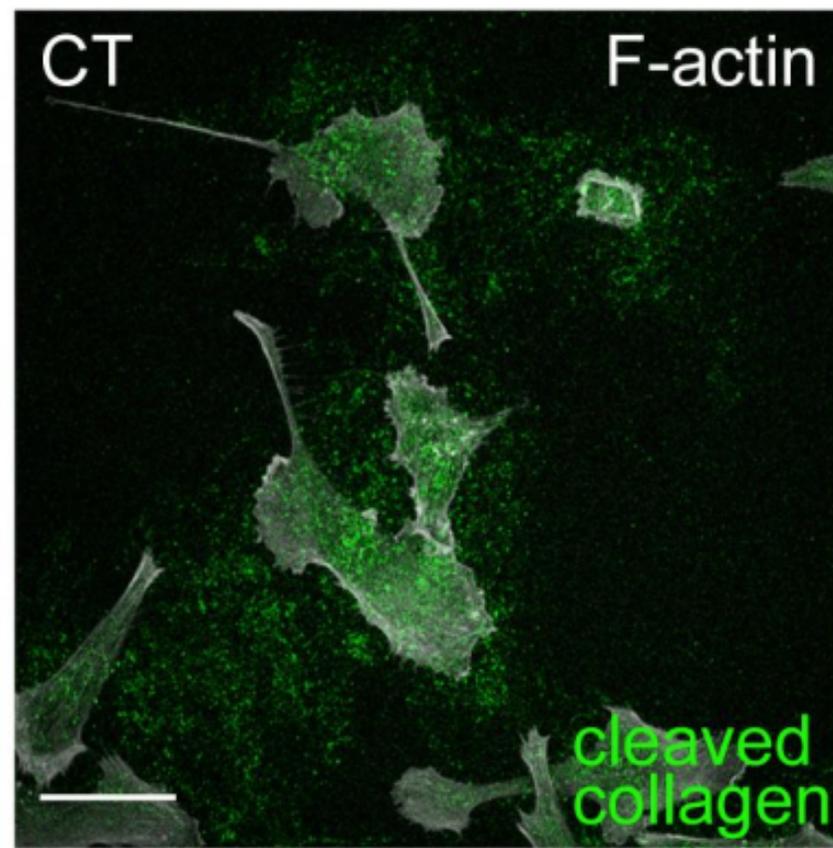
**A****B**

Fig. S4

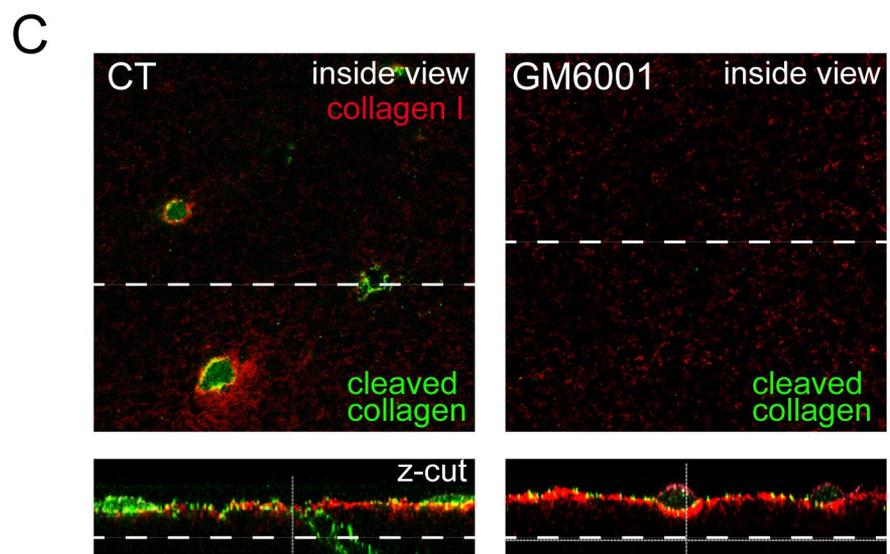
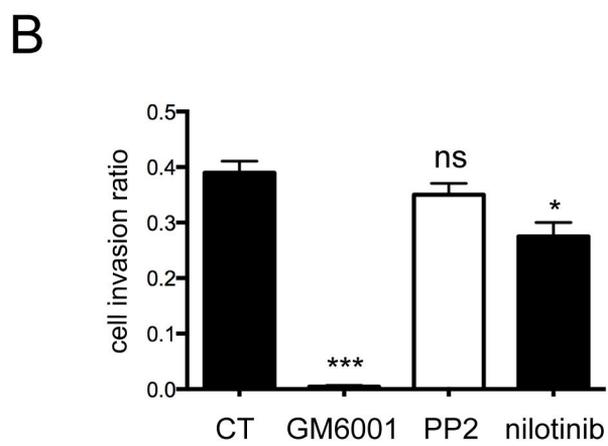
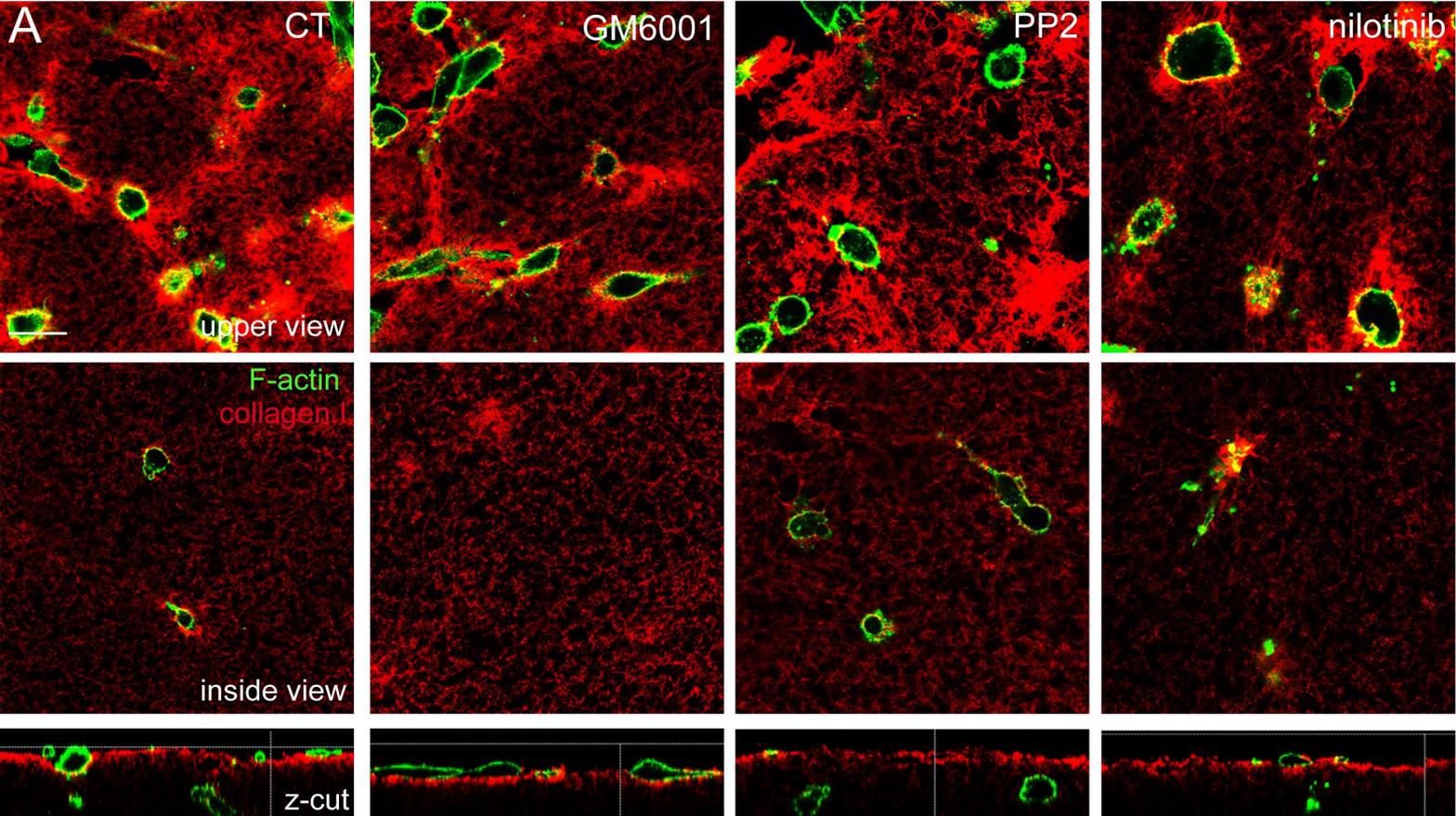


Fig. S5

	NCBI gene symbol	Gene Description	siRNA Target Sequence 5'-3'	provenance
GEF crible	ARHGEF37	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 37	SI03205825	Qiagen
	ARHGEF38	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 38	SI00396781	Qiagen
	ARHGEF4	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	SI00110411	Qiagen
	ARHGEF9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	SI04138498	Qiagen
	DNMBP #1	dynamamin binding protein	SI04220237	Qiagen
	DNMBP #2	dynamamin binding protein	GAGCUUGAGGGAACAUACAAGAUUU	Eurofins MWG Operons
	FARP2	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2	SI00384769	Qiagen
	FARP2	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2	SI04332370	Qiagen
	FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1	SI00386568	Qiagen
	FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1	SI05044494	Qiagen
	FGD2	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	SI00386603	Qiagen
	FGD3	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3	SI04211130	Qiagen
	FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	SI00386652	Qiagen
	ITSN1	intersectin 1 (SH3 domain protein)	SI04161136	Qiagen
	ITSN1	intersectin 1 (SH3 domain protein)	SI05030865	Qiagen
	ITSN2	intersectin 2	SI00086779	Qiagen
	PLEKHG2	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2	SI00686910	Qiagen
	SPATA13	spermatogenesis associated 13	SI04177103	Qiagen

VU :

VU :

**Le Directeur de Thèse  
Doctorale**

(Nom et Prénom)

**Le Responsable de l'École**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINÉAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le Président de Jury,**

(Nom et Prénom)

## Résumé

La fibrose hépatique est un problème de santé publique. Cette pathologie est caractérisée par une accumulation excessive de matrice extracellulaire, composée principalement de collagène, augmentant la rigidité du foie. Environ 90% des hépatocarcinomes se développent sur un foie fibrotique/cirrhotique, laissant présager une relation entre la rigidité tissulaire et le développement tumoral. Pour étudier le rôle des forces exercées par la matrice extracellulaire sur le phénotype des cellules hépatiques, nous avons développé un modèle de culture 3D de cellules hépatiques dans des gels de collagène de rigidités variables. Dans ces conditions, les cellules hépatiques présentent une forte prolifération et un maintien de la différenciation dans les matrices les plus rigides. En parallèle, les cellules hépatiques transformées peuvent modifier la matrice de collagène pour former des signatures de collagène TACS (Tumor Associated Collagen Signatures). Une analyse des voies de signalisation impliquées dans la formation des TACS 3 nous a permis de déterminer 2 voies indispensables pour ces mécanismes: MEK/ERK et MLCK. Le bon maintien des fonctions différenciées et de biotransformation des cellules hépatiques font des cultures 3D en gel de collagène un excellent modèle pour des applications en biotechnologie. Nous avons également développé une technique de quantification standardisée et automatisée du collagène, dans un modèle murin de fibrose hépatique, par utilisation de la microscopie SHG, qui permet de détecter de faibles variations de quantité de collagène. Cette technique permet également de caractériser qualitativement, après analyse d'images, le collagène et de renforcer la discrimination entre les différents stades fibrotiques. La caractérisation des cross-links de collagène, par cette approche, est actuellement en cours d'étude et permettrait d'appréhender les capacités de réversion.

**Mots-clés** : Rigidité matricielle, fibrose hépatique, culture in vitro 3D, microscopie SHG, phénotype hépatique.

## Abstract

Liver fibrosis is a real public health problem. This pathology is characterized by an excessive accumulation of extracellular matrix, mainly composed of collagen, increasing liver rigidity. Approximately 90% of hepatocellular carcinomas develop from a fibrotic/cirrhotic liver, suggesting a relationship between tissue rigidity and tumor development. To investigate the role of stiffness on the hepatic phenotype, we have developed a 3D culture model of collagen gels of varying stiffness. Our results show a better survival, an increase of proliferation and differentiation of liver cells in rigid matrices. In addition, the cells are able to modify the collagen matrix and to form collagen signatures TACS (Tumor Associated Collagen Signatures). An analysis of the signaling pathways involved in the formation of TACS 3 allowed us to determine that 2 pathways are important for these mechanisms: MEK/ERK and MLCK. The high level of differentiated functions and biotransformation of the hepatic cells make 3D collagen cultures an excellent model for applications in biotechnology.

Using the SHG microscopy, we have also developed a standardized and automated quantification of collagen to detect small amount of collagen in a mouse liver fibrosis model. This technique allows us to characterize qualitatively the collagen and to strengthen the discrimination between fibrotic scores. The characterization of the collagen cross-links by this approach is under study and would allow to study the reversion capacity.

**Keywords**: stiffness matrix, liver fibrosis, in vitro 3D cultures, SHG microscopy, hepatic phenotype.