UNIVERSITE DE PARIS

Ecole doctorale n°562 - Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)
Centre de Recherche des Cordeliers INSERM UMRS1138
–
Equipe Prolifération, Stress et Physiologie Hépatique

Mécanismes d'immunosurveillance NKG2D et DNAM-1 dans le carcinome hépatocellulaire

Par Mathilde Cadoux

THESE DE DOCTORAT D'IMMUNOLOGIE

Dirigée par le Dr Jean-Pierre Couty

Présentée et soutenue publiquement à Paris, le 15 novembre 2019

Président du jury	**CREMER Isabelle**	**PU**	**Sorbonne Université**
Rapporteurs	**CALDERARO Julien**	**MCU-PH**	**Université Paris Est Créteil**
	MARTINET Ludovic	**CR1**	**Université de Toulouse**
Examinateurs	**GILGENKRANTZ Hélène**	**DR2**	**Université Paris Diderot**
	HERBELIN André	**DR2**	**Université de Poitiers**
Directeur de thèse	**COUTY Jean-Pierre**	**MCU**	**Université Paris Diderot**

Except where otherwise noted, this work is licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/fr/

Titre

Mécanismes d'immunosurveillance NKG2D et DNAM-1 dans le carcinome hépatocellulaire

Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un cancer grave sans traitement efficace. Le rôle du microenvironnement immunitaire dans le CHC étant essentiel, l'immunothérapie représente une perspective intéressante. Mes travaux de thèse visent à étudier les mécanismes d'immunosurveillance appelés NKG2D et DNAM-1 basés sur la reconnaissance de ligands sur les cellules tumorales reconnus par le récepteur (NKG2D et DNAM-1) sur les cellules immunitaires. Nous montrons que l'expression des ligands de NKG2D (MICA/B et ULBP1/2) sont associés à des CHC agressifs à la fois chez l'Homme chez la souris. Nous avons également observé que l'expression des ligands ULBP1/2 est drastiquement diminuée dans les CHC humains mutés pour la β-caténine et corrèle négativement avec les cibles de la β-caténine. De façon intéressante, nous montrons chez la souris que ces ligands Rae-1 orthologues des ULBP1/2 sont directement inhibés par la β-caténine expliquant en partie le bon pronostic des tumeurs *CTNNB1* mutées. Pour le système DNAM-1, nous avons observé que seules les cellules NKT exprimaient toutes le récepteur DNAM-1 (100%) dans un foie normal et que cette proportion est diminuée dans les CHC mutés pour la β-caténine faisant alors apparaitre, une population de NKT DNAM-1 négatives. L'analyse fonctionnelle de la population NKT DNAM-1 négatives montre qu'elles arborent un phénotype de cellules épuisées ayant perdues leurs capacités anti-tumorales. Mes travaux de thèse ont permis de démontrer le rôle délétère du mécanisme NKG2D dans la tumorigenèse hépatique et dévoilent la présence d'une population épuisée de NKT DNAM-1 négatives dans les CHC mutés pour la β-caténine. L'ensemble de ces résultats montre que les mécanismes NKG2D et DNAM-1 sont moins sollicités dans les CHC mutés β-caténine expliquant leur phénotype peu agressif.

Mots clefs

Carcinome hépatocellulaire, CHC, immunosurveillance, NKG2D, DNAM-1, CD226, NKT, β-caténine, microenvironnement immunitaire, inflammation

Title

NKG2D and DNAM-1 immunosurveillance mechanisms in hepatocellular carcinoma

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a very aggressive cancer without effective treatment. As many studies have shown the essential role of the immune microenvironment in cancer, immunotherapy represents a very interesting perspective for the treatment of HCC. In this context, my thesis work aims to study immunosurveillance mechanisms called NKG2D and DNAM-1 based on the recognition of ligands expressed on tumor cells and recognized by the specific receptor (NKG2D and DNAM-1) on immune cells allowing their activation. First, we analysed the expression of NKG2D ligands (MICA/B and ULBP1/2) in human and in HCC mouse models. We demonstrated that NKG2D ligands expression correlates with aggressive HCCs. We also observed that the expression of ULBP1/2 ligands is drastically decreased in β-catenin-mutated HCC and negatively correlates with the targets of β-catenin signalling. Interestingly, we demonstrate in mouse that NKG2D ligands, Rae-1, ULBP1/2 orthologous in human, are directly inhibited by β-catenin signalling explaining in part the good prognosis of β-catenin-mutated HCC. For the DNAM-1 system, we show that all NKT cells expressed the DNAM-1 receptor (100%) in a normal liver and are reduced specifically in β-catenin mutated HCCs resulting in the presence of a DNAM-1 negative NKT population. Functional analysis of DNAM-1 negative versus DNAM-1 positive populations shows that DNAM-1 negative NKT have an exhausted phenotype and the loss their anti-tumoral capacities. My thesis work demonstrated the deleterious role of NKG2D mechanism in hepatic tumorigenesis and revealed the presence of an exhausted DNAM-1 negative NKT population in β-catenin mutated HCC. Altogether, this work evidenced that the NKG2D and DNAM-1 mechanisms are less solicited in β-catenin-mutated HCC, which would confer the tumors a less aggressive phenotype.

Keywords

Hepatocellular carcinoma, HCC, immunosurveillance, NKG2D, DNAM-1, CD226, NKT, β-catenin, immune microenvironnement, inflammation

Dédicace

A Francis

Aux Chantereau

Et au bon vin

SOMMAIRE

SOMMAIRE 5

ABREVIATIONS 9

TABLE DES FIGURES 12

LE FOIE 14

I. Anatomie 14

II. La structure 14

III. La composition cellulaire 15

A. LES HEPATOCYTES 16
B. LES CHOLANGIOCYTES 16
C. LES CELLULES ENDOTHELIALES 16
D. LES CELLULES ETOILEES 17

IV. Les caractéristiques 17

A. LA REGENERATION HEPATIQUE 17
B. LA POLYPLOÏDIE 18

V. Les fonctions 20

A. UNE « STATION D'EPURATION » 20
B. LA ZONATION HEPATIQUE 20
C. SON SYSTEME IMMUNITAIRE 23

LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE 24

I. Epidémiologie, facteurs de risques et traitements 24

II. Les mécanismes de la cancérogenèse 25

A. AVEC CIRRHOSE 25
B. SANS CIRRHOSE 26

III. Les classifications des CHC 27

IV. Les traitements du CHC 29

A. LES TRAITEMENTS ACTUELS 29
B. L'IMMUNOTHERAPIE DU CHC ET SES PERSPECTIVES 30

IMMUNITE, TOLERANCE, INFLAMMATION ET IMMUNOSURVEILLANCE HEPATIQUE 32

I. Le système immunitaire du foie 32

A. LES MACROPHAGES 32
B. LES CELLULES NATURAL KILLER 33
C. LES CELLULES NATURAL KILLER T 35
D. LES LYMPHOCYTES T 40

II. La tolérance hépatique 41

III. L'inflammation et la fibrose 42
IV. L'immunosurveillance 45
A. LES DEBUTS DE L'IMMUNOSURVEILLANCE 45
B. L'IMMUNO-EDITION 46
C. LES ALARMINES ET IFN DE TYPE I 46
D. LA VOIE C-GAS/STING 48
E. LA RECONNAISSANCE PAR LES CELLULES INNEES 48
LE SYSTEME NKG2D/NKG2DL 51
I. Le récepteur NKG2D 51
A. SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES 51
B. LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE 51
II. Les ligands de NKG2D 52
A. LEUR DIVERSITE ET POLYMORPHISME 53
B. LA REGULATION DES LIGANDS DE NKG2D 54
III. NKG2D dans le cancer du foie 58
LE SYSTEME DNAM-1/DNAM-1L 60
I. Le récepteur DNAM-1 60
A. SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES 60
B. LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE 61
II. Les récepteurs inhibiteurs 62
A. TIGIT 62
B. CD96 63
III. Les ligands 65
IV. DNAM-1 dans le cancer du foie 66
PRESENTATION DE L'ETUDE 70
I. Cohorte de patients 71
II. Les modèles d'études 71
A. MODELE DE TUMORIGENESE PAR LE DIETHYLNITROSAMINE (DEN) 71
B. MODELE DE CHC MUTE POUR LA B-CATENINE 72
C. MODELE APC-KO 73
III. Contexte du laboratoire 73
IV. Projet initial 74
V. Projet de thèse 77
PARTIE 1 : LE SYSTEME NKG2D 78

PARTIE 2 : LE SYSTEME DNAM-1 125

I. Résultats 128

II. Matériel et Méthodes 138

A. MATERIELS 138

B. METHODES 138

III. Discussion 143

IV. Perspectives 149

CONCLUSION GENERALE 151

BIBLIOGRAPHIE 154

ANNEXE 176

ABRÉVIATIONS

- A -

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
a-GalCer	Alpha Galactosyl Céramide
ALAT	Alanine Aminotransférase
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ASAT	Aspartate Aminotransférase
ATP	Adénosine Triphosphate
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related

- B -

BSA	Bovine Serum Albumin

- C -

C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CD	Cluster de Différenciation
cDC	conventional Dendritic Cell
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CLEC4F	C-type Lectin domain Family 4 member F
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CTNNB1	Catenin Beta 1

- D -

DAB	DiAminoBenzidine
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DAP	DNAX-activating proteins
DEN	Diethylnitrosamine
DDR	DNA Damage Response
DKK1	Dickkopf 1
DNAM-1	DNAX Accessory Molecule-1

- E -

EGF	Epidermal Growth Factor

- F -

FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

- G -

GS	Glutamine Synthétase
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3

- H -

H2AX	Histones H2A, membre X
HBS	Hank's Balanced Salt
HDAC	Histone Deacétylase
HE	Hémalun Eosine
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMGB1	High–Mobility Group Box 1
HNF1α	Hepatic Nuclear Factor 1 alpha
HSC	Hepatic Stellate Cells
HSP70	Heat schock protein 70

- I -

IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFNγ	Interféron-gamma
IL10	Interleukine 10
IL6	Interleukine 6
ILCs	Innate Lymphoid Cells
iNKT	invariants NKT
iNOS	inducible NO Synthase
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif

- J -

JAK	Janus Kinase

- K -

KAR	Killer Activating Receptor
KC	Kupffer Cells
KIR	Killer Inhibitory Receptor

- L -

LEF	Late Expression Factor
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen 1
Lpk	Liver pyruvate kinase
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	Liver Sinusoid Endothelial Cells
LT	Lymphocytes T

- M -

MAIT	Mucosal Invariant T Cell
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cells
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MICA/B	MHC class I Chain-related protein A /B

MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMPs	Matrix Metalloproteiases

- N -

NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NK	Natural Killer
NKG2A	Natural Killer Group 2 member A
NKG2D	Natural Killer Group 2 member D
NKG2DL	Natural Killer Group 2 member D Ligand
NO	Monoxyde d'azote
NPC	Non-Parenchymal Cells

- P -

PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed cell Death 1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1
PD-L2	Programmed cell Death Ligand 2
pDC	plasmacytoid Dendritic Cell
PGE2	Prostaglandine E2
PLZF	Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger
PRR	Patterns Recognition Receptors
PVR	Polio Virus Receptor

- R -

RAE-1	Retinoic Acid Early inducible 1
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

- S -

SASPs	Senescence-Associated Secretory Phenotype factors
SLAM	Signaling Lymphocytic Activation Molecule
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STING	Stimulator of Interferon Genes

- T -

TAA	Tumor Associated Antigen
TACTILE	T Cell-Activated Increased Late Expression
TCR	T Cell Receptor
TERC	telomerase RNA Component
TERT	Telomerase reverse Transcriptase
TGFβ	Tumor Growth Factor β
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM
TIM4	T-cell Immunoglobulin Mucin protein 4
TP53	Tumor Protein 53
TRAIL	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

- U -

ULBP	UL16 binding protein

- V -

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHB	Virus Hépatite B
VHC	Virus Hépatite C

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de l'organisation structurale du foie. 15
Figure 2 : Zonation métabolique du foie. 21
Figure 3 : La signalisation Wnt/β-caténine. 22
Figure 4 : Représentation graphique des causes de mortalité par cancer dans le monde. 24
Figure 5 : Les mécanismes de la transformation tumorale et les voies majeures dérégulés dans le CHC. 27
Figure 6 : Classification des CHC. 29
Figure 7 : Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK 34
Figure 8 : Développement et maturation des cellules NKT. 37
Figure 9 : Les types de cellules iNKT dans les différents organes murins. 40
Figure 10 : Tableau récapitulatif des CPA non professionnelles du foie favorisant la tolérance hépatique. 41
Figure 11 : Les étapes de fibrose et de cirrhose lors d'hépatopathies chroniques. 43
Figure 12 : Immunosurveillance versus inflammation. 45
Figure 13 : Les alarmines et leur conséquence sur l'immunité anti-tumorale. 47
Figure 14 : Mécanismes conduisant à l'apoptose de la cellule cible par TRAIL et FasL. 49
Figure 15 : Les récepteurs activateurs et inhibiteurs sur les cellules NK. 50
Figure 16 : Le récepteur NKG2D et ses adaptateurs DAP. 52
Figure 17 : les ligands de NKG2D chez l'Homme et chez la souris. 53
Figure 18 : Le DNA Damage Response. 55
Figure 19 : Le blocage compétitif de MULT1 dans un modèle murin de mélanome. 58
Figure 20 : Cascade de signalisation de DNAM-1 après liaison avec les ligands. 62
Figure 21 : les structures des récepteurs CD226, TIGIT, CD96 et du ligand CD155. 64
Figure 22 : Analyse de la ploïdie dans les tumeurs mutés Ctnnb1 avec ou sans LECT2 et iNKT. 76
Figure 23 : les mécanismes d'immunosurveillance NKG2D et DNAM-1 dans la cancérogenèse hépatique chez l'Homme et la souris. 152

LE FOIE

I. Anatomie

Le foie est un organe appartenant au système digestif qui possède de nombreuses fonctions et des propriétés uniques. Chez l'Homme, il est l'organe le plus volumineux mesurant jusqu'à 20 cm de longueur et pouvant peser jusqu'à 1,5 kg. Il se situe dans la partie supérieure droite de l'abdomen, juste en dessous du diaphragme où il est partiellement protégé par les côtes. Le foie humain est composé de deux lobes : le gauche et le droit alors que chez la souris le foie en possède quatre : le médian, le gauche, le droit et le caudé (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

L'une des particularités du foie est sa vascularisation. Elle est particulièrement importante puisqu'une centaine de litres de sang passe par le foie toutes les heures. Elle est aussi complexe car elle se présente sous la forme d'un système à double entrée (Sheth and Bankey, 2001). En effet, le foie est irrigué par la veine porte (80% de l'apport sanguin) qui apporte du sang provenant de l'intestin, pauvre en oxygène, riche en nutriments, en toxines et en antigènes bactériens mais aussi par l'artère hépatique (20%) qui apporte du sang provenant du cœur, riche en oxygène. Après avoir circulé dans les différents lobes, le sang, épuisé en oxygène et en nutriments, se déverse dans la veine centrolobulaire pour rejoindre la veine cave puis l'ensemble cœur/poumons.

II. La structure

Les cellules du foie sont agencées en unités structurales hexagonales appelées lobules ou acini. Il s'agit d'une organisation très fine entre les voies biliaires et vasculaires (Rappaport et al., 1954). Chaque lobule est organisé autour d'une veine centrolobulaire, qui définit l'espace périveineux et d'où partent des travées d'hépatocytes jusqu'à atteindre une triade portale (l'espace périportal) composées d'une veinule porte, une artériole hépatique et un canal biliaire ***(Figure 1)***.

La vascularisation sanguine du lobule se fait de l'espace périportal vers l'espace périveineux pour atteindre ainsi les travées d'hépatocytes grâce à des capillaires appelés sinusoïdes hépatiques (Wisse, 1970). A l'inverse, la bile synthétisée dans le cytoplasme des hépatocytes est déversée dans les canalicules biliaires formés par les pôles apicaux des hépatocytes pour être acheminée vers les canaux biliaires dans le sens opposé de la circulation sanguine. Au niveau de l'espace porte, la bile passe alors par le canal de Hering puis par le canal biliaire interlobulaire pour rejoindre les canaux biliaires extra-hépatiques et être finalement stockée dans la vésicule biliaire ***(Figure 1)***.

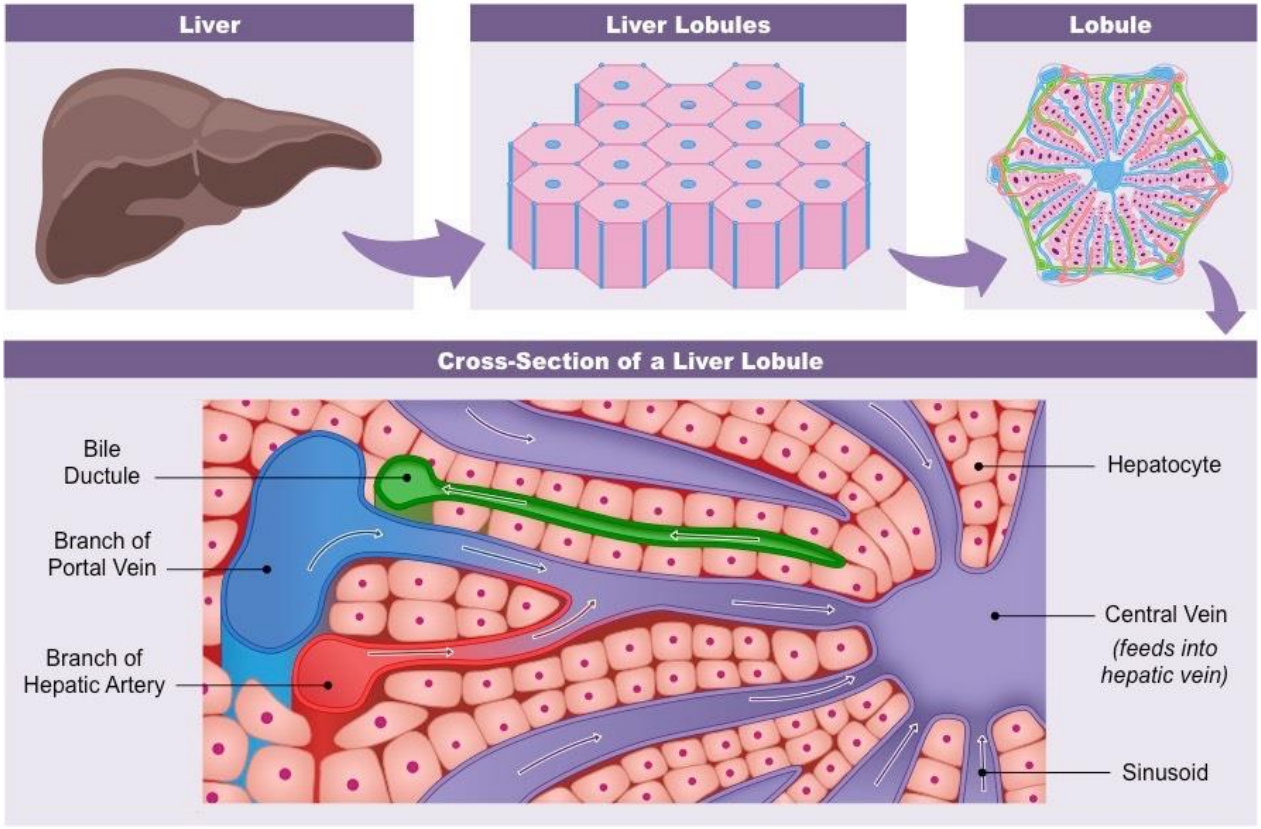


Figure 1 : Représentation de l'organisation structurale du foie.

Le foie est organisé en lobules hépatiques de forme hexagonale dont chaque pointe définie un espace porte, ou triade portale et au milieu de l'hexagone l'espace centrolobulaire qui est formé par la veine centrale. (de bioninja.com ; Liver Structure)

III. La composition cellulaire

Le foie est composé de nombreux types cellulaires permettant d'assurer l'ensemble des fonctions hépatiques. Dans le foie adulte, les cellules majoritaires sont les hépatocytes et les cellules biliaires. Les autres cellules, appelées cellules non

parenchymateuses (Non parenchymal cells, NPC) sont composées des cellules endothéliales sinusoïdales, de cellules étoilées et de cellules immunitaires.

A. Les hépatocytes

Ces cellules constituent à elles seules 60% de l'ensemble des cellules du foie et 80% de la masse tissulaire (Blouin et al., 1977). Les hépatocytes, d'environ 25 à 30 µm de diamètre, possèdent un cytoplasme important permettant d'héberger une machinerie cellulaire très développée comme un réticulum endoplasmique volumineux, un grand nombre d'appareils de Golgi, de mitochondries et de peroxysomes (Weibel et al., 1969). Grâce à ces nombreux organites, les hépatocytes assurent de multiples fonctions, principalement métaboliques mais peuvent jouer un rôle dans les réponses immunitaires intra-hépatiques grâce à leur capacité à présenter des antigènes à l'instar des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

B. Les cholangiocytes

De façon intéressante, les cellules biliaires appelées cholangiocytes, résultent d'un progéniteur commun avec les hépatocytes appelé hépatoblaste. Ces cellules ont pour rôle de constituer les canaux biliaires intrahépatiques (Benedetti et al., 1996). Il a aussi été montré que les cholangiocytes pouvaient réguler les réponses immunitaires en sécrétant des cytokines et interagir directement avec les cellules immunitaires (Glaser et al., 2009).

C. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales aussi appelées « Liver Sinusoid Endothelial Cells » ou LSEC forment la paroi des sinusoïdes et représentent environ 20% des cellules hépatiques. Contrairement à la majorité des epithelia, ces sinusoïdes agissent comme des filtres. En effet, elles présentent de larges fenestrations transcytoplasmiques mesurant de 100 à 150 nm permettant des échanges entre la circulation sanguine et le parenchyme hépatique mais aussi un accès limité à certaines macromolécules (Sørensen et al., 2015). De plus, ces cellules ont la capacité de réguler la coagulation et la réponse immunitaire. En effet, elles peuvent jouer un rôle de cellule présentatrice d'antigène et permettent le passage de cellules immunitaires à travers la barrière sinusoïdale (DeLeve and Maretti-Mira, 2017).

D. Les cellules étoilées

Les cellules étoilées, aussi appelées « Hepatic Stellate Cells » (HSC) ou encore cellules de Ito représentent moins de 1% des cellules hépatiques (Geerts, 2001). Elles sont localisées entre les travées d'hépatocytes et les capillaires sanguins qui forment l'espace de Disse. Comme leur nom l'indique, elles ont une forme particulière en étoile en raison de leurs extensions membranaires qui ressemblent à celles des cellules dendritiques. Ces cellules étoilées sont indispensables pour le stockage de vitamines liposolubles de type A et D et peuvent aussi avoir un rôle dans les réponses immunitaires. Grâce à des interactions étroites avec les cellules immunitaires, elles sont capables de réguler la résolution des lésions hépatiques (Friedman, 2008). En conditions pathologiques, elles peuvent notamment sortir de quiescence et participer à la mise en place d'une réponse fibrogénique en adoptant un phénotype de cellules myofibroblastiques.

IV. Les caractéristiques

A. La régénération hépatique

Cette capacité du foie à se régénérer avait déjà été décrite en Grèce antique dans le mythe de Prométhée. Ce titan a été puni pour avoir volé le feu sacré afin de le donner aux Hommes. Zeus, dieu et roi de l'Olympe, a alors condamné Prométhée à être enchainé à un rocher où un aigle arrive et lui dévore le foie. La nuit, son foie régénère entièrement pour que le jour suivant, l'aigle le lui dévore à nouveau et ceci pour l'éternité.

Ce mythe décrit l'une des caractéristiques du foie, la régénération hépatique. En effet, le foie, quiescent en condition physiologique, a la capacité de restaurer sa masse et de maintenir ses fonctions après résection ou agression du tissu par des médicaments.

La régénération hépatique physiologique dans le cas d'une résection est majoritairement étudiée grâce à une chirurgie pratiquée sur des modèles murins appelée hépatectomie partielle aux deux-tiers et a permis sa caractérisation précise (Fausto et al., 2006; Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2018; Michalopoulos, 2017). Après résection de 66% de la masse hépatique, le foie a la capacité de retrouver sa

masse initiale grâce à une régulation fine de phases de prolifération avec la participation de tous les types cellulaires. En effet, pendant les 48 premières heures, les hépatocytes prolifèrent en premier et de manière synchronisés. Ensuite, la prolifération des autres types cellulaires se succèdent jusqu'à la restauration complète de la masse hépatique après 7 à 10 jours (Stöcker and Heine, 1971). La régénération se divise en trois phases : de « priming », de prolifération et de terminaison. La phase de priming définit la sortie de quiescence des hépatocytes du tiers du foie restant initiant leur prolifération. Cette phase est déclenchée grâce à l'activation des cellules de Kupffer (Chapitre III, I) par le TNFα. Ces cellules sécrètent de l'IL6 qui se fixe sur le récepteur à la surface des hépatocytes permettant de déclencher la voie JAK/STAT et d'activer la transition G0/G1 du cycle cellulaire (Cressman et al., 1995, 1996; Taub, 2004). Durant la phase de prolifération des hépatocytes, une deuxième vague de facteurs de croissance est sécrétée comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) qui permettent la transition G1 à S (Pediaditakis et al., 2001; Skov Olsen et al., 1988; Tan et al., 2005). De façon intéressante, une stéatose, c'est-à-dire une accumulation de lipides dans les hépatocytes, se met en place afin de constituer une réserve de phospholipides nécessaire à la formation des membranes plasmiques des cellules en mitose. L'arrêt des cycles de division hépatocytaire est régi par différentes voies dont celle du TGFβ sécrété par les cellules étoilées et l'interaction des facteurs C/EBP et HDAC, décrivant la dernière phase de la régénération hépatique. Après un à deux cycles de division, la masse hépatique est rétablie.

B. La polyploïdie

Chez les mammifères, la majorité des cellules du corps est diploïde. Elles possèdent une paire de chaque jeu de chromosomes (n) que l'on décrit alors comme 2n. Il existe cependant des exceptions comme les gamètes qui ne possèdent qu'un seul jeu de chromosome dit « n » ou haploïdes ou les mégacaryocytes, les cardiomyocytes qui peuvent être polyploïdes (>2n) lors du développement et de la différenciation de ces cellules. De façon intéressante, les hépatocytes ont pour caractéristique physiologique, un statut polyploïde, possédant plus de deux jeux de chromosomes homologues. Dans le foie, il existe deux formes de ploïdie : la ploïdie nucléaire et la ploïdie cellulaire. La première définit le nombre de chromosomes dans un noyau et la deuxième définit le nombre de noyaux au sein d'une cellule. Ainsi, un

hépatocyte polyploïdie peut avoir un seul noyau contenant plusieurs jeux de chromosomes (4n, 8n, 16n…) ou contenir plusieurs noyaux eux-mêmes pouvant contenir plusieurs jeux de chromosomes. Les cellules possédant deux noyaux sont appelées cellules binucléées (2 noyaux de 2n = 2 x 2n, 2 x 4n, 2 x 8n…).

Chez l'Homme, la polyploïdie physiologique hépatique est d'environ 27% (Bou-Nader et al., 2019) avec majoritairement des hépatocytes tétraploïdes (Toyoda et al., 2005) alors qu'elle approche 80 à 90% dans le foie murin (C57Bl6J) avec majoritairement des hépatocytes binucléés (Guidotti et al., 2003; Si-Tayeb et al., 2010). Chez les rongeurs, c'est au cours du développement post-natal que la ploïdie physiologique du foie se met en place. A la fin des trois premières semaines après la naissance, juste après le sevrage, la proportion d'hépatocytes diploïdes (2n) diminue pour laisser place à des hépatocytes tétraploïdes binucléés (2x2n) et mononucléés (4n) (Guidotti et al., 2003; Margall-Ducos et al., 2007). Mon équipe a d'ailleurs démontré que ces hépatocytes tétraploïdes (2x2n) étaient générés par à un processus de cytodiérèse incomplète (Celton-Morizur et al., 2009). Ces cellules gardent leur capacité de prolifération pouvant alors donner d'autres cellules filles, soit deux cellules tétraploïdes (4n) ou une cellule binucléée octoploïde (2x4n) (Gentric and Desdouets, 2014). De façon intéressante, cette capacité de prolifération est très finement régulée empêchant l'émergence d'hépatocytes de plus de 8n (Celton-Morizur et al., 2009).

A l'âge adulte, le foie est quiescent et possède une ploïdie stable. Cependant, celle-ci peut être modifiée au cours du vieillissement ou dans différents processus comme lors d'une résection, d'agressions aigues par un toxique ou encore lors de maladies chroniques du foie comme la stéatohépatite non alcoolique (ou Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH) (Donné et al., Nat Rev Gastro, in press). Il a d'ailleurs été montré par mon équipe que dans la NASH, la proportion d'hépatocytes diploïdes diminuait au profit d'hépatocytes hautement polyploïdes (≥8n). Leur présence est très rarement observée dans un contexte physiologique et elle est par ailleurs associée à une grande variété de stress cellulaires (Gentric et al., 2015; Gupta, 2000). Récemment, notre équipe a montré dans le carcinome hépatocellulaire que le contingent de cellules binucléées réduisait de façon drastique afin de laisser place à une polyploïdie nucléaire « pathologique » (≥8n) dans les CHC. Ces hépatocytes hautement polyploïdes sont particulièrement retrouvés dans les CHC associés à un

mauvais pronostic et mutés dans le gène *TP53* (Bou-Nader et al., 2019). Cependant, le rôle et les conséquences de cette polyploïdie hépatique, en physiologie et en pathologie, restent encore méconnus et font l'objet de plusieurs projets de recherche au sein de notre équipe.

V. Les fonctions

A. Une « station d'épuration »

Compte tenu de sa localisation anatomique, le tissu hépatique est perçu comme un filtre permettant la détoxification de l'organisme. Il peut modifier et éliminer bon nombre de molécules endogènes comme l'hémoglobine et le cholestérol ou exogènes, comme les toxines, les antigènes bactériens provenant du tractus intestinal (chapitre 3, III), les médicaments et l'alcool.

B. La zonation hépatique

Toutes ces fonctions métaboliques et d'épuration sont assurées grâce à la structure particulière du foie organisée en lobules mais aussi grâce à ce que l'on appelle la zonation métabolique. Cette zonation est définie en deux espaces, périportal et périveineux, qui reçoivent respectivement un sang chargé en oxygène ou un sang chargé en nutriments. Par conséquent, les hépatocytes présentent des fonctions distinctes le long de cet axe porto-central afin d'assurer les fonctions hépatiques (Jungermann and Kietzmann, 1996). La mise en place et le maintien de cette zonation sont rendu possible grâce à une voie de signalisation particulière et très importante appelée la voie Wnt/β-caténine ***(Figure 2)***.

L'équipe du Dr Perret a notamment démontré le lien entre la voie Wnt/β-caténine et le foie grâce à son étude dans la cancérogenèse hépatique sur des modèles murins (de La Coste et al., 1998). En effet, les mutations dans le gène *CTNNB1* codant pour la β-caténine définissent une voie majeure de tumorigenèse hépatique (Chapitre 2, II) dont le phénotype est très spécifique et étroitement lié au métabolisme (Audard et al., 2007; Boyault et al., 2007; Colnot et al., 2004). La voie Wnt/β-caténine contrôle positivement ou négativement l'expression de nombreuses enzymes impliqués dans différentes voies métaboliques (Cadoret et al., 2002).

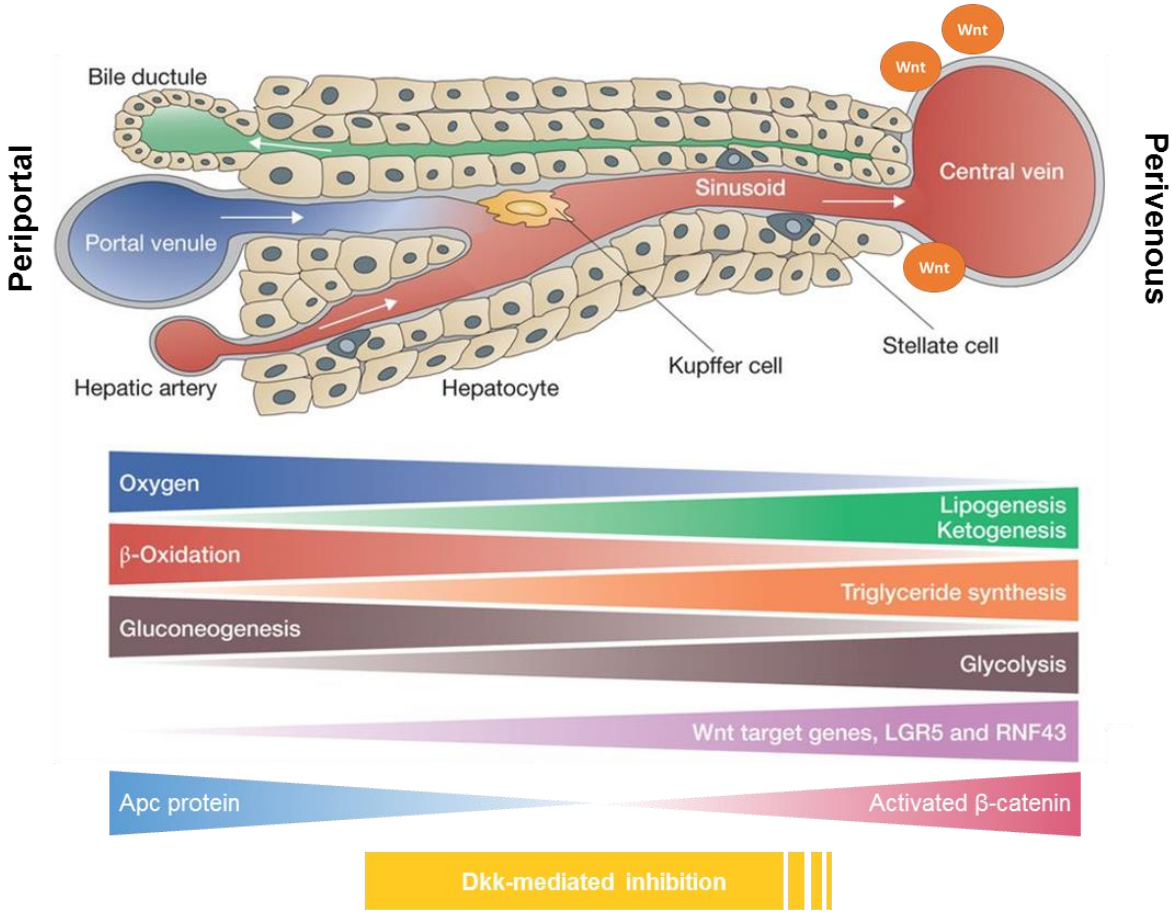


Figure 2 : Zonation métabolique du foie.

Il existe une zonation entre les espaces porte et centrolobulaire permettant au foie d'assurer toutes les fonctions qui lui sont propres. Les hépatocytes entre ces deux espaces possèdent des fonctions différentes. Les hépatocytes de l'espace porte assurent la β-oxydation, la dégradation des acides gras et la néoglucogenèse alors que les hépatocytes proches de l'espace centrolobulaire sont spécialisés dans la synthèse de glycogène et des triglycérides. Adaptée de (Benhamouche et al., 2006; Birchmeier, 2016)

Cette signalisation, très conservée dans l'évolution, est impliquée dans le foie tout au long de la vie. Lors du développement, elle permet par exemple de guider les hépatoblastes dans la lignée biliaire (Decaens et al., 2008) mais aussi de stimuler la

croissance du tissu hépatique (Apte et al., 2007) et de déterminer la structure finale du foie adulte (Benhamouche et al., 2006).

La zone périportale est caractérisée par la présence de la protéine Apc (adenomatous polyposis coli), gardienne de la zonation métabolique (Benhamouche et al., 2006), qui permet l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/β-caténine et dont l'expression devient de plus en plus faible jusqu'à la zone périveineuse pour permettre une forte activation de la protéine β-caténine dans les hépatocytes entourant la veine centrolobulaire ***(Figure 2)***.

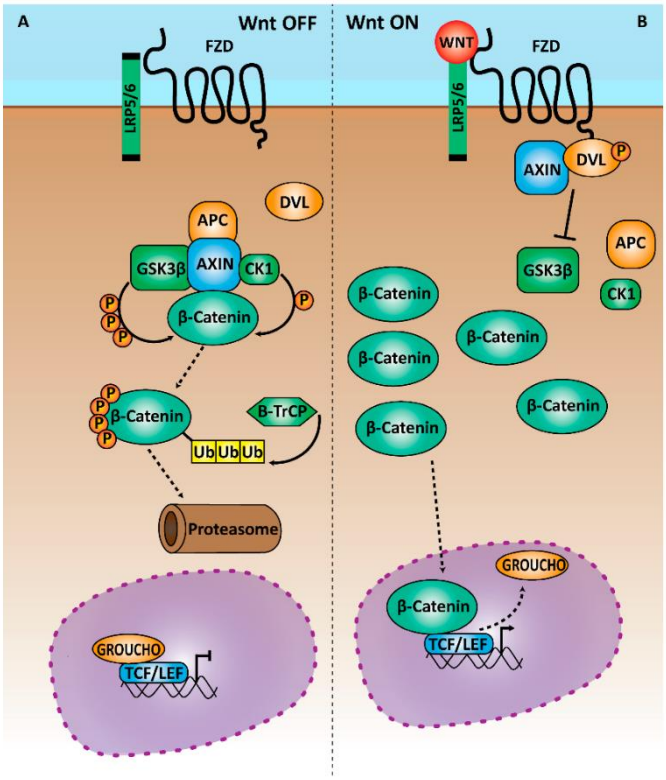


Figure 3 : La signalisation Wnt/β-caténine.

A) Lorsque la signalisation est éteinte, en absence de facteurs Wnt, la β-caténine est piégée dans un complexe multimoléculaire formé par les molécules APC, CK1, GSK3 et l'axine. La β-caténine va alors être phosphorylée et cette phosphorylation provoque son ubiquitinylation pour être envoyée au protéasome et provoquer sa destruction.

B) Lorsque les facteurs Wnt se fixent au récepteur Frizzled et au co-récepteur LRP5/6 à la surface de la cellule, la protéine axine est recrutée à la membrane et se détache du complexe de dégradation, la β-caténine est alors libre dans le cytoplasme et s'accumule jusqu'à traverser l'enveloppe nucléaire où elle se fixe à ses partenaires LEF/TCF permettant ainsi l'activation ou la répression de ses gènes cibles. (de Jaime-Soguero et al., 2018)

Précisément, dans l'espace périportal, la β-caténine est piégée par les protéines AXINE1, APC (gènes suppresseurs de tumeurs) et les kinases GSK3 et CK1, ce qui favorise sa phosphorylation puis son ubiquitinylation et enfin sa destruction par le protéasome. A l'inverse, les facteurs Wnt, produits par les cellules endothéliales de l'espace périveineux (Wang et al., 2015b), se fixent aux récepteurs Frizzled ce qui

inactive le complexe APC/AXINE1 et libère la β-caténine (Benhamouche et al., 2006). Celle-ci va alors pouvoir être transloquée dans le noyau et interagir avec les facteurs de transcription LEF/TCF. Dans le foie, il s'agit plus précisément du facteur TCF4 qui permet la liaison du complexe sur les gènes cibles ***(Figure 3)*** car la β-caténine ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. De façon intéressante, il existe une inhibition de la signalisation β-caténine par un antagoniste des facteurs Wnt appelé DKK1 (Dickkoopf 1) exprimé entre la zone périportale et la zone périveineuse mais dont le rôle inhibiteur s'arrête au niveau de la première couronne d'hépatocytes autour de la veine centrolobulaire ***(Figure 2)*** (Benhamouche et al., 2006).

C. Son système immunitaire

Comme énoncé précédemment, presque tous les composants cellulaires du foie peuvent jouer un rôle dans l'immunité, c'est pourquoi il est considéré comme un organe lymphoïde. Il possède d'ailleurs un système immunitaire unique et complexe qui permet de maintenir l'homéostasie hépatique mais a aussi un rôle très important dans de nombreuses pathologies du foie et particulièrement dans le carcinome hépatocellulaire (Chapitre 3, II).

LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

I. Epidémiologie, facteurs de risques et traitements

Le carcinome hépatocellulaire ou CHC est le cancer primitif du foie le plus fréquent. Il représente la 4ème cause de mortalité par cancer dans le monde après le cancer du poumon, du sein et colorectal ***(Figure 4)***. Le taux de survie à 5 ans du CHC ne dépasse pas 1%, le plus bas de toutes les tumeurs solides (Siegel et al., 2019).

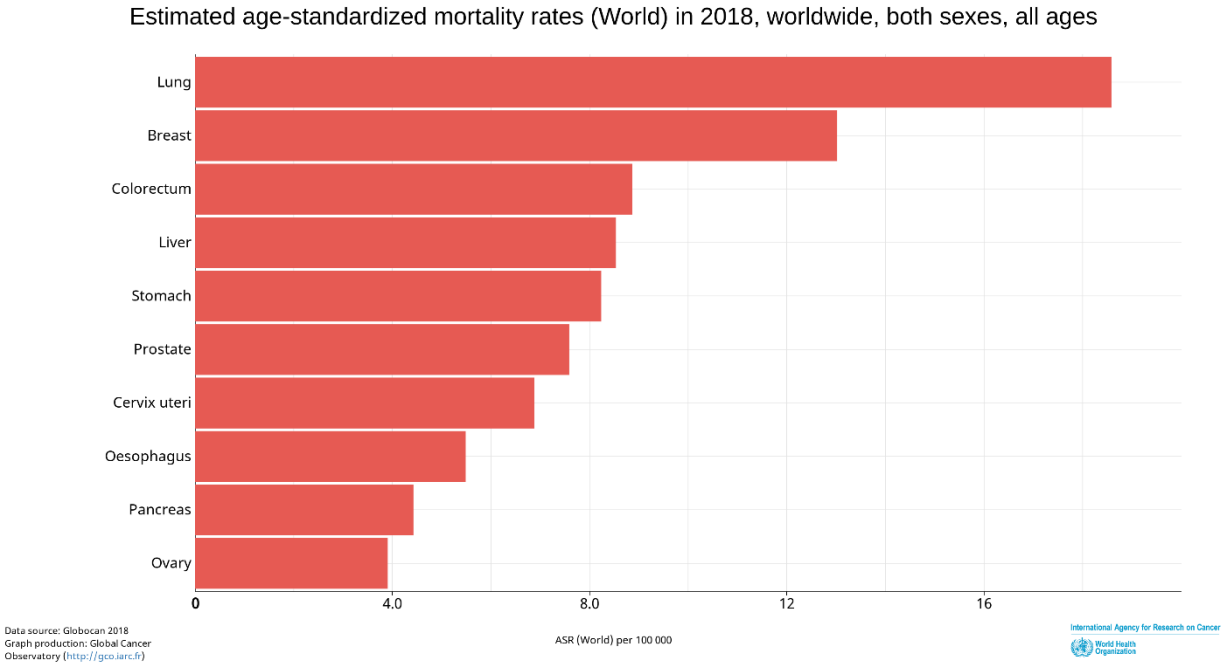


Figure 4 : Représentation graphique des causes de mortalité par cancer dans le monde.

Ce graphique présente le taux de mortalité par cancer dans le monde en 2018 en tenant compte des deux sexes et de tous les âges par l'agence internationale de la recherche contre le cancer (de l'International Agency for Research on Cancer, World Health Organization).

A présent bien établis, les principaux facteurs de risque sont les infections par les virus de l'hépatite B (VHB) et de l'hépatite C (VHC), l'exposition excessive et répétée à l'alcool, à des toxines et plus récemment, le syndrome métabolique (Bosetti et al., 2014).

Historiquement, les infections par les virus VHB et VHC sont les facteurs de risque majoritaires (Kulik and El-Serag, 2019). Cependant, il est prévu que leur incidence diminue dans les années à venir grâce à des vaccins et des thérapies efficaces et économiques. En revanche, le syndrome métabolique est en pleine expansion aux Etats-Unis et en Europe en raison du mode de vie occidental moderne qui combine une sédentarité, une alimentation excessive en aliments gras et sucrés provoquant

l'apparition d'une obésité et d'un diabète de type 2. Ce syndrome favorise ce que l'on appelle communément la maladie du foie gras ou maladie du soda. Elle regroupe les hépatopathies stéatosiques non-alcooliques ou « NAFLD » pour Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases. Les NAFLD sont caractérisées par une séquence allant de la stéatose (NAFL) qui correspond à une accumulation de lipides dans les hépatocytes pouvant évoluer sous une forme plus sévère appelée stéatohépatite non-alcoolique (NASH) associant une inflammation chronique, un stress oxydant et des dommages à l'ADN (Margini and Dufour, 2016) pouvant aller jusqu'à provoquer le développement d'une fibrose et d'une cirrhose (Chapitre 3, III).

II. Les mécanismes de la cancérogenèse

Les mécanismes impliqués dans le développement d'un CHC sont bien établis mais restent multiples, complexes et dépendants de l'hépatopathie sous-jacente.

A. Avec cirrhose

Le CHC se développe en très grande majorité à partir d'une cirrhose (80-90% des cas). Ce type de cancérogenèse est due à différentes hépatopathies comme les infections au VHB et VHC, la consommation excessive d'alcool ou la NASH provoquant une inflammation chronique non résolue. La cirrhose est caractérisée morphologiquement par des nodules dysplasiques entourés de fibrose qui détruit l'architecture du foie (Chapitre 3, III). A l'intérieur de ces nodules, l'inflammation et la prolifération aberrante des hépatocytes vont favoriser l'apparition d'altérations génétiques provoquant la transformation des hépatocytes. Cette transformation va alors générer des nodules dysplasiques de bas grade puis de haut grade d'où il émerge des foyers de transformation maligne définissant le CHC précoce. Enfin, lorsque le nodule se compose uniquement de CHC, mais fait une taille inférieure à 2 cm, il est appelé « petit CHC » ***(Figure 5)***.

De façon intéressante, de nombreux travaux ont démontré le rôle clef des télomères et des télomérases dans la séquence cirrhose/CHC (Nault et al., 2019a; Satyanarayana et al., 2004). Les télomères sont des séquences répétées d'ADN permettant de protéger la fin des chromosomes et sont synthétisés par les télomérases, TERC et TERT. Dans le foie adulte humain, la télomérase n'est pas exprimée dans les hépatocytes matures. Cependant, dans un tissu cirrhotique, on

observe un raccourcissement des télomères, associé à des mutations dans le gène TERT diminuant l'activité de l'enzyme et provoquant ainsi la sénescence des hépatocytes (Calado and Young, 2009; Hartmann et al., 2011). Des études ont permis de montrer que la déficience en télomérase chez la souris provoquait l'apparition d'une cirrhose (Rudolph et al., 2000) et que sa réactivation était requise pour le développement d'un CHC (Farazi et al., 2003). En effet, dans plus de 90% des cas, la télomérase est réactivée à cause de l'apparition de mutations, d'amplifications ou une insertion du VHB dans le promoteur TERT. La fréquence de mutation dans ce promoteur augmente petit à petit du nodule dysplasique de bas grade jusqu'au stade de CHC précoce où elle est retrouvée dans 61% des cas. Cette fréquence reste stable dans les stades de CHC avancés où l'on retrouve d'autres mutations dans les gènes drivers de la tumorigenèse comme *TP53* ou *CTNNB1* codant pour la β-caténine ***(Figure 5 et 6)***.

B. Sans cirrhose

Dans d'autres cas, un CHC peut se développer à partir d'un foie non cirrhotique. Les facteurs de risque de ce type de CHC sont une infection au VHB ou encore à l'exposition de certains agents génotoxiques comme l'aflatoxine B1 provenant de champignons contaminant les cacahuètes, le chlorure de vinyle, l'alcool et le tabac. Ces agents peuvent provoquer des mutations ponctuelles, des modifications épigénétiques ou des aberrations chromosomiques. Enfin, de façon moins fréquente, le CHC peut émerger à l'intérieur d'un adénome qui se définit par la prolifération monoclonale et bénigne d'hépatocytes. Il est observé majoritairement chez les jeunes femmes prenant des contraceptifs oraux pendant plus de trois ans (Nault and Zucman Rossi, 2013). De façon intéressante, l'émergence d'un CHC dépend des mutations retrouvées dans l'adénome. En effet, un CHC aura plus de risque d'émerger dans d'un adénome muté dans le gène *CTNNB1* que muté dans le gène codant HNF1α.

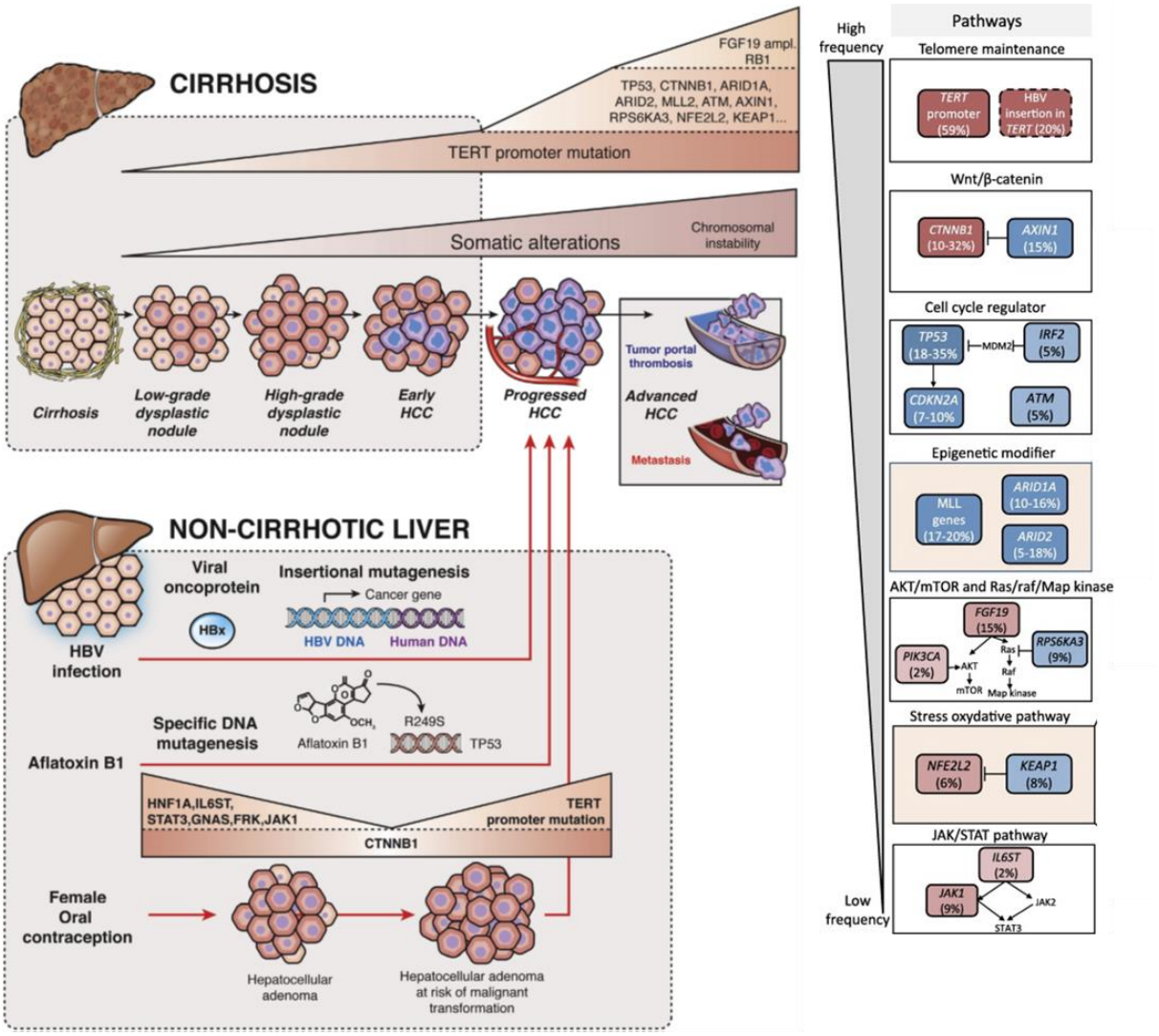


Figure 5 : Les mécanismes de la transformation tumorale et les voies majeures dérégulés dans le CHC.

La majorité des CHC se développe à partir d'un foie cirrhotique lui-même causé par différentes pathologies. Avant d'arriver à un CHC avancé, le tissu hépatique est fortement remodelé et certaines zones transitent par différentes étapes évoluant d'un nodule dysplasique de bas grade, puis de haut grade pour atteindre le stade de CHC précoce ou « early HCC ». Ce stade de tumorigenèse est difficilement discernable du nodule de haut grade sans analyses complémentaires mais il aura été diagnostiqué de façon précoce et apparait de bon pronostic (Kudo M. Liver Cancer 2013 Apr). Ce CHC précoce est suivi de stades de tumorigenèse plus avancés où l'on peut retrouver de nombreuses voies moléculaires dérégulées. Enfin, le reste des CHC se développe sur un foie décrit comme « sain » ne présentant pas de lésions visibles et implique des facteurs de risque bien établis comme les infections au virus de l'hépatite B, l'intoxication à l'aflatoxine B ou la prise de contraceptif oraux. (Zucman-Rossi et al., 2015)

III. Les classifications des CHC

Le développement d'un CHC résulte d'une combinaison d'altérations somatiques provoquant jusqu'à 80 mutations dans les régions codantes de la tumeur (Guichard et al., 2012; Schulze et al., 2015; Totoki et al., 2014) majoritairement dans des gènes « passenger ». Cependant, certaines mutations apparaissent dans des gènes

« drivers », c'est-à-dire impliqués dans des signalisations clefs de la cancérogenèse du foie ***(Figure 5)*** et dont la nature dépend de l'hépatopathie sous-jacente.

L'analyse de ces tumeurs en termes de mutations somatiques, de modifications épigénétiques et de profils d'expression génique a permis de définir des classifications moléculaires des CHC prenant en compte le phénotype histologique et certains paramètres cliniques. Ces classifications ont permis de faire ressortir des classes communes de CHC, malgré l'hétérogénéité démographique (Goossens et al., 2015). Il existe plusieurs classifications mais toutes séparent les tumeurs en deux groupes : classe prolifération/classe non prolifération (Calderaro et al., 2019), tumeurs plus agressives/tumeurs moins agressives (Goossens et al., 2015) ou tumeurs « chaudes » inflammatoires/tumeurs non inflammatoires « froides » (Pinyol et al., 2019).

Grâce au séquençage génomique haut-débit permettant ainsi de définir une classification, qui sera utilisée dans cette étude, associant analyses pathologiques, histologiques et profils d'expression génique, l'équipe de Jessica Zucman-Rossi à Paris propose une répartition des tumeurs en six groupes (G1 à G6) ***(Figure 6)***. Ces groupes peuvent être aussi séparés en deux types : G1-G2-G3 regroupant des tumeurs peu différenciées, inflammatoires, proliférantes, associées à une instabilité chromosomique et à un mauvais pronostic et un deuxième groupe de tumeurs G4-G5-G6 présentant une bonne différenciation, associées à une stabilité chromosomique et de meilleur pronostic ***(Figure 6)***. Après la mutation dans le gène du promoteur TERT, la mutation dans le gène codant la β-caténine (mutations activatrices gain de fonction) est la plus fréquente puisqu'elle est retrouvée dans 40% des tumeurs et classées dans les groupes G5 et G6 (Calderaro et al., 2017). Ces tumeurs semblent avoir des caractéristiques très particulières qui ressortent dans toutes les classifications. Elles présentent une cholestase (arrêt de la sécrétion de bile et son accumulation dans les hépatocytes) donnant un aspect verdâtre à la tumeur, ne sont jamais stéatosiques et présentent une surexpression des cibles de la voie Wnt/β-caténine comme GLUL, LGR5 et TBX3 (Boyault et al., 2007; Chiang et al., 2008; Zucman-Rossi et al., 2007). Ces tumeurs sont bien différenciées et se caractérisent par l'absence d'infiltrats immunitaires qui lui donne son statut de tumeur « froide », non inflammatoire et donc non-éligible aux immunothérapies (paragraphe IV).

A l'inverse, les tumeurs mutées dans le gène *TP53* (21% des cas) retrouvées dans les groupes G1 à G3, présentent un profil génique associé à une prolifération accrue, une inflammation, une transition épithélio-mésenchymateuse et une activation angiogénique associant ces tumeurs à un mauvais pronostic.

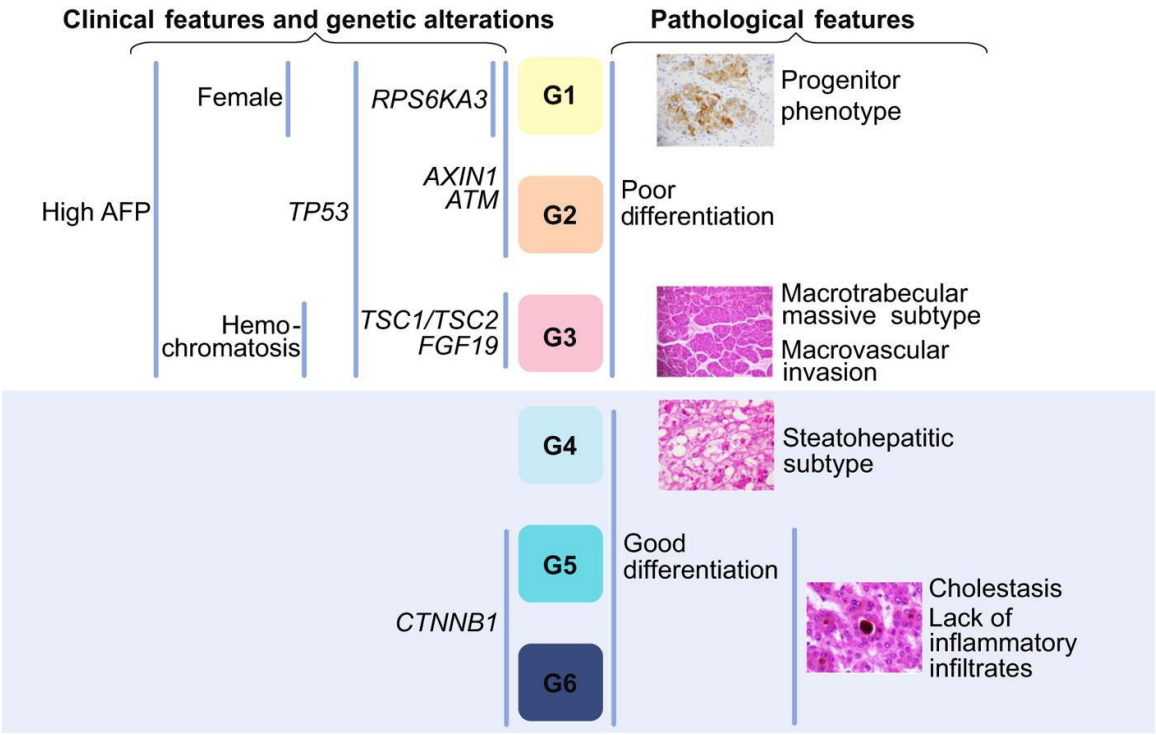


Figure 6 : Classification des CHC.

Cette classification par l'équipe de Jessica Zucman-Rossi répartit les CHC en 6 groupes de tumeurs alliant caractéristiques cliniques, génétiques et pathologiques. Les groupes G1-G2-G3 présentent un profil histologique de faible différenciation avec une forte expression de l'α-foetoprotéine (protéine normalement produite à des stades embryonnaires) et associé à des altérations génétiques dans des gènes de la prolifération ou de la réponse aux dommages à l'ADN comme TP53 ou ATM. Le groupe de tumeurs G4 présente un phénotype différent des groupes G5-G6 associés à des mutations dans le gène CTNNB1. Ces derniers présentent un phénotype différencié, cholestatique, sans infiltrats immunitaires alors que les tumeurs de G4 sont des tumeurs associées à une stéatose non alcoolique et présentent des infiltrats immunitaires. Enfin, les mutations présentent dans ces tumeurs sont difficiles à classifier puisqu'aucune mutation préférentielle n'a pu être mise en évidence. (Calderaro et al., 2017)

IV. Les traitements du CHC

A. Les traitements actuels

Les traitements du CHC restent encore peu nombreux. Les plus efficaces se résument à la résection de la tumeur ou à la transplantation. Cependant, les patients sont éligibles à ces traitements uniquement lorsque la tumeur est bien localisée et découverte de façon précoce. Pour les patients diagnostiqués à des stades

intermédiaires, le traitement préconisé est la chimio-embolisation en ciblant l'artère irrigant la tumeur permettant de provoquer la nécrose du tissu. Cependant, dans de nombreux cas, des mécanismes de néo-vascularisation se mettent en place empêchant alors la nécrose du tissu.

Asymptomatique aux stades précoces de la maladie, le CHC se diagnostique majoritairement à un stade avancé, lors de la perte des fonctions hépatiques (insuffisance hépatique). Dans ce cas, le traitement de première ligne est le sorafenib, des inhibiteurs des protéines kinases dont la kinase Raf kinase, VEGF-R1,-R2 et -R3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), PDGF-Rβ (Platelet-Derived Growth Factor Receptor β) Flt3, c-kit et la kinase RET. Cependant, ce traitement n'augmente l'espérance de vie que d'environ 3 mois et présente un taux de réponse faible ainsi qu'une forte toxicité (Sanoff et al., 2016).

B. L'immunothérapie du CHC et ses perspectives

Récemment, la compréhension du système immunitaire et de son implication dans la tumorigenèse a provoqué l'essor de l'immunothérapie. De nombreux travaux ont en effet démontré le rôle très important du microenvironnement immunitaire dans de nombreux cancers en étudiant les différentes populations immunitaires retrouvées à l'intérieur de la tumeur comme les lymphocytes T ou les macrophages. L'analyse de la nature des infiltrats immunitaires permet d'ailleurs de prédire le pronostic de différents types de cancers et la réponse à certains traitements (Galon et al., 2012, 2013; Guo et al., 2019; Martin and Märkl, 2019). Par exemple, de nombreux travaux ont démontré que la présence d'infiltrats composés de lymphocytes T CD8+ corrèle avec un meilleur pronostic et une meilleure réponse aux traitements anti-cancéreux (Ali et al., 2014; Lee et al., 2018; Leman et al., 2018; Reissfelder et al., 2015; de Ruiter et al., 2017; Schalper et al., 2015). L'équipe du Dr Galon a d'ailleurs mis en place à l'échelle internationale un immunoscore basé sur des analyses immunohistochimiques permettant de déterminer la densité des cellules T CD8+ et CD3+ dans les tumeurs du côlon. Cet immunoscore permet d'estimer de façon fiable le risque de récurrence chez des patients atteints de cancer du côlon (Pagès et al., 2018).

Les stratégies immunothérapeutiques les plus intéressantes découvertes jusqu'à présent visent d'ailleurs à améliorer la réponse anti-tumorale des lymphocytes T

CD8+ en utilisant des anticorps permettant le blocage certaines molécules inhibitrices comme PD-1 ou CTLA-4 appelés les « checkpoints » inhibiteurs. Les traitements basés sur les inhibiteurs de checkpoints comme les anticorps anti-PD-1 (programmed cell death protein 1), anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 (cytotoxic T lymphocytic protein 4) ont donné des résultats sans précédents dans de nombreux cancers.

Dans le CHC, il a été montré que les cellules de Kupffer et les cellules T CD8+ expriment fortement les molécules PD-1 et PD-L1 (Wu et al., 2009). Il a d'ailleurs été montré qu'un fort niveau d'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales est associée avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de CHC (Calderaro et al., 2016; Long et al., 2018).

Plusieurs essais cliniques avec des anti-PD-1 ont été publiés dans le cancer du foie avec des taux de succès assez variables mais prometteurs. Cependant, le nombre de patients répondant à l'immunothérapie anti-PD-1 reste restreint (15 à 20% ; 26% pour les patients présentant une très forte expression de PD-L1) et les effets secondaires sont fréquents et divers (cytolyse hépatique, colite, auto-immunité, infections opportunistes…) (El-Khoueiry et al., 2017; Zhu et al., 2018). De façon intéressante, la combinaison des anti-PD-1 avec des anti-CTLA-4 a montré un effet thérapeutique supérieur que les monothérapies dans le mélanome (An and Liu, 2019; Postow et al., 2012; Wolchok et al., 2013), démontrant un effet non redondant de ces molécules. A ce jour, cette combinaison thérapeutique fait l'objet d'essais cliniques dans le CHC (Kelley et al., 2017).

Il est donc nécessaire de mieux comprendre le système immunitaire et les mécanismes anti-tumoraux dans la cancérogenèse hépatique afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et dans le futur, des traitements plus efficaces.

IMMUNITE, TOLERANCE, INFLAMMATION ET IMMUNOSURVEILLANCE HEPATIQUE

I. Le système immunitaire du foie

Le foie est irrigué en grande majorité par le sang provenant du tractus intestinal amenant des nutriments mais aussi des antigènes alimentaires et de la flore intestinale. Le foie possède donc un système immunitaire particulier (20% des cellules hépatiques) permettant le maintien d'une tolérance immunitaire envers les antigènes intestinaux. Il est également capable de monter une réaction immunitaire rapide et efficace contre d'éventuels pathogènes. Il est intéressant de noter que toutes les cellules du foie sont capables d'adopter un rôle de CPA et d'activer localement les lymphocytes T. Le foie est donc un organe original et particulièrement complexe en termes de réactions immunitaires et de composition en cellulaires immunitaires. En effet, il possède un système immunitaire singulier caractérisé par une accumulation importante de cellules de l'immunité innée avec quelques différences entre l'Homme et la souris.

A. Les macrophages

Les macrophages du foie sont constitués de deux types. Les macrophages non-résidents infiltrant le tissu, issu de monocytes circulant, se déplacent dans le tissu hépatique afin d'effectuer une patrouille à la recherche d'éventuels pathogènes et sont retrouvés en proportions variables en homéostasie (Guillot and Tacke, 2019; Movita et al., 2012). Les cellules de Kupffer qui constituent les macrophages résidents du foie, proviennent des précurseurs hématopoïétiques du sac vitellin (Naito et al., 1997). Dans le tissu hépatique, elles s'attachent aux parois des sinusoïdes (Movita et al., 2012) et sont donc difficiles à étudier puisque leur isolement requiert des traitements mécaniques et/ou enzymatiques. Récemment, de nouveaux marqueurs comme CLEC4F et TIM4 ont été identifiés comme marqueurs spécifiques permettant une meilleure caractérisation de ces cellules (Devisscher et al., 2017).

Leur localisation dans la structure du lobule hépatique leur confère un rôle de filtre entre circulation sanguine et tissu hépatique permettant ainsi de réguler les réponses

immunitaires locales et systémiques (Dixon et al., 2013). Ces cellules immunitaires sont les plus représentées puisqu'elles représentent 1/3 des cellules non parenchymateuses (non parenchymal cells, NPC) chez la souris. Elles possèdent de nombreux récepteurs dont deux complément qui permettent la phagocytose des particules opsonisées. Elles possèdent aussi des PRRs (Pattern Recognition Receptors) reconnaissant des DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) et des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) comme le LPS (Lipopolyaccharide) ou la flageline des bactéries (Dixon et al., 2013). Ainsi, lorsque le niveau d'endotoxines bactériennes est bas, les cellules de Kupffer promeuvent l'immunotolérance au sein du tissu hépatique en sécrétant des cytokines comme l'IL-10, le TGFβ et des facteurs anti-inflammatoires comme la prostaglandine E2 (PGE2). En réponse à une concentration de PAMPs plus forte, les cellules de Kupffer vont à l'inverse sécréter des cytokines, pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-12 (Dixon et al., 2013).

B. Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer ou NK, sont des cellules lymphocytaires de l'immunité innée particulièrement enrichies dans le foie car elles représentent 40% des lymphocytes résidents hépatiques chez l'Homme. Les cellules NK sont connues pour leur activation rapide, leur capacité à sécréter des cytokines mais principalement pour leur fonction cytotoxique. Leur activation est finement régulée grâce à la balance d'expression entre des récepteurs activateurs, Killer Activating Receptor ou KAR (comme NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D et NKG2C/CD94) encore DNAM-1 (CD226) ou NKp80 et CD16 et des récepteurs inhibiteurs, Killer Inhibitory Receptor ou KIR comme NKG2A (CD94) ***(Figure 7)*** (Lanier, 2005).

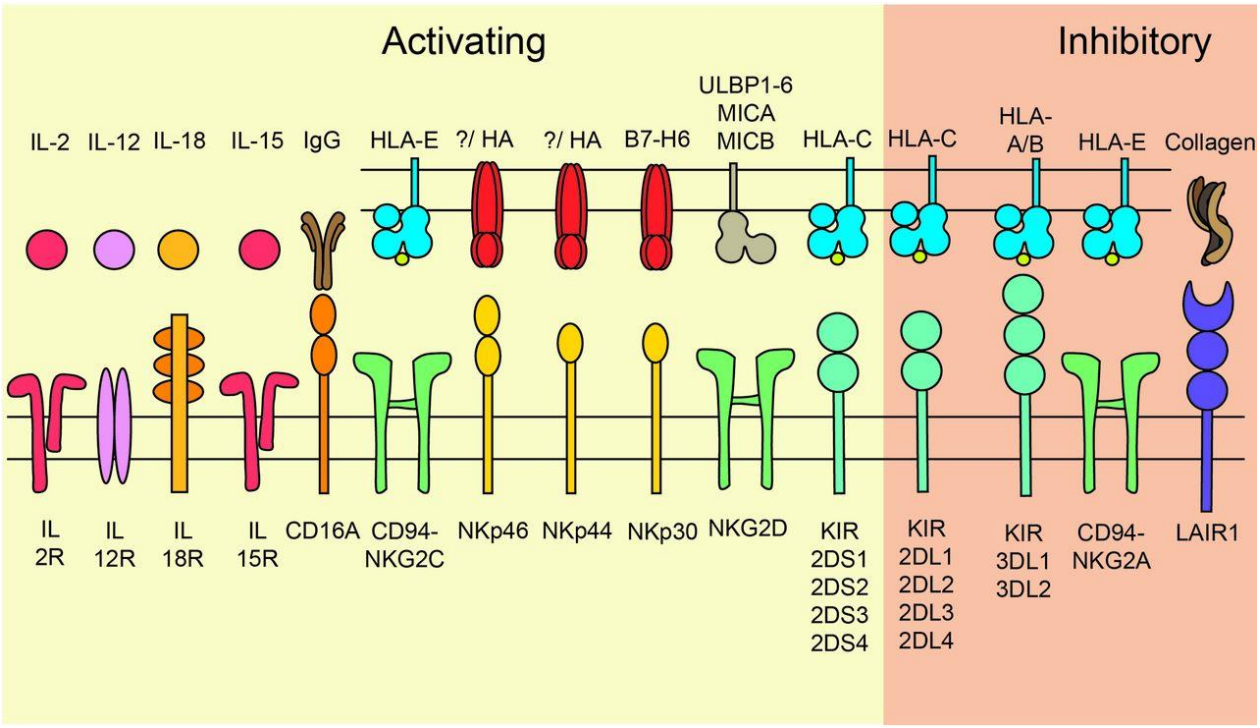


Figure 7 : Récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK

Ce schéma récapitule les nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs ainsi que leur(s) ligand(s) chez l'Homme. Ces récepteurs peuvent aussi être exprimés chez d'autres cellules immunitaires que les cellules NK comme les lymphocytes T, les MAITs et les iNKT. (Calabrese et al., 2019)

Cependant, comme les cellules de Kupffer, les cellules NK résidentes du foie possèdent un phénotype et des fonctions qui diffèrent des cellules NK conventionnelles. Rarement exprimé sur les cellules NK périphériques, le marqueur d'activation CD69 est fortement exprimé par les cellules NK hépatiques qui favorise un état de pré-activation (Melsen et al., 2016).

Récemment, plusieurs études ont réexaminé l'origine et la fonction des cellules NK hépatiques et conventionnelles et ont pu les identifier comme des cellules innées lymphoïdes ou Innate Lymhoid Cells (ILCs). De nombreux travaux proposent une classification de ces cellules qui distingue trois principaux groupes : ILC1s, ILC2s ILC3s. Les ILC1s, exprimant le facteur de transcription T-bet produisent des cytokines de type 1 comme l'IFNγ et le TNF (H spots Nat Immunol 2016), les ILC2s, exprimant le facteur GATA-3, s'apparentent aux cellules Th2 et produisent des cytokines comme l'IL-4, IL-5 et IL-13 (Scanlon and McKenzie, 2012; Walker et al., 2013) et enfin le groupe 3, exprimant le facteur RORγt, exprimant ou non NKp46, et ayant la capacité de sécréter la cytokine IL-17 (Montaldo et al., 2015; Tugues et al., 2019). L'intégration des cellules NK, qu'elles soient conventionnelles ou hépatiques dans ces différents groupes a soulevé de nombreux débats au sein de la

communauté scientifique. Certaines études ont d'ailleurs démontré que les NK hépatiques appartiennent à un groupe particulier d'ILC, les ILCs mucosales (Peng and Tian, 2015). Ces classifications comme celles des macrophages M1 et M2, permettent une vision théorique mais simplifiée et de la biologie des cellules immunitaires et soulèvent parfois de nombreux débats du fait de la discordance de résultats entre laboratoires.

C. Les cellules Natural Killer T

Les cellules Natural Killer T ou NKT sont des cellules particulièrement intéressantes. De par leur phénotype et leur fonction, elles sont au carrefour de l'immunité innée et adaptative. Les NKT expriment des marqueurs de cellules NK (NK1.1 chez la souris et CD56 chez l'Homme) et partage des similarités avec les cellules NK comme leur capacité à s'activer rapidement. Elles possèdent également des caractéristiques de lymphocytes T car elle possède un TCR composé de deux chaines αβ comme les lymphocytes T conventionnels. Ce TCR a cependant la particularité de reconnaitre non pas des antigènes peptidiques mais des antigènes lipidiques portés par la molécule CD1d s'apparentant au Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1 (CMH I). Lorsque la molécule CD1d est délétée chez la souris, les cellules NKT ne peuvent être formées dans le thymus et sont donc absentes de leur organisme. Comme les lymphocytes T, les cellules NKT humaines peuvent exprimer soit le CD4+ soit le CD8+ ou être double négative. Chez la souris, elles expriment ou non le CD4+ mais sont toutes CD8 négatives.

Les cellules NKT sont généralement classées en deux types, I et II. Les NKT de type I ou invariant NKT (iNKT) présentent une variabilité restreinte au niveau de leur chaine α du TCR. Cette chaine α est issue du réarrangement Vα14-Jα18 chez la souris et Vα24-Jα18 chez l'Homme. Ainsi, une souris Jα18 déficiente ne possède pas de cellules iNKT. Elles peuvent être facilement étudiées grâce à l'antigène provenant d'une algue marine, l'α-galactosylcéramide (αGalCer) qui permet de les stimuler de façon artificielle mais spécifique. Cette molécule permette également de les identifier et de les isoler lorsqu'elle est couplée à un tétramère de molécules CD1d. En physiologie, les antigènes reconnus par les iNKT sont des antigènes provenant de microorganismes commensaux et pathogéniques permettant de les

activer. Elles peuvent s'activer en reconnaissant des antigènes lipidiques du soi ou également s'autoactiver.

Les cellules NKT de type II sont minoritaires chez la souris mais sont majoritaires chez l'Homme (Singh et al., 2018). Ces cellules reconnaissent un répertoire plus divers d'antigènes lipidiques comme par exemple les sulfatides (Rhost et al., 2012). Ce répertoire d'antigènes est encore mal connu de nos jours ce qui rend difficile l'identification et l'analyse du phénotype de ces cellules. En effet, les tétramères combinés avec un antigène lipidique ne sont spécifiques que d'une partie des NKT de type II ce qui ne permet pas d'étudier la population entière.

Bien que possédant un TCR, elles ont cependant certaines propriétés qui les différencient des lymphocytes T conventionnels. Tout d'abord, leur spécificité est très conservée au sein des mammifères et leur développement permet déjà d'avoir un phénotype de maturité fonctionnelle avant même de sortir du thymus. En effet, le développement des cellules NKT est bien décrit ***(Figure 8)*** et commence comme les lymphocytes T conventionnels ou les MAIT (Mucosal associated invariant T cells) par des cellules double-positives (CD4+ CD8+) dans le cortex thymique (Bezbradica et al., 2005; Egawa et al., 2005; Gapin et al., 2001). Les lymphocytes T reconnaissent les molécules du CMH, les cellules NKT la molécule CD1d, les MAIT reconnaissent quant à elle la molécule MR-1. Les MAITs possèdent également un TCR semi invariant et partage de nombreuses similarités avec les cellules NKT notamment dans le développement (Wang and Hogquist, 2018). Les MAITs et les NKT ont d'ailleurs fait l'objet de nombreuses études ces dernières années et sont toutes les deux particulièrement importantes dans le foie humain (pour revue (Huang et al., 2018; Sun et al., 2019a).

Dans le thymus, les cellules NKT restent dans le cortex environ 4 jours le temps du réarrangement du TCR (Heller et al., 2018) et de leur sélection. Cette sélection est dépendante du CD1d et des récepteurs de la famille SLAM présents sur les cellules épithéliales thymiques (Chung et al., 2005; Pasquier et al., 2005).

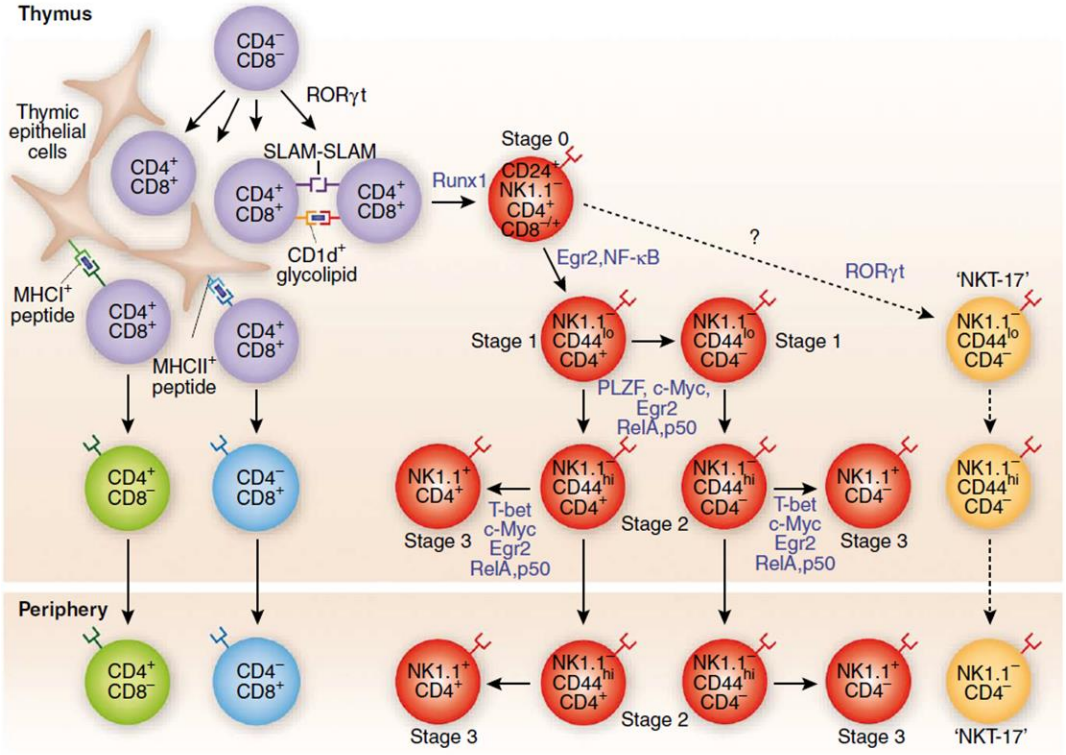


Figure 8 : Développement et maturation des cellules NKT.

Les cellules NKT naissent dans le thymus d'un précurseur double positif CD4+ CD8+ commun avec les lymphocytes T qui ont entrepris un réarrangement génique du TCR. La liaison du TCR avec les molécules du CMH I et II mène à la sélection positive des lymphocytes T conventionnels CD8+ et CD4+ respectivement alors que les thymocytes se liant à la molécule CD1d entre dans le linéage NKT. Une fois sélectionnés, les précurseurs des cellules NKT passent série d'étapes de différentiation qui aboutissent par au moins quatre stades de développement (de 0 à 3) contrôlés par différents facteurs de transcription. Les cellules NKT migrent du thymus majoritairement au stade 2 et peuvent évoluer en stade 3 en périphérie. (Godfrey et al., 2010)

Après leur sélection positive, les thymocytes expriment le facteur de transcription PLZF (Constantinides and Bendelac, 2013) et le récepteur CXCR7 (Cowan et al., 2014; Kozai et al., 2017) leur permettant de migrer vers la medulla thymique et de commencer leur spécification en différents sous-groupes (Wang and Hogquist, 2018). Elles adoptent alors des phénotypes proches des cellules Th1, Th2 et Th1 que l'on appelle NKT1, NKT2 NKT17 à l'exception des NKT10 (productrices d'IL-10) qui expriment peu ou pas le facteur PLZF. Contrairement aux lymphocytes T conventionnels, les cellules NKT n'ont pas besoin d'interaction avec le CD1d de façon répétée. Cependant, leur homéostasie est très dépendante de l'IL-15 comme les cellules NK (Matsuda et al., 2002; McNab et al., 2005; Ranson et al., 2003). Elles ont aussi la particularité de répondre rapidement après stimulation de leur TCR en sécrétant de grande quantité de cytokines en un temps record ce qui leur permet de

participer aux réactions immunitaires innées. Par ailleurs, dans de nombreux modèles murins d'hépatopathies chroniques, les cellules iNKT hépatiques ont la particularité de s'activer très rapidement contrairement aux cellules NKT de type II.

Outre leur activation par stimulation du TCR, elles peuvent être activées comme les cellules NK par des cytokines. Il a été montré que l'activation « indirecte » des cellules NKT implique la production de cytokines par les cellules dendritiques et peut-être d'autres CPA. Les principales cytokines pouvant activer les cellules NKT sont l'IL-18, les interférons de type I et enfin, l'IL-12 qui joue un rôle déterminant (Lawson, 2012; Leite-De-Moraes et al., 1999; Park et al., 2003; Tyznik et al., 2008; Wesley et al., 2008). De plus, plusieurs travaux ont démontré que l'IL-33 pouvait induire l'activation des cellules iNKT chez l'Homme et la souris et la sécretion d'IFNγ en présence d'α-GalCer (Bourgeois et al., 2009). Leur capacité cytotoxique reste peu étudiée et est encore débattue *in vivo* (Smyth et al., 2002) mais des études ont montré *in vitro* que les NKT1 hépatiques avaient une capacité cytotoxique plus forte que les autres cellules iNKT (Crowe et al., 2005).

De façon intéressante, les cellules iNKT sont connues pour être résidentes de différents organes comme la rate, les poumons, le tissu adipeux, l'intestin et particulièrement dans le foie (Bendelac et al., 2007; Johnston et al., 2003). Elles y sont très représentées chez la souris : 40% des lymphocytes intra-hépatiques mais représentent seulement 3 à 5% chez l'Homme. Les cellules iNKT résidentes du tissu hépatique adoptent majoritairement un phénotype NKT1 ***(Figure 9)***. Cette accumulation de cellules NKT dans le foie est provoquée par l'expression du récepteur CXCR6 qui va permettre, grâce à l'interaction avec son ligand CXCL16, la migration des cellules NKT vers le foie et leur maintien dans le tissu hépatique (Crosby and Kronenberg, 2018; Geissmann et al., 2005; Germanov et al., 2008; Johnston et al., 2003). Les cellules NKT hépatiques ont un rôle important lors d'infections et d'inflammation car elles ont la capacité de se déplacer rapidement le long des sinusoïdes. Elles peuvent cependant s'arrêter lors de leur activation par l'IL-12 ou l'IL-18 ainsi que par la stimulation du TCR par les cellules endothéliales exprimant fortement le CD1d. Cette molécule est aussi exprimée par les cellules de Kupffer, les cellules dendritiques et encore les hépatocytes que les cellules NKT peuvent atteindre grâce aux fenestrations de l'endothélium.

Le rôle des cellules iNKT après activation peut être protecteur comme lors d'infection ou d'une réparation après lésion hépatique ou délétère lorsque leur activation devient chronique ou excessive. En effet, l'induction d'une NASH chez la souris par un régime gras provoque la surexpression de la molécule CD1d dans le tissu hépatique ce qui provoque une activation excessive des cellules NKT conduisant à une augmentation de la fibrogenèse, des transaminases sanguines (ALAT/ASAT) et du score de NASH (Tajiri et al., 2009). De plus, après un régime déficient en choline, riche en lipides ou alcoolique, les cellules iNKT activées par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ou les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) favorisent la stéatose et la stéatohépatite en provoquant l'accumulation de gras par les hépatocytes et le recrutement de macrophages et de neutrophiles (Marrero et al., 2018). Les cellules iNKT peuvent également participer activement à la mise en place d'une fibrose en accélérant l'activation des HSC (Marrero et al., 2018; Syn et al., 2010). Enfin, il a été montré dans un modèle murin de régime riche en lipide et déficient en lipides (CD-HFD) récapitulant la séquence NAFLD/NASH/CHC, que les cellules NKT activée à travers la sécrétion de la molécule LIGHT augmentent l'accumulation de lipides dans les hépatocytes (stéatose hépatique) et, en coopération avec les lymphocytes T CD8+ induisent des dommages hépatiques menant à l'émergence d'un CHC (Wolf et al., 2014).

En revanche, dans un modèle murin récapitulant la tumorigenèse hépatique basé sur l'activation oncogénique de la β-caténine, le groupe du Dr Jean-Pierre Couty a démontré que l'absence des cellules iNKT (souris Jα18$^{-/-}$) accentue la gravité des tumeurs démontrant ainsi un rôle protecteur dans le CHC muté pour la β-caténine (Anson et al., 2012). Tous ces résultats suggèrent que le rôle bénéfique ou délétère des cellules NKT dans le foie dépend de la pathologie.

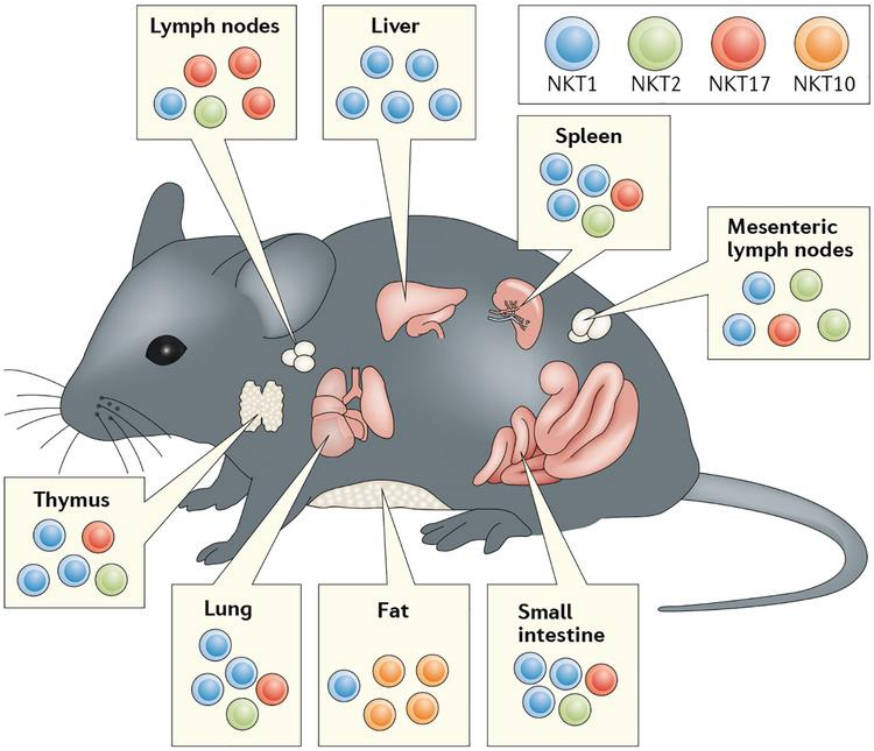


Figure 9 : Les types de cellules iNKT dans les différents organes murins.

Les cellules iNKT peuvent être résidentes de plusieurs organes et y adoptent un phénotype particulier afin de s'adapter à l'environnement tissulaire. Cette figure donne le type et la fréquence relative des différents types d'iNKT au sein du tissu. Par exemple on peut voir que dans le tissu adipeux la grande majorité des cellules iNKT sont des NKT10 qui ont un rôle anti-inflammatoire alors que dans les nodules lymphatiques les cellules iNKT sont majoritairement NKT17 ayant un rôle pro-inflammatoire. Le foie est composé entièrement de NKT1 dépendant du récepteur chimiotactique CXCR6 pour leur survie et leur maintien dans le tissu hépatique. (Crosby and Kronenberg, 2018).

D. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T CD8+ (majoritaires par rapport aux CD4+) résidents du tissu hépatiques exprimant les marqueurs CXCR6 et CXCR3, patrouillent le long des sinusoïdes permettant de protéger le foie contre des pathogènes (Wang and Zhang, 2019). En effet, les lymphocytes T hépatiques sont majoritairement des lymphocytes effecteurs et mémoires (Mafra et al., 2019). Cependant, il a été montré récemment que les lymphocytes T CD8+ à la fois chez l'Homme et chez la souris ont un rôle délétère dans la tumorigenèse hépatique au travers de la sécrétion excessive d'IFNγ favorisant la lyse hépatocytaire (Ma et al., 2016; Sheppard et al., 2017; Wolf et al., 2014).

II. La tolérance hépatique

De par sa localisation particulière dans la circulation sanguine, le foie permet de filtrer les molécules endogènes mais aussi des molécules exogènes comme les antigènes des bactéries intestinales. Malgré l'exposition permanente à ces molécules, les réactions immunitaires du foie restent contrôlées grâce à de nombreux mécanismes. Ils permettent de maintenir une tolérance immunitaire tout en maintenant une surveillance accrue contre les pathogènes.

Tout d'abord, il a été montré que la capacité de présentation d'antigènes des cellules dendritiques hépatiques est très faible par rapport à celles présentes dans d'autres organes lymphoïdes comme la rate. Elles expriment moins de molécules de CMH et de co-stimulation et grâce à la sécrétion d'indoléamine 2,3-dioxygenase (IDO), d'IL-10 et à l'expression de PD-L1, elles vont inhiber l'activité des lymphocytes T. Outre les cellules dendritiques, la majorité des cellules du foie ont la capacité de présenter des antigènes. Une étude a d'ailleurs répertorié le rôle dans la tolérance hépatique de ces cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles dans un tableau récapitulatif ***(Figure 10)*** (Mehrfeld et al., 2018).

Cell type	Antigen presentation	Outcome
Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs)	Major histocompatibility complex (MHC)-I, MHC-II, and XP	Induction of $CD25^{low}FoxP3^{-}$ regulatory T-cells (T_{regs}) (M); LSEC primed $CD8^{+}$ memory T-cells (M); and effector cytotoxic T-Lymphocyte (M)
Hepatocytes	MHC-I, CD1d, XP and MHC-II in inflammation	$CD8^{+}$ T-cell Deletion (M); invariant natural killer cell (iNKT) activation (M); and T_{reg} induction (M)
Hepatic stellate cells	MHC-I, CD1d, MHC-II (in the presence of interferon γ)	T-cell response controversial (M) and iNKT activation (M)
Cholangiocytes	MHC-I, MHC class I-like-related molecule, and CD1d	$CD8^{+}$ T-cell response controversial (M); mucosal-associated invariant T-cell activation (H); and iNKT activation *in vitro* (H + M)

Figure 10 : Tableau récapitulatif des CPA non professionnelles du foie favorisant la tolérance hépatique.

XP : cross-présentation ; (H) étudié chez l'humain ou chez la souris (M) (Mehrfeld et al., 2018).

Majoritairement, la présentation d'antigènes par ces cellules provoque l'inhibition ou l'apoptose des lymphocytes T et la formation de lymphocytes T mémoires quiescents. Cependant, cette particularité ne réprime pas pour autant leur capacité à monter une réponse immunitaire contre un pathogène.

Par ailleurs, les cellules de Kupffer jouent un rôle important dans cette tolérance puisqu'elles expriment de nombreuses molécules immunosuppressives comme PD-L1, l'IL-10, l'arginase, l'oxyde nitrique (NO) ou encore des espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS). De plus, des études ont démontré que les cellules NK résidentes du foie ont un rôle déterminant dans le maintien d'un état de tolérance grâce à leur phénotype et leurs fonctions spécifiques. En effet, les cellules NK conventionnelles sont connues pour leur grande capacité à sécréter de l'IFNγ et leur cytotoxicité mais les cellules NK hépatiques ont pour caractéristiques d'exprimer constitutivement TRAIL et NKG2A permettant l'inhibition des lymphocytes T CD8+ (Zhang et al., 2019). Enfin, cet état de tolérance est également favorisé par l'expansion des cellules T régulatrices ou par l'inactivation et la délétion des cellules T auto-réactives (Crispe, 2014).

III. L'inflammation et la fibrose

Dans le foie, l'inflammation mise en place en réponse à des dommages tissulaires est très efficace mais peut être néfaste si elle n'est pas contrôlée. Le foie est d'ailleurs considéré comme un organe modèle pour l'inflammation grâce à la complexité des interactions entre tous ses composants aussi bien de l'immunité innée, de l'épithélium ou des cellules étoilées (Hepatic Stellate Cell, HSC). A court terme, l'inflammation est bénéfique car elle permet d'éliminer les éventuels pathogènes et de favoriser la régénération lors de dommages hépatiques aigues. Si cette inflammation persiste, un processus de fibrose est mis en place. Ce processus correspond à la formation d'une grande quantité de tissu cicatriciel dans le tissu hépatique qui peut être bénéfique en homéostasie ***(Figure 11)***. En effet, des études ont montré que lorsque les réponses fibrotique et régénérative sont contrôlées, la fibrose protège les hépatocytes des stimuli toxiques potentiels et permet donc au tissu d'être plus résistant aux lésions. Cette étape de fibrose est régulée et contrôlée par différents acteurs du système immunitaire comme certaines cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les cellules NK et les cellules dendritiques ou adaptative comme les lymphocytes T CD4+.

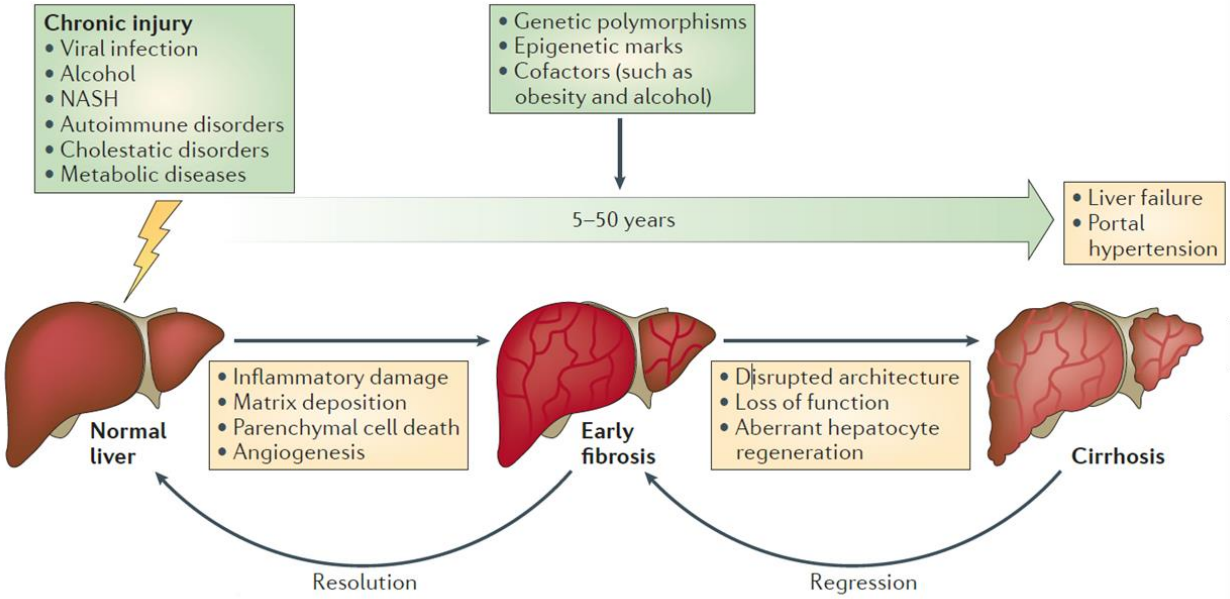


Figure 11 : Les étapes de fibrose et de cirrhose lors d'hépatopathies chroniques.

Lors de lésions hépatiques répétées, le foie induit des mécanismes conduisant à une inflammation chronique associée à des dépôts de matrice extracellulaire, de la mort cellulaire et de l'angiogenèse. Ces mécanismes vont alors favoriser une fibrose qui peut être résolue car elle est réversible en éliminant la cause de l'inflammation. Cependant, lorsque cette cause persiste, la fibrose s'aggrave et va conduire à une cirrhose en détruisant l'architecture hépatique qui s'accompagne d'une perte de fonctions hépatiques. Cette étape de cirrhose peut mettre des années à se développer comme dans le cas de l'hépatite C chronique (30 ans). Une fois la cirrhose établie, la résolution de la maladie devient impossible et le potentiel de régression diminue de façon drastique. A cette étape, le patient souffre alors de complications comme les infections, l'hémorragie digestive ou encore une encéphalopathie et enfin le développement d'un CHC (Pellicoro et al., 2014).

Cependant, si l'inflammation devient chronique, elle peut provoquer une cirrhose, un processus pathologique favorisant l'émergence d'un CHC (voir chapitre 2, II, A). En effet, lorsque le parenchyme hépatique est endommagé de façon chronique, des boucles de lyse hépatocytaire et de régénération s'opèrent et provoquent la sécrétion de différentes cytokines comme l'IL-6, l'IL-1β et le TNFα par les cellules immunitaires résidentes comme les cellules de Kupffer, les monocytes ou les ILCs. Ces cytokines vont alors favoriser le recrutement de cellules immunitaires et l'activation des cellules étoilées qui vont à leur tour sécréter des cytokines et des facteurs de croissance et ainsi favoriser une boucle d'inflammation (Amicone and Marchetti, 2018). Plus précisément, l'IL-1β est une cytokine inflammatoire sécrétée par les macrophages après activation de l'inflammasome. Le TNFα, produit majoritairement par les cellules inflammatoires et endothéliales, induit la survie et empêche l'apoptose des hépatocytes. Enfin l'IL-6 produite majoritairement par les cellules de Kupffer et rapidement après une lésion hépatique, active et maintient une inflammation

constante ce qui favorise la cirrhose et l'activation de certaines signalisations associées à la tumorigenèse. De plus, il a été montré que les macrophages hépatiques et l'arrivée de cellules inflammatoires favorisent la production de ROS ainsi que de TGFβ provoquant la différentiation des HSC en myofibroblastes (Bataller and Brenner, 2005; Fabregat and Caballero-Díaz, 2018). Ces cellules vont alors relarguer de grande quantité de matrice extracellulaire favorisant le processus de fibrose. La libération de ROS dans le tissu hépatique peut conduire à des dommages à l'ADN induisant des altérations génétiques et des mutations initiatrices de la tumorigenèse.

Bien que majoritairement décrit lors des étapes pré-cancéreuses, l'inflammation joue aussi un rôle dans la tumeur en favorisant l'arrivée et la différenciation de cellules inflammatoires comme les monocytes, les cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC) qui vont relarguer des molécules immunosuppressives comme l'iNOS (inducible NO synthase), l'arginase-1, mais aussi des facteurs aggravant la tumorigenèse comme le VEGF, les MMPs, le TGF-β et les S100A8/9 qui vont stimuler la néo-vascularisation, l'invasion, la prolifération et enfin l'apparition de métastases (Umansky et al., 2014).

L'inflammation jour donc un rôle à double tranchant selon son intensité, sa chronicité et la nature de ses acteurs. Elle peut être bénéfique si elle est contrôlée mais aussi être délétère si elle devient chronique en instaurant un environnement favorable à l'émergence d'un CHC. L'inflammation et l'immunosurveillance sont donc étroitement liées et peuvent être vues comme les deux extrêmes d'une balance ***(Figure 12)***.

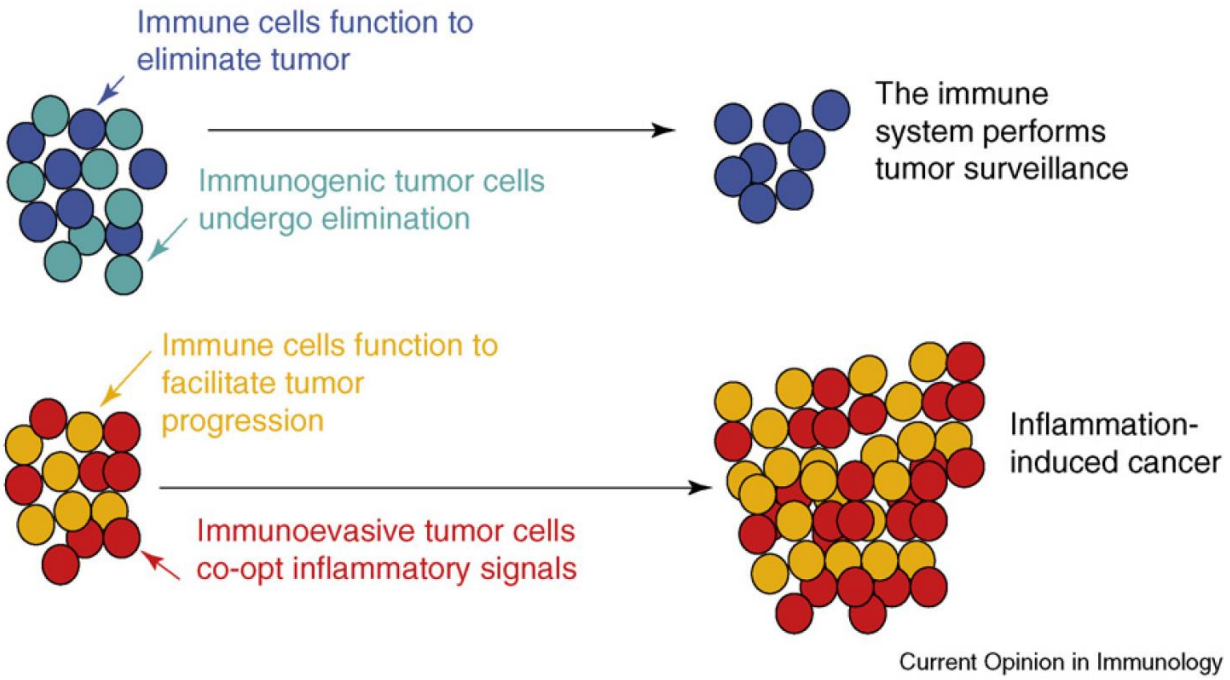


Figure 12 : Immunosurveillance versus inflammation.

Ce schéma montre les deux extrêmes d'une réponse immunitaire contre des cellules tumorales. Le panel du haut représentant l'immunosurveillance, montre des cellules tumorales immunogéniques, pouvant être reconnues par des cellules immunitaires fonctionnelles et être éliminées. Le panel du bas représente une réponse immunitaire inefficace contre des cellules tumorales invisibles. Dans ce cas, les cellules immunitaires sont pro-inflammatoires incapable de reconnaitre les cellules tumorales et favorisant même la tumorigenèse. Les cellules tumorales quant à elles, sont agressives et ont la capacité de polariser les cellules immunitaires à leur avantage. Ce dialogue pro-inflammatoire va alors favoriser l'émergence d'une tumeur arborant un phénotype agressif. (Bui and Schreiber, 2007)

IV. L'immunosurveillance

A. Les débuts de l'immunosurveillance

La première hypothèse sur l'immunosurveillance du cancer date des années 50 et postule que des cellules de l'immunité adaptative peuvent reconnaitre une cellule transformée comme du non soi et l'éliminer. Plus tard, plusieurs équipes (Bui and Schreiber, 2007; Burnet, 1971) définissent plus précisément le concept d'immunosurveillance en stipulant que les cellules pré-néoplasiques peuvent être reconnue par les cellules immunitaires. Elles sont dites immunogéniques de par l'expression d'antigènes tumoraux à leur surface. Ces antigènes associés à la tumeur appelés tumor-associated antigen ou TAA, sont exprimés après l'accumulation de mutations changeant le profil d'expression génique des cellules tumorales (Dunn et al., 2004). Dans le CHC, des TAA ont été bien identifiés comme

l'α-fœtoprotéine (AFP), une protéine synthétisée dans le foie fœtal et normalement absent des hépatocytes matures.

B. L'immuno-édition

L'immuno-édition du cancer est un processus dynamique qui décrit le façonnage de la tumeur par la réponse des cellules immunitaires. Ce processus illustant parfaitement le rôle ambivalent du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale, se présente en trois phases : Elimination, Equilibre et Echappement donnant « la règle des trois E ».

Lors d'un processus de tumorigenèse, les cellules pré-néoplasiques expriment certaines molécules comme des signaux de danger, des TAAs ou encore des ligands de récepteurs innés, permettant aux cellules immunitaires de reconnaitre ces cellules et de les éliminer. Cependant, il peut arriver que la totalité des cellules tumorales ne soit pas éliminée et persistent, on assiste alors à un équilibre entre la tumeur et la réponse immunitaire. Pendant cette longue phase, certaines cellules tumorales peuvent acquérir un avantage sélectif comme la perte d'expression d'un TAA ou du CMH (appelés variants tumoraux) alors même que certaines populations essayent de les éliminer. D'autres cellules infiltrant la tumeur peuvent également remodeler le microenvironnement en relargant certaines molécules favorisant l'angiogenèse et le remodelage de la matrice extracellulaire comme lors d'un processus de réparation tissulaire après des dommages (voir paragraphe inflammation et fibrose) ou la diminution des molécules de reconnaissance. Ainsi, ces mécanismes entrainent l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance (van der Burg et al., 2016; Hanahan and Coussens, 2012; O'Donnell et al., 2019; Schäfer and Werner, 2008).

C. Les alarmines et IFN de type I

Lors de dommages tissulaires ou pendant la tumorigenèse, certaines cellules meurent majoritairement par nécrose, libérant ainsi certaines molécules intracellulaires dans le milieu extracellulaire. Ces molécules, qui ne sont pas censées se retrouver en dehors des cellules, sont alors reconnues par le système immunitaire. On appelle ces molécules, les DAMPs (damage-associated molecular patterns), ou alarmines. Les alarmines peuvent provenir de granules comme les

défensines, du noyau comme HMGB1, l'IL-1α, l'IL-33 ou encore du cytoplasme comme l'HSP70, les protéines S100 ou l'ATP (Saïd-Sadier and Ojcius, 2012; Yang et al., 2017). Toutes ces alarmines sont reconnues par des récepteurs appelés PRR, patterns recognition receptors, principalement portés par les cellules dendritiques et les macrophages (Garg and Agostinis, 2017). Ces signaux de danger peuvent avoir des rôles ambivalents en particulier dans la réponse anti-tumorale ***(Figure 13)*** et peuvent mener à la sécrétion d'interféron de type I.

Alarmin	Promotor of tumor immunity	Inhibitor of tumor immunity
HMGN1	Th1 immune response Tumor-specific CTLs Antitumor immune protection	HMGN1 knockout
HMGB1	Th1 immune response Tumor-specific CTLs TAA cross-presentation	Angiogenesis Interacting with TIM-3 Tumor relapse in *Tlr4** patients
IL-1α	Anti-proliferative Th1 immune response Tumor-specific CTLs NK and CTL infiltration	Angiogenesis Tumor-associated inflammation Keratinocyte transformation
IL-33	Antitumor immune response NK and CTL infiltration	Th2 immune response ST2 knockout Tumor cell proliferation MDSC generation & recruitment
Defensins	Th1 immune response Tumor-specific CTLs NK and CTL infiltration	Tumor cell proliferation Tumor-associated inflammation
HSPs	Th1 immune response Tumor-specific CTLs TAA cross-presentation CTL-mediated killing	
S100A8/A9	Tumor cell apoptosis	DC and Mϕ differentiation MDSC generation & recruitment Tumor metastasis S100A8 knockout
ATP	Antitumor immune response	Rapid conversion to adenosine P2X7 knockout

Figure 13 : Les alarmines et leur conséquence sur l'immunité anti-tumorale.

Toutes les alarmines, à l'exception des HSPs, arborent des rôles ambivalents dans l'immunité tumorale. (Yang et al., 2017)

Les interférons de type I (IFN de type I) sont sécrétés après la reconnaissance des DAMPs par les cellules portant un PRRs. Ces IFN ont un rôle très important dans la promotion de la réponse anti-tumorale puisqu'ils font le lien entre les réponses innées et adaptatives (Woo et al., 2015). En effet, il a été démontré que la production d'IFN de type I par les cellules dendritiques dans le microenvironnement tumoral permet la génération de lymphocytes T CD8+ spécifiques de la tumeur grâce à la

stimulation de la cross-présentation par les cellules dendritiques (Fuertes et al., 2013) ainsi que la production d'IFNγ par les lymphocytes Tγδ (Devilder et al., 2009).

D. La voie c-Gas/STING

Récemment, il a été montré que les cellules tumorales pouvaient présenter un dérèglement de la réplication de l'ADN résultant en la présence d'ADN cytosolique (Khoo and Chen, 2018). Lors d'une progression en mitose, les dommages à l'ADN dans les cellules tumorales peuvent provoquer la formation de micronuclei qui, lorsque leur enveloppe se rompt, expose l'ADN chromatidien. Ces différents types d'ADN sont reconnus par la molécule cGas et activent une réponse pro-inflammatoire dépendante de STING (Stimulator of Interferon Genes). Cette réponse induit la production d'IFN de type I ainsi que de facteurs inflammatoires associés à la sénescence (senescence-associated secretory phenotype factors, SASPs).

E. La reconnaissance par les cellules innées

Les premières cellules de l'immunité innée ayant été décrites dans l'immunité anti-tumorale sont les cellules NK. Ces cellules ont la capacité de détecter des cellules tumorales grâce à de nombreux mécanismes, d'initier la réponse anti-tumorale mais aussi de contrôler la progression tumorale et l'apparition de métastases (López-Soto et al., 2017).

1. L'APOPTOSE PAR LE TNF, TRAIL ET FAS

Les cellules cytotoxiques tels que les cellules NK ou encore les lymphocytes T CD8+ peuvent exprimer des ligands faisant partis de la famille du TNF qui, lorsqu'ils se lient à leur récepteur, vont provoquer l'apoptose de la cellule cible ***(Figure 14)***.

Ces ligands présentent une homologie de structure mais diffèrent au niveau de plusieurs points. Ils ont chacun leur spécificité de reconnaissance : FasL reconnait le récepteur Fas/CD95, le TNF se lie aux TNF récepteur -1 ou -2 (TNFR-1/-2) et TRAIL à différents récepteurs comme TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2 et l'OPG (von Karstedt et al., 2017).

De façon intéressante, il a été montré que les cellules NK hépatiques exprimant TRAIL avaient un rôle important dans la tumorigenèse car elles sont capables d'éliminer les métastases du foie (Cretney et al., 2002; Takeda et al., 2001).

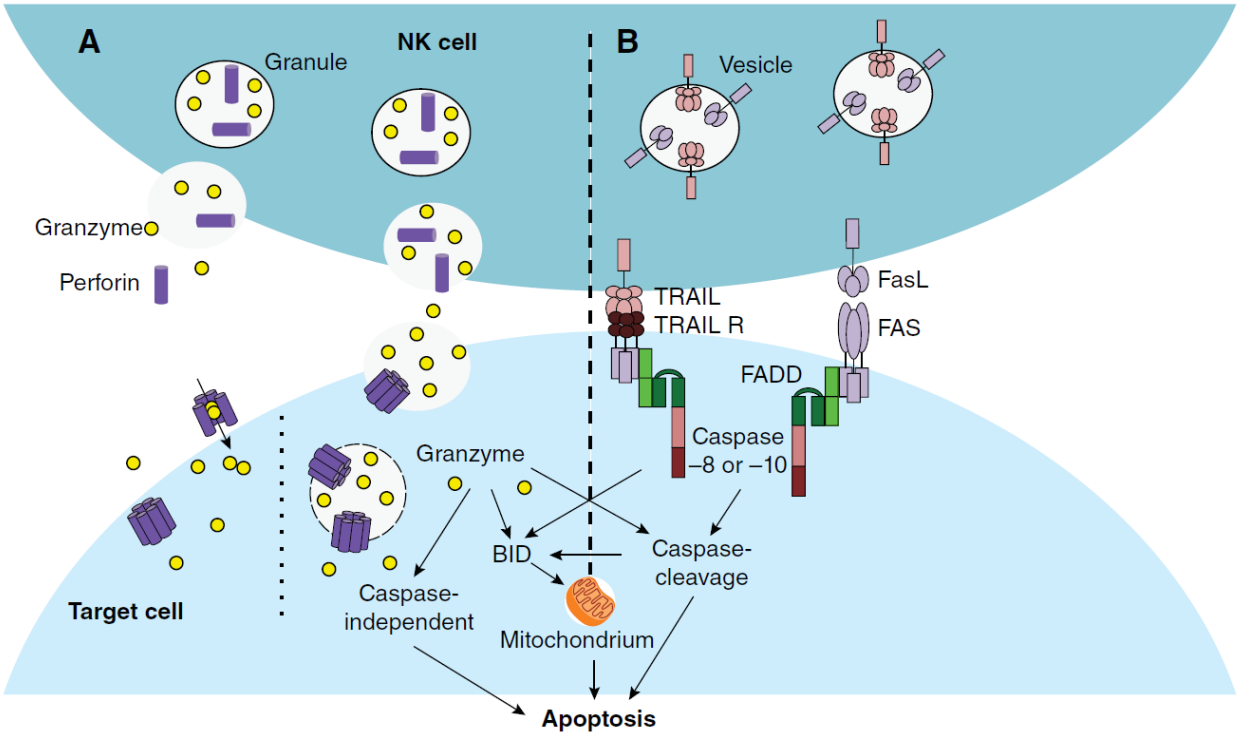


Figure 14 : Mécanismes conduisant à l'apoptose de la cellule cible par TRAIL et FasL.

(A) Cytotoxicité par les granzymes. Des granules de granzymes sont libérées par la cellule NK après reconnaissance de la cellule cible. Les molécules de granzymes entrent dans la cellule cible soit par des pores soit par endocytose provoquant l'activation des caspases, une dysfonction mitochondriale ou encore une apoptose caspase-indépendante.

(B) Cytotoxicité par les récepteurs de mort. La liaison de FasL ou de TRAIL avec leur récepteur spécifique provoque l'activation des caspases, une dysfonction mitochondriale et l'apoptose de la cellule cible. (Prager and Watzl, 2019)

2. LES RECEPTEURS ACTIVATEURS INNES

De nombreux récepteurs inhibiteurs ou activeurs ont été décrit à la surface des cellules NK. Il a d'ailleurs été montré que la balance de leur expression permette la régulation de l'état d'activation de ces cellules (***Figure 15***) (Leung, 2014).

De façon générale, les cellules NK peuvent reconnaitre les cellules présentant un stress comme lors d'une infection virale, un stress oxydatif, prolifératif ou d'un stress oncogénique. Ces différents stress provoquent l'expression de molécules appelées ligands à la surface des cellules et sont reconnus spécifiquement par des récepteurs activateurs à la surface des cellules immunitaires comme les NK mais aussi les NKT, les lymphocytes T γδ ou encore les lymphocytes T CD8+. Cette reconnaissance va alors activer les cellules immunitaires et permettre l'élimination des cellules stressées. Ces ligands peuvent aussi être reconnus par des récepteurs inhibiteurs induisant l'inhibition de la cellule immunitaire après liaison avec le ligand ***(Figure 15)***.

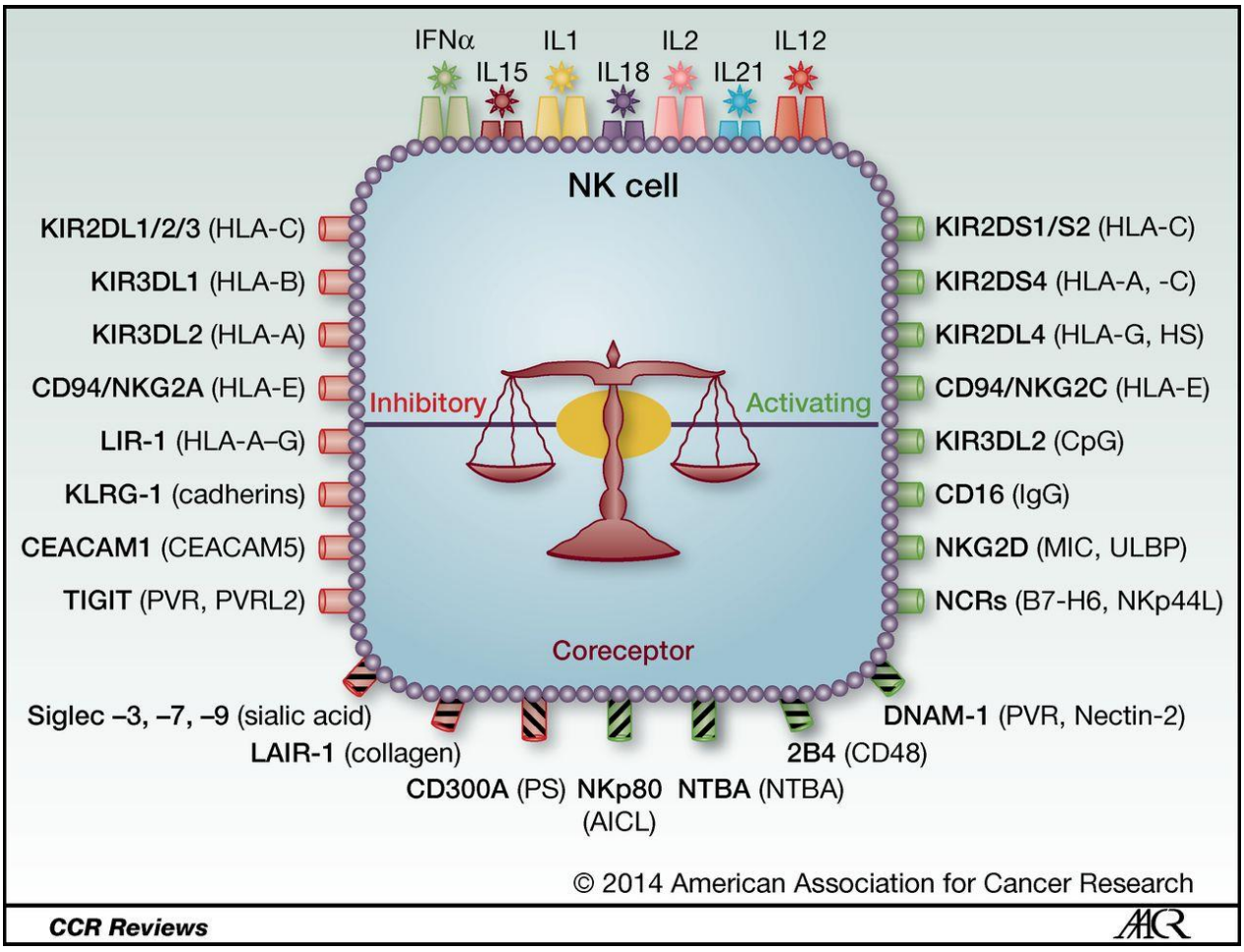


Figure 15 : Les récepteurs activateurs et inhibiteurs sur les cellules NK.
(Leung, 2014)

Il existe de nombreux systèmes de reconnaissance dont les système NKG2D et DNAM-1 qui font l'objet de cette étude.

LE SYSTEME NKG2D/NKG2DL

I. Le récepteur NKG2D

Le récepteur NKG2D, codé par le gène *KLRK1*, est le récepteur activateur le plus connu et le plus décrit dans la littérature.

A. Sur les cellules immunitaires

L'expression de ce récepteur a tout d'abord été identifiée à la surface des cellules NK puis a été découverte sur les lymphocytes T CD8+, les cellules NKT, les lymphocytes T γδ et certains lymphocytes CD4+. Chez l'Homme, le récepteur NKG2D est exprimé par presque toutes les cellules NK, tous les lymphocytes T CD8+ et certains lymphocytes CD4+ alors que chez la souris il est exprimé par les cellules NK et les lymphocytes CD8+ seulement lorsqu'ils sont activés. Son expression n'a jamais été documenté à la surface des lymphocytes CD4+ conventionnels (Marcus et al., 2014; Raulet, 2003).

B. La signalisation intracellulaire

Comme beaucoup de récepteurs activateurs, l'activité de NKG2D dépend de molécules adaptatrices pour l'initiation du signal de transduction et l'activation de la cellule. Deux molécules adaptatrices ont été décrites pour s'associer avec le NKG2D qui sont appelées DNAX-activating proteins of 10 kDa, DAP10 et 12kDa, DAP12. La sélection de l'adaptateur dépend du type cellulaire, de l'isoforme de NKG2D (long, NKG2D-L ou short, NKG2D-S) ainsi que de l'espèce ***(Figure 16)***. Les deux isoformes sont retrouvées chez la souris alors que chez l'Homme, seule la forme longue existe car il n'existe pas d'épissage alternatif. Ainsi, la différence de fonctionnalité du récepteur dans les cellules NK ou les lymphocytes T pourraient être expliquée par le choix de l'adaptateur ainsi que de l'isoforme de NKG2D dans la signalisation moléculaire.

En effet, la simple liaison du récepteur NKG2D avec le ligand permet l'activation des cellules NK et ceci malgré la présence de signaux inhibiteurs (Kim et al., 2005) induisant la libération du contenu des granules cytolytiques et dans certains cas, stimule la production de cytokines comme l'IFNγ (Frazao et al., 2019; Wu et al., 1999). De façon intéressante, les lymphocytes T CD8+ naïfs ne répondent pas à la stimulation par le NKG2D (Nausch and Cerwenka, 2008). Cette stimulation ne s'effectue que lorsque le lymphocyte T CD8+ a déjà été activé et permet uniquement un signal de co-stimulation amplifiant l'activité du TCR (Prajapati et al., 2018) et facilitant la reconnaissance et la destruction de la cellule cible.

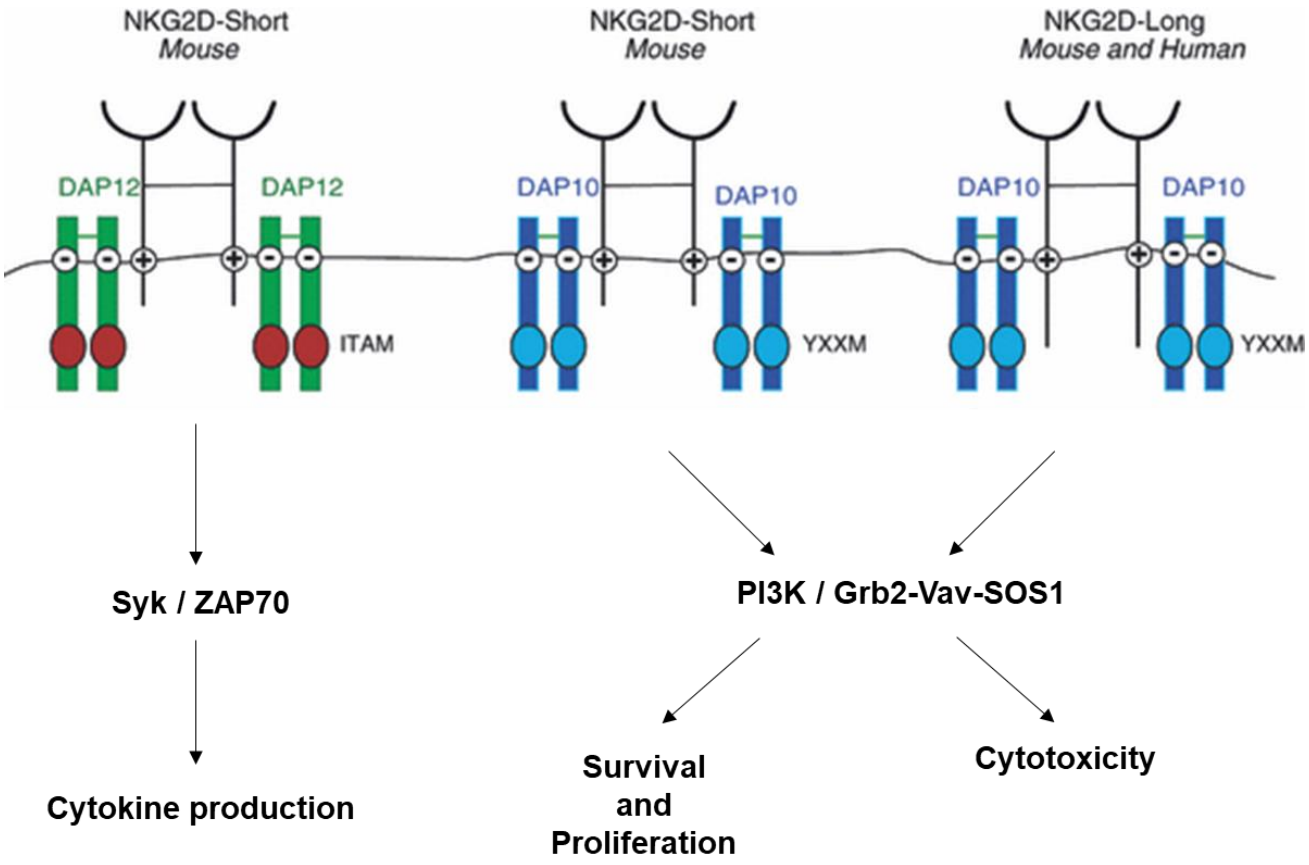


Figure 16 : Le récepteur NKG2D et ses adaptateurs DAP.
Adaptée de (Wu and Wang, 2011)

II. Les ligands de NKG2D

Le récepteur NKG2D se lie spécifiquement à de nombreux ligands qui diffèrent entre l'Homme et la souris.

A. Leur diversité et polymorphisme

Chez l'Homme, il existe deux familles de ligands pouvant être reconnues par NKG2D. La première famille est composée des protéines transmembranaires MICA (MHC-class-I-chain related protein A) et MICB qui sont très polymorphiques (100/40 allèles respectivement) encodées dans la région du CMH. La deuxième famille est composée de six ligands, ULBP1 à ULBP6 qui arborent un polymorphisme plus faible (moins de 20 allèles) (Fernández-Messina et al., 2012; Zingoni et al., 2018) ***(Figure 17)***. Chez la souris, même si le polymorphisme est moindre que chez l'humain, il existe 9 ligands de NKG2D regroupés aussi en familles : RAE-1(α-ε), H60 (a-c) et MULT1 dont aucune n'est homologue de MICA/B ***(Figure 19)***.

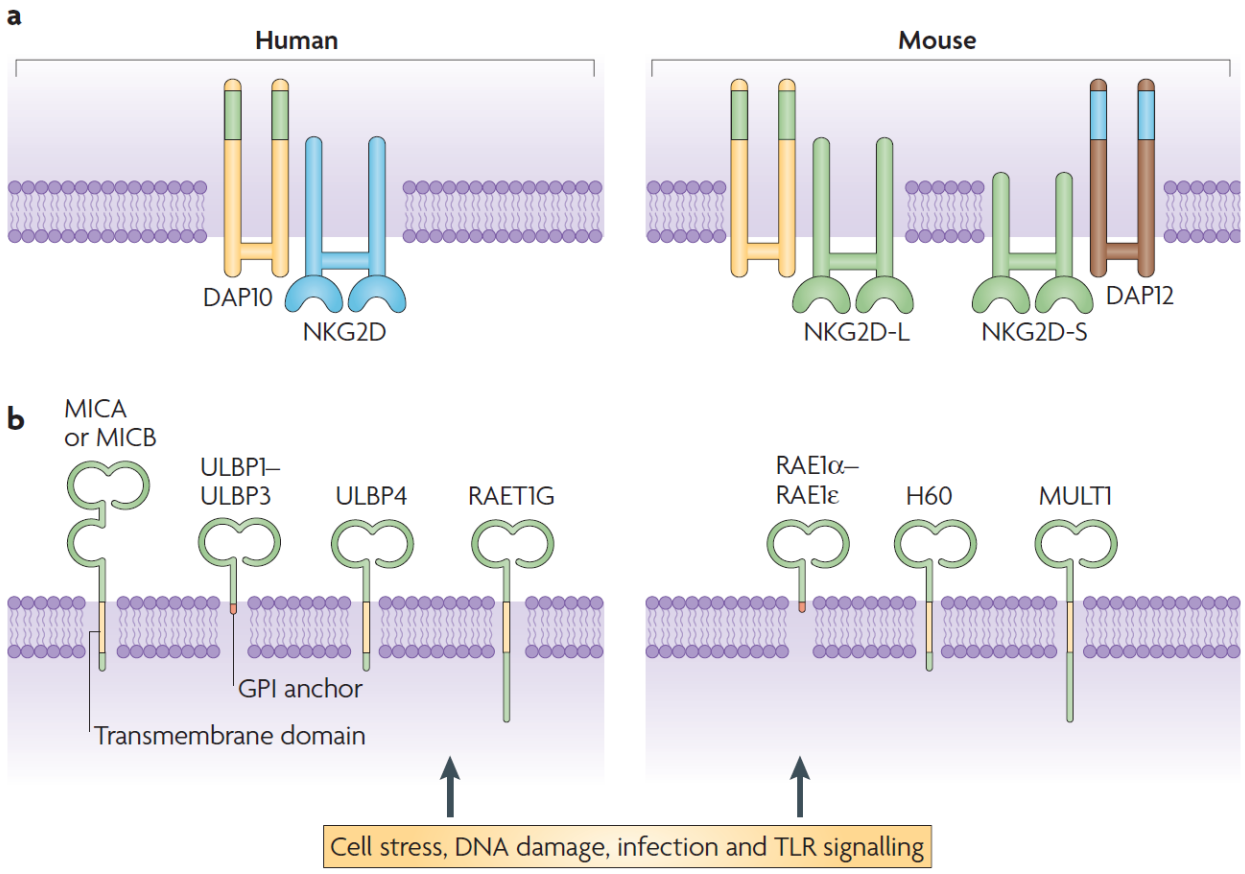


Figure 17 : les ligands de NKG2D chez l'Homme et chez la souris.
(Eagle and Trowsdale, 2007)

L'existence d'autant de ligands pour un seul récepteur a donné naissance à quelques théories. La théorie la plus partagée fait référence à la co-évolution entre l'hôte et les pathogènes se côtoyant depuis des millions d'années (Zingoni et al., 2018; Zuo et al., 2018). En effet, la diversité de ces ligands permet de contrecarrer les mécanismes d'évasion des pathogènes et majoritairement les virus. A ce jour, il

n'existe pas de protéine virale ou d'ARN pouvant cibler tous les allèles et les différents ligands de NKG2D. Cette diversité permet aussi de limiter certaines complications autoimmunes (Eagle et al., 2009) puisque certains allèles provoqueraient des réactions cytotoxiques d'intensité différentes. D'autre part, leur affinité est différente en fonction de la nature du ligand et de l'allèle (Spear et al., 2013).

B. La régulation des ligands de NKG2D

L'étude de ces ligands est complexe tout d'abord à cause de leur diversité et leur polymorphisme mais aussi à cause des nombreux mécanismes permettant leur expression dont la régulation se fait à plusieurs niveaux.

Les ligands de NKG2D ne sont pas exprimés à la surface de cellules normales. Ils ne sont exprimés qu'après un stress comme lors de signaux prolifératifs, d'une infection, d'un stress oxydatif ou encore d'une transformation maligne (stress oncogénique). Tous ces mécanismes partagent la capacité d'activer la réponse aux dommages à l'ADN ou « DNA Damage Response ».

1. Les mecanismes induisant l'expression des NKG2D ligands

a) Le DNA damage response, DDR

L'organisme étant constamment exposé à un stress génotoxique pouvant endommager l'ADN des cellules, le DDR est un mécanisme essentiel aux cellules de l'organisme car il permet de préserver l'intégrité du génome. L'activation de ce mécanisme peut être provoquée par différents stress comme un stress oxydatif due à l'accumulation de ROS qui peut engendrer des dommages à l'ADN ou encore lors d'un dysfonctionnement au niveau des télomères (Longhese, 2008). Les cellules prénéoplasiques présentent généralement une augmentation de leurs signaux prolifératifs due à des mutations ce qui provoque un stress réplicatif et l'activation du DDR afin de stopper la progression dans le cycle cellulaire et réparer les potentielles lésions de l'ADN.

La signalisation du DDR est différente en fonction de la nature de la lésion de l'ADN. En effet, il existe différents types de lésions qui vont activer des checkpoints spécifiques. Après une cassure double brin, la protéine γH2AX est phosphorylée et se propage rapidement sur un large domaine de la chromatine afin d'encadrer les cassures. La master kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) peut alors identifier la cassure double brin et activer la cascade de phosphorylation (Maréchal and Zou, 2013). La deuxième master kinase jouant un rôle dans le DDR est la protéine ATR, (Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related), activée après un spectre plus grand de dommages à l'ADN comme par exemple lors de l'arrêt des fourches de réplication provoqué par un stress oncogénique. Cependant, il a été démontré que ces deux protéines avaient des rôles indépendants et essentiels dans la réparation des cassures double brins démontrant que leur rôle n'est pas redondant (Brown and Baltimore, 2003; Wang et al., 2004) ***(Figure 18)***.

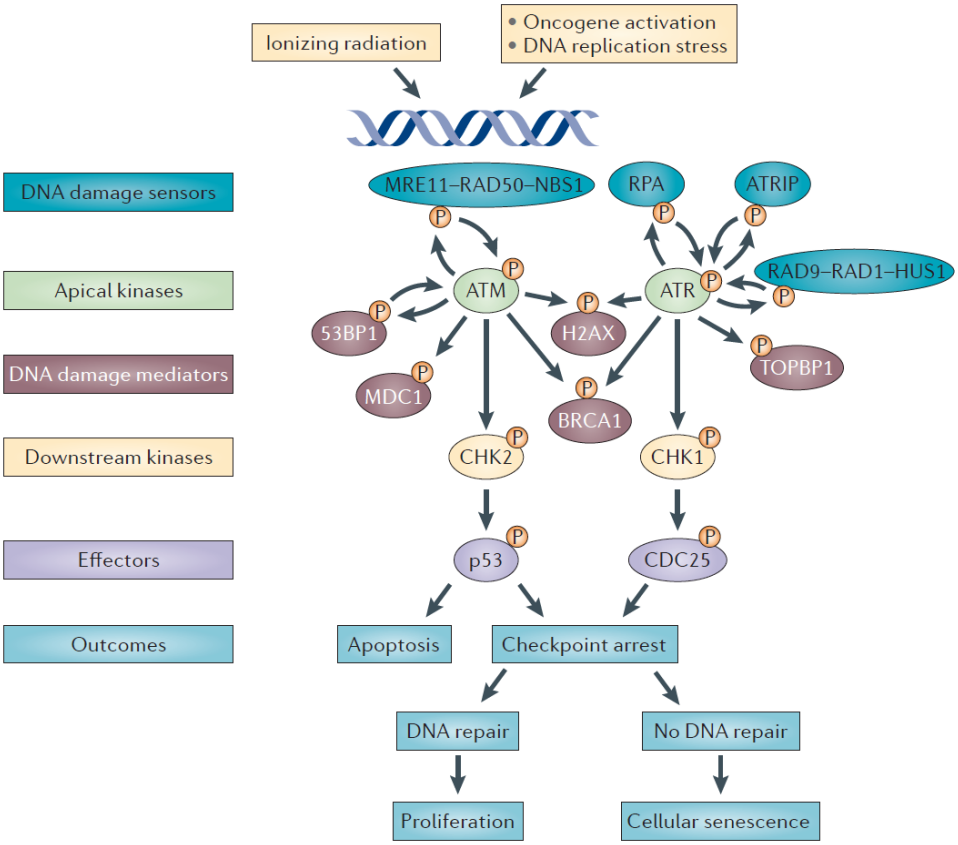


Figure 18 : Le DNA Damage Response.
(Sulli et al., 2012)

L'activation du DDR induit également la phosphorylation de p53 ou de la protéine CDC25 en fonction de l'activation d'ATM ou d'ATR ce qui provoque soit l'apoptose de la cellule soit l'arrêt du cycle cellulaire permettant d'engager une réparation. La

cellule peut reprendre son cycle si le dommage est réparé. Si la réparation n'a pas été efficace et que le dommage persiste, la cellule rentre en senescence ***(Figure 18)*** (Sulli et al., 2012).

b) Les autres mécanismes

De façon intéressante, lorsque le DDR est combiné avec un stress oxydatif ou prolifératif, les signalisations NF-κB et E2F1 sont renforcées et induisent l'expression des MICA/B chez l'Homme et des RAE-1 chez la souris. De plus, la présence d'ADN cytosolique peut activer la voie de signalisation STING qui est reconnue comme un régulateur de l'expression des ligands RAE-1 (Lam et al., 2014). Enfin, il a été montré que le stress du réticulum endoplasmique provoquait l'augmentation de l'expression des ligands ULPBs chez l'Homme ou de MULT1 chez la souris via les signaux PERK-ATF4-CHOP (Hosomi et al., 2018).

La régulation de ces ligands se fait par la suite à plusieurs niveaux, de l'épissage alternatif à la régulation post-transcriptionnelle et post traductionnelle.

2. REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE

De façon intéressante, il a été démontré que de nombreux microRNAs (miRNAs) pouvaient empêcher ou réguler la traduction des ligands de NKG2D dans les cellules cancéreuses. Par exemple, les miR34a et miR34c, des micro ARN suppresseurs de tumeurs, peuvent diminuer fortement le ligand ULBP2 dans le mélanome (Heinemann et al., 2012; Zhang et al., 2016). A l'inverse, dans un modèle murin de cancer du sein, miR-34a peut augmenter l'expression des ligands RAE-1 par un mécanisme encore inconnu.

3. REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE

De façon intéressante, les cellules tumorales ou infectées par un virus ont trouvé un moyen de se cacher du système immunitaire de façon efficace. En effet, il existe des mécanismes de régulation post-traductionnelle qui aboutissent, le plus souvent, à l'absence de ligands à la surface de la cellule transformée ou infectée.

Il est maintenant bien connu que le microenvironnement tumoral est riche en protéases comme les MMPs (matrix metalloproteases) ou des ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) qui ont la capacité de couper les ligands de NKG2D à la surface des cellules tumorales. Ce mécanisme, appelé « shedding », provoque l'échappement des cellules tumorales à l'immunité mais aussi la libération des

ligands de NKG2D dans le milieu. Ces ligands, une fois libérés, peuvent se retrouver dans la circulation sanguine des patients et, étant toujours capables de se lier au récepteur NKG2D, peuvent activer chroniquement les cellules immunitaires et ceci à distance de la tumeur (Chitadze et al., 2013). Cette liaison induit l'activation des cellules et l'internalisation du récepteur (Molfetta et al., 2017). Il a aussi été montré que l'engagement répété du récepteur pouvait provoquer la diminution de l'activité des autres récepteurs activateurs (Koch et al., 2017). Le shedding a donc pour effet de diminuer la réponse anti-tumorale (Dhar and Wu, 2018). En effet, il a été montré que le niveau de MICA soluble est fortement corrélé avec un pronostic défavorable pour les patients atteints de nombreux cancers (Holdenrieder et al., 2006) comme l'ostéosarcome (Xiao et al., 2007), le cancer gastrique (Zhao et al., 2018) ou celui de la prostate (Liu et al., 2018).

Cependant, il a aussi été démontré que la forme soluble et recombinante de MULT1 pouvait promouvoir l'activation des cellules NK ainsi que le rejet de la tumeur dans un modèle murin de mélanome (Deng et al., 2015). En effet, la forme libre de ce ligand très affin pour NKG2D, provoque dans ce modèle la réhabilitation de l'activité des cellules NK en bloquant le récepteur. Ce blocage compétitif permet d'éviter leur désensibilisation par une interaction répétée avec les ligands exprimés à la surface les cellules associées à la tumeur comme les macrophages leur permettant d'attaquer la tumeur à l'aide d'autres récepteurs activateurs ***(Figure 19)***.

De façon intéressante, la susceptibilité de shedding par les metalloprotéases ou la sécrétion dans les exosomes de ces ligands est différente en fonction du ligand, de son allèle et de sa structure. Par exemple, il a été montré que les ligands ULBP1 et ULBP3 étaient plus résistants à la coupure par des métalloprotéases et sont libérés majoritairement par des exosomes.

Les conséquences de la sécrétion des ligands de NKG2D par les exosomes sont sensiblement similaires au shedding. En effet, ils peuvent modifier l'expression de NKG2D et l'activité des NK grâce à la présence des ligands mais aussi grâce à la présence d'autres molécules comme des molécules du CMH I/II, des ligands de récepteurs de mort ou des molécules d'adhérence (Chitadze et al., 2013).

De façon intéressante, il a aussi été démontré que l'augmentation de la sécrétion par les exosomes est due à différents types de stress comme par exemple le stress génotoxique (Vulpis et al., 2017) ou le stress oxydatif (Hedlund et al., 2011).

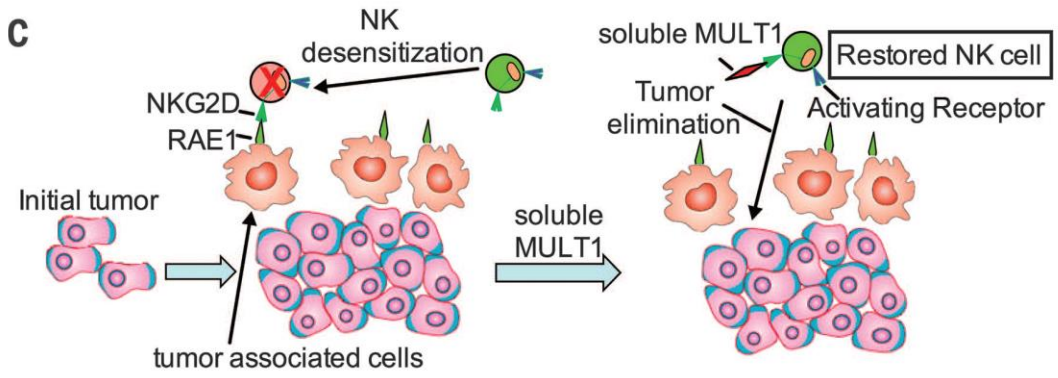


Figure 19 : Le blocage compétitif de MULT1 dans un modèle murin de mélanome.
(Deng et al., 2015)

III. NKG2D dans le cancer du foie

De nombreux travaux montrent que le système NKG2D est impliqué dans l'immunosurveillance tumorale grâce à la reconnaissance et la lyse de cellules tumorales exprimant au moins un des ligands de NKG2D par les cellules NK *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins (Bauer et al., 1999; Bryceson et al., 2006; Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001; Gilfillan et al., 2002; Jamieson et al., 2002; Pende et al., 2001). Chez l'Homme, l'expression des ligands de NKG2D a été décrite dans différents cancers comme les leucémies chroniques (lymphoïdes ou myéloïdes) (Salih et al., 2003) mais aussi dans des tumeurs solides comme le neuroblastome (Raffaghello et al., 2004), le cancer colorectal (McGilvray et al., 2009), de l'ovaire (McGilvray et al., 2010), du col de l'utérus (Cho et al., 2014), du sein (de Kruijf et al., 2012), du pancréas (Chang et al., 2011), mélanome (Paschen et al., 2009) ou encore de l'estomac (Kamei et al., 2018). De façon intéressante, l'expression des ligands de NKG2D peut être corrélée avec un bon pronostic (Colorectal : McGilvray et al., 2009; Col de l'utérus : Cho et al., 2014) ou un mauvais pronostic (Sein : Madjd et al., 2007 ; Poumon : Chen et al., 2013; Ovaire : McGilvray et al., 2010) démontrant le rôle paradoxal du système NKG2D dans le cancer.

Dans le CHC, plusieurs travaux ont démontré qu'une faible expression de MICA/B corrèle avec un haut grade de tumeur et une diminution de la survie (Fang et al.,

2014). Cependant, une autre étude démontre que l'expression de ULBP1 corrèle significativement avec une récurrence précoce de la tumeur (Kamimura et al., 2012). Le système NKG2D est aussi connu pour avoir un rôle important dans les hépatites virales et non virales. En effet, plusieurs travaux ont montré une augmentation de l'expression du récepteur NKG2D à la surface des cellules T intrahépatiques (Kennedy et al., 2008), NK (Huang et al., 2017b; Oliviero et al., 2009; Sène et al., 2010; Varchetta et al., 2009) ou iNKT (Baron et al., 2002) dans les infections virales hépatiques et des ligands (Dansako et al., 2018; Kennedy et al., 2008) durant une infection aux VHB et HVC ainsi que dans la NAFLD et la NASH. De plus, il a été observé que des patients atteints de NAFL et de NASH arborent une augmentation significative de l'expression de MICA/B sur les hépatocytes, qui corrèle avec diminution des fonctions hépatiques, une augmentation de la fibrose et une apoptose hépatocytaire (Kahraman et al., 2010). Tous ces travaux montrent un rôle important mais controversé du système NKG2D dans les différentes pathologies hépatiques, des hépatites virales, dans la NASH jusqu'au CHC.

Récemment, l'équipe de Nadia Guerra à Londres (Imperial College) a étudié l'effet de la délétion de la molécule NKG2D (*Klrk1*$^{-/-}$) sur la tumorigenèse hépatique induite par un carcinogène chimique (diethylnitrosamine, DEN) chez la souris (Sheppard et al., 2017, 2018). De façon intéressante, comparé aux souris NKG2D-déficientes, les souris sauvage (wild-type WT) exprimant NKG2D arborent une diminution de la survie et une augmentation de la charge tumorale. De plus, les résultats de ces travaux montrent que la présence de NKG2D accentue l'inflammation du foie en augmentant l'activité des lymphocytes T CD8+, les lésions hépatiques et une prolifération compensatoire (Sheppard et al., 2017). Ainsi, ces travaux démontrent un rôle pro-inflammatoire et pro-tumoral de NKG2D dans la tumorigenèse hépatique induite par le DEN chez la souris.

LE SYSTEME DNAM-1/DNAM-1L

Le système DNAM-1 décrit comme un système d'alerte comme le système NKG2D est pourtant bien différent dans de nombreux aspects. Bien que de plus en plus étudié depuis quelques années, son rôle reste encore peu connu et particulièrement dans le foie.

I. Le récepteur DNAM-1

A. Sur les cellules immunitaires

Le récepteur DNAM-1 (DNAX accessory molecule 1) aussi appelé CD226 a tout d'abord été décrit comme une molécule d'adhérence et de costimulation (Shibuya et al., 1996) permettant de favoriser la synapse entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales ou infectées. Ce récepteur est exprimé par les lymphocytes T, les cellules NK ainsi que les cellules monocytaires et certaines cellules B (Shibuya et al., 1996). Par la suite, il a été démontré que DNAM-1 était essentiel dans l'immunosurveillance tumorale dans plusieurs modèles de tumeurs puisque son absence (souris DNAM-$1^{-/-}$) ou son blocage diminue la réponse anti-tumorale *in vivo* et *in vitro* (Chan CJ et al., Cell death Diff., 2014) et accélère la croissance tumorale (Iguchi-Manaka et al., 2008). Plus précisément, il a été démontré que ce récepteur permettait de stimuler la cytotoxicité et la production d'IFNγ des cellules NK (Chan et al., 2010; Lakshmikanth et al., 2009) grâce à la stabilisation de la synapse immunologique avec la cellules cible (Kim et al., 2017).

De façon intéressante, il a récemment été montré que DNAM-1 est exprimé de façon précoce lors du développement des cellules NK dans la moelle osseuse et est impliqué dans leur éducation de façon indépendante du CMH I (Wagner et al., 2017). En périphérie, deux populations de cellules NK se distiguent chez la souris en fonction de l'expression de DNAM-1 : les cellules DNAM-1 positives et DNAM-1 négatives, arborant des phénotypes et des profils géniques différents. Les cellules NK DNAM-1 positives peuvent sécréter de grandes quantités de cytokines comme l'IL-12 et l'IL-18 et ont un rôle anti-tumoral essentiel. De façon intéressante, les fonctions de ces cellules ne sont cependant pas dépendantes de l'interaction avec le

ligand CD155. Les cellules NK DNAM-1 négatives produisent davantage de cytokine proinflammatoire MIP1 et expriment plus fortement certains gènes codant les récepteurs aux cellules NK mais pas le récepteur NKG2D (Martinet et al., 2015).

B. La signalisation intracellulaire

La signalisation intracellulaire du récepteur DNAM-1 est encore peu connue. Cependant, il a été démontré que cette signalisation, contrairement à la majorité des récepteurs activateurs des cellules NK, utilise ni un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) ni une autre molécule adaptatrice possédant un motif ITAM. En effet, après la liaison de DNAM-1 avec son ligand, le domaine intracellulaire du récepteur est phosphorylé par la protéine kinase C permettant d'activer un signal intracellulaire (Shibuya et al., 1996). La phosphorylation de la Ser329 permet la liaison du récepteur avec la protéine LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) requise pour leurs différentes fonctions et particulièrement pour la cytotoxicité (Shibuya et al., 1999) ***(Figure 20)***. Cette association est requise pour le recrutement de la Fyn Src kinase qui va alors phosphoryler la Tyr322 conduisant à la phosphorylation des protéines SLP-76 et Vav1. Après liaison, DNAM-1 s'associe avec le cytosquelette (Ralston et al., 2004) et avec les protéines hDlg impliquées dans la formation de la synapse immunitaire (Hanada et al., 2000) et 4.1G ***(Figure 20)***.

De façon très intéressante, en plus de la balance d'expression entre les récepteurs activateurs et inhibiteurs, la fonction cytotoxique et de relargage de cytokines des cellules NK est régulée par une activation synergique de paires spécifiques de récepteurs activateurs en fonction de leur dominance. De façon intéressante, le récepteur activateur NKG2D est considéré comme « dominant » de par son association avec la molécule adaptatrice DAP10 contenant un domaine ITAM. A l'inverse, DNAM-1 est considéré comme un récepteur de costimulation au même titre que ceux de la famille SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) comme par exemple 2B4 (Long et al., 2013). Cependant, des travaux *in vitro* utilisant une lignée cellulaire de drosophile, ont démontré que NKG2D au même titre que DNAM-1, NKp46, 2B4, CD2 ne pouvait pas à lui seul stimuler la dégranulation mais devait être associé à d'autres récepteurs, la seule exception étant la combinaison de NKG2D et DNAM-1 (Long et al., 2013). Il a par ailleurs été montré que la régulation de la

sécrétion de cytokines et de chimokines était beaucoup plus complexe que la dégranulation en tant que telle. Par exemple, l'engagement du récepteur 2B4 est suffisant pour activer la sécrétion de RANTES et des MIP-1α et β mais son association avec les récepteurs DNAM-1, LFA-1 et NKG2D permet une sécrétion plus forte de ces cytokines ainsi que la sécrétion d'autres types de cytokines comme l'IFNγ et le TNFα (Fauriat et al., 2010).

Ainsi, la signalisation et le rôle fonctionnel de tous ces récepteurs sont encore peu connus, et donc débattus dans la communauté scientifique.

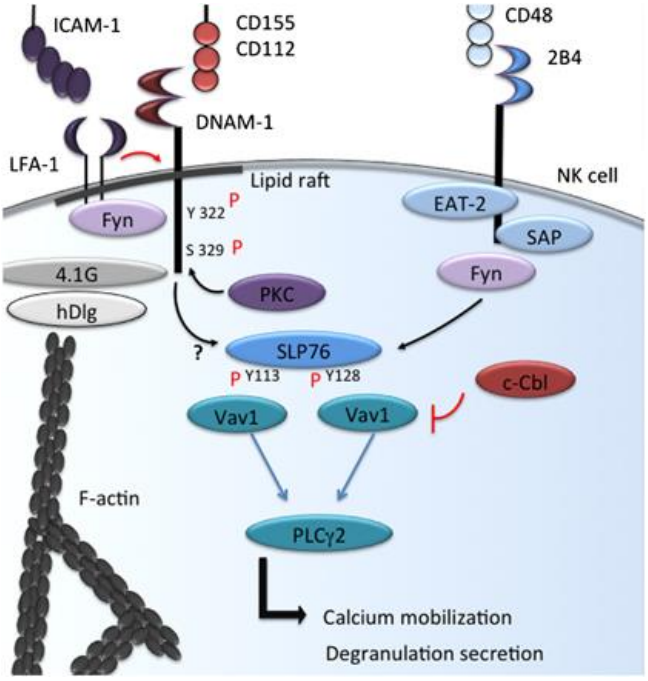


Figure 20 : Cascade de signalisation de DNAM-1 après liaison avec les ligands.

Après engagement du récepteur avec ses ligands, la Ser329 est phosphorylé par la PKC permettant alors l'association de DNAM-1 avec LFA-1 et la liaison au cytosquelette d'actine via hDlg et 4.1G. LA Fyn Src kinase est alors recrutée et va phosphoryler la Tyr322 dans la partie intracellulaire de DNAM-1 conduisant à la phosphorylation des protéines SLP-76 et Vav1 puis PLCγ2 afin de stimuler la mobilisation du calcium et stimuler la dégranulation et la sécrétion de cytokine. (de Andrade et al., 2014)

II. Les récepteurs inhibiteurs

D'autres récepteurs sont capables de se lier aux mêmes ligands que le récepteur DNAM-1 qui sont les récepteurs TIGIT et CD96 (TACTILE) qui contrairement à DNAM-1 provoque l'inhibition des cellules immunitaires.

A. TIGIT

TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain) est un récepteur de la famille de CD28 qui se lie, chez l'Homme, aux ligands CD155, CD112 (paragraphe III) ainsi

qu'à un troisième ligand, CD113. Cependant, chez la souris, TIGIT semble exclusivement se lier au CD155 (Stanietsky et al., 2013). De façon intéressante, l'affinité de TIGIT est plus forte que celle de DNAM-1 pour le ligand CD155 (Stengel et al., 2012). Il a d'ailleurs été montré que le récepteur TIGIT diminue l'interaction de DNAM-1 avec CD155 de façon dose-dépendante (de Andrade et al., 2014) suggérant que ce système fonctionne de façon similaire au système CD28-CTLA-4-CD80-CD86 chez les lymphocytes T (Alegre et al., 2001).

Ce récepteur est exprimé à la surface de différents types cellulaires comme les lymphocytes T mémoires, les Treg, les cellules NK et les cellules NKT (de Andrade et al., 2014; Chan et al., 2014; Stamm et al., 2018). TIGIT contient deux motifs ITIM conduisant à une signalisation inhibitrice des fonctions de la cellule ***(Figure 21)***. Par ailleurs, des travaux ont montré que la liaison de TIGIT avec ses ligands diminue la cytotoxicité des cellules NK à la fois chez l'Homme et chez la souris (Stanietsky et al., 2009, 2013). De plus, le niveau d'expression de TIGIT à leur surface corrèle négativement avec la capacité des cellules NK humaines à lyser des cellules cibles exprimant CD155 ainsi qu'à produire de l'IFNγ (Wang et al., 2015a).

De façon intéressante, son expression constitutive sur les cellules T régulatrices permet de stimuler une réponse anti-inflammatoire en induisant la production d'IL-10 (Fuhrman et al., 2015; Joller et al., 2014).

B. CD96

CD96 (TACTILE) est un récepteur inhibiteur découvert en 1992 (Wang et al., 1992) qui reconnait le ligand CD155 et CD111 chez la souris (Seth et al., 2007). Il possède un domaine intracellulaire ITIM et peut être exprimé sur les cellules T et NK mais aussi NKT. Ce récepteur a été très peu étudié malgré sa découverte il y a plus de 25 ans. Ses fonctions ont donc été longtemps peu connues. Cependant, les travaux de l'équipe de Mark Smyth, utilisant une souris CD96 déficiente, ont démontré que celui-ci avait un rôle inhibiteur des cellules NK (Chan et al., 2014).

Les données sur CD96 et TIGIT sont controversées dans la littérature. En effet, TIGIT est considéré comme le récepteur inhibiteur dominant comparé à CD96 (Stanietsky et al., 2009, 2013). Cependant, en utilisant des souris *Cd96-/-*, *Cd226-/-*, *Tigit-/-* et *Cd226-/-* et C*d96-/-*, il a été montré que CD96 avait la capacité de contrer l'activité de CD226 alors que la déficience en TIGIT n'avait aucun effet. Par ailleurs,

les cellules NK déficientes en CD96 arborent un phénotype identique des cellules NK contrôles en terme de cytotoxicité contre une cellule cible. L'une des hypothèses apportées par Mark Smyth et ses collègues se trouve dans la dynamique d'activation des cellules NK. Une cellule naïve ou activée depuis peu verra son activité être régulée par CD96 qui sera downrégulé (Chan et al., 2014) afin de laisser place à TIGIT, dont l'expression augmente de façon concomitante.

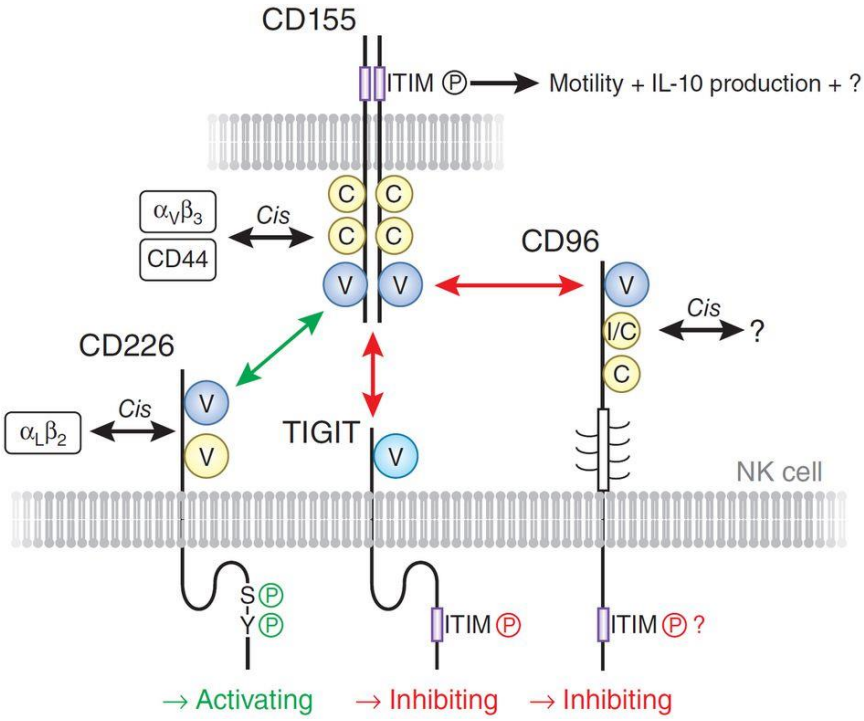


Figure 21 : les structures des récepteurs CD226, TIGIT, CD96 et du ligand CD155.

CD155 peut se lier avec 3 récepteurs : CD226, récepteur activateur et deux récepteurs inhibiteurs, TIGIT et CD96. D'autres interactions, non représenté sur ce schéma, sont possibles comme CD226-CD112, TIGIT-CD112 considérées comme faibles et probablement avec une fonction mineure dans l'immunosurveillance. CD155 interagit en cis avec LFA-1 (αLβ2) dans certain tissu ou avec CD44 dans les monocytes. LFA-1 est associé aussi mais de façon permanente avec CD226 dans les cellules NK alors que dans les lymphocytes T cette interaction ne se produit que lorsqu'ils sont activés. (Bernhardt, 2014)

De plus, lorsque l'on retrouve ces deux récepteurs sur une même cellule, TIGIT et CD96 n'auraient pas le même rôle. En effet, TIGIT inhiberait la lyse des cellules cibles tandis que CD96 limiterait la production de cytokines telles que l'IFNγ. Une autre hypothèse propose que TIGIT aurait un rôle inhibiteur préférentiellement dans les lymphocytes T CD8+ (Chauvin et al., 2015; Johnston et al., 2014; Joller et al., 2014; Kong et al., 2016) alors que le récepteur CD96 inhiberait majoritairement les cellules NK (Bi et al., 2014; Georgiev et al., 2018; Liu et al., 2013; Lozano et al., 2012). Cependant, une étude récente démontre que le récepteur CD96 est aussi capable d'inhiber les capacités anti-tumorales des lymphocytes T CD8+ dans un

contexte de tumorigenèse. Ces travaux démontrent aussi que les lymphocytes infiltrants les tumeurs (TILs) à la fois murin et humain coexprimaient CD96 et TIGIT (Mittal et al., 2019).

Ainsi, les mécanismes moléculaires de ces récepteurs et leur rôle exact restent encore peu connus.

III. Les ligands

Comme les ligands de NKG2D, les ligands CD155 (PVR, necl-5) et CD112 (PVRL2, nectin-2) font partis de la super famille des immunoglobulines et sont respectivement, une nectine-like et une nectine. Ces molécules sont connues pour leur rôle dans les jonctions entres deux cellules épithéliales et la polarisation (Ikeda et al., 2003; Mueller and Wimmer, 2003; Takai et al., 2003).

Ces ligands sont majoritairement exprimés sur des cellules ayant subi un stress génotoxique comme lors d'une infection ou d'une transformation après activation des protéines ATM/ATR (de Andrade et al., 2014; Gao et al., 2017).

Bien que leur affinité avec le récepteur soit similaire, le ligand CD112 se lie moins facilement au récepteur DNAM-1 *in vitro* (Tahara-Hanaoka et al., 2004). Il a même été suggéré qu'il n'y aurait pas d'interaction entre ces deux molécules chez la souris (Stanietsky et al., 2013). De plus, il a été démontré chez l'Homme que CD226 se lierait préférentiellement au CD155. C'est pourquoi la majorité des études sur ce système se concentrent sur l'analyse de l'expression de CD155 plutôt que de CD112.

Absent à la surface des cellules normales, ces ligands sont majoritairement exprimés sur des cellules ayant subi un stress génotoxique comme lors d'une infection ou d'une transformation après activation des protéines ATM/ATR (de Andrade et al., 2014; Gao et al., 2017). Il a d'ailleurs été montré que l'expression du CD155, initialement identifié comme le récepteur au poliovirus (Poliovirus Receptor, PVR), est induite par le DDR lors d'un stress oncogénique mais aussi lors d'un stress oxydatif (présence de ROS) (Ardolino et al., 2011; Fionda et al., 2015; Soriani et al., 2009). La présence de ce ligand a été rapportée dans de nombreux cancers solides et hématologiques comme l'adénocarcinome pulmonaire, le mélanome, le sarcome

des tissus mous et le cancer colorectal (Atsumi et al., 2013; Bevelacqua et al., 2012; Masson et al., 2001; Nakai et al., 2010). De plus, des études cliniques ont montré une corrélation entre l'expression de CD155 et la progression tumorale ainsi qu'un pronostic défavorable chez des patients atteint de cancer du poumon (Nakai et al., 2010), cancer colorectal (Masson et al., 2001) ainsi que dans l'ostéosarcome (Zhuo et al., 2018), le cholangiocarcinome (Huang et al., 2017a), le mélanome (Bevelacqua et al., 2012), le cancer du pancréas (Nishiwada et al., 2015) et le cancer du sein (Triki H. Life Sci. 2019 Jun). Aussi, il a été démontré chez l'Homme et chez la souris qu'en plus de son expression sur les cellules tumorales, il peut être exprimé par des cellules myéloïdes qui infiltrent les tumeurs altérant ainsi les fonctions des lymphocytes T et des cellules NK via les récepteurs inhibiteurs TIGIT et CD96 (Li et al., 2018). Enfin, il a été rapporté par plusieurs études que la présence de CD155 à la surface des cellules tumorales favorise leur migration, leur adhérence et leur résistance à l'apoptose (Li et al., 2018; Morimoto et al., 2008; Sloan et al., 2004, 2005) ***(Figure 21)*** expliquant alors la corrélation de son expression avec le mauvais pronostic de nombreuses tumeurs.

IV. DNAM-1 dans le cancer du foie

Le système DNAM-1 est de plus en plus étudié dans le mélanome mais aussi d'autres cancers dont le CHC. Il a été démontré dans une cohorte de patients atteints de CHC que la perte d'expression du ligand CD155 était corrélée à un phénotype agressif de la tumeur et à un mauvais pronostic (Qu et al., 2015). De plus, cette étude montre que CD155 n'est pas exprimé dans la tumeur mais dans le tissu péritumoral. Une deuxième étude montre qu'une faible expression du ligand CD112 était associée à une faible survie globale chez les patients atteints de CHC (Huang et al., 2014) démontrant que la diminution de l'expression de ces ligands pouvait être un mécanisme permettant l'évasion des cellules tumorales à l'immunosurveillance. L'un des mécanismes induisant la diminution du ligands CD155 dans le cancer du foie a été démontré *in vitro* par Gong et al., 2014. Utilisant une lignée cellulaire humain d'hépatome, ces travaux montrent que l'activation de la réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal reliées (Unfolded Protein Response, UPR) diminue l'expression de CD155 mais pas de CD112 diminuant ainsi la capacité cytotoxique des cellules NK contre ces cellules (Gong et al., 2014). De façon intéressante, il a été

montré dans plusieurs lignées cellulaires humains d'hépatoblastome exprimant les ligands de NKG2D MICA/B, que le blocage de CD155 diminuait fortement la lyse de ces cellules par les cellules NK démontrant le rôle essentiel de ce système dans le contrôle de l'hépatoblastome (Pfeiffer et al., 2011).

Comme énoncé précédemment, le système DNAM-1 est assez peu étudié et les travaux s'intéressant aux récepteurs de ce système dans le foie et le CHC sont rares.

La première étude sur DNAM-1 (CD226) dans le CHC a été publiée en 2009 par l'équipe de Véronique Catros à Rennes et démontre que les lymphocytes T non conventionnels Vγ9Vδ2 peuvent exprimer DNAM-1 et CD96. Ils montrent aussi que la cytotoxicité de ces cellules contre des lignées cellulaires humaines de CHC et leur capacité à produire de l'IFNγ étaient dépendants de DNAM-1. De façon intéressante, seul CD155 est impliqué dans les fonctions des lymphocytes Tγδ remettant en cause une fois de plus le rôle de CD112 (Toutirais et al., 2009).

Une autre étude parue en 2017, montre chez des patients atteints de CHC, que l'expression de CD226 (mRNA et protéine) est plus faible dans la tumeur que dans le tissu adjacent (Jia et al., 2017). Ces travaux démontrent également qu'une forte expression de DNAM-1 corrèle avec un meilleur taux de survie. Cependant, cette étude montre de nombreuses lacunes bibliographiques et manque de relevance quant aux expériences *in vitro*.

Les travaux portant sur les récepteurs CD96 et TIGIT sont plus nombreux que ceux sur le récepteur DNAM-1. En effet, ces deux récepteurs ayant un rôle inhibiteur comme les checkpoints PD-1 et CTLA-4, ils suscitent beaucoup d'intérêt et semblent des cibles intéressantes pour l'immunothérapie. Il a été montré en physiologie et dans le CHC que TIGIT était exprimé à la surface des NK résidents du foie exprimant également les marqueurs CD56, CXCR6+, CD69 et le facteur de transcription Eomes (Harmon et al., 2016; Hudspeth et al., 2016; Stegmann et al., 2016; Sun et al., 2019b). Des travaux ont démontré le rôle déterminant de TIGIT dans l'hépatite virale aigue chez la souris. En effet, le blocage et la délétion de ce récepteur provoque l'aggravation des lésions hépatiques. De façon intéressante, cette étude montre également que les cellules de Kupffer exprimant le ligand CD155 diminue l'activité des NK qui produisent moins d'IFNγ diminuant ainsi les lésions hépatiques. Ces travaux ont permis de montrer un nouveau mécanisme de tolérance hépatique lors d'une hépatite virale (Bi et al., 2014). Enfin, il a été montré très récemment chez les

patients atteints de CHC que le récepteur CD96 corrélait avec un mauvais pronostic des tumeurs (Sun et al., 2019c). Cette étude montre également que l'augmentation des cellules NK exprimant CD96 dans la tumeur. Ces cellules arborent un phénotype d'épuisement avec une diminution de la capacité de sécrétion d'IFNγ et de TNFα ainsi qu'une diminution de l'expression transcriptionnelle des gènes codant pour T-bet, IL-15, perforine et granzyme B. Cependant, l'expression transcriptionnelle des gènes codant pour l'IL-10 et pour le TGFβ est augmentée dans ces cellules. Ainsi, le système d'immunosurveillance DNAM-1 semble avoir un rôle important dans le foie et plus particulièrement dans le CHC.

PROJET DE THESE

PRESENTATION DE L'ETUDE

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), est une tumeur grave pour laquelle, il y a peu de traitements efficaces. De nombreux travaux ayant montré le rôle essentiel du microenvironnement immunitaire dans le cancer, l'immunothérapie représente une perspective très intéressante pour le traitement du CHC (Hou et al., 2019).

Durant ces dernières années, plusieurs classifications ont été proposées (Chapitre 2, III) et toutes démontrent que les CHC peuvent être séparés en deux types de cancérogenèse : classe prolifératives/classe non prolifératives, tumeurs plus agressives/tumeurs moins agressives (Goossens et al., 2015) ou en 6 groupes de tumeurs, G1 à G6 ***(Figure 6)*** (Calderaro et al., 2017, 2019). Le premier type de tumeurs est associé principalement à des mutations *TP53* regroupant les groupes de tumeurs G1/G2/G3 qui présentent une forte instabilité génomique, une prolifération importante et une perte de différenciation des hépatocytes. Le deuxième type est dépendant de mutations activatrices du gène *CTNNB1* codant pour la β-caténine qui représente environ 30 à 40% des CHC et qui se répartissent dans les groupes G5 et G6 (Calderaro et al., 2017; Nault et al., 2019b). Ces tumeurs sont bien différenciées, associées à une faible instabilité chromosomique. De façon intéressante, elles sont caractérisées par l'absence d'infiltrat immunitaire et sont peu inflammatoires. Ces tumeurs sont donc dites « froide » et ne sont pas éligibles à l'immunothérapie (Pinyol et al., 2019).

Mes travaux de thèse visent à étudier le microenvironnement immunitaire du CHC à la fois chez l'Homme et chez la souris, en s'intéressant aux mécanismes d'immunosurveillance qui permettent le contrôle de la tumorigenèse. Pour cela, nous avons accès à une cohorte annotée de patients atteints de CHC rangés en fonction des altérations génétiques. De plus, afin d'étudier plus en détails les mécanismes d'immunosurveillance dans la tumorigenèse hépatique, nous avons choisi deux modèles murins récapitulant les deux types majoritaires de CHC ainsi qu'un modèle murin permettant l'étude de la voie Wnt/β-caténine.

I. Cohorte de patients

Pour cette étude, nous avons utilisés deux cohortes de patients atteints de CHC permettant d'analyser les ligands des mécanismes NKG2D et DNAM-1.

Pour les ligands de NKG2D MICA/B et de DNAM-1 CD155 et CD112, nous avons utilisé notre cohorte de patients atteints de CHC publié dans Nault et al., 2019b incluant 801 échantillons provenant de 720 patients. Nous avons considéré uniquement 354 échantillons où nous avons analysé l'expression des ligands MICA/B par qPCR (Fluidigm Taqman).

Pour les ligands de NKG2D ULBP1/2, nous avons utilisé une cohorte de patients publié dans Bayard et al., 2018 où nous avons analysé leur expression dans 160 échantillons de CHC (voir Partie 1, Mat&Met).

II. Les modèles d'études

A. Modèle de tumorigenèse par le diéthylnitrosamine (DEN)

Afin de modéliser les groupes de tumeurs humaines G1/G2/G3 associées à un mauvais pronostic, nous utilisons au laboratoire le modèle de carcinogenèse hépatique induite par un mutagène chimique, le diéthylnitrosamine ou DEN. C'est un modèle utilisé par de très nombreuses équipes de recherche travaillant sur le cancer du foie. Une seule dose de DEN (25 mg/kg) est injectée à 14 jours de vie de la souris (lorsque les hépatocytes sont encore en prolifération). Après injection, une série de réactions chimiques complexes modifie la molécule de DEN in vivo afin de former un agent réagissant avec les bases de l'ADN provoquant des mutations qui ont été retrouvées majoritairement dans le gène H-ras et B-ras (Chen et al., 1993; Friemel et al., 2019; Stahl et al., 2005). Au bout de 8 à 9 mois, de multiples nodules tumoraux émergent (Finnberg et al., 2004). Ces tumeurs présentent un phénotype très agressif, arborent un important stress oxydant (Qi et al., 2008) et sont associées à une inflammation du tissu hépatique (Dow et al., 2018; Heindryckx et al., 2009; Tang et al., 2017). Pour notre étude, le développement tumoral a été suivi par échographie à la plateforme du petit animal de l'institut Cochin.

Ce modèle ne récapitule pas de manière exacte la tumorigenèse hépatique humaine des groupes G1/G2/G3 puisqu'il n'y a pas d'activation de la télomérase, ni de

mutations dans le gène p53 (Dow et al., 2018; Friemel et al., 2019). Cependant, la tumorigenèse hépatique induite par le DEN se développe lentement (9 mois) et permet de mimer l'hétérogénéité des CHC chez l'Homme (Schulze et al., 2016) ainsi que l'incidence mâle/femelle dans la plupart des populations (Kulik and El-Serag, 2019; Naugler et al., 2007). De plus, les tumeurs induites par le DEN arborent une instabilité chromosomique certains marqueurs retrouvés dans les CHC humains comme le glypican-3 ainsi que la heat shock protein 70 (Di Tommaso et al., 2007). Enfin, des travaux de génomique montrent que les CHC induits par le DEN arborent des profils d'expression génique dont les signatures inflammatoires (TNFα, IL-6 et NF-κ-B) sont similaires aux CHC humains de mauvais pronostic (Hoshida et al., 2008; Lee et al., 2004; Naugler et al., 2007).

Ce modèle de CHC induit par le DEN, malgré certaines discordances avec les CHC humains, permet d'obtenir des tumeurs graves, inflammatoires et ayant des caractéristiques similaires aux hépatites et CHC humains en terme d'expression de ligands de NKG2D (Sheppard et al., 2018).

B. Modèle de CHC muté pour la β-caténine

L'équipe du Dr Perret a mis au point un modèle murin de carcinome hépatocellulaire spontané basé sur la transgénèse de l'oncogène c-myc placé sous le contrôle du promoteur de la pyruvate kinase hépatique (liver pyruvate kinase, Lpk) permettant l'expression de c-myc dans les hépatocytes appelé modèle Lpk-myc (Cartier et al., 1992). L'accumulation de cette protéine va permettre l'induction de mutations activatrices dans le gène codant pour la β-caténine spécifiquement dans les hépatocytes (de La Coste et al., 1998). Le mécanisme exact de l'apparition de cette mutation reste encore inconnu. Cependant, il est maintenant bien établi que cet évènement mutationnel provoque l'émergence d'un CHC muté dans le gène *Ctnnb1* à environ 10 à 12 mois de vie.

De plus, il a été montré que ces tumeurs présentent une grande similarité avec les tumeurs CTNNB1 mutées chez l'Homme autant au niveau du type de mutations qu'au niveau du phénotype de la tumeur (voir Chapitre 2, II et III) (Cadoret et al., 2002; de La Coste et al., 1998).

C. Modèle Apc-KO

Afin d'analyser en détails les conséquences d'une activation de la voie Wnt/β-caténine, nous disposons d'un modèle murin Apcflox/flox, TTR-cre-Tam. Ce modèle est issu du croisement entre le modèle Apcflox/flox, qui contient deux séquences loxP au niveau de l'exon 14 du gène Apc et le modèle TTR-cre-Tam qui expriment la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur hépatospécifique de la transthyrétine (Tannour-Louet et al., 2002). Ce modèle est basé sur la délétion de la séquence entre les deux sites loxP du gène Apc grâce à l'expression de la CRE recombinase exprimée spécifiquement dans les hépatocytes et après injection d'une large dose de tamoxifène (1,5 mg par souris). La protéine APC, frein de la voie Wnt/β-caténine, n'est alors plus active permettant la libération de la β-caténine du son complexe de séquestration, son accumulation dans le cytoplasme et l'activation de la voie dans tous les hépatocytes du parenchyme hépatique (Benhamouche et al., 2006; Colnot et al., 2004) (Chapitre 1, V, Figure 3).

III. Contexte du laboratoire

Les projets du laboratoire, dirigé par le Dr Chantal Desdouets, visent à étudier les maladies du foie, de la stéatose non alcoolique à la stéatohépatite jusqu'au CHC, en termes de polyploïdie, de cycle cellulaire, de DDR et d'immunosurveillance des hépatocytes. Les travaux du Dr Jean-Pierre Couty s'inscrivent au sein de ces thématiques avec un accent particulier sur l'immunologie du cancer. Le Dr Jean-Pierre Couty s'intéresse notamment au rôle d'une petite molécule de 16 kDa, LECT2 (Leukocyte Cell-Derived Chemotaxin-2), initialement décrite comme un facteur chimiotactique des neutrophiles (Yamagoe et al., 1998a). L'expression de cette protéine est retrouvée principalement dans le foie chez l'Homme et chez la souris (Yamagoe et al., 1998a, 1998b). Il a d'ailleurs été montré par l'équipe du Dr Perret que LECT2 était majoritairement produit par les hépatocytes sous le contrôle direct de la signalisation Wnt/β-caténine (Ovejero et al., 2004). Son expression est donc significativement augmentée dans les CHC mutés pour la β-caténine. Ses rôles sont divers et sont liés de façon étroite à l'inflammation dans différentes hépatopathies, de la NASH jusqu'au CHC. Sandrine Pham, étudiante en thèse sous la direction de

Jean-Pierre Couty, travaille notamment sur le rôle de LECT2 dans le métabolisme et le microenvironnement immunitaire dans un contexte de NASH.

LECT2 joue un rôle très important dans la biologie de certaines cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules NKT dans le foie. En effet, la souris LECT2-/- présente un enrichissement de la population NKT intrahépatique sans modification des autres populations immunitaires (Saito et al., 2004) et cette observation est dépendante du statut sanitaire des animaleries et de l'alimentation (non publiés). Dans ce contexte, le Dr Jean-Pierre Couty a démontré que, dans des modèles murins récapitulant la cancérogenèse hépatique dépendante d'une activation aberrante de la voie Wnt/β-caténine, LECT2 avait un rôle prépondérant, favorisant une réponse anti-inflammatoire et permettant de réguler l'agressivité des tumeurs. En effet, la délétion de LECT2 dans le modèle murin de CHC muté pour la β-caténine provoque l'arrivée de monocytes inflammatoires qui participent activement à l'aggravation des tumeurs qui sont alors plus proliférantes, plus inflammatoires et indifférenciées (Anson et al., 2012; L'Hermitte et al., 2019) (voir Annexe). De façon intéressante, le même phénotype apparait dans une souris Lpk-myc n'ayant plus d'iNKT (Jα-18-/-) démontrant ainsi un rôle anti-tumoral puissant de ces cellules (Anson et al., 2012).

IV. Projet initial

Mon projet de thèse initial visait donc à caractériser le rôle de LECT2 et des cellules iNKT dans la tumorigenèse hépatique en termes d'immunosurveillance des hépatocytes et sur la ploïdie hépatique. En effet, il a été montré qu'au cours de la transformation d'un tissu, le contingent diploïde diminue au profit d'un contingent hyperploïde. L'apparition de ce contingent favorise l'émergence d'un contingent aneuploïde caractérisé par son instabilité chromosomique et sa sensibilité à la transformation (Davoli and de Lange, 2012). Par ailleurs, des travaux par l'équipe de Guido Kroemer ont rapporté pour la première fois, à partir d'un modèle de cancer du côlon, que le système immunitaire était capable de reconnaître une cellule hyperploïde cancéreuse à partir de l'exposition d'une molécule de stress du réticulum endoplasmique, la calréticuline, à sa surface empêchant l'apparition de ce contingent (Aranda et al., 2018; Senovilla et al., 2012).

De façon intéressante, une autre équipe a démontré que les cellules polyploïdes pouvaient être reconnues et éliminées par les systèmes d'immunosurveillance NKG2D et DNAM-1 grâce à l'expression de leurs ligands à la surface des cellules hyperploïdes (Acebes-Huerta et al., 2016). De plus, l'expression des ligands de ces systèmes d'immunosurveillance est activée par le stress oncogénique et le DDR dans de nombreux cancers mais restent peu étudiés dans le cancer du foie (Chapitre 3 et 4, II, III). Ainsi, nous avons choisi d'étudier ces systèmes d'immunosurveillance dans la cancérogenèse hépatique.

Dans ce contexte, il a été observé sur coupes de foie qu'un contingent hautement polyploïde était présent dans les tumeurs mutées β-caténine (Lpk-myc), déficiente en LECT2 (Lpk-myc x LECT2-/-) et en iNKT (Lpk-myc x Jα18-/-) comparativement au foie sain. Nous avons donc choisi d'analyser et de cartographier à grande échelle ce contingent polyploïde dans les CHC grâce à une technique d'imagerie pour laquelle j'ai participée à la mise au point pendant ma thèse. Après marquage en immunofluorescence du noyau des hépatocytes sur coupe de foie (Hoechst), cette technique, appelée « macro » permet de détecter et de mesurer la taille des noyaux des hépatocytes afin de définir la proportion des contingents 2n, 4n, 8n et plus et de les visualiser au sein du tissu tumoral (Chapitre 1, IV, B) (voir annexe : Bou-Nader et al., 2019).

Après la mise au point de cette technique, j'ai pu effectuer l'analyse de nombreuses tumeurs provenant des souris Lpk-myc, Lpk-myc x LECT2-/- et Lpk-myc Jα-18-/- ainsi que du modèle Apc-KO, Apc-KO x LECT2-/-, Apc KO x Jα18-/- en terme de ploïdie (environ 4 souris pour chaque condition). De façon surprenante, l'analyse de la ploïdie de ces tumeurs a révélé des résultats inattendus et assez hétérogènes. De façon surprenante, nous avons observé une diminution du contingent hyperploïde (8n) uniquement dans les CHC sans NKT comparé à un CHC avec NKT.

Ainsi, l'analyse de ces résultats révèle des mécanismes complexes et paradoxaux qui diffèrent des résultats chez les patients atteints de CHC (Bou-Nader et al., 2019) ainsi que dans d'autres pathologies hépatiques comme la NASH (Gentric et al., 2015).

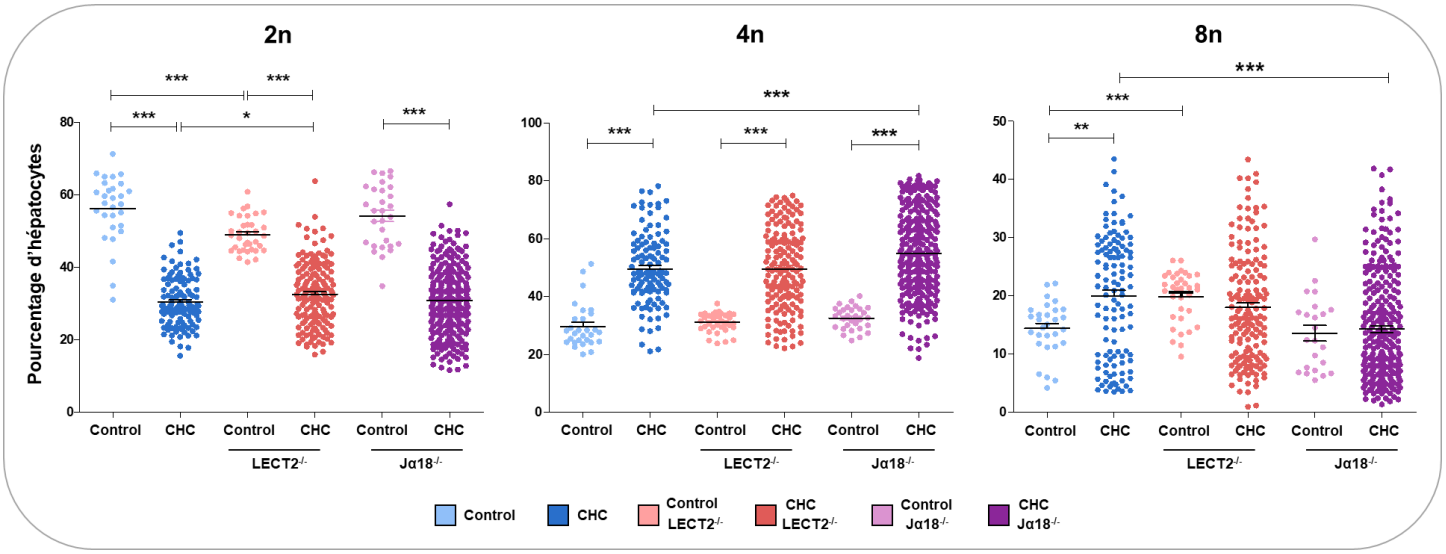


Figure 22 : Analyse de la ploïdie hépatocytaire dans les tumeurs mutés Ctnnb1 avec ou sans LECT2 et iNKT.

Par ailleurs, je n'ai pas observé de différences significatives lors de l'analyse des mécanismes NKG2D et DNAM-1 aussi bien en termes d'expression de ces récepteurs que de leurs ligands dans les différents modèles (Lpk-myc ; Lpk-myc x LECT2-/-, Lpk-myc x Jα18-/- ; Apc-KO, Apc-KO x LECT2-/-, Apc KO x Jα18-/-). Ces résultats montrent que l'absence de LECT2 ou des cellules NKT ne semblent pas influencer ces mécanismes dans la tumorigenèse hépatique murine. Ces travaux, qui ont duré environ 18 mois, m'ont amené à revoir les objectifs de mon projet. L'analyse des systèmes d'immunosurveillance NKG2D et DNAM-1 chez les patients et dans nos modèles murins a en effet montré des résultats très intéressants et inattendus. Nous nous sommes donc concentrés sur ces aspects.

J'ai également participé aux travaux du Dr Séverine Celton-Morizur qui visent à caractériser le rôle de la protéine kinase p38 dans l'hépatite fulminante. Cette étude a permis de montrer que la perte de p38 dans l'hépatocyte permet la protection du tissu hépatique contre une agression aigue au tétrachloride (CCl4) de carbone par la modification de la réponse inflammatoire et le remodelage du microenvironnement immunitaire (voir annexe).

V. Projet de thèse

Mon projet de thèse vise à étudier de façon pertinente les mécanismes d'immunosurveillance NKG2D et DNAM-1 dans la cancérogenèse hépatique à la fois chez l'Homme et chez la souris en distinguant les différents types de CHC basés sur les groupes de tumeurs humaines classées en fonction des altérations génétiques et de leur gravité. Les traitements contre le cancer du foie étant limité (Chapitre 2, IV), l'étude de ces systèmes permettrait de mieux comprendre l'immunosurveillance de ce cancer et, à plus long terme, de trouver de nouvelles pistes immunothérapeutiques pour le CHC.

Afin de récapituler la tumorigenèse hépatique humaine et d'en étudier plus précisément les mécanismes, nous avons choisi deux modèles murins de carcinogenèse hépatique permettant de mimer les deux groupes majoritaires de CHC chez l'Homme. Les groupes de tumeurs G1/G2/G3 associées à une instabilité chromosomique sont modélisés grâce au modèle murin de CHC induit par le DEN qui développe des tumeurs hépatiques très inflammatoires et de mauvais pronostic (Paragraphe II, A). Les groupes G5-G6, de bon pronostic et associés à des mutations dans le gène Ctnnb1 codant pour la β-caténine sont modélisés grâce à notre modèle murin Lpk-myc (Paragraphe II, B) (Anson et al., 2012; L'Hermitte et al., 2019).

Mes travaux de thèse seront présentés en deux parties consacrées au mécanisme NKG2D et DNAM-1. La première partie sur le mécanisme NKG2D sera présentée sous forme de publication scientifique en anglais et d'une discussion/conclusion en français. La deuxième partie sur le mécanisme DNAM-1 sera présentée sous forme d'ébauche d'article, en français.

PARTIE 1

LE SYSTEME NKG2D

Le mécanisme d'immunosurveillance NKG2D est très étudié dans de nombreux cancers et particulièrement à travers l'étude de l'expression transcriptionnelle et protéique de ses ligands. Le récepteur NKG2D est quant à lui bien connu pour son rôle activateur des lymphocytes leur permettant de participer à une réponse anti-tumorale. Cependant, ce système a été peu étudié dans le foie et dans la cancérogenèse hépatique.

Dans cette première partie, j'ai étudié ce mécanisme chez l'Homme et chez la souris (voir Introduction, Chapitre 4) en concentrant mes analyses sur l'expression des ligands de NKG2D dans les CHC de bon et mauvais pronostic.

Ces résultats sont présentés sous forme d'article en anglais suivi d'une discussion en français.

The expression of NKG2D ligands determines HCC aggressiveness and is repressed by beta-catenin signalling

Mathilde CADOUX[1], Stefano CARUSO[2], Angélique GOUGELET[3], Sandrine PHAM[1], Séverine CELTON-MORIZUR[1], Nadia GUERRA[4], Jessica ZUCMAN-ROSSI[2], Chantal DESDOUETS[1], and Jean-Pierre COUTY[1]*

1: Team Proliferation Stress and Liver Physiopathology, Genome and Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France.

2: Team Functional Genomics of Solid Tumors, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Labex Immuno-Oncology, Équipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France.

3: Team Oncogenic functions of beta-catenin signaling in the liver" Genome and Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France.

4: Department of Life Sciences, Imperial College London, London, United Kingdom

***Corresponding author**

Jean-Pierre COUTY, Ph.D

Centre de Recherche des Cordeliers (CRC), UMRS INSERM U1138, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, F-75006 Paris, France

Département Génome et Cancer, Building A,

15 Rue de L'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France;

phone: 33 1 44 27 69 06

e-mail: jean-pierre.couty@inserm.fr

CONFLICTS OF INTEREST: All authors concur with submission and affirm that the material submitted for publication, has not been previously reported and is not under consideration for publication elsewhere. The authors also disclose no conflicts of interest.

Abbreviations: HCC, Hepatocellular carcinoma, TME, Tumor microenvironment, NKG2D ligands

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) remains one of the deadliest cancer worldwide. However, many studies have shown the essential role of the immune microenvironment in cancer bringing immunotherapy into the forefront of medical science. Immunosurveillance mechanisms by which immune cells control tumorigenesis, have been insufficiently investigated in HCC. In the present work, we precisely investigated NKG2D system, both in humans and mice, through the expression of NKG2D ligands (MICA/B, ULBP1/2 et Rae-1) in HCC, taking into account for the first time the genomic characteristics/features of HCC tumours. We provided compelling evidence that the expression of NKG2D-ligands associates with poor patients' outcome. Indeed, we found that NKG2D ligands are higher expressed in *TP53*-mutated HCCs than in those harbouring *CTNNB1*-activating mutations. Moreover, we observed that specifically ULBP1/2 expression was downregulated in *CTNNB1*-mutated HCCs and negatively correlates with β-catenin target genes in HCC patients suggesting that β-catenin signalling could inhibit their expression. Using HCC mouse models recapitulating the two major types of human HCCs, we clearly evidenced at the molecular level, that beta-catenin signalling negatively regulates Rae-1 NKG2D ligands, orthologs of ULBPs, through TCF4 binding. Collectively, we demonstrate that the expression of NKG2D ligands correlates with aggressive liver tumorigenesis and that their constant lower expression in *CTNNB1*-mutated HCC could explain their less aggressive tumour phenotype.

Keywords: NKG2D ligands, Hepatocellular carcinoma, HCC, beta-catenin-signalling

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second leading cause of cancer-related death and the fifth-most-common cancer worldwide (Ferlay et al., 2015). HCC is responsible for approximately 800000 deaths each year. Around 90% of HCCs develop on a background of chronic liver disease of varying severity, the induction of fibrosis and/or subsequent cirrhosis (Llovet et al., 2016). Although, in <10% of cases, HCC develops in a healthy liver (El-Serag and Davila, 2011; Forner et al., 2012). The most common risk factors for HCC concern hepatotropic viruses (HBV, HCV), alcohol consumption, aflatoxin B1 exposure, haemochromatosis and more recently metabolic syndrome frequently seen in patients with diabetes and/or obesity (Forner et al., 2012). Importantly, cirrhosis, the ultimate stage of chronic liver disease, remains the main risk factor for HCC development in Western countries (Nault, 2014). Our understanding of HCC pathogenesis has steadily increased in the past 20 years. Recently, genomic functional studies provide an accurate picture of the landscape of genetic alterations and defined core pathways deregulated in HCC (Zucman-Rossi et al., 2015). The most prevalent mutations after those arising in *TERT* promoter are being *TP53* and *CTNNB1* (Nault et al., 2014; Nault and Zucman-Rossi, 2014) defining two major groups of tumors exhibiting specific features. *TP53*-mutated HCCs are aggressive proliferating tumors harboring high level of inflammation (hot tumors) and genomic instability. Conversely, *CTNNB1*-mutated HCCs, exhibit a less severe phenotype that is associated with a favourable prognosis and low levels of proliferation and inflammation (cold tumors).

Treatment options for HCC remain very limited. They mostly concern multitargeted tyrosine kinase inhibitors with very poor survival advantages over best supportive care (Llovet et al., 2015). The fact that the immune system has a major role in the control of tumor growth and metastasis is now a foundation of most cancer

immunotherapies. Until here, therapy using immune checkpoint blockade such as anti-PD1 and/or anti-CTLA-4, represents a very exciting perspective for HCC treatment. However, only 25% of HCCs are eligible to immunotherapy as they express markers of an inflammatory response (Sia et al., 2017). Recent findings report that *CTNNB1*-mutated HCCs harbouring β-catenin activation are associated with immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy (Pinyol et al., 2019; Ruiz de Galarreta et al., 2019). Consequently, new therapeutic strategies based on our understanding of tumor and its relationship with its immune microenvironment, are urgently needed to improve HCC treatment.

With regards to cancer surveillance, the couple NKG2D-ligand/NKG2D has been the subject of intense research in cancer, infection and autoimmunity. Discovered more than two decades ago, the potent activating receptor NKG2D, originally identified on NK cell surface, was evidence as critical player during surveillance of tumors by the immune system. NKG2D-dependent elimination of tumor cells that express at least one cognate ligand has been well documented both *in vitro* (Bauer et al., 1999; Bryceson et al., 2006; Jamieson et al., 2002; Pende et al., 2001) and *in vivo* models of transplanted tumors (Cerwenka et al., 2000; Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001; Gilfillan et al., 2002). Induction and upregulation of NKG2D ligands result from various stress signals including infection, DNA damage, heat shock and hyperproliferation (Lanier, 2008; Raulet et al., 2013).

Expression of NKG2D ligands has been observed in various human cancers. These ligands are cell surface proteins structurally related to major histocompatibility complex (MHC). In human, NKG2D ligands are the two most studied MHC class-I-related chain A and B, MICA and MICB proteins and the six, but very less studied, unique long 16 (UL-16)-binding proteins (ULBP1-6) (Sutherland et al., 2001). Their

counterparts in mice are the retinoic acid early inducible gene-1 Rae-1α-ε (orthologous of ULBPs), minor histocompatibility H60a-c and murine UL16-binding protein-like transcript (MULT1) proteins. In human, variable expression of MICA, MICB and ULBP1-3 ligands was observed in hematopoietic malignancies, including acute and chronic leukemias (lymphoid and myeloid origins) (Salih et al., 2003), but also in solid tumors (Chang et al., 2011; de Kruijf et al., 2012; Kamei et al., 2018; Paschen et al., 2009; Raffaghello et al., 2004). One common feature is the heterogeneity in ligand expression between cancer types and individuals. Several studies have highlighted the paradoxical relationship between ligand expression and patient outcome. Briefly, high levels of cell-surface ligand expression correlated with improved disease-free survival in colorectal (McGilvray et al., 2009), cervical (Cho et al., 2014) and nasopharyngeal carcinoma (Xu et al., 2017) whereas conversely these levels associated with poor prognosis in breast (Madjd et al., 2007), lung (Chen et al., 2013) and ovarian cancers (McGilvray et al., 2010). The expression of NKG2D ligands in HCC remains insufficiently explored as there is still conflicting data about the beneficial versus deleterious role of NKG2D in HCC (Sheppard et al., 2018).

In the present study, we evaluated the expression of NKG2D ligands as MICA/B and ULBP1/2 in a large human HCC data set and in two mouse models that recapitulate both types of human tumors.

Results

The expression of NKG2D ligands, *MICA* and *MICB*, in human HCC correlates with tumor aggressiveness and poor patients' outcome.

To determine whether MICA and MICB was associated with specific clinical HCC features, we assessed their expression level by qPCR analysis (Fluidigm TaqMan) in 354 sample patients (Nault et al., 2019). We first monitored their level of expression according to different diagnosis conditions as following, early HCC (N=10), HCC emerging from HepatoCellular Adenoma (HCA), referred here as HHC/HCA (N=7) and HCC (N=337) compared to Normal Liver samples (N=5) (Figure 1, Panel A). We found that both *MICA* and *MICB* were significantly expressed in early HCC and HCC/HCA compared to NL (N=5). Moreover, both *MICA* and *MICB* were expressed at higher levels in HCC compared to early HCC and HCC/HCA (Figure 1, Panel A). We also checked that the expression levels of both genes *MICA* and *MICB* were well correlated (R=0,677, p<0,0001) suggesting that these two genes belonging to the same family are co-expressed during liver tumorigenesis (Figure S1, Panel A). To go further, we evaluated their expression in HCC according to Edmonson-Steiner grade criteria, discriminating four specific stages and that depicts tumor cells differentiation. We found that the expression of both *MICA* and *MICB* was positively correlated with tumor grade and weak differentiation (Figure 1, Panel B, Figure S1 Panel B). In addition, we evaluated *MICA* and *MICB* expression in the peritumoral adjacent tissue according to fibrosis score. We found that *MICA* and *MICB* ligands are expressed regardless the presence of not of fibrosis in the surrounding tissue histology but with a higher level in the intermediate score of fibrosis F2/F3 (Figure S1, Panel C).

Finally, we used a molecular 5-gene score predicting the outcome of patients with HCC (Nault et al., 2013b) deciphering two groups of HCC as P1 represents HCC with

good prognosis and P2 HCC associated with bad prognosis and early tumor recurrence. Interestingly, we identify that HCC with poor patient outcome exhibited high expression levels of both *MICA* and *MICB* (Figure 1, Panel C).

Collectively, our data show that the expression of NKG2D ligands, *MICA* and *MICB*, in human HCC, associates with tumor aggressiveness and poor patients' outcome.

NKG2D ligands, *MICA* and *MICB*, are lower expressed, in HCC harboring chromosomal stability.

To determine whether the expression of *MICA/B* associates with a specific genetic alteration, we evaluated MICA and MICB expression according the molecular classification of human HCCs (Calderaro et al., 2017). This classification distinguishes G1 to G3 groups that are characterized by aggressive HCC tumors harbouring a high level of chromosomal instability and *TP53* mutations (Boyault et al., 2007; Calderaro et al., 2017; Pal et al., 2010; Tornesello et al., 2013). Conversely, G4 to G6 groups are associated with a better prognosis harbouring chromosomal stability and a well-differentiated tumor phenotype. Particularly, *CTNNB1*-mutated HCCs are found in G5-G6 group and are characterized by the absence of inflammatory infiltrates. Interestingly, we found that the expression levels of both MICA/B were significantly lower in HCC samples from G4 to G6 groups than in G1 to G3 groups (Figure 2, Panel A). We also studied their level of expression according to the three more prevalent mutations (*TERT, TP53, CTNNB1*) within the landscape of genetic alterations of HCC and found that *TP53*-mutated HCC significantly expressed a higher level of *MICA/B* compared to non-mutated HCC (Figure 2, Panel B). Their expression was not significantly different in HCC either mutated or not for *TERT* or *CTNNB1* (Figure 2, Panel B).

Finally, we were able to find a positive correlation in the expression of *MICA/B* with that of *ATM/ATR* genes, two master regulators of the DNA-damage response (Figure S2). These data clearly evidence that *MICA/B* ligands are higher expressed in *TP53*-mutated chromosomically instable HCCs and were correlated with DDR associated genes.

The expression of ULBP1/2 ligands in human HCC is lower in chromosomicallly stable tumors and depends on *CTNNB1* mutational status.

We extended our analysis to the study of ULBP ligands expression, which have so far been poorly studied in HCC. To determine if the expression of ULBPs share common characteristics with MICA/B, we monitored the expression of ULBP1 and 2 based on our previous RNAseq data set according to the molecular classification of human HCCs. Similarly to MICA/B, we found that their expression was significantly lower in G4 to G6 groups compared to chromosomically unstable HCC (G1 to G3 groups) and was even lower compared to normal liver (Figure 3, Panel A). Importantly, the expression of ULBP1/2 in HCC samples according to mutational status revealed a significant higher level of ULBP1/2 in *TP53*-mutated HCCs compared to non-mutated as for MICA/B (Figure 3, Panel B). Interestingly, we found a significant lower level of ULPB1/2 in *CTNNB1*-mutated HCCs suggesting that beta-catenin signalling might regulate negatively the expression of ULBP1/2 ligands (Figure 3, Panel B). In support of these observations, we found that ULBP1 expression was inversely correlated with the expression of 3 positive beta-catenin target genes such as GLUL, LGR5 and TBX3 (Figure 3, Panel C).

Collectively, these findings indicate that the expression of ULBP1/2 ligands in human HCC is higher in *TP53*-mutated HCC and diminished in *CTNNB1*-mutated HCCs strongly suggesting that beta-catenin-signalling controls their expression.

***CTNNB1*-mutated HCC in mice express low levels of NKG2D ligands.**

To gain insights into the molecular mechanisms regulating the expression of NKG2D ligands, we chose two mouse models of liver tumorigenesis that recapitulate the two major groups of human HCC. The Diethylnitrosamine DEN-induced HCC model mimics aggressive unstable tumors with high oxidative stress (Di Tommaso et al., 2007; Qi et al., 2008) and the Lpk-myc+ model recapitulating chromosomally stable *Ctnnb*1-mutated HCC tumors (de La Coste et al., 1998). We then evaluated the level of expression of NKG2D ligands in. In agreement with human data, we found that mouse NKG2D ligands (Rae-1δ, Rae-1ε, human ULBP orthologs) mRNA levels were strongly upregulated in aggressive HCCs compared to non-tumoral control livers (Figure 4, Panel A). But more interestingly, as in human HCC, we observed an almost complete extinction of their expression in *Ctnnb1*-mutated HCC, emphasizing that beta-catenin signalling regulates negatively the expression of NKG2D ligands (Figure 4, Panel A). To confirm these observations, we used a second mouse model Apc-KO allowing an activation of the beta-catenin pathway in all hepatocytes (without mutation on *Ctnnb1* gene) (Benhamouche et al., 2006; Colnot et al., 2004). Accordingly, we were able to confirm that NKG2D ligands (Rae-1δ, Rae-1ε) were significantly downregulated at the mRNA level in Apc-KO livers compared to non-beta-catenin activated livers (Figure 4, Panel B). Of importance, we validated our observations at the protein level using immunohistochemical staining of Rae-1 on paraffin-embedded mouse liver sections. We found that the expression of Rae-1

ligands was absent in specific areas in which beta-catenin signalling was turn on (stained for Glutamine synthase, beta-catenin-positive target) in control livers (Figure 4, Panel C). As shown in Figure 4 Panel C, Rae-1 ligands were expressed in hepatocytes except in those surrounding the pericentral vein (constitutive activation of beta-catenin signalling), absent in *Apc*-deleted hepatocytes and *Ctnnb1*-mutated tumor hepatocytes but expressed in non-beta-catenin mutated HCC (DEN-induced HCC).

Collectively, these data strongly support that beta-catenin signalling negatively regulates the expression of Rae-1 NKG2D ligands in hepatocytes.

Beta-catenin inhibits Rae-1 NKG2D ligands through TCF4 binding on Rae1-promoter.

To prove at the molecular level that beta-catenin signalling directly inhibits Rae-1 expression, we performed chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP Seq) experiment from purified primary beta-catenin-activated hepatocytes (Apc-KO) and control hepatocytes (Figure 5, Panel A). As beta-catenin does not have a DNA binding domain, ChIP seq experiment was performed using its preferential partner TCF4 in hepatocyte. Interestingly, we found a significant enrichment of TCF4 binding to Rae-1 promoter in beta-catenin-activated hepatocytes (Apc-KO mouse model) compared to control hepatocytes (Figure 5, Panel A). These molecular data strongly demonstrate that beta-catenin directly inhibits the expression of Rae-1 NKG2D ligands through its partnership with TCF4 onto Rae-1 promoter in hepatocytes.

To confirm that Rae-1 ligand expression is a negative target of the β-catenin signalling, we used an non mutated-hepatocyte cell line (αML) and performed β-catenin exon 3 excision by CRISPR-Cas9 technology leading to the activation of the

β-catenin signalling. Importantly, we did find again a significant downregulation of Rae-1 ligands (Rae-1δ, Rae-1ε) expression in β-catenin-activated αML cells compared to αML control cells strongly reinforcing our ChIP seq molecular data (Figure 5, Panel B).

Altogether, we provided strong evidence in both human (ULBP1/2) and mouse (Rae-1) that NKG2D ligands have a significant lower expression in HCC harbouring CTNNB1 activating mutations that limits the expression of these NKG2D ligands.

Discussion

The worldwide incidence of HCC comparable to patient mortality underlines its poor prognosis. Therapeutic options for HCC are still a major concern. Immunotherapy in other solid tumours (breast, melanoma, prostate, lung), which until then had remained incurable, has given spectacular results (Ansell et al., 2015; Brahmer et al., 2012; Gentzler et al., 2016; Hodi et al., 2010; Schadendorf et al., 2015; Zou et al., 2016). In HCC, these immunotherapeutic strategies are currently investigated but have given until now insufficient results (El-Khoueiry et al., 2017; Harding et al., 2019; Hou et al., 2019; Sangro et al., 2013; Zhu et al., 2018). Therefore, original ways counteracting HCC progression are urgently needed.

In the present study, we have investigated NKG2D immunosurveillance mechanism, both in humans and mice, through the expression of NKG2D ligands (human MICA/B, ULBP1/2 and murine Rae-1) in HCC, taking into account for the first time the genomic features of liver tumours. Our work provides compelling evidence that NKG2D ligands expression is correlated with aggressive liver tumorigenesis and that ULBP1/2/Rae-1 ligands are downregulated in *CTNNB1*-mutated HCC. Precisely, we evidenced that ULBP1/2 expression was specifically downregulated in *CTNNB1*-mutated HCCs compared to normal liver and HCC associated with chromosomal instability (G4/G5/G6) and negatively correlates with β-catenin signalling target genes. At the molecular level, we clearly evidenced, using mouse models that beta-catenin signalling negatively regulates Rae-1 ligands, orthologs of ULBPs.

We have identified for the first time that NKG2D ligands expression was higher in G1/G2/G3 groups of HCCs associated with poor prognosis. These HCCs are aggressive tumors exhibiting high level of inflammation (hot tumors) (Boyault et al., 2007; Tornesello et al., 2013; Zucman-Rossi et al., 2015). In the liver, it is now well

established that inflammation promotes HCC development and determines its aggressiveness through the enhancement of cellular proliferation, angiogenesis and tumor invasiveness (Grivennikov et al., 2010; He and Karin, 2011; Hou et al., 2019; Ringelhan et al., 2018). Recent data have clearly illustrated that inflammatory milieu within peritumoral tissue is correlated to worse prognosis and favoring tumor recurrence (Budhu et al., 2006; Cariani et al., 2012; Hoshida et al., 2008; Sia et al., 2017a; Sia and Llovet, 2017; Sia et al., 2017b). Recent data using DEN-induced murine HCC provided compelling evidence that NKG2D worsens the course of tumorigenesis through the enhancement of inflammatory response in the surrounding tissue (Sheppard et al., 2018). Moreover, the increase expression of MICA/B ligands in NASH liver correlated with decreased liver function, increased fibrosis and hepatocyte apoptosis evidencing the deleterious role of these ligands in hepatic parenchyma (Kahraman et al., 2010). Interestingly, we found that MICA/B expression was higher in HCCs associated with poor prognosis and tumor early recurrence (within 2 years after resection), attributed to either incomplete initial treatment or micrometastases within the liver (Nault et al., 2013; Sherman, 2008). Therefore, we propose that high level of NKG2D ligands exacerbates liver tissue damage and thus contributes to a high inflammatory response during liver tumorigenesis determining subsequently tumor aggressiveness and poor patient outcome.

Interestingly, *CTNNB1*-mutated HCCs are characterized by the absence of inflammatory infiltrates (cold tumors) (Pinyol et al., 2019; Ruiz de Galarreta et al., 2019; Sia et al., 2017a). Based on molecular features, recent data analysed the immunological landscape of HCC highlighting a specific group of HCC expressing markers of immune response called the immune class (Sia et al., 2017a). Importantly, this study evidenced that *CTNNB1*-mutated HCCs were excluded from

this immune class that could predict their resistance to immune checkpoint therapy (Sia et al., 2017a). In support of these data, clinical study demonstrated that checkpoint inhibitors (anti-PD-1/PD-L1, anti-CTLA-4) treatment does not change the progression free survival (PFS) of beta-catenin activated HCCs (Harding et al., 2019). This work, although preliminary, evidenced that beta-catenin activated human HCCs were unresponsive to checkpoint blockade (Harding et al., 2019) underlying that these tumors are not eligible to these immunotherapeutic treatments. Herein, the clinical therapeutic management of these patients remains limited. To render these HCCs eligible for immunotherapy, treatment options designed to convert cold into hot tumors are considered.

However, the molecular basis explaining the absence of inflammation in *CTNNB1*-mutated, is still an open question. Here, we propose that the low level of NKG2D ligands in *CTNNB1*-mutated HCC and the evidence that beta-catenin signalling inhibits part of NKG2D ligands could explain their less inflamed and aggressive phenotype. Further work is required to specifically determine whether NKG2D ligands expression correlates with inflammatory associated genes in HCC patients. Moreover, whether the expression of Rae-1 ligands in *Ctnnb1*-mutated murine HCC converts these cold tumors into hot aggressive HCCs should be tested.

Figure 1

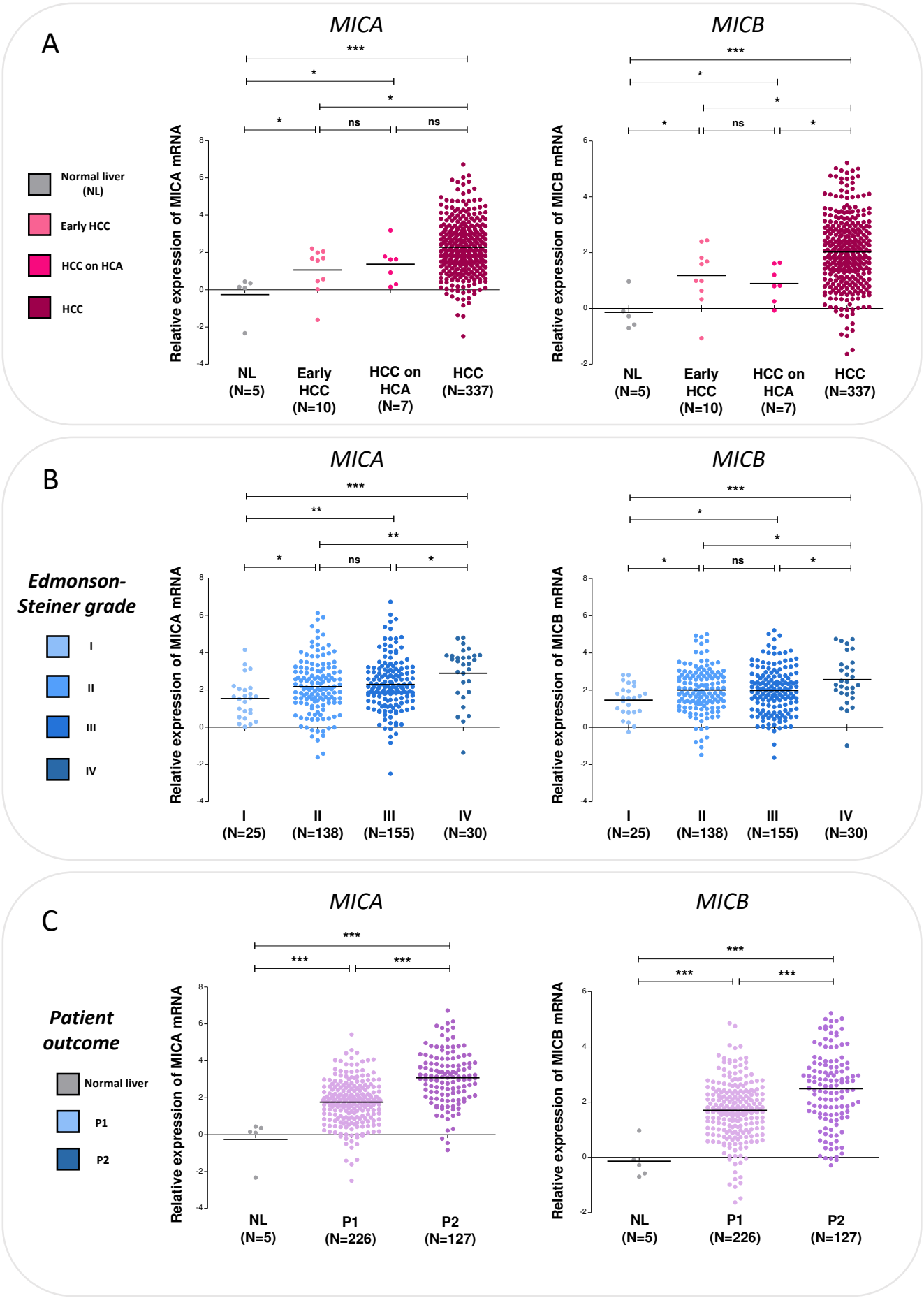

A
MICA
MICB
Normal liver (NL)
Early HCC
HCC on HCA
HCC
Relative expression of MICA mRNA
Relative expression of MICB mRNA
***
*
ns
NL (N=5)
Early HCC (N=10)
HCC on HCA (N=7)
HCC (N=337)
B
Edmonson-Steiner grade
I
II
III
IV
**
I (N=25)
II (N=138)
III (N=155)
IV (N=30)
C
Patient outcome
Normal liver
P1
P2
NL (N=5)
P1 (N=226)
P2 (N=127)

Figure 2

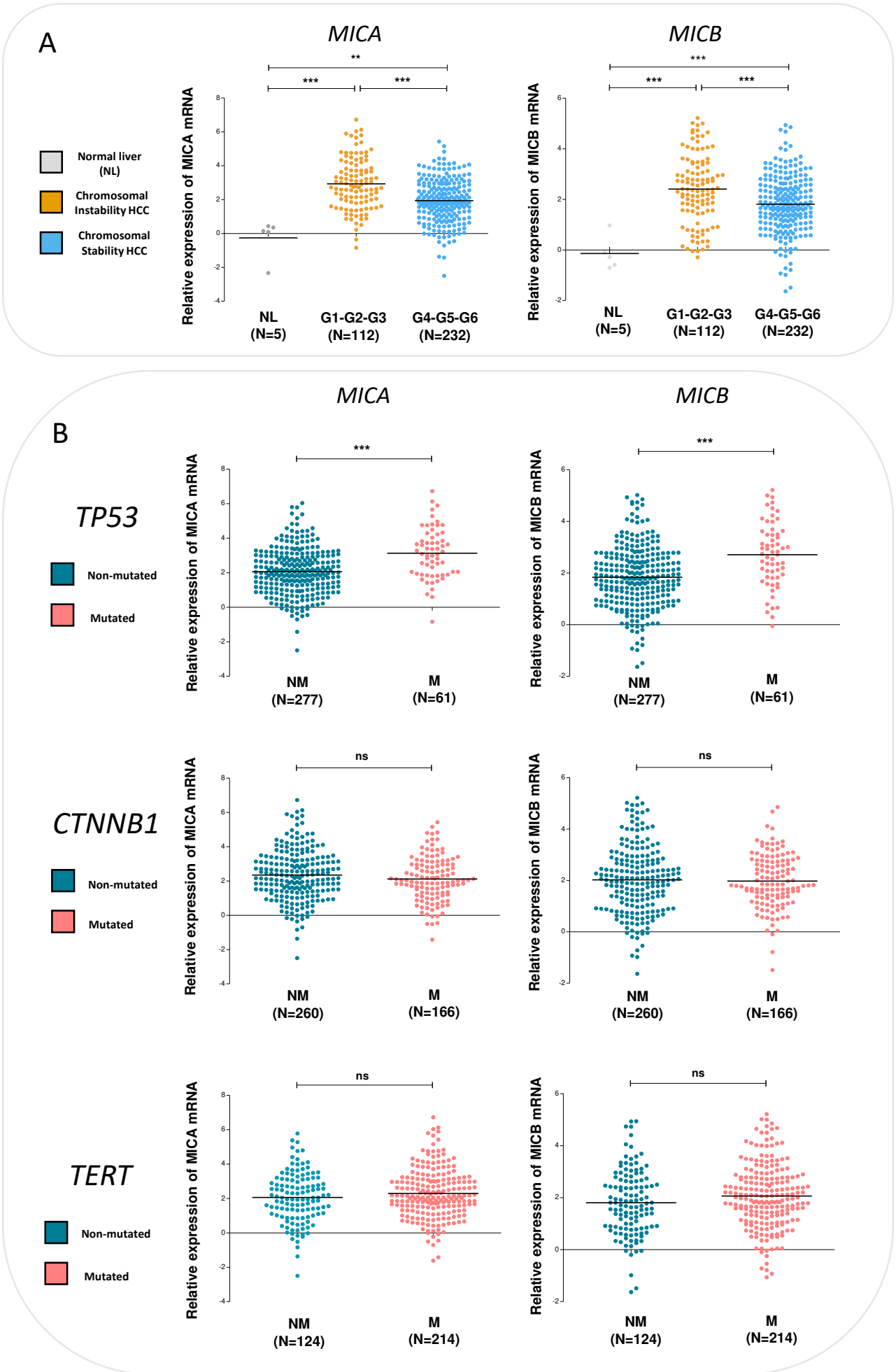

A
MICA
MICB
Normal liver (NL)
Chromosomal Instability HCC
Chromosomal Stability HCC
Relative expression of MICA mRNA
Relative expression of MICB mRNA
**
***
***
NL (N=5)
G1-G2-G3 (N=112)
G4-G5-G6 (N=232)
B
TP53
Non-mutated
Mutated
NM (N=277)
M (N=61)
CTNNB1
NM (N=260)
M (N=166)
TERT
NM (N=124)
M (N=214)
ns

Figure 3

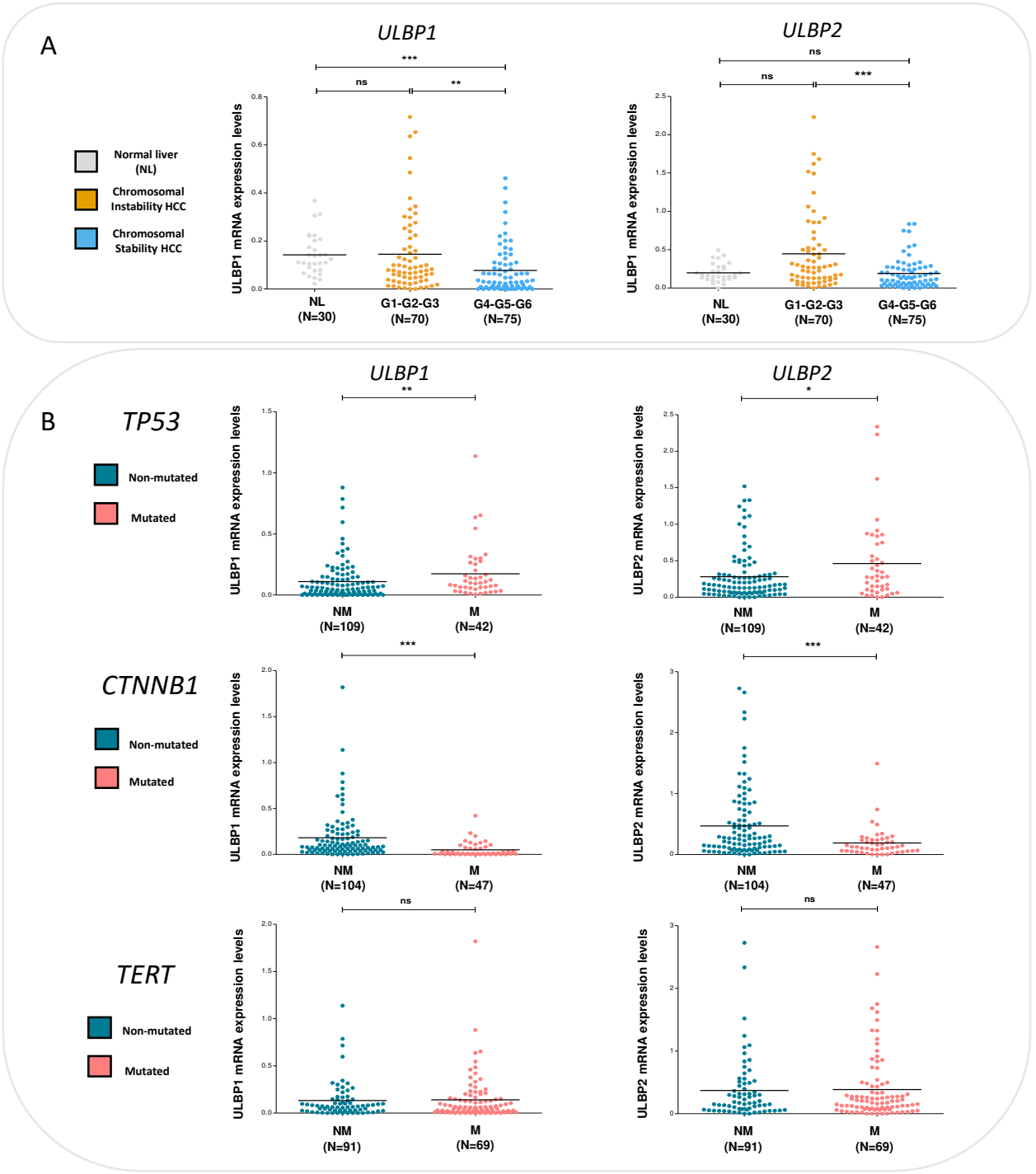
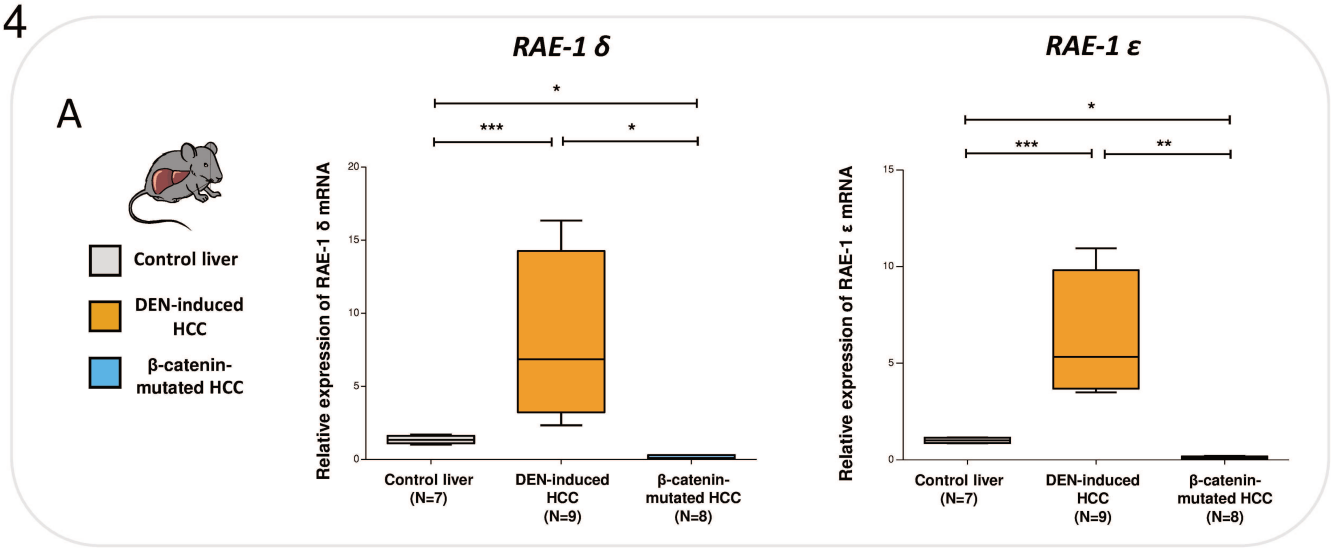
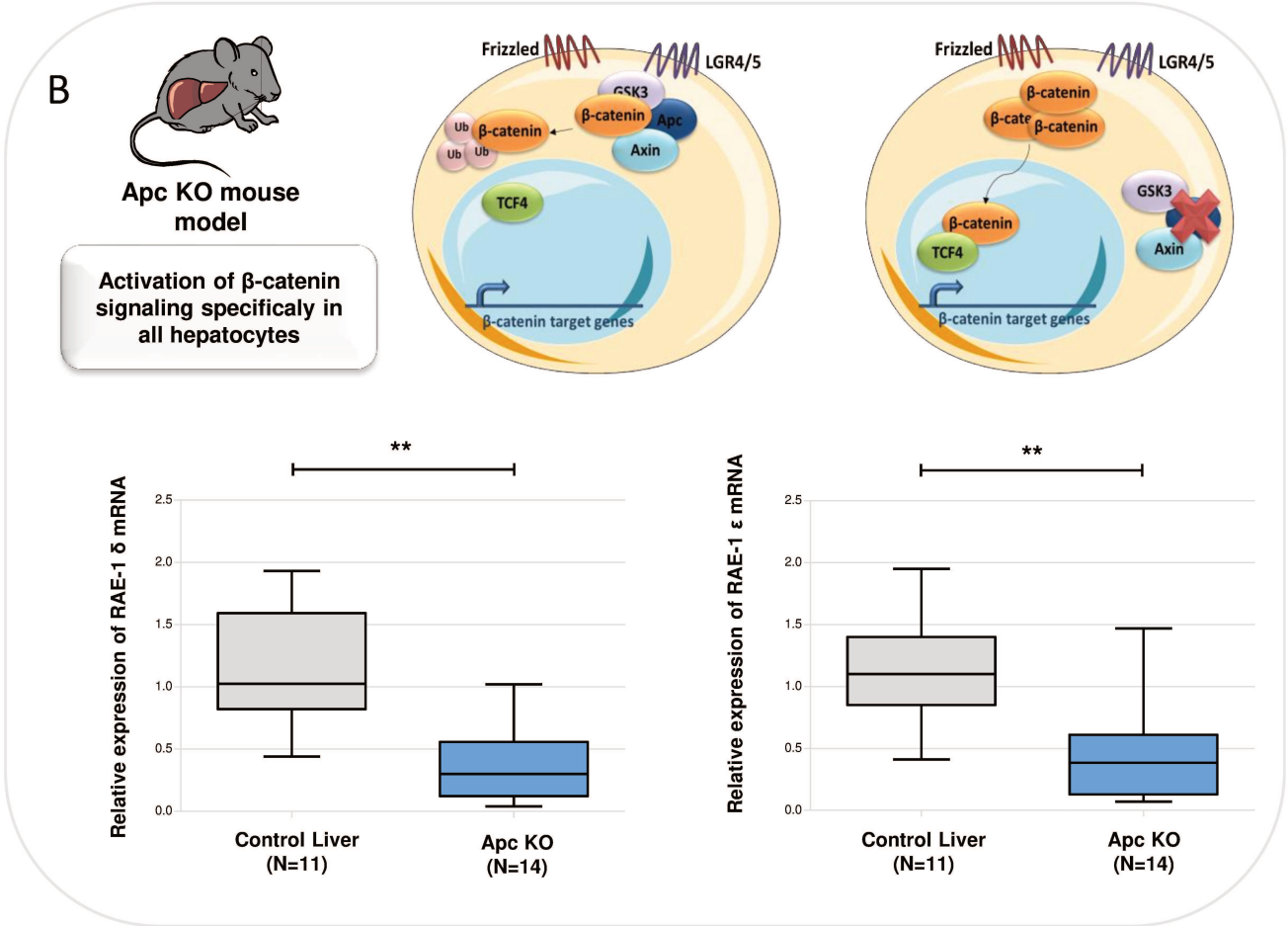

A
ULBP1
ULBP2
Normal liver (NL)
Chromosomal Instability HCC
Chromosomal Stability HCC
ULBP1 mRNA expression levels
ULBP2 mRNA expression levels
NL (N=30)
G1-G2-G3 (N=70)
G4-G5-G6 (N=75)
B
TP53
CTNNB1
TERT
Non-mutated
Mutated
NM (N=109)
M (N=42)
NM (N=104)
M (N=47)
NM (N=91)
M (N=69)
C
GLUL
LGR5
TBX3
ULPB1
ULPB2
R: -0.335
P-value< 0.0001
R: -0.344
P-value< 0.0001
R: -0.385
P-value< 0.0001
R: -0.159
P-value: 0.045
R: -0.321
P-value< 0.0001
R: -0.18
P-value: 0.022

Figure 4


A
RAE-1 δ
RAE-1 ε
Control liver
DEN-induced HCC
β-catenin-mutated HCC
Relative expression of RAE-1 δ mRNA
Relative expression of RAE-1 ε mRNA
Control liver (N=7)
DEN-induced HCC (N=9)
β-catenin-mutated HCC (N=8)


B
Apc KO mouse model
Activation of β-catenin signaling specificaly in all hepatocytes
Frizzled
LGR4/5
GSK3
β-catenin
Apc
Axin
Ub
TCF4
β-catenin target genes
Relative expression of RAE-1 δ mRNA
Relative expression of RAE-1 ε mRNA
Control Liver (N=11)
Apc KO (N=14)

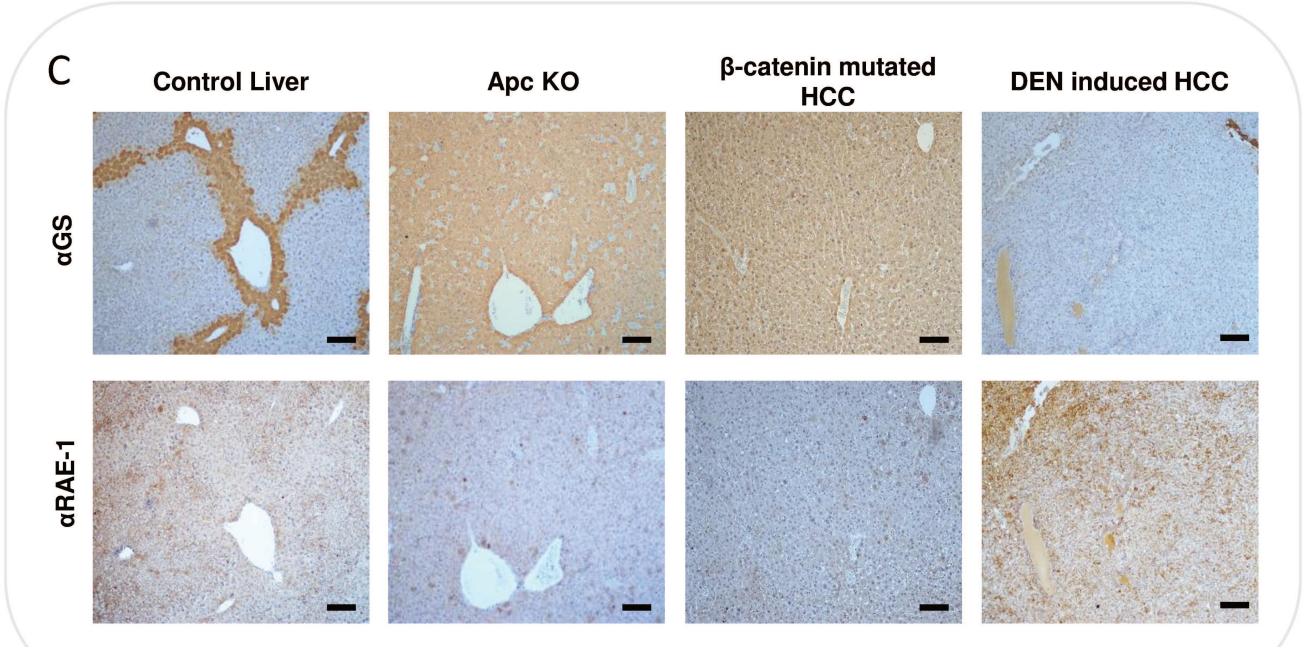

C
Control Liver
Apc KO
β-catenin mutated HCC
DEN induced HCC
αGS
αRAE-1

Figure 5

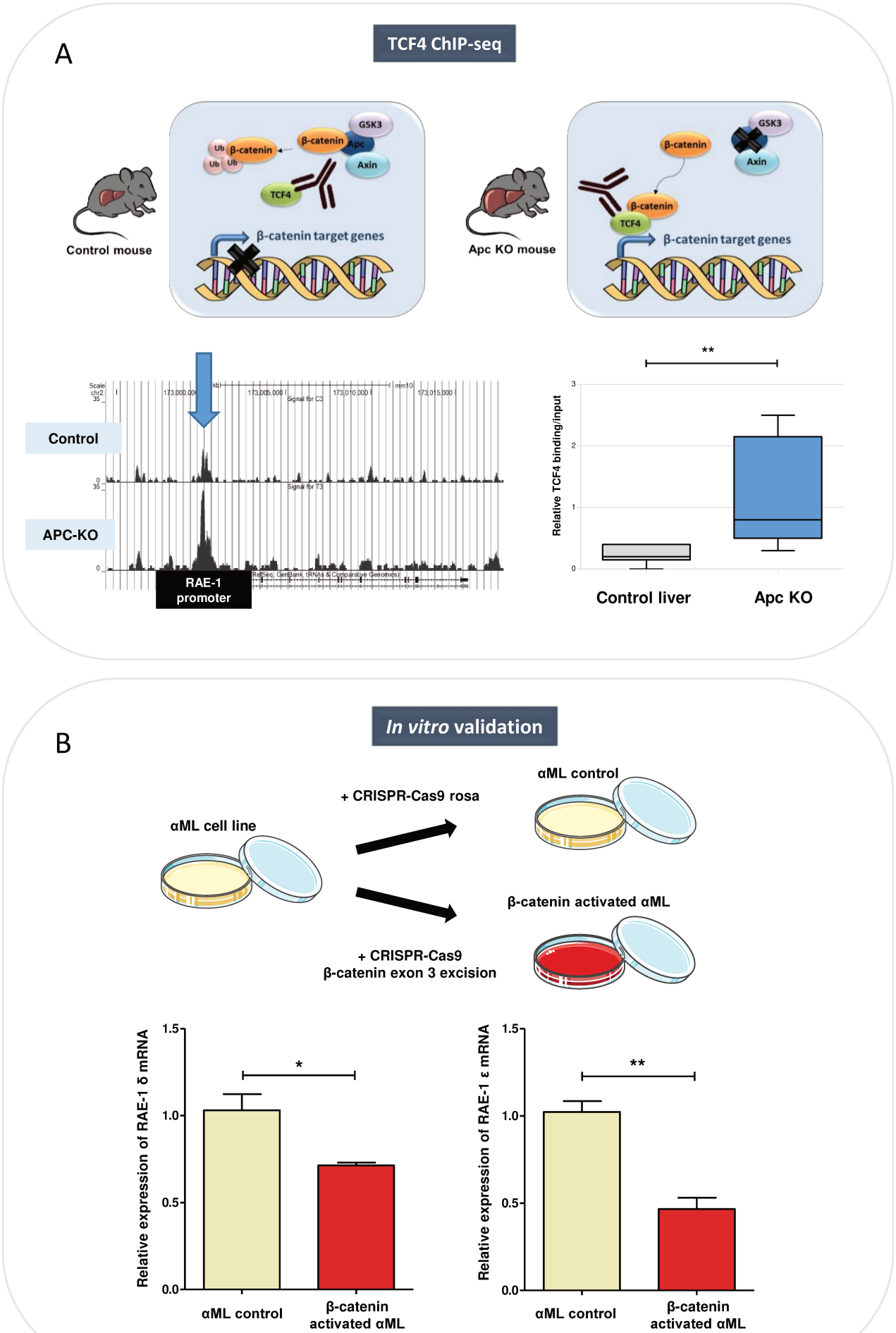

A
TCF4 ChIP-seq
Control mouse
Ub
β-catenin
GSK3
Apc
Axin
TCF4
β-catenin target genes
Apc KO mouse
Control
APC-KO
RAE-1 promoter
**
Relative TCF4 binding/input
Control liver
Apc KO
B
In vitro validation
αML cell line
+ CRISPR-Cas9 rosa
αML control
β-catenin activated αML
+ CRISPR-Cas9
β-catenin exon 3 excision
Relative expression of RAE-1 δ mRNA
*
αML control
β-catenin activated αML
Relative expression of RAE-1 ε mRNA
**

Figure S1

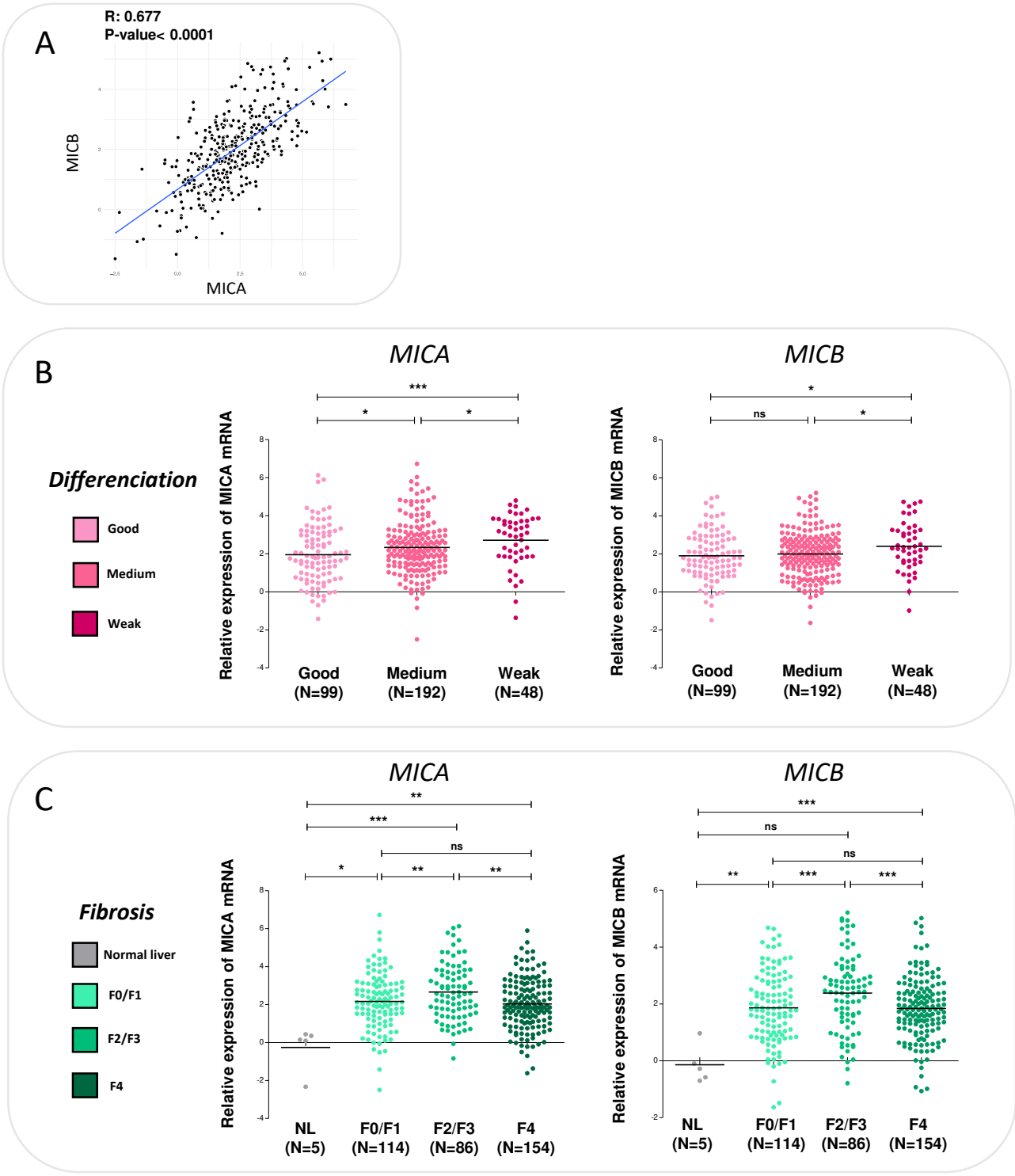

A
R: 0.677
P-value< 0.0001
MICB
MICA
B
MICA
MICB
Differenciation
Good
Medium
Weak
Relative expression of MICA mRNA
Relative expression of MICB mRNA
***
*
*
ns
Good (N=99)
Medium (N=192)
Weak (N=48)
C
Fibrosis
Normal liver
F0/F1
F2/F3
F4
**
ns
NL (N=5)
F0/F1 (N=114)
F2/F3 (N=86)
F4 (N=154)

Figure S2

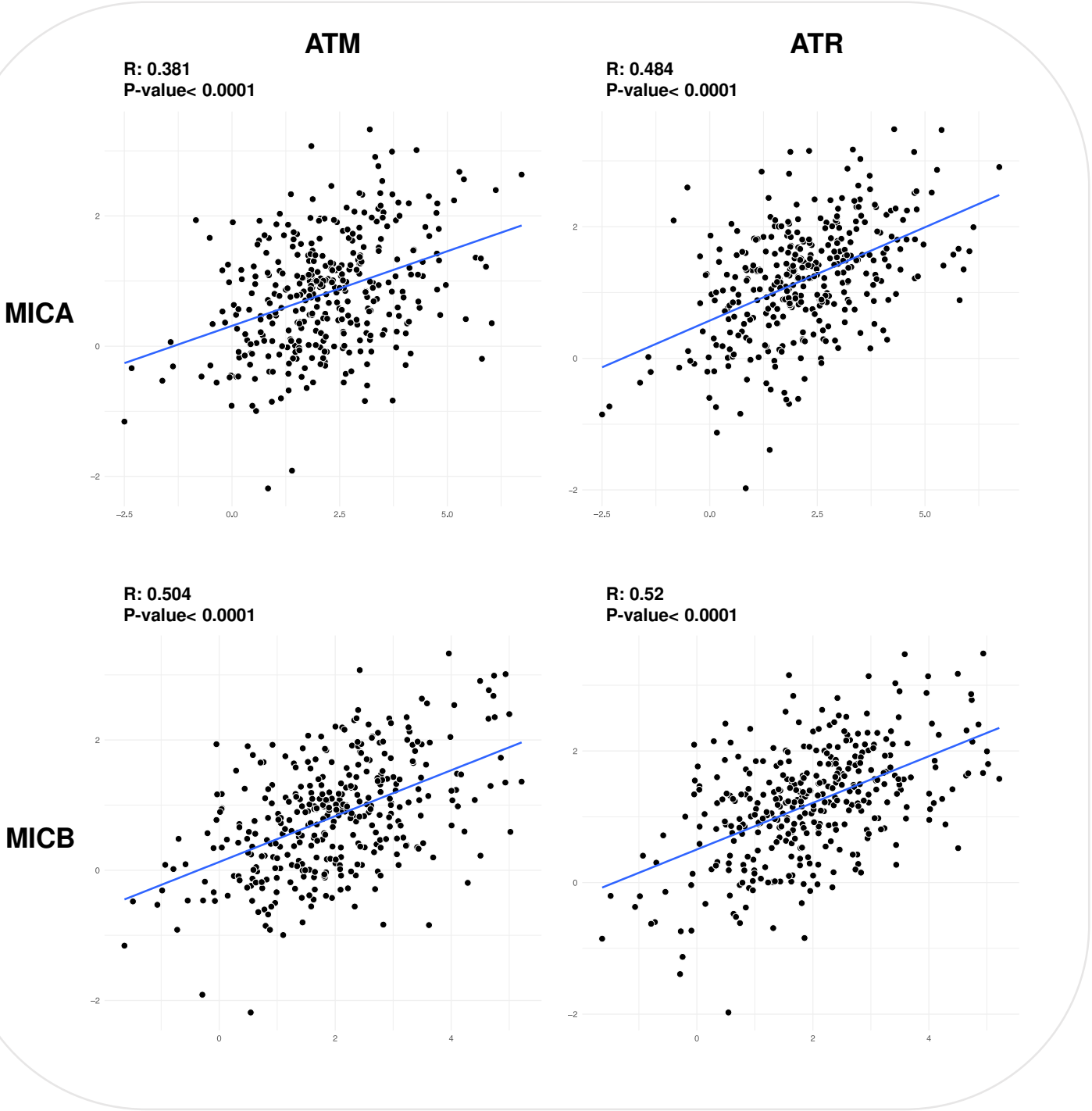

ATM
ATR
MICA
MICB
R: 0.381
P-value< 0.0001
R: 0.484
P-value< 0.0001
R: 0.504
P-value< 0.0001
R: 0.52
P-value< 0.0001

Figure Legends

Figure 1. MICA and MICB expression is upregulated during human HCC development and strongly correlates with tumor grade.

(A) The levels of NKG2D ligands (MICA and MICB) mRNAs were assayed in normal liver (NL) (N=5), Early HCC (N=10), HCC on HCA (N=7), HCC (N=337). The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: *P<0.05; ***P<0.001.

(B) The levels of NKG2D ligands (MICA and MICB) mRNAs were assayed in HCC classified according to Edmonson Steiner grade. Grade I = very well differentiated; Grade II = moderately differentiated, Grade III = = poorly differentiated; Grade IV = undifferentiated HCC. The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: *P<0.05; **P<0.01 ***P<0.001.

(C) The levels of NKG2D ligands (MICA and MICB) mRNAs were assayed in normal liver (NL) (N=5) and in HCC using a molecular 5-gene score predicting the outcome of patients. P1 (N=226) and P2 (N=127). The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 2. MICA and MICB expression is strongly upregulated in G1/G2/G3 groups of HCC and lower expressed in G4/G5/G6 groups of HCC harbouring chromosomal stability.

(A) The levels of NKG2D ligands (MICA and MICB) mRNAs were assayed in normal liver (NL) (N=5), G1/G2/G3 (N=112), G4/G5/G6 (N=232) groups of HCC. G1 to G6 classification according to Calderaro J, 2017. The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: **P<0.01; ***P<0.001.

(B) The levels of NKG2D ligands (MICA and MICB) mRNAs were assayed in *TP53*-mutated (N=61) and non-mutated (N=277), CTNNB1-mutated (N=166) and non-mutated (N=260), TERT-mutated (N=214) and non-mutated (N=124) HCCs. The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: ***P<0.001.

Figure 3. ULBP1 and ULBP2 expression is specifically downregulated in G4/G5/G6 groups of HCC harbouring chromosomal stability compared to normal liver and G1/G2/G3 groups of HCC.

(A) The levels of NKG2D ligands (ULPB1 and ULBP2) mRNAs were assayed in normal liver (NL) (N=5), G1/G2/G3 (N=70), G4/G5/G6 (N=75) groups of HCC. G1 to G6 classification according to Calderaro J, 2017. The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: **P<0.01; ***P<0.001.

(B) The levels of NKG2D ligands (ULPB1 and ULBP2) mRNAs were assayed in *TP53*-mutated (N=42) and non-mutated (N=109), CTNNB1-mutated (N=47) and non-mutated (N=104), TERT-mutated (N=69) and non-mutated (N=91) HCCs. The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: ***P<0.001.

(C) Correlation between ULBP1 and ULBP2 mRNA and LGR5, TBX3 or GLUL mRNAs levels in human HCC samples (N=354). Single values were plotted and the correlation was determined by Pearson product-moment correlation coefficient. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test.

Figure 4. Rae-1 δ and Rae-1 ε NKG2D ligands are strongly downregulated in β-catenin activated HCC.

(A) The expression of NKG2D ligands (Rae-1 δ and ε) mRNAs was assayed by real-time qPCR in DEN-induced HCC (N=9), β-catenin-mutated HCC (N=8) and control liver (N=7). Gene expression was normalized to 18s rRNA for each sample. The data

are expressed as the mean ± SEM – non parametric t test. *P<0.05; **P<0.01 ***P<0.001.

(B) The expression of NKG2D ligands (Rae-1 δ and ε) mRNAs was assayed by real-time qPCR in Apc KO livers (N=14) and control liver (N=11). Gene expression was normalized to 18s rRNA for each sample. The data are expressed as the mean ± SEM – non parametric t test. *P<0.05; **P<0.01 ***P<0.001.

(C) Paraffin-embedded sections obtained from Apc KO, DEN-induced HCC, β-catenin-mutated HCC and control livers were stained for glutamine synthetase (GS) and Pan Rae-1. Scale bars: 100μm.

Figure 5. Rae-1 δ and Rae-1 ε NKG2D ligands gene expression are directly inhibited by β-catenin signalling.

(A) Genomic environment of the Rae-1 gene (UCSC Genome Browser) and ChIP-seq peaks at the Rae-1 promoter. The crude reads of ChIP-seq data performed in Apc KO and control livers against TCF4 (data has been deposited as GSE32513 in the gene expression omnibus data base). Then qPCR to amplified the Rae-1 promoter was performed. The data are expressed as the mean ± SEM – non parametric t test. **P<0.01

(B) The expression of NKG2D ligands (Rae-1 δ and ε) mRNAs was assayed by real-time qPCR in CRISPR-Cas9 exon 3 β-catenin activated αML cells and CRISP-Cas9 rosa control αML cells. Gene expression was normalized to 18s rRNA for each sample. The data are expressed as the mean ± SEM – non parametric t test. *P<0.05; **P<0.01 ***P<0.001.

Figure S1. MICA and MICB expression is positively correlated to aggressive tumorigenesis clinical features.

(A) Correlation between MICA and MICB mRNA levels in human HCC samples (N=354). Single values were plotted and the correlation was determined by Pearson product-moment correlation coefficient. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test.

(B) The levels of NKG2D ligands (MICA and MICB) mRNAs were assayed in good (N=99), medium (N=192), weak (N=48) differentiated HCCs. The fold change (log_2)

in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: *P<0.05; ***P<0.001.

(C) The levels of NKG2D ligands (MICA and MICB) mRNAs were assayed in normal liver (NL) (N=5) and according to fibrosis score F0/F1 (N=114), F2/F3 (N=86), F4 (N=154). The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to the expression in normal liver. The black lines correspond to the mean values. A significant difference in expression was defined by Mann-Whitney: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure S2. MICA and MICB expression correlated with DNA damage master regulators ATM/ATR.

Correlation between MICA and MICB mRNA and ATM or ATR mRNAs levels in human HCC samples (N=354). Single values were plotted and the correlation was determined by Pearson product-moment correlation coefficient. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test.

Methods

Patients and Tumor material

Human Liver samples: A series of 354 liver tumor samples, including 10 early HCCs, 337 HCCs and 7 malignant transformation of HCA into HCC (HCC on HCA), were collected from 325 patients surgically treated in Europe. The study was approved by institutional review board committees (CCPRB Paris Saint-Louis, 1997, 2004 and 2010, approval number 01-037; Bordeaux, 2010-A00498-31) and all patients gave their informed consent according to French law. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C.

Clinical data, Biological and Histological parameters: Clinicopathological data were available for all cases and already described in a previously published study (Nault et al., 2019). Briefly, among the 325 HCC patients, 82.4% were male, with a median age of 64 years old and associated with various risk factors including chronic excessive alcohol intake (45.4%), Hepatitis C (21%), Hepatitis B (19.5%) and/or metabolic syndrome (15.6%). Most of the HCC samples were developed on cirrhosis (43.5%) and “moderately differentiated” according to WHO classification (55.7%). The proportions of mutations on the main driver genes in these HCC samples were similar to those already published (TERT promoter mutations: 63.8%; CTNNB1 gene mutations: 36.9%; TP53 gene mutations: 17.6%) HCC were classified in the G1-G6 classification and to bad or good prognosis subgroup using the 5-gene score as previously described (Boyault et al., 2007; Nault et al., 2013a).

Samples were classified according to clinical, pathological and genetic features as previously described. In all HCC samples, the ratio of tumor cells to non-tumor cells

was evaluated to be >50%; the PurBayes method estimated an average of 70% (range of 39–100%) tumor purity on the basis of sequencing data. Definition of DMN and early, small and progressed, classic and poor-prognosis HCC was based on histopathological criteria in HCC proposed by the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. DMN was defined by macronodules containing low-grade (a cell population lacking architectural atypia with a mild increase in cellularity as compared to the surroundings; portal tracts detectable) or high-grade (frank cytological and architectural atypia as compared to the surroundings but insufficient for a diagnosis of malignancy; portal tracts detectable) dysplastic nodules. Early HCC was defined by a diameter ≤2 cm and a vaguely nodular lesion with indistinct margins and a well-differentiated histology that might require careful distinction from high-grade dysplastic nodules; few portal tracts were detectable. Small and progressed HCC was defined by a diameter ≤2 cm and a distinctly nodular lesion with well- (G1) to moderately (G2) differentiated histology in which malignancy was recognized at first glance; no portal tracts were detectable. Poor-prognosis HCC was defined by HCC cases displaying recurrence within 2 years. Classic HCC was defined as non-early, non-small, non–poor prognosis HCC.

Quantitative RT-PCR et RNA-sequencing

We assessed mRNA expression by quantitative RT-PCR in 354 HCC samples. We performed reverse transcription of 500 ng of total RNA using the High-Capacity Transcription Kit (Life Technologies) and assess gene expression using TaqMan predesigned assays (MICA: Hs00741286_m1; MICB: Hs00792952_m1; ATM: Hs01112326_m1; ATR: Hs00354807_m1; Life Technologies) on Fluidigm 96 dynamic arrays with the Bio-Mark Real-Time PCR system. Expression level (Ct values) was assessed using the Fluidigm Real-Time PCR Analysis software (4.1.3)

and gene expression data were expressed using the 2DDCt method relative to ribosomal 18S (R18S) and the expression level of the corresponding gene in 5 normal liver samples.

RNAseq data from 160 previously published tumors were used to evaluate the *ULBP1* and *ULBP2* expression in HCC patients (Bayard et al., 2018).

Variables		Data available	Numbers (%), Median (Min-Max)
Analysis per patient (n=325)			
Age (years)		324	64 (18-90)
Gender (Male)		324	267 (82,4%)
Hepatitis B		323	63 (19,5%)
Hepatitis C		324	68 (21,0%)
High alcohol intake		324	147 (45,4%)
Metabolic syndrome		321	50 (15,6%)
Without etiology		324	43 (13,3%)
AFP > 20 ng/mL		306	129 (42,2%)
Analysis per tumor (n=354)			
Histological Diagnosis	**early HCC**	354	10 (2,8%)
	HCC on HCA		7 (2,0%)
	HCC		337 (95,2%)
Metavir score (fibrosis of non-tumor liver)	**F0-F1**	354	114 (32,2%)
	F2-F3		86 (24,3%)
	F4		154 (43,5%)
G1G6	**G1**	353	26 (7,4%)
	G2		39 (11,1%)
	G3		47 (13,3%)
	G4		125 (35,4%)
	G5		70 (19,8%)
	G6		46 (13,0%)
Edmondson III-IV		348	185 (53,2%)
WHO	**good**	348	106 (30,5%)
	medium		194 (55,7%)
	bad		48 (13,8%)
5-gene score	**good**	353	226 (64,0%)
	bad		127 (36,0%)
***TERT promoter* mutations**		338	214 (63,3%)
***CTNNB1* mutations**		339	125 (36,9%)
***TP53* mutations**		347	61 (17,6%)

Table 1: HCC patients

Statistical analysis

Data visualization and statistical analysis were performed using PRISM software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) and R software version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org) with Bioconductor packages. Comparison of continuous variable in 2 or more groups was

performed using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test. Correlation analysis between continuous variables was performed using Pearson r correlation when both variables were normally distributed with the assumptions of linearity and homoscedasticity or Spearman's rank-order correlation. All tests were two-tailed and P-value < 0.05 was considered as significant.

Mice and HCC induction

All reported animal procedures were carried out in accordance with the rules of the French Institutional Animal Care and Use Committee. All animal studies were approved by the regional veterinary services of the Paris police headquarters (agreement no. 75-956). All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and food pellets.

The different HCC mouse models used in the study that modeled HCC tumorigenesis were previously described (Anson et al., 2012). The *Lpk-myc***+** transgenic mice, which express the oncogene c-*myc* gene in the liver under the control of rat L-PK regulatory regions, developed HCC mutated for *Ctnnb1* homogeneous groups of mice consisting exclusively of littermates were established (de La Coste et al., 1998). In our study, Lpk-myc+ model is referred as β-mutated HCC model. Cohorts of male age-matched wild-type (WT) mice received a single intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN) (Sigma) (25 mg kg^{-1} body weight) or PBS at 14 days of age to induce HCC. *HCC development was studied at 12 to 14 months in Lpk-myc+ and* DEN induced HCC mice*.* To analyze the Wnt/β-catenin signalling, we used the inducible hepatocyte-specific inactivation of the *Apc* gene, named Apc^{LKO} (*Apc* $^{flox/flox}$, *TTR-Cre Tam*), control mice were (*Apc* $^{flox/flox}$, Cre negative) (Benhamouche et al., 2006; Colnot et al., 2004). Inactivation of the *Apc* gene was done by a single i.p.

injection of 1.5 mg tamoxifen (MP Biomedicals, France) in 9- to 12-week-old mice. All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and food pellets.

Preparation of total RNA and quantitative PCR analysis

Total RNA from mouse liver tissue was extracted using Trizol (Invitrogen), and 2 µg were used as a template for cDNA synthesis (MMLV, Life Technologies). Purified RNA was then reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed with the Fast StartQuantitative PCR (q-PCR) was performed using a SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR master mix (Thermo Scientific) and specific primers. The reactions were performed in 96-well plates in a LightCycler 480 instrument (Roche) with 40 cycles. We determined the relative amounts of the mRNAs studied by means of the second-derivative maximum method, with LightCycler 480 analysis software and were normalized to the abundance of 18s mRNA, used as an invariant control for all studies.

Immunohistochemistry

Tissue were fixed by incubation in 4% formol overnight at 4 °C and subsequently embedded in paraffin wax. For immunohistochemistry, liver sections (5µm) were de-paraffinized. Antigen was retrieved by incubating liver sections in Tris based-buffer (Vector Laboratories) in a microwave at 850 Watts for 20 min after boiling. Tissues section were blocked with the Avidin/Bioting blocking kit (Vector laboratories) for 15 min each at room temperature (RT) and with normal horse serum (2.5%) for 20 min à RT. Tissue section were then incubated overnight at 4°C with the anti-Rae1 Pan

specific antibody (R&D AF1136) at 10µg/mL or with antibodies directed against glutamine synthase (BD Transduction Laboratories, clone 6, 1/400). To block endogenous peroxidase, sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 20 min at room temperature. Tissue sections were incubated with biotinylated anti-goat IgG (1:250 dilution, Vector Laboratories, CA, USA) for 30 minutes. Specific binding was detected with ABC reagent (Vector Laboratories) and DAB (Vector Laboratories) and the slides were counterstained with haematoxylin.

TCF4 ChIP-sequencing

The ChIP protocol was adapted from previous work (Nelson et al., 2006) as previously described (Gougelet et al., 2014). ChIP seq data were deposited as GSE35213 in the Gene Expression Omnibus database. Briefly, β-catenin and TCF-4 binding to the Rae promoter, relative to that of the immunoglobulin isotype control, was assessed by SYBR green with the following oligonucleotides: FW-GACTTTCCACAAACGCACAA, Rev-GAAACTGCCCCGTTACCAC designed according to the sequence of the TCF-4 peak identified upstream of Rae-1.

Gene edition of Ctnnb1 Exon 3 by CRISPR-Cas 9 technology

Murine hepatocyte cell line AML12 cell line was purchased at ATCC® CRL-2254™. Briefly, AML12 was cultured in DMEM/F-12 (1 :1) + GlutaMAX, 10% heat-inactivated FCS with antibiotics. Exon 3 region of *CTNNB1* was deleted by CRISPR-Cas9 technology, conferring in those cells an activation of beta-catenin signalling. CRISPR-Cas9 After selection with puromycin, deleted Exon 3 deleted clones were passaged over 10 times. Cells were harvested and collected to proceed to RNA extraction as described above.

Acknowledgement:

We thank the Tumor Biobank of Henri Mondor University Hospital and the Réseau National Centre de Ressources Biologiques (CRB) Foie for contributing to the tissue collection. We also thank the core facilities of Cochin Institute (Histology, Immunostaining [HistIM], Animal facility, CHIC (Center of Histology Imaging and Cytometry) facility of the Centre de Recherche des Cordeliers. We sincerely thank Nadia Boussetta for mice breeding and genotyping.

Footnotes

Contributors: MC designed, performed and analysed the experiments, compiled the figures and wrote the manuscript. SC analysed the experiments, compiled the data with statistical analysis /designed the figures. AG designed and analysed the ChIP experiments, and compiled the data. MC, SC, AG, SF, SCM performed experimental research. AG, NG, JZR, CD and JPC analysed the data and provided critical help on the manuscript. JZR and CD analysed the experiments, funded the project and provided critical help on the manuscript. JPC designed and performed the experiments, analysed the data, funded the project and wrote the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut National du Cancer (PRTK-2017, PLBIO 2018-140), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer), Ligue Contre le Cancer (Comité de Paris), The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF-SUBV 2017), EVA-Plan Cancer INSERM HTE and the Agence Nationale de Recherche ANR (ANR-16-CE14). MC was a fellow of Université Paris Descartes (Université de Paris) and received a fellowship from Fondation ARC.

Competing interests: None declared.

Ethics approval: The study was approved by the Institutional Review Board committees (CCPRB Paris Saint Louis, 1997, 2004 and 2010)

Patient consent for publication: Obtained.

References

Ansell, S. M., Lesokhin, A. M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E. C., Gutierrez, M., Schuster, S. J., Millenson, M. M., Cattry, D., Freeman, G. J., *et al.* (2015). PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. The New England journal of medicine *372*, 311-319.

Anson, M., Crain-Denoyelle, A. M., Baud, V., Chereau, F., Gougelet, A., Terris, B., Yamagoe, S., Colnot, S., Viguier, M., Perret, C., and Couty, J. P. (2012). Oncogenic beta-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. The Journal of clinical investigation *122*, 586-599.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science *285*, 727-729.

Bayard, Q., Meunier, L., Peneau, C., Renault, V., Shinde, J., Nault, J. C., Mami, I., Couchy, G., Amaddeo, G., Tubacher, E., *et al.* (2018). Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. Nature communications *9*, 5235.

Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D. S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C. J., Kahn, A., Perret, C., and Colnot, S. (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Developmental cell *10*, 759-770.

Boyault, S., Rickman, D. S., de Reynies, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Herault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., *et al.* (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology *45*, 42-52.

Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., *et al.* (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. The New England journal of medicine *366*, 2455-2465.

Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G., and Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. Blood *107*, 159-166.

Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q. H., Jia, H. L., He, P., Zanetti, K. A., Kammula, U. S., Chen, Y., Qin, L. X., Tang, Z. Y., and Wang, X. W. (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*, 99-111.

Calderaro, J., Couchy, G., Imbeaud, S., Amaddeo, G., Letouze, E., Blanc, J. F., Laurent, C., Hajji, Y., Azoulay, D., Bioulac-Sage, P., *et al.* (2017). Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. Journal of hepatology *67*, 727-738.

Cariani, E., Pilli, M., Zerbini, A., Rota, C., Olivani, A., Pelosi, G., Schianchi, C., Soliani, P., Campanini, N., Silini, E. M., *et al.* (2012). Immunological and molecular correlates of disease recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma. PloS one *7*, e32493.

Cerwenka, A., Bakker, A. B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (2000). Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. Immunity *12*, 721-727.

Cerwenka, A., Baron, J. L., and Lanier, L. L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 11521-11526.
Chang, Y. T., Wu, C. C., Shyr, Y. M., Chen, T. C., Hwang, T. L., Yeh, T. S., Chang, K. P., Liu, H. P., Liu, Y. L., Tsai, M. H., *et al.* (2011). Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection. PloS one *6*, e20029.
Chen, Y., Lin, G., Guo, Z. Q., Zhou, Z. F., He, Z. Y., and Ye, Y. B. (2013). Effects of MICA expression on the prognosis of advanced non-small cell lung cancer and the efficacy of CIK therapy. PloS one *8*, e69044.
Cho, H., Chung, J. Y., Kim, S., Braunschweig, T., Kang, T. H., Kim, J., Chung, E. J., Hewitt, S. M., and Kim, J. H. (2014). MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. BMC cancer *14*, 957.
Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 17216-17221.
de Kruijf, E. M., Sajet, A., van Nes, J. G., Putter, H., Smit, V. T., Eagle, R. A., Jafferji, I., Trowsdale, J., Liefers, G. J., van de Velde, C. J., and Kuppen, P. J. (2012). NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. BMC cancer *12*, 24.
de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C. A., Buendia, M. A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., and Perret, C. (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 8847-8851.
Di Tommaso, L., Franchi, G., Park, Y. N., Fiamengo, B., Destro, A., Morenghi, E., Montorsi, M., Torzilli, G., Tommasini, M., Terracciano, L., *et al.* (2007). Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. Hepatology *45*, 725-734.
Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., and Raulet, D. H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. Nature *413*, 165-171.
El-Khoueiry, A. B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T. S., Kudo, M., Hsu, C., Kim, T. Y., Choo, S. P., Trojan, J., Welling, T. H. R., *et al.* (2017). Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. Lancet *389*, 2492-2502.
Gentzler, R., Hall, R., Kunk, P. R., Gaughan, E., Dillon, P., Slingluff, C. L., Jr., and Rahma, O. E. (2016). Beyond melanoma: inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway in solid tumors. Immunotherapy *8*, 583-600.
Gilfillan, S., Ho, E. L., Cella, M., Yokoyama, W. M., and Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. Nature immunology *3*, 1150-1155.
Gougelet, A., Torre, C., Veber, P., Sartor, C., Bachelot, L., Denechaud, P. D., Godard, C., Moldes, M., Burnol, A. F., Dubuquoy, C., *et al.* (2014). T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. Hepatology *59*, 2344-2357.
Grivennikov, S. I., Greten, F. R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. Cell *140*, 883-899.
Harding, J. J., Nandakumar, S., Armenia, J., Khalil, D. N., Albano, M., Ly, M., Shia, J., Hechtman, J. F., Kundra, R., El Dika, I., *et al.* (2019). Prospective Genotyping of Hepatocellular Carcinoma: Clinical Implications of Next-Generation Sequencing for

Matching Patients to Targeted and Immune Therapies. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *25*, 2116-2126.
He, G., and Karin, M. (2011). NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. Cell research *21*, 159-168.
Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. The New England journal of medicine *363*, 711-723.
Hoshida, Y., Villanueva, A., Kobayashi, M., Peix, J., Chiang, D. Y., Camargo, A., Gupta, S., Moore, J., Wrobel, M. J., Lerner, J., *et al.* (2008). Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. The New England journal of medicine *359*, 1995-2004.
Hou, J., Zhang, H., Sun, B., and Karin, M. (2019). The Immunobiology of Hepatocellular Carcinoma in Humans and Mice: Basic Concepts and Therapeutic Implications. Journal of hepatology.
Jamieson, A. M., Diefenbach, A., McMahon, C. W., Xiong, N., Carlyle, J. R., and Raulet, D. H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. Immunity *17*, 19-29.
Kahraman, A., Schlattjan, M., Kocabayoglu, P., Yildiz-Meziletoglu, S., Schlensak, M., Fingas, C. D., Wedemeyer, I., Marquitan, G., Gieseler, R. K., Baba, H. A., *et al.* (2010). Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology *51*, 92-102.
Kamei, R., Yoshimura, K., Yoshino, S., Inoue, M., Asao, T., Fuse, M., Wada, S., Kuramasu, A., Furuya-Kondo, T., Oga, A., *et al.* (2018). Expression levels of UL16 binding protein 1 and natural killer group 2 member D affect overall survival in patients with gastric cancer following gastrectomy. Oncology letters *15*, 747-754.
Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. Nature immunology *9*, 495-502.
Llovet, J. M., Villanueva, A., Lachenmayer, A., and Finn, R. S. (2015). Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. Nature reviews Clinical oncology *12*, 436.
Madjd, Z., Spendlove, I., Moss, R., Bevin, S., Pinder, S. E., Watson, N. F., Ellis, I., and Durrant, L. G. (2007). Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. Cancer immunity *7*, 17.
McGilvray, R. W., Eagle, R. A., Rolland, P., Jafferji, I., Trowsdale, J., and Durrant, L. G. (2010). ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. International journal of cancer *127*, 1412-1420.
McGilvray, R. W., Eagle, R. A., Watson, N. F., Al-Attar, A., Ball, G., Jafferji, I., Trowsdale, J., and Durrant, L. G. (2009). NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *15*, 6993-7002.
Nault, J. C., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. (2013a). Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care. Gastroenterology *144*, 888-902.
Nault, J. C., De Reynies, A., Villanueva, A., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Decaens, T., Franco, D., Imbeaud, S., Rousseau, F., *et al.* (2013b). A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. Gastroenterology *145*, 176-187.
Nault, J. C., Martin, Y., Caruso, S., Hirsch, T. Z., Bayard, Q., Calderaro, J., Charpy, C., Copie-Bergman, C., Ziol, M., Bioulac-Sage, P., *et al.* (2019). Clinical Impact of Genomic Diversity From Early to Advanced Hepatocellular Carcinoma. Hepatology.

Nelson, J. D., Denisenko, O., and Bomsztyk, K. (2006). Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. Nature protocols *1*, 179-185.
Pal, S., Polyak, S. J., Bano, N., Qiu, W. C., Carithers, R. L., Shuhart, M., Gretch, D. R., and Das, A. (2010). Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. Journal of gastroenterology and hepatology *25*, 627-634.
Paschen, A., Sucker, A., Hill, B., Moll, I., Zapatka, M., Nguyen, X. D., Sim, G. C., Gutmann, I., Hassel, J., Becker, J. C., *et al.* (2009). Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *15*, 5208-5215.
Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L. (2001). Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. European journal of immunology *31*, 1076-1086.
Pinyol, R., Sia, D., and Llovet, J. M. (2019). Immune Exclusion-Wnt/CTNNB1 Class Predicts Resistance to Immunotherapies in HCC. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *25*, 2021-2023.
Qi, Y., Chen, X., Chan, C. Y., Li, D., Yuan, C., Yu, F., Lin, M. C., Yew, D. T., Kung, H. F., and Lai, L. (2008). Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. International journal of cancer *122*, 2682-2688.
Raffaghello, L., Prigione, I., Airoldi, I., Camoriano, M., Levreri, I., Gambini, C., Pende, D., Steinle, A., Ferrone, S., and Pistoia, V. (2004). Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. Neoplasia *6*, 558-568.
Raulet, D. H., Gasser, S., Gowen, B. G., Deng, W., and Jung, H. (2013). Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. Annual review of immunology *31*, 413-441.
Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., and Heikenwalder, M. (2018). The immunology of hepatocellular carcinoma. Nature immunology *19*, 222-232.
Ruiz de Galarreta, M., Bresnahan, E., Molina-Sanchez, P., Lindblad, K. E., Maier, B., Sia, D., Puigvehi, M., Miguela, V., Casanova-Acebes, M., Dhainaut, M., *et al.* (2019). beta-Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. Cancer discovery *9*, 1124-1141.
Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H. G., and Steinle, A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. Blood *102*, 1389-1396.
Sangro, B., Gomez-Martin, C., de la Mata, M., Inarrairaegui, M., Garralda, E., Barrera, P., Riezu-Boj, J. I., Larrea, E., Alfaro, C., Sarobe, P., *et al.* (2013). A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C. Journal of hepatology *59*, 81-88.
Schadendorf, D., Hodi, F. S., Robert, C., Weber, J. S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T. T., Berman, D. M., and Wolchok, J. D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *33*, 1889-1894.
Sheppard, S., Ferry, A., Guedes, J., and Guerra, N. (2018). The Paradoxical Role of NKG2D in Cancer Immunity. Frontiers in immunology *9*, 1808.
Sia, D., Jiao, Y., Martinez-Quetglas, I., Kuchuk, O., Villacorta-Martin, C., Castro de Moura, M., Putra, J., Camprecios, G., Bassaganyas, L., Akers, N., *et al.* (2017a). Identification of an

Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. Gastroenterology *153*, 812-826.
Sia, D., and Llovet, J. M. (2017). Liver cancer: Translating '-omics' results into precision medicine for hepatocellular carcinoma. Nature reviews Gastroenterology & hepatology *14*, 571-572.
Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S. L., and Llovet, J. M. (2017b). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. Gastroenterology *152*, 745-761.
Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., and Cosman, D. (2001). The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. Immunological reviews *181*, 185-192.
Tornesello, M. L., Buonaguro, L., Tatangelo, F., Botti, G., Izzo, F., and Buonaguro, F. M. (2013). Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. Genomics *102*, 74-83.
Xu, Y., Zhou, L., Zong, J., Ye, Y., Chen, G., Chen, Y., Liao, X., Guo, Q., Qiu, S., Lin, S., *et al.* (2017). Decreased expression of the NKG2D ligand ULBP4 may be an indicator of poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. Oncotarget *8*, 42007-42019.
Zhu, A. X., Finn, R. S., Edeline, J., Cattan, S., Ogasawara, S., Palmer, D., Verslype, C., Zagonel, V., Fartoux, L., Vogel, A., *et al.* (2018). Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. The Lancet Oncology *19*, 940-952.
Zou, W., Wolchok, J. D., and Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. Science translational medicine *8*, 328rv324.
Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C., and Llovet, J. M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology *149*, 1226-1239 e1224.

Discussion de l'article

Le CHC est une tumeur grave pour laquelle les options thérapeutiques demeurent une préoccupation majeure. L'immunothérapie ayant donné des résultats très prometteurs dans d'autres types de cancers, ces traitements font l'objet d'essais cliniques chez des patients atteints de CHC. Cependant, ces études préliminaires ont apporté jusqu'à présent des résultats assez contradictoires. Les bénéfices de ces traitements n'ont été observés que pour une faible proportion (20%) de patients atteints de CHC et s'accompagnent d'effets secondaires non négligeables (Hou et al., 2019). Ces essais cliniques sont souvent effectués avec des patients ayant déjà été traités avec le sorafenib. Comme énoncé dans l'introduction, le traitement utilisant le sorafenib permettant d'allonger de 3 mois la survie des patients mais provoque de nombreux effets secondaires. Une étude clinique a d'ailleurs été établie afin de comparer le sorafenib avec le nivolumab (anti-PD-1) chez des patients atteints de CHC avancé. Cette étude n'a pas donné de résultats significatif entre les deux types de traitements (Hou et al., 2019). Par conséquent, il est urgent de trouver de nouvelles cibles immunothérapeutiques efficaces pour le traitement du CHC.

Dans notre étude, nous avons étudié le mécanisme d'immunosurveillance du NKG2D par l'expression de ligands de NKG2D (MICA/B, ULBP1/2 humains et Rae-1 murins) dans les CHC humains en tenant compte pour la première fois des caractéristiques génomiques des tumeurs. Jusqu'ici, les travaux sur le système NKG2D dans le foie sont peu nombreux et ont donné des résultats discordants. Ils n'ont d'ailleurs été effectués qu'à partir d'un nombre réduit d'échantillons et sans tenir compte des caractéristiques phénotypiques et des altérations génétiques retrouvées dans le CHC.

Nos travaux permettent d'établlie pour la première fois chez l'Homme, la corrélation entre l'expression des ligands de NKG2D avec l'agressivité tumorale du CHC. Ce résultat démontre le rôle délétère de ce système dans le CHC humain et ouvre de nouvelles voies pour comprendre les mécanismes moléculaires responsables de ce phénotype. De plus, nous avons montré que l'expression des ligands ULBP1/2/Rae-1 est diminuée de façon drastique spécifiquement dans les CHC mutés *CTNNB1* comparé à des foies normaux (contrôles) et des CHC de mauvais pronostic. Les CHC mutés CTNNB1 arborant une forte activation de cette signalisation dans la tumeur, ces résultats suggèrent que la signalisation β-caténine inhibite l'expression de ces ligands. Pour aller plus loin, nous avons analysé l'expression des ligands ULPB1/2 en fonction de l'expression des gènes cibles de la β-caténine et montrons une corrélation négative entre l'expression de ces gènes validant notre hypothèse. Nous avons ensuite analysé chez la souris, l'expression des ligands orthologues des ULPB1 appelés Rae-1 dans les CHC. Comme chez l'Homme, nous montrons une forte augmentation de l'expression de ces ligands dans les CHC agressifs (induits par le DEN) et une diminution transcriptionnelle et protéique quasi-totale de ces ligands dans les CHC mutés *Ctnnb1*. Pour déterminer si la signalisation β-caténine régule directement l'expression des ligands Rae-1, nous avons utilisé un modèle murin appelé Apc-KO permettant d'activer la signalisation β-caténine dans l'ensemble des hépatocytes. Dans ce modèle, nous avons analysé par ChIP-seq, le facteur de transcription TCF4, partenaire préférentiel de la β-caténine dont la liaison permet de réguler les gènes cibles de la signalisation. Nous avons observé que lors de l'activation de la signalisation β-caténine, TCF4 se lie spécifiquement sur le promoteur du gène Rae-1 démontrant que les ligands Rae-1 sont des cibles négatives de la signalisation β-caténine.

L'expression des ligands de NKG2D favorise l'inflammation du tissu hépatique et l'agressivité du CHC.

Nous avons identifié que l'expression des ligands NKG2D était plus élevée dans les CHC des groupes G1/G2/G3. Ces CHC sont des tumeurs agressives présentant un niveau élevé d'inflammation (tumeurs chaudes). En effet, il est maintenant bien établi que la persistance de signaux inflammatoires dans le tissu hépatique favorise le développement du CHC et détermine son agressivité par l'augmentation de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse et de l'invasion tumorale (Ringelhan et al., 2018). De façon intéressante, de nombreuses études ont clairement démontré que le milieu inflammatoire du tissu péritumoral conduit à un pronostic défavorable et favorise la récidive de cancer du foie (Budhu et al., 2006; Cariani et al., 2012; Hoshida et al., 2008; Sia et al., 2017). Des données récentes utilisant le modèle de CHC induit par le DEN, ont permis de démontrer que NKG2D aggrave la tumorigenèse par augmentation de la réponse inflammatoire dans le tissu hépatique et particulièrement dans le tissu péritumoral (Sheppard et al., 2017). En effet, la perte de NKG2D dans la tumorigenèse hépatique induite par le DEN augmente la survie, diminue les lésions hépatiques et l'inflammation dans le tissu adjacent à la tumeur en diminuant l'infiltration de neutrophiles, de lymphocytes T CD8+ activés dans le tissu péritumoral (Sheppard et al., 2017, 2018). De plus, il a été montré que l'expression des ligands MICA/B dans les désordres métaboliques hépatiques comme la NASH est corrélée à une diminution de la fonction hépatique, une fibrose accrue et une apoptose hépatocytaire démontrant leur rôle délétère dans le tissu hépatique (Kahraman et al., 2010). En lien avec la fibrose, nous avons observé dans notre étude que l'expression de MICA/B était augmentée de façon similaire entre les CHC indépendamment de la présence (F2/F3 et F4) ou de l'absence (F0/F1) de fibrose

dans le tissu péritumoral. Ces résultats indiquent que le score de fibrose n'influence pas l'expression intratumorale des ligands MICA/B. Cependant, il serait intéressant d'analyser l'expression des ligands de MICA/B dans le tissu péritumoral afin de déterminer si une forte expression est associée à un mauvais pronostic.

De plus, nous avons constaté que l'expression de MICA/B était plus élevée dans les CHC associés à un mauvais pronostic et à une récidive précoce de tumeur (dans les 2 ans suivant la résection), imputable soit à un traitement initial incomplet, soit à des micrométastases dans le foie (Nault et al., 2013; Sherman, 2008). Par conséquent, nous proposons qu'un niveau élevé de ligands NKG2D exacerbe l'inflammation ce qui favorise les lésions du tissu hépatique aggravant la tumorigenèse hépatique.

Dans ce contexte, nous proposons que l'administration d'agents anti-inflammatoires basés sur le blocage des ligands de NKG2D en combinaison avec les traitements classiques ou immunothérapeutiques serait une perspective intéressante pour le traitement du CHC (Hou et al., 2019).

L'expression des ligands MICA et MICA dans les CHC est associée à une signature inflammatoire.

Nous avons recherché au préalable si l'expression de MICA/B était corrélée avec une signature inflammatoire. Nous montrons que leur expression corrèle positivement avec l'expression transcriptionnelle du TNFα, IFNγ, IL-12 et l'IL-7 ainsi qu'avec l'IL-6 et l'IL-4 pour MICB ***(Figure 7)***. Ces observations confortent notre hypothèse mais demeurent préliminaires. En effet, la signature inflammatoire reste encore limitée à quelques gènes et ne concernent qu'une partie des ligands de NKG2D. D'autres analyses sont donc nécessaires pour corréler de façon plus complète l'expression des ligands NKG2D MICA/B avec les gènes de l'inflammation.

De plus, afin d'étendre cette analyse aux ligands ULBP1/2, l'expression des ligands ULPB1/2 sera étudiée avec la technique utilisée pour l'expression des ligands MICA et MICB (Fluidigm).

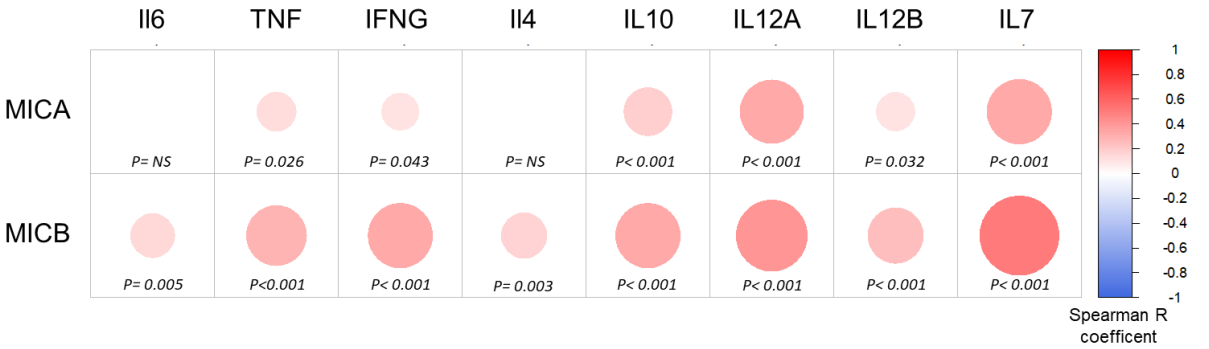


Figure 7 : L'expression de MICA et MICB corrèle avec une signature inflammatoire.

Corrélation (coefficient de Spearman R) des gènes inflammatoires IL6, TNF, IL4, IL10, IL12A, IL12B et IL7 avec les gènes MICA et MICB.

La présence des ligands de NKG2D dans le sérum des patients atteints de CHC semble être associée à un mauvais pronostic.

Les analyses effectuées dans notre étude sont concentrées sur l'expression intratumorale des ligands de NKG2D. Cependant, les ligands de NKG2D peuvent être excrétés dans la circulation sanguine via plusieurs mécanismes (voir introduction Chapitre 4, II, B, 4). Il a d'ailleurs été montré dans différents cancers que la présence de ces ligands dans le sérum des patients était associée à un mauvais pronostic. Cependant, elle n'est pas systématiquement associée à la diminution de la réponse anti-tumorale (Schmiedel and Mandelboim, 2018). En effet, plusieurs études ayant analysé les ligands de NKG2D dans le sérum de patients atteints de cancers ont donné des résultats contradictoires (Sheppard et al., 2018). Dans le CHC, des études *in vitro* ont montré que le traitement utilisant le sorafenib ou le regorafenib permettaient d'inhiber l'excrétion des ligands de NKG2D (Kohga et al., 2010) et la restauration de l'expression de ces ligands à la surface des cellules tumorales (Arai

et al., 2018). Ces études ne permettent cependant pas de déterminer les conséquences de la présence de ces ligands dans le sérum de ces patients. Ainsi, il serait intéressant d'analyser à grande échelle, la présence, la nature et la concentration des ligands de NKG2D dans le sérum de patients atteints de CHC et de corréler leur expression avec le pronostic de ces patients.

La faible expression des ligands de NKG2D expliquerait le phénotype peu inflammatoire des CHC mutés CTNNB1.

Il est intéressant de noter que les CHC mutés *CTNNB1* sont caractérisés par l'absence d'infiltrats inflammatoires ce qui leur vaut le terme de tumeurs froides. Cependant, les mécanismes moléculaires conduisant à l'absence d'inflammation dans les CHC mutés *CTNNB1*, restent encore peu connus. De façon intéressante, l'activation de la β-caténine dans les cellules cancéreuses de mélanome, inhibe l'infiltration de lymphocytes T et provoque une forte production d'IL-10 (Gao et al., 2018). De plus, dans les CHC mutés *CTNNB1*, une étude récente utilisant des modèles murins de CHC et une cohorte de patients, a montré que l'activation de la signalisation β-caténine diminue le recrutement des cellules dendritiques et l'expression de la chimiokines CCL5 altérant l'immunosurveillance tumorale (Ruiz de Galarreta et al., 2019). Cette étude utilise un modèle d'injection hydrodynamique d'éléments géniques pour modifier le génome des souris afin de créer des tumeurs en 6 à 8 semaines de vie. Cette technique induit donc des tumeurs de façon extrêmement rapide dont les caractéristiques phénotypiques semblent différentes des tumeurs humaines. Il est important de noter que les modifications du mircorenvironnement immunitaire dans ce modèle ne sont également pas transposables à ceux aux modèles de tumeurs spontanées.

Dans cette étude, nous proposons que le faible taux de ligands de NKG2D dans ces CHC et la régulation d'une partie des ligands par la signalisation β-caténine, pourraient expliquer leur phénotype peu inflammatoire. Afin de savoir si l'expression des ligands Rae-1 dans le CHC muté *Ctnnb1* peut convertir les tumeurs froides en CHC agressifs et inflammatoires, nous avons réintroduit par voie intraveineuse une construction AAV8 contenant le gène Rae-1 (δ) sous la dépendance du promoteur de la transthyrétine (spécifique des hépatocytes) dans des souris Lpk-myc+ (développant des CHC mutés *Ctnnb1*). Ce type de vecteur a un tropisme très fort pour le foie, est peu inflammatoire et permet d'introduire facilement des gènes dans le génome des hépatocytes. Tout d'abord, nous avons validé cette manipulation sur des souris Apc-KO (N=3). Nous avons ensuite injecté plusieurs lots de souris Lpk-myc+ avec ce vecteur. Ainsi, nous allons analyser le phénotype de ces tumeurs Ctnnb1 mutées Rae-1+ en comparaison avec des tumeurs Rae-1-. Nous allons également analyser au niveau transcriptionnel des gènes associés à l'inflammation et les conséquences de cette réintroduction sur l'agressivité de la tumorigenèse et le phénotype des cellules immunitaires.

Les ligands de NKG2D dans la thérapie du CHC

Des travaux de génomique fonctionnelle ont récemment analysé de façon précise le paysage immunologique du CHC. Cette étude a permis de mettre en évidence un groupe de CHC appelé « immune class » qui expriment des marqueurs de la réponse immunitaire permettant de prédire la réponse aux traitements basés sur l'utilisation des checkpoints inhibiteurs. De façon intéressante, les CHC mutés *CTNNB1* sont exclus de cette classe immunitaire ce qui prédirait leur résistance aux immunothérapies (Sia et al., 2017). Une étude clinique a d'ailleurs montré que

l’administration de traitements immunothérapeutiques (anti-PD-1/PD-L1, anti-CTLA-4) ne modifie pas la survie sans progression des patients atteints de CHC mutés *CTNNB1* (Harding et al., 2019). Bien que préliminaires, ces travaux ont permis de démontrer que ces CHC ne répondent pas au blocage des points de contrôle les rendant non admissibles aux traitements immunothérapeutiques (Harding et al., 2019). La prise en charge thérapeutique de ces patients reste donc limitée. Ainsi, la communauté scientifique et médicale envisage de trouver des options thérapeutiques permettant de convertir ces tumeurs froides en tumeurs chaudes afin de les rendre admissibles à l'immunothérapie.

Dans notre étude, nous démontrons que l’expression des ligands de NKG2D dans le CHC sont associés à une inflammation du tissu hépatique et proposons donc la réintroduction de l’expression des ligands de NKG2D comme une option pouvant rendre les CHC mutés *CTNNB1* répondeurs aux immunothérapies. En perspective de ce travail, nous testerons si l’administration d’un traitement anti-PD-1 aux souris atteints de CHC activés pour la β-caténine dans lesquels nous aurons réintroduit l’expression de Rae-1, a un impact sur la tumorigenèse.

PARTIE 2

LE SYSTEME DNAM-1

Le système DNAM-1 est un système d'immunosurveillance encore peu étudié aujourd'hui et particulièrement dans le cancer du foie. Nous avons donc choisi de l'étudier chez l'Homme dans une cohorte de patients atteints de CHC rangés en fonction des altérations génétiques et dans nos différents modèles murins de tumorigenèse afin de mieux comprendre son rôle dans le CHC. Nous nous sommes particulièrement concentrés sur l'analyse du récepteur DNAM-1 à la surface des lymphocytes du foie dans les deux types de CHC chez la souris.

Ces résultats préliminaires sont présentés sous forme d'ébauche d'article en français.

LES CELLULES NKT DNAM-1-NEGATIVES ARBORENT UN PHENOTYPE DE CELLULES EPUISEES DANS LES CHC CTNNB1-MUTES

I. Résultats

L'expression transcriptionnelle de CD155 est augmentée dans les CHC humains et corrèle avec la gravité de la tumeur.

Nous avons analysé l'expression des ligands de DNAM-1 (CD155 et CD112), à la fois chez des patients atteints de CHC et dans nos modèles murins de tumorigenèse hépatique induit par le DEN (DEN-induced HCC) et Lpk-myc (β-catenin-mutated HCC). De façon intéressante, chez l'Homme, nous montrons que l'expression des deux ligands est significativement augmentée dans les CHC comparativement aux foies normaux ***(Figure 1, A)***. De plus, nous montrons que leur expression est corrélée avec une faible différenciation des tumeurs hépatiques ***(Figure 1, B)***.

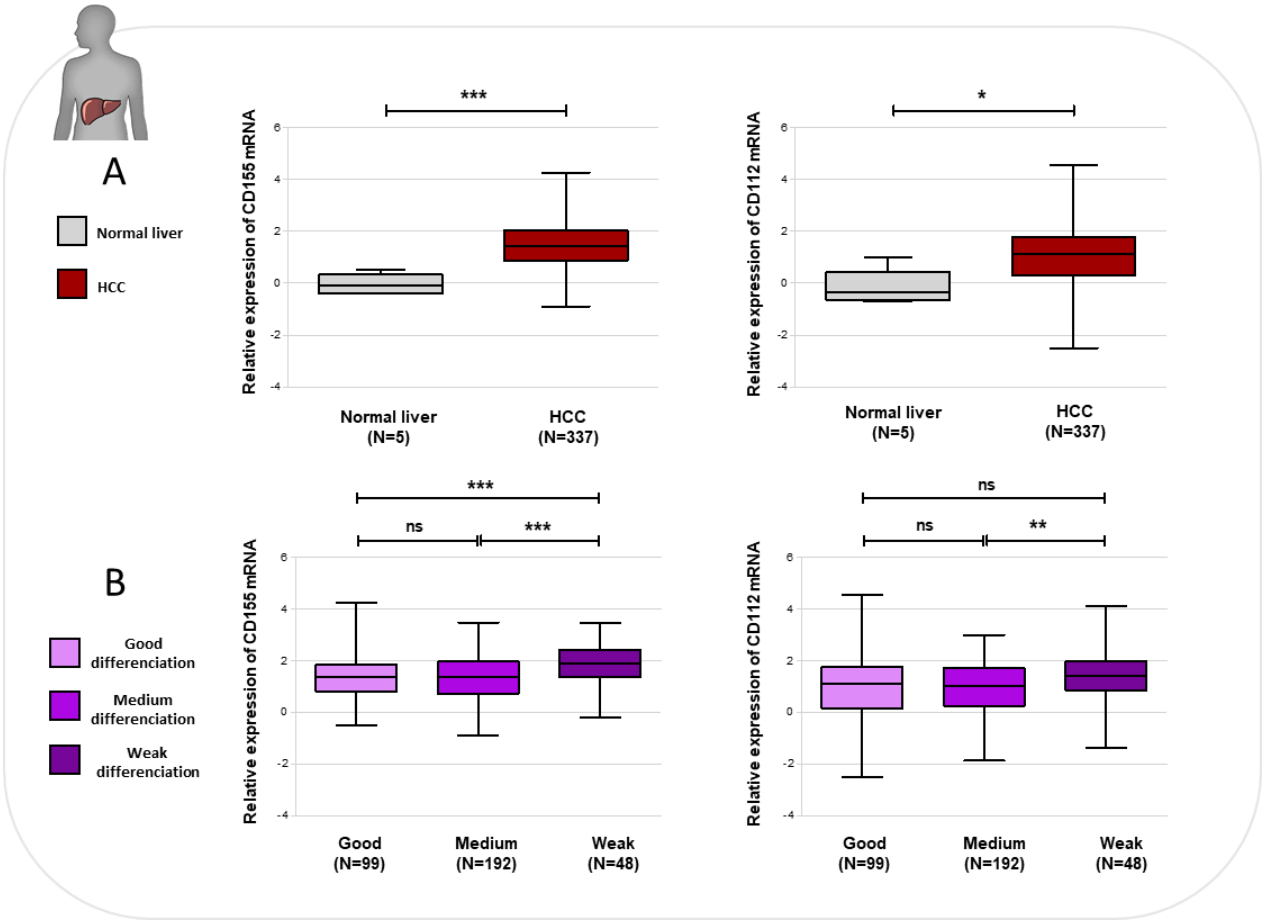


Figure 1 : L'expression transcriptionnelle des ligands de CD155 et CD112 augmentent dans le CHC et corrèle avec une faible différenciation des tumeurs.

*Analyse de l'expression des ligands CD155 et CD112 par RT-qPCR chez les patients atteints de CHC ou non (A) et en fonction des groupes de tumeurs (B). ns<0,05, *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.*

Par ailleurs, nous avons également analysé l'expression de CD155 et CD112 dans les deux groupes majeurs de tumeurs hépatiques (G1/G2/G3 versus G4/G5/G6). De façon intéressante, seule l'expression de CD155 est plus forte dans les CHC présentant une forte instabilité chromosomique ***(Figure 2, A)***.

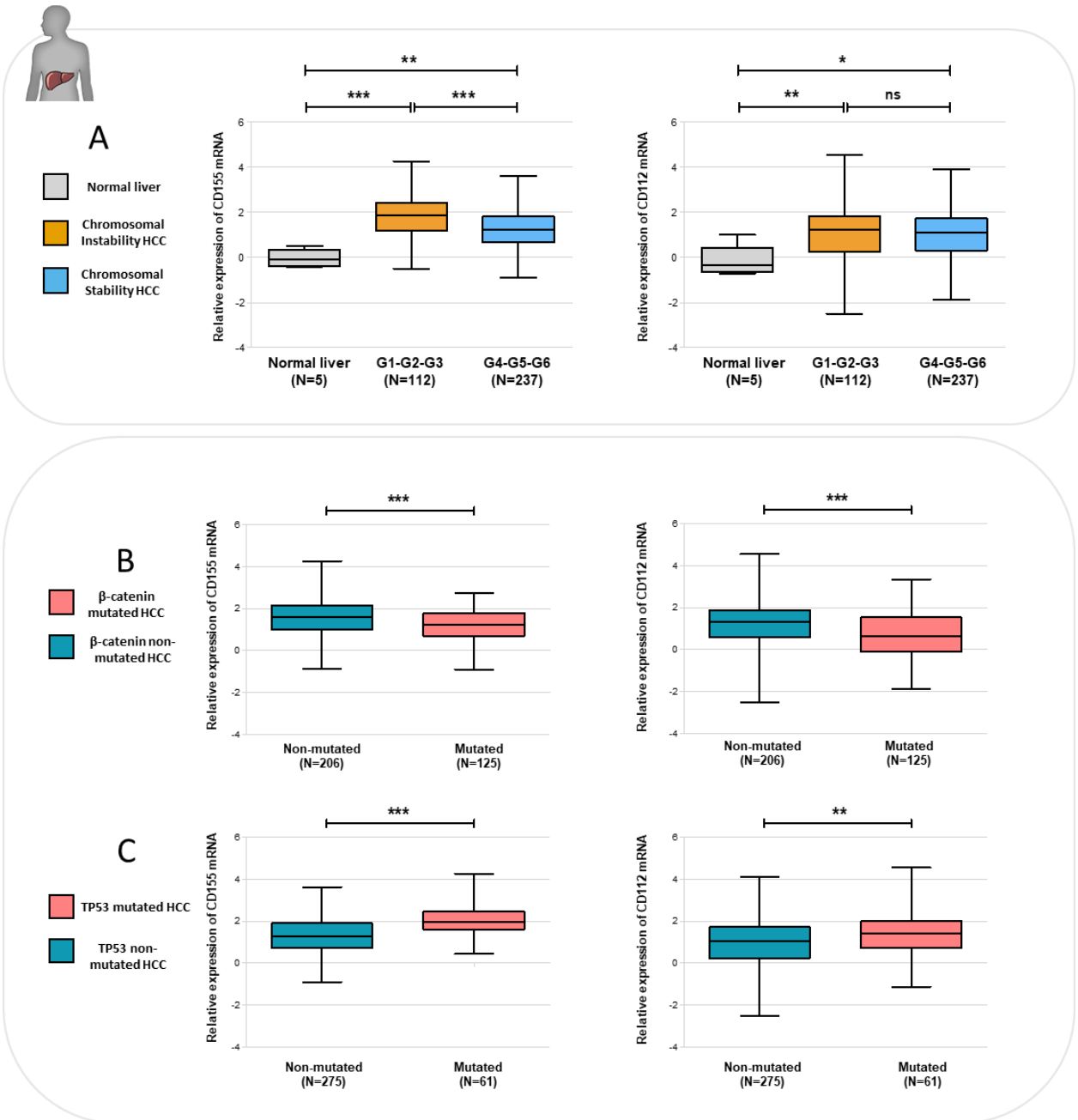


Figure 2 : L'expression des ligands CD155 et CD112 est associée à une mutation TP53 chez les patients atteints de CHC.

*Analyse de l'expression des ligands CD155 et CD112 par RT-qPCR chez les patients atteints de CHC mutés dans le gène CTNNB1 (A) ou TP53 (B). ns<0,05, *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.*

Par ailleurs, nous montrons que l'expression des deux ligands CD155 et CD112 est diminuée dans les CHC mutés pour la β-caténine ***(Figure 2, B)*** et augmentée dans les

CHC mutés TP53 ***(Figure 2, C)*** validant nos observations dans les différents groupes de CHC (voir Introduction, Chapitre 2, III) ***(Figure 2, A)***.

L'ensemble de ces résultats montre que l'expression des ligands de DNAM-1 augmente dans les CHC humains démontrant leur implication dans la tumorigenèse hépatique. De plus, nous montrons l'expression du ligand CD155 est associée à des tumeurs peu différenciées et augmente dans les tumeurs G1/G2/G3 suggérant le rôle délétère de CD155 dans la cancérogenèse hépatique.

L'expression de CD155 est augmentée uniquement dans les CHC murins mutés pour la β-caténine.

Afin d'analyser plus en détails le système DNAM-1 dans la cancérogenèse hépatique, nous avons analysé l'expression de CD155 et de CD112 dans nos modèles murins récapitulant la tumorigenèse humaine. Nous montrons que l'expression transcriptionnelle de CD155 est uniquement augmentée dans les CHC mutés pour la β-caténine comparativement aux contrôles et aux CHC induits par le DEN. L'expression transcriptionnelle du ligand CD112 est augmentée plus fortement dans les CHC induits par le DEN et faiblement aumgentée dans les CHC mutés *Ctnnb1* comparativement aux foies contrôles ***(Figure 3)***.

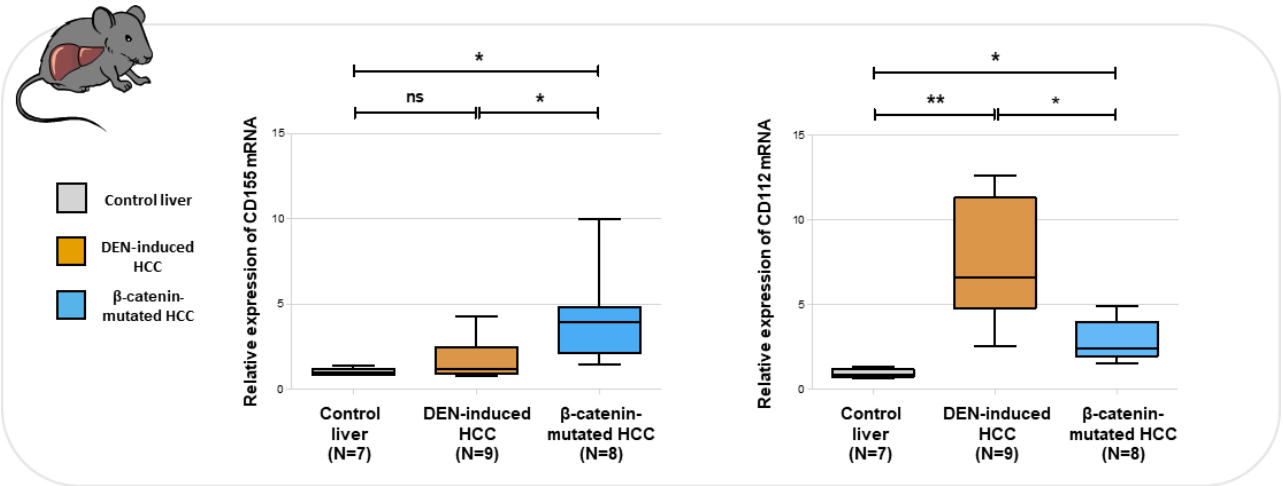


Figure 3 : L'expression du ligand CD112 est augmentée dans les CHC murins contrairement au ligand CD155 uniquement augmenté dans les CHC mutés Ctnnb1.

*Analyse de l'expression des ligands CD155 et CD112 par RT-qPCR dans nos modèles murins de CHC induit par le DEN ou mutés dans le gène Ctnnb1 et dans les foies contrôles. ns<0,05, *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.*

Les cellules NKT perdent l'expression de DNAM-1 à leur surface dans les CHC mutés β-caténine.

Outre l'expression des ligands, nous nous sommes également intéressés chez la souris à l'expression du récepteur DNAM-1 à la surface des cellules immunitaires à fort potentiel anti-tumoral comme les cellules lymphocytaires NKT (βTCR1^{mid}, NK1.1^{+}), NK (βTCR^{-}, NK1.1^{+}) et T CD8+ (βTCR1^{high}, NK1.1^{-}, CD8^{+}). Ainsi, nous avons analysé l'expression du récepteur DNAM-1 à la surface de ces cellules extraites des tumeurs par cytométrie en flux dans nos modèles murins de CHC et leurs contrôles respectifs.

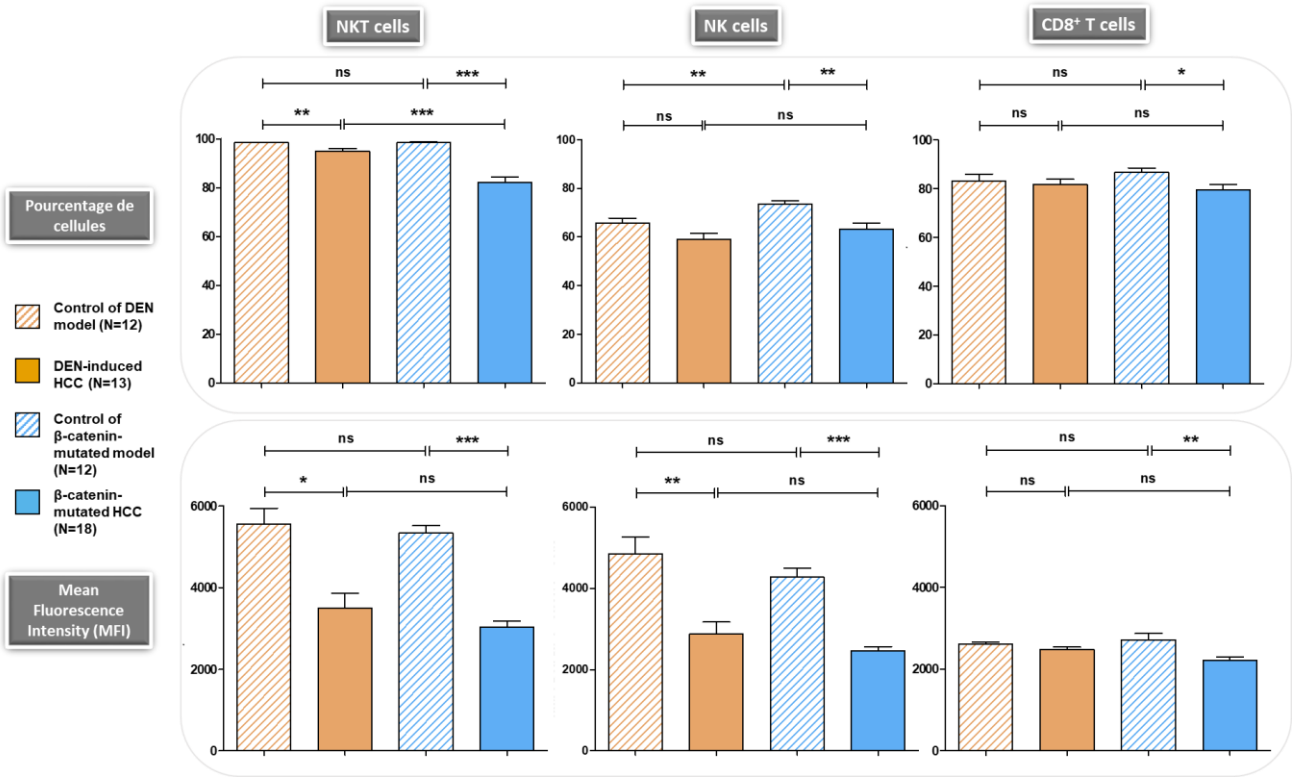


Figure 4 : Analyse du pourcentage de cellules DNAM-1 positives et de leur MFI au sein des populations de cellules NKT, NK et T CD8+ par cytométrie en flux.

Panneau haut : Comparaison du pourcentage de cellules DNAM-1 positives au sein des populations NKT, NK et T CD8+ dans des foies de contrôles DEN, des foies tumoraux du modèle DEN, des foies contrôles du modèle β-caténine et des foies tumoraux mutés pour la β-caténine.
*Panneau bas : Comparaison de la quantité relative de molécule à la surface des cellules NKT, NK et T CD8+ DNAM-1 positives par intensité de fluorescence (MFI). ns<0,05, *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001*

Dans les foies contrôles, nous montrons que le pourcentage de cellules DNAM-1 positives est différent entre les trois populations et relativement élevé. En effet, le pourcentage de cellules NKT qui expriment le récepteur DNAM-1 est d'environ 98% dans un foie normal et d'environ 70% et 85% pour les cellules NK et T CD8+ respectivement ***(Figure 4)***.

De plus, nous montrons que la quantité relative de molécule à la surface (MFI) des cellules est aussi différent en fonction des populations analysées (NKT : 5500 ; NK : 4500 ; T CD8+ : 2700) ***(Figure 4)*** démontrant une hétérogénéité de l'expression de DNAM-1 au sein de ces populations immunitaires dans des conditions physiologiques.

De façon intéressante, nous avons observé que l'expression de DNAM-1 sur les populations de NKT, de NK et de lymphocyte T CD8+ est différente dans la rate en terme de proportion et de MFI comparativement au foie ***(Figure 5)***.

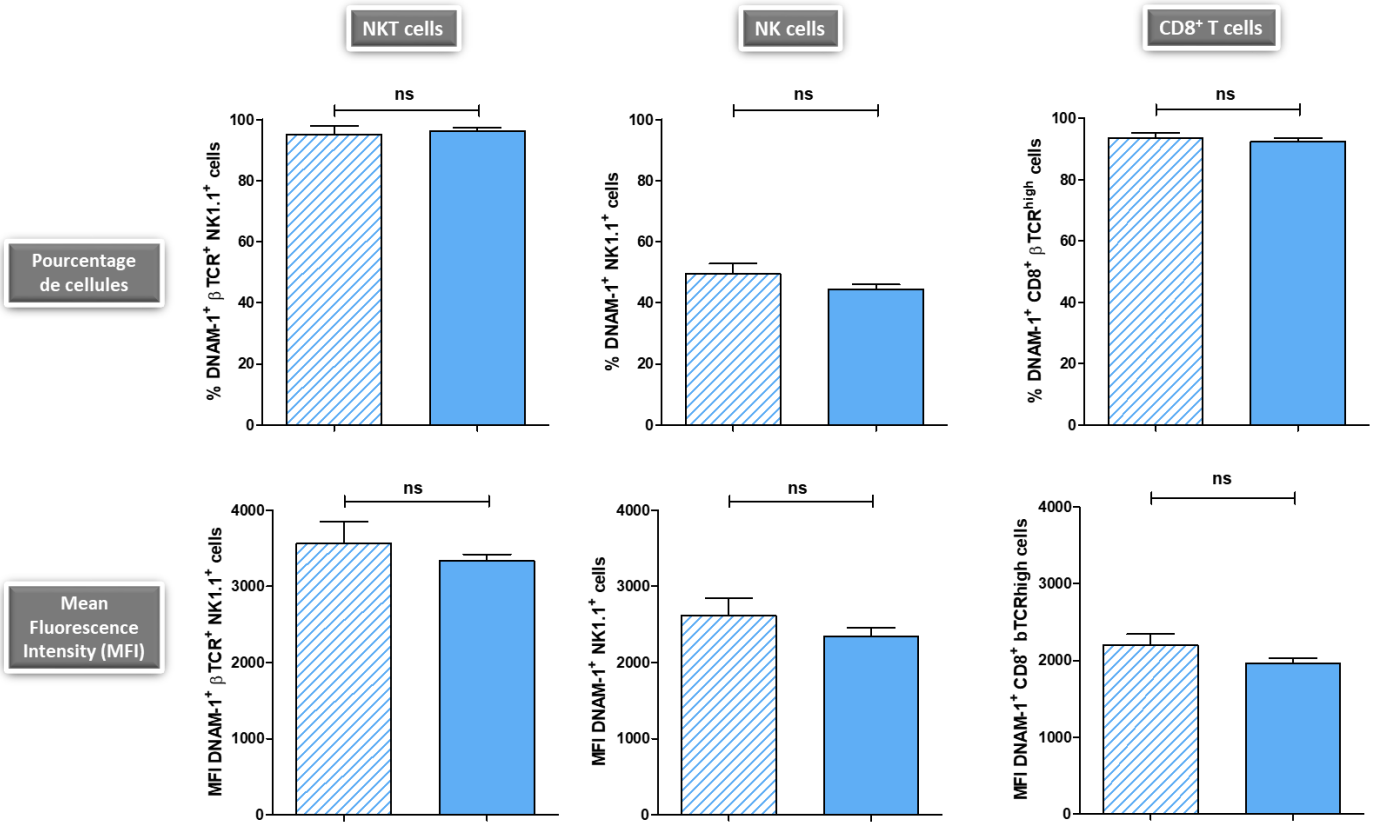


Figure 5 : L'expression de DNAM-1 des populations NKT, NK et TCD8+ diffèrent en terme de pourcentages et de MFI entre la rate et le foie.

*Panneau haut : Comparaison du pourcentage de cellules DNAM-1 positives au sein des populations NKT, NK et T CD8+ dans des rates provenant de souris contrôles et de souris présentant un CHc mutés pour la ß-caténine. Panneau bas : Comparaison de la quantité relative de molécule à la surface des cellules NKT, NK et T CD8+ DNAM-1 positives par intensité de fluorescence (MFI). ns<0,05, *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001*

En effet, nous avons analysé l'expression de ce récepteur sur ces mêmes populations et nous montrons que le pourcentage de cellules T CD8+ provenant de la rate est de presque 100% contrairement aux cellules T CD8+ hépatiques. Ces cellules arborent une expression de surface (MFI) similaire dans les deux organes (2600 versus 2200 respectivement) ***(Figure 4 et 5)***. L'expression de DNAM-1 est plus faible sur les cellules NK de la rate que dans le foie en proportion (45% versus 65%)

et en MFI (2600 versus 5000). Les cellules NKT expriment également moins DNAM-1 dans la rate que dans le foie (3500 versus 5800) suggérant que l'expression de DNAM-1 à la surface des populations immunitaires est dépendante de l'environnement dans lequel elle sont localisées.

Dans un contexte de tumorigenèse induite par le DEN, seul le pourcentage de cellules NKT DNAM-1 positives diminue. En revanche, nous montrons que le pourcentage des trois populations hépatiques NKT, NK et T CD8+ diminue dans le modèle de CHC mutés pour la β-caténine ***(Figure 4)***. De façon intéressante, nous montrons que la quantité relative de molécule DNAM-1 (MFI) à la surface des cellules DNAM-1 positives diminue de façon drastique dans la tumorigenèse hépatique, de façon similaire entre le modèle DEN et le modèle muté pour la β-caténine excepté pour les lymphocytes T CD8+ dans les CHC induits par le DEN ***(Figure 4)***.

Ensemble, ces observations montrent que l'expression de DNAM-1 est fortement diminuée à la surface des populations immunitaires hépatiques à fort potentiel anti-tumoral dans la tumorigenèse hépatique.

Les cellules NKT DNAM-1-négatives arborent un phénotype de cellules épuisées.

Nous avons pu observer que le pourcentage de cellules NKT DNAM-1 positives, proche de 100% dans les foies contrôles, diminue dans les deux modèles de CHC (Figure 4). Nous pouvons donc observer la présence de cellules NKT DNAM-1 négatives dans les deux types de CHC qui n'est pas présente dans un foie sain. Cependant, le pourcentage de cellules NKT DNAM-1 négatives est plus important dans un contexte de CHC muté pour la β-caténine (17%) que dans un contexte de CHC induit par le DEN (environ 4%). Il est à noter que le grand nombre d'échantillons et les faibles écarts types donnent une significativité statistique pour ce dernier résultat. Le faible pourcentage de cellules NKT DNAM-1 négatives dans les CHC induits par le DEN) ne nous permettant pas de trier assez de cellules pour les étudier, l'analyse de cette population n'a pas été poursuivie.

Nous nous sommes donc intéressés plus en détails à la population de NKT DNAM-1 négatives dans les CHC mutés pour la β-caténine afin d'analyser son phénotype et de comprendre son rôle. Tout d'abord, Nous avons analysé de façon préliminaire l'expression de quelques molécules par cytométrie en flux. Nous avons analysé le récepteur activateur NKG2D, la cytokine IFNγ connue pour son rôle anti-tumoral et le marqueur d'immunosuppression PD-1 sur les populations de NKT DNAM-1 positives et négatives extraites des CHC mutés pour la β-caténine ***(Figure 6)***.

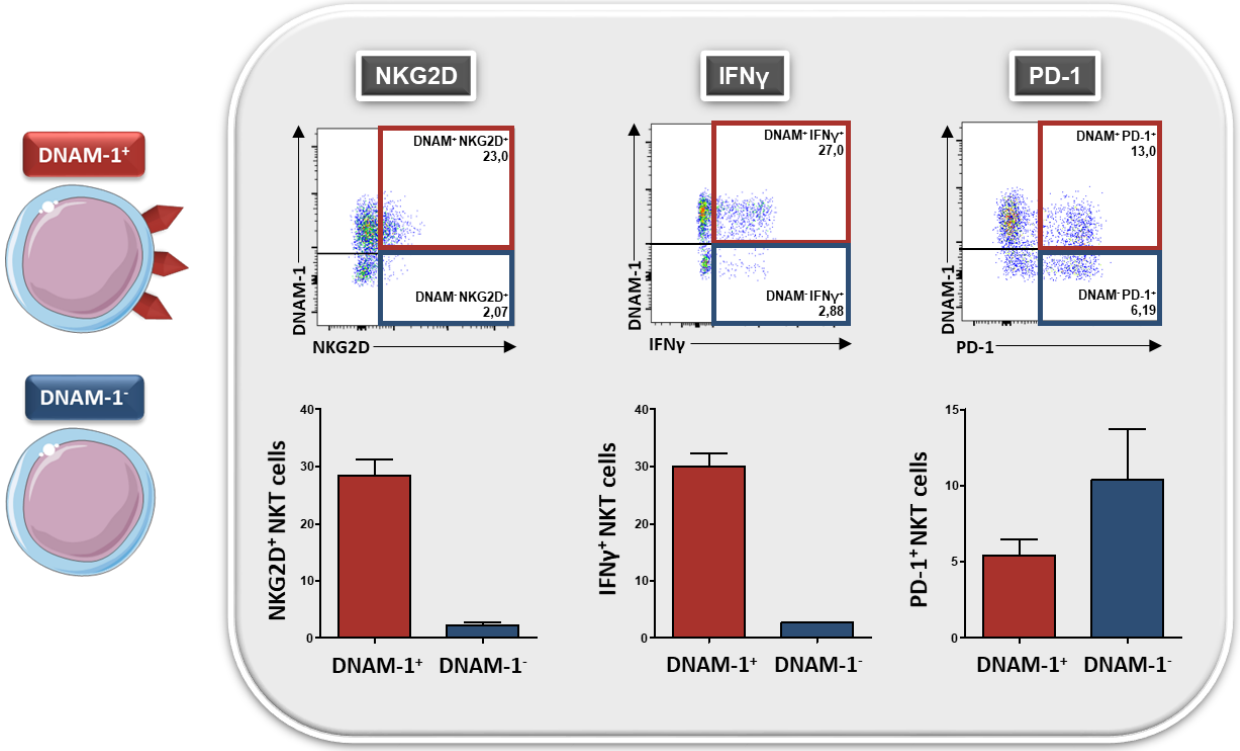


Figure 6 : Phénotypage des cellules NKT DNAM-1 positives et négatives dans les CHC mutés pour la β-caténine.

Analyse de l'expression des molécules NKG2D, sécrétion d'IFNγ et de PD-1 dans les populations de cellules NKT DNAM-1 négatives et positives dans le modèle de CHC muté pour la β-caténine par cytométrie en flux.

De façon intéressante, nous montrons que les cellules NKT DNAM-1 positives expriment fortement le récepteur NKG2D dans ce modèle (28,4% versus 2,2%) ***(Figure 6)*** et possède une capacité importante de sécrétion d'IFNγ comparativement aux cellules NKT DNAM-1 négatives (30% versus 2,7%) ***(Figure 6)***. Enfin, nous pouvons observer que les deux populations de NKT, DNAM-1 positives et négatives, expriment le marqueur d'immunosuppression PD-1 (5% et 10% respectivement) ***(Figure 6)***.

Ensemble, ces observations suggèrent fortement que la population de NKT hépatiques DNAM-1 négatives arbore un phénotype de cellules épuisées.

La population de cellules NKT DNAM-1 négatives présente un profil d'expression génique de cellules épuisées.

Afin d'étudier plus en détails le phénotype de la population de cellules NKT DNAM-1 négatives, nous avons analysé son profil génique en comparaison avec celui des cellules NKT DNAM-1 positives extraites des CHC mutés pour la β-caténine par RNA sequencing après tri par FACS (fluorescence-activated cell sorting). Les résultats de ce RNAseq ayant été obtenus tardivement, nous avons effectué une analyse préliminaire de ces données permettant la validation de notre hypothèse et nos analyse précédentes. Nous analyserons plus précisément ces signatures géniques ultérieurement.

Le séquençage RNA-seq a permis de détecter 19066 gènes avec un niveau d'expression supérieur à 0,1 FPKM (expressions normalisées). Le clustering hiérarchique permet de regrouper les échantillons en fonction de leur similarité de profil d'expression ***(Figure 7***. Il regroupe les échantillons les plus proches de façon non supervisée et sur la base de l'expression des gènes. Ici, les 1000 gènes les plus variables au sein de l'expérience ont été ainsi clusterisés sans à priori d'appartenance à un groupe. La Heatmap montre une séparation claire des échantillons en 2 groupes en fonction de l'expression de DNAM-1 ***(Figure 7***. Deux patterns d'expression sont nettement opposés. Alors que le groupe A les profils d'expression des 6 échantillons sont quasi-identiques, nous observons dans le groupe B des profils légèrement variables ***(Figure 7)***.

Nous avons ensuite étudié l'expression des gènes d'intérêt les plus dérégulés dans les différents échantillons (1 à 6) ***(Figure 8)***. Tout d'abord, nous avons validé le tri des populations en vérifiant que le gène *Cd226* n'était pas exprimé dans les cellules NKT DNAM-1 négatives (B) et est exprimé dans les cellules NKT DNAM-1 positives (A) ***(Figure 8)***. Nous avons aussi validé les résultats obtenus par cytométrie en flux ***(Figure 8)*** pour les gènes codant l'IFNγ (*Ifng*) et le récepteur NKG2D (*Klrk1*).

De façon intéressante, nous pouvons observer que les gènes codant pour des molécules de co-stimulation (*Cd3e*, *CD3g*, *Cd28*, *Thy1*), pour les protéases granzyme B et perforine (*Gzmb*, *Prf1*) permettant la fonction lytique des cellules cytotoxiques sont régulés négativement dans les cellules NKT DNAM-1 négatives suggérant une diminution leur stimulation par le TCR et de leur fonction cytotoxique.

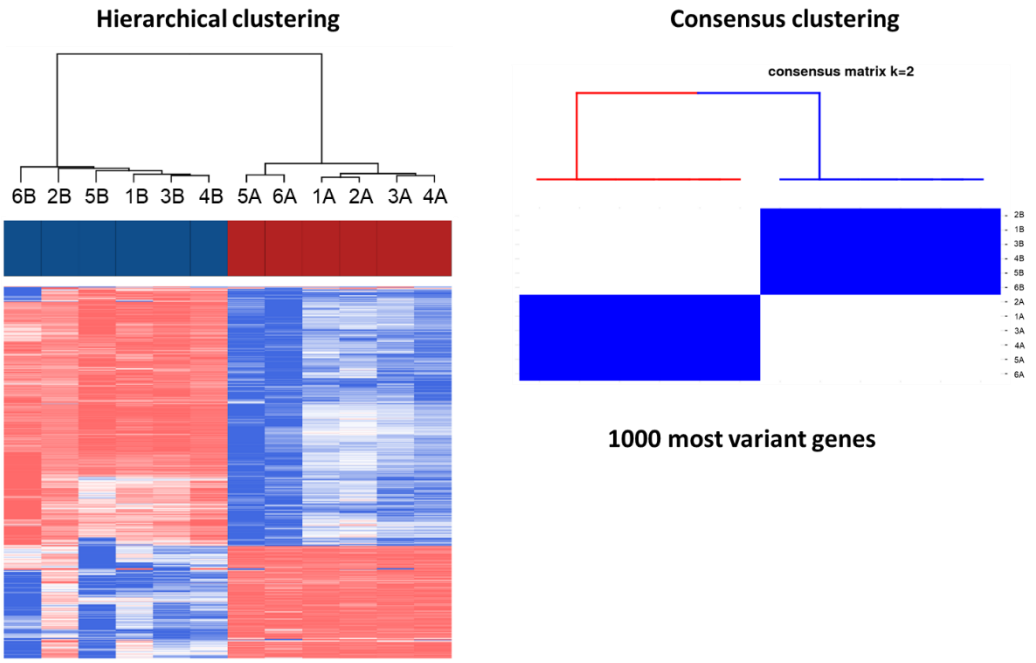


Figure 7 : Analyse du profil génétique par RNA sequencing des populations de cellules NKT DNAM-1 positive (A) et DNAM-1 négative (B) après tri par FACS.
Panneau de gauche : regroupement hiérarchique des échantillons (1 à 6).
Panneau de droite : regroupement par consensus des échantillons (1 à 6).

De plus, nous montrons que l'expression des gènes codant pour les ligands CD40L (*Cd40lg*), FasL (*Fasl*) et TRAIL (*Tnfsf10*) est drastiquement diminuée dans les cellules NKT DNAM-1 négatives suggérant fortement que leur capacité d'induire la mort d'autres cellules par apoptose est diminuée. De plus, nous montrons que l'expression des gènes codant le récepteur inhibiteur CD96 est diminué dans les cellules DNAM-1 négatives et a une tendance à diminuer pour le gène codant le récepteur TIGIT.

Enfin, nous montrons que l'expression des gènes codant pour les récepteurs CXCR3 et CXCR6 est fortement diminuée dans les cellules NKT DNAM-1 négatives comparée aux cellules NKT DNAM-1 positives. Ces résultats suggèrent que les cellules NKT DNAM-1 négatives ne possèdent plus les récepteurs permettant leur migration et leur résidence dans le foie et/ou les tissus inflammés (respectivement) (Marra and Tacke, 2014).

L’ensemble de ces résultats montre que les cellules NKT DNAM-1 négatives ne peuvent plus exprimer des récepteurs d’immunosurveillance, les molécules de lyse et interleukines traduisant un phénotype de cellules épuisées sans expression du marqueur PD-1.

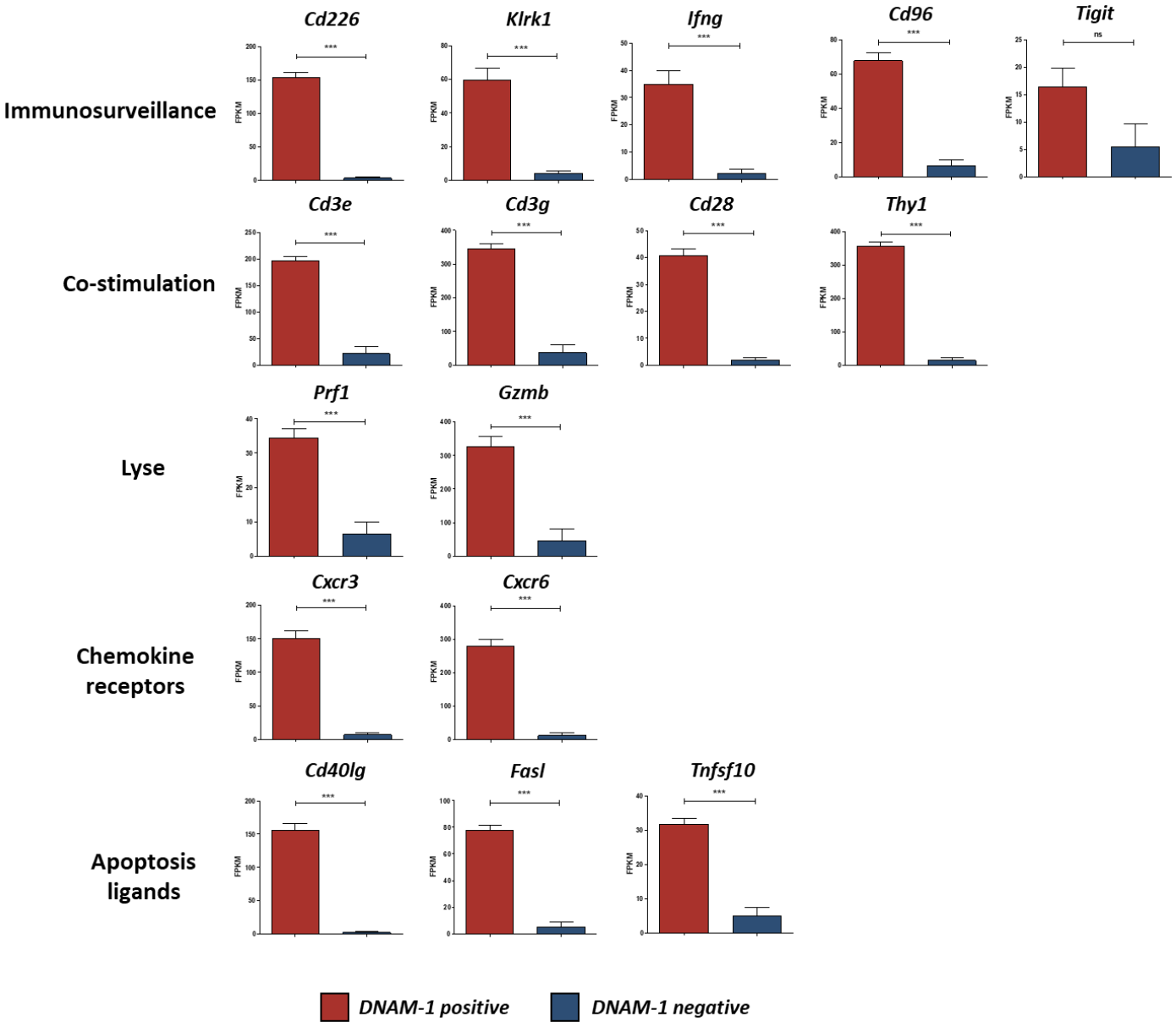


Figure 8 : Augmentation de l’expression transcriptionelle des gènes Cd226, Klrk1, Ifng, Cd3e, Cd3g, Cd28, Thy1, Prf1, Gzmb, Cxcr3, Cxcr6, Cd40lg, Fasl, Tnfsf10 dans les populations de NKT DNAM-1 positives comparées aux DNAM-1 négatives extraites de CHC mutés pour la β-caténine.

II. Matériels et Méthodes

A. Matériels

1. PATIENTS

La cohorte de patients atteints de CHC qui a été utilisée dans cette étude a été décrite dans les travaux de la Partie 1.

2. MODELES MURINS

Les modèles murins de CHC induit par le DEN et muté Ctnnb1 utilisés pour cette étude ont été décrit dans la paragraphe II de la présentation de l'étude.

3. ANTICORPS

Les anticorps anti-βTCR-FITC (H57-597), anti-CD8-APC-H7 (53-6.7), anti-CD4-Pacific Blue (RM4-5), anti-NK1.1-PE Cy7 (PK136) sont commercialisés par BD Biosciences de la gamme Pharmingen (Rungis, France). Les anticorps anti-IFNγ-BV421 (XMG1.2), anti-NKG2D-PE (CX5), anti-PD1-PE (J43) et anti-DNAM-1-APC (10E5) sont commercialisés par eBiosciences (Paris, France), alpha-GalCer loaded CD1d or APC (National Institute of Health, Bethesda, USA).

B. Méthodes

1. ISOLEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES DU FOIE

Après prélèvement du foie, les lobes sont séparés, perfusés par du tampon Hank's-Balance-Salt contenant 10 mM d'Hépès (HBSS) afin d'éliminer le sang. Les foies sont ensuite broyés sur un filtre 100 µm et repris dans 50 mL de milieu Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Gibco) 2% sérum de veau fœtal (SVF) supplémenté de 5.10^{-5} M de β-mercaptoéthanol (Gibco), 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Une première centrifugation de 3 min à 800 rpm à 4ºC permet de culoter les hépatocytes. Le surnageant est de nouveau centrifugé à 1500 rpm pendant 10 min à 4°C afin de culoter les leucocytes, qui seront repris dans 10 mL de Percoll (GE Healthcare, Suède) 40% (dilué en RPMI 2% SVF) déposés sur 10 mL de Percoll 80% (dilué en PBS 1X, Eurobio). Les tubes de Percoll sont centrifugés 20 min à 20ºC à 2000 rpm sans frein. Les anneaux de leucocytes et les culots

(contenant les polynucléaires) sont récupérés et lavés en grands volumes en PBS, puis resuspendus dans 5 mL de tampon Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) afin d'éliminer les érythrocytes. La réaction est arrêtée avec 25 mL de milieu RPMI 10% SVF puis les échantillons sont centrifugés 10 min à 1500 rpm à 4ºC. Le surnageant est éliminé, puis les cellules sont comptées sur hématimètre de Malassez. En parallèle, une rate provenant d'une souris contrôle est prélevée afin de réaliser les monomarquages pour la calibration du cytomètre en flux. Elle est directement broyée sur filtre 100 µm et resuspendue dans 3 mL d'ACK pendant 3 min, la réaction est arrêtée avec 10 mL de RPMI 10 % SVF. Les marquages se font à partir de 3.10^5 à 1.10^6 cellules.

2. IMMUNOMARQUAGE ET CYTOMETRIE EN FLUX

Les échantillons cellulaires sont saturés dans une solution de Fc Block (anti-CD16/CD32 0,5 mg/mL) (Invitrogen) diluée au 1/50ème en tampon FACS (PBS 1X, 3% SVF) pendant 30 min, puis centrifugés 5 min à 1500 rpm à 4ºC. Les surnageants sont éliminés et les culots rincés en tampon FACS, centrifugés 5 min à 1500 rpm à 4ºC, puis incubés avec soit un seul anticorps (monomarquages), soit avec un panel d'anticorps dilués en Fc Block, ou non marqué, pendant 30 min sur glace, à l'abri de la lumière. Les culots sont ensuite lavés 3 fois en tampon FACS après centrifugation de 5 min à 1500 rpm à 4ºC et élimination du surnageant, puis resuspendus dans 300 µL de tampon FACS.

Pour les marquages intracellulaires, les échantillons cellulaires sont stimulés pendant 3 h à 37°C, 5% CO_2 dans du milieu RPMI 10% contenant 1 µg/mL de Phorbol Myristate Acetate (PMA), 500 ng/mL de ionomycine et 10 µL/mL de brefeldine A. Les marquages de surface se font comme décrit ci-dessus, puis les cellules sont perméabilisées pendant 20 min à 4°C à l'obscurité avec un kit Cytofix Cytoperm (BD) selon les recommandations du fournisseur. Le marquage intracellulaire est effectué après 2 lavages en PermWash (contenu dans le kit) avec l'anticorps dilué en PermWash sur la nuit à 4°C. Enfin, les cellules sont lavées 2 fois en PermWash, une fois en tampon FACS, puis resuspendues dans 300µL de tampon FACS. Les échantillons cellulaires sont analysés avec un cytomètre LSR Fortessa (BD Biosciences) comportant 5 lasers, doté du logiciel Diva, puis les données sont traitées avec le logiciel d'analyse Flow Jo

3. TRI CELLULAIRE PAR FACS

Les cellules immunitaires du foie ont été incubées avec des anticorps anti-CD16/CD32 (Fcγ récepteur III/II, clone 2.4G2, eBiosciences) avant la coloration avec des anticorps marqués, selon la méthode les recommandations du fabricant.

Les cellules NKT DNAM-1 positives et négatives ont été triées sur la base d'un marquage β-TCR^{mid}, NK1.1^{low}. A partir d'un cytomètre en flux/trieur de cellules ARIA3 (BD Biosciences) avec le logiciel DIVA (BD Biosciences). Pour les micro-réseaux, les cellules ont été triées directement dans le tampon de lyse prévu à cet effet avec le kit d'extraction d'ARN QIAGEN. Dans ces expériences 10 000 à 30 000 cellules triées ont été utilisées pour effectuer l'analyse du transcriptome menée par RNA Seq.

4. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES

a) Extraction d'ARN

Les fragments hépatiques sont lysés, puis les ARN sont extraits en utilisant une solution de Trizol (Invitrogen, France) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN sont précipités en présence d'isopropanol 100%, puis solubilisés dans l'eau stérile dépourvue de RNases. La quantité d'ARN est évaluée par lecture spectrophotométrique au Nanodrop λ= 260nm.

b) Transcription inverse

La transcription inverse des ARNm en ADNc est réalisée en utilisant le kit " High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (APPLIED biosystems), selon les recommandations du fournisseur. Une quantité de 100 ng d'ARN est soumise à une réaction de transcription inverse par 50 U d'enzyme MultiScribe ™ Reverse Transcriptase, dans un thermocycleur avec les conditions suivantes : un cycle de 10 min à 25°C, un cycle de 2 h à 37°C et enfin un cycle de 5 min à 85° C pour inactiver l'enzyme. Les échantillons de cDNA sont conservés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

c) PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les ADNc sont analysés par PCR quantitative (qPCR) à l'aide d'un kit « Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix » (Thermo Scientific) par la méthode utilisant le SYBR Green. La réaction de qPCR est réalisée avec 10 ng d'ADNc, 10 µM d'amorces sens et antisens, et le mélange réactionnel fourni par le kit. Le Light Cycler CFX96 (BioRad) est réglé pour réaliser le programme suivant : 50ºC pendant

2 min, 95ºC pendant 10 min, 44 itérations de 15 s à 95ºC, 30 s à 60ºC, 30 s à 72ºC, puis 5 s à 65ºC, 5 s à 95ºC et 1 min à 40ºC. Les niveaux d'expression des gènes sont évalués en déterminant une valeur seuil (Ct) pour laquelle l'amplification est spécifique du gène étudié. Les valeurs seuil sont calculées pour l'ARN 18S (gène ubiquitaire dont l'expression est identique dans tous les types cellulaires, permettant ainsi une normalisation des résultats) et pour le gène étudié grâce au logiciel associé au Light Cycler. L'expression relative de chaque gène est normalisée par rapport à l'expression du 18S par la méthode du ΔΔCt : le ΔCt correspond à la différence entre les valeurs Ct du gène cible et de l'ARN 18S (ΔCt = Ct cible – Ct 18S). Le ΔΔCt est ensuite calculé entre le contrôle et l'échantillon à analyser (ΔΔCt = ΔCt contrôle – ΔCt échantillon). Enfin, le ratio d'expression normalisée du gène d'intérêt par rapport à l'expression de l'ARN 18S est déterminé par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5. Analyse du profil genique des cellules NKT hepatiques DNAM-1 positives et negatives par RNA Seq

Après extraction des ARNm des cellules NKT triées (DNAM-1 positives et DNAM-1 négatives), la société Integragen a réalisé le séquençage des ARNs. Les données normalisées (normalization FPKM) ont été analysées dans l'outil Galileo développé par Integragene. Le séquençage RNA-seq a permis de détecter 19066 gènes avec un niveau d'expression supérieur à 0,1 FPKM. Le traitement des données a débuté par une analyse en composantes principales ou ACP (méthode de statistique descriptive multidimensionnelle permettant de traiter simultanément un nombre très important de variables quantitatives). Elle consiste à rechercher des facteurs en nombre restreint et résumant le mieux possible les données considérées. Ces facteurs sont calculés à partir de la matrice de corrélations des données. Ici, chaque échantillon est représenté par 19066 variables correspondant au niveau d'expression des 19066 gènes détectés en RNA-seq. Comme il est difficile de représenter une image globale des données dans un espace à 19 000 dimensions, l'objectif de l'ACP est donc de résumer l'information dans un espace de dimension plus restreint en partant de la matrice de corrélation. Elle permet de projeter les observations sur les échantillons depuis un espace à 19000 dimensions vers un espace à seulement quelques dimensions, représentées par les axes de l'ACP. Si l'information associée aux 2 ou 3 premiers axes représente un pourcentage suffisant de la variabilité totale,

on pourra représenter les observations sur un graphique à 2 ou 3 dimensions, facilitant ainsi grandement l'interprétation.

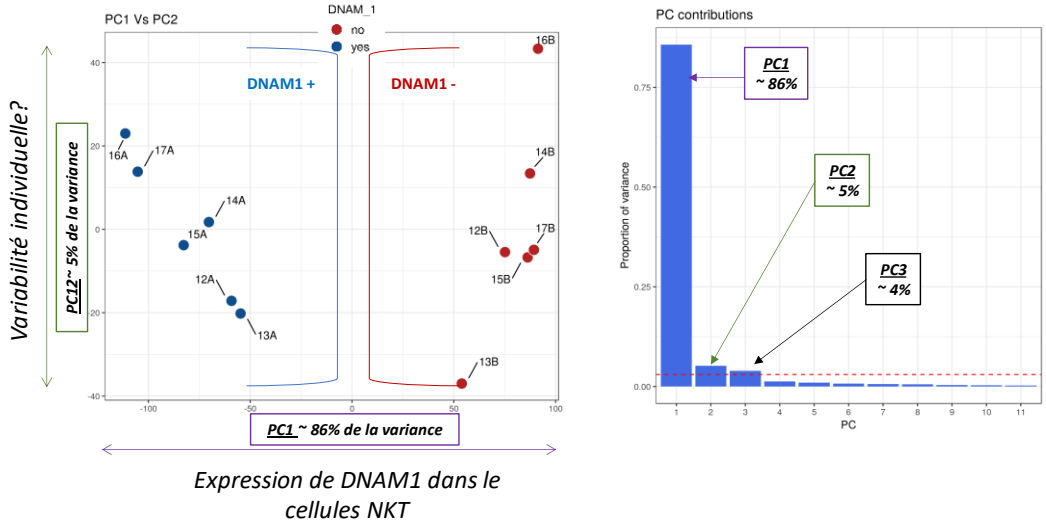


Figure 9 : Analyse par RNA-1seq des profils géniques des populations de NK DNAM-1 positives et négatives

Comme l'indique l'histogramme, 95% de la variance (variabilité de l'expression des gènes dans chaque échantillon) est porté par les 3 premières composantes principales. La première composante (PC1) sépare parfaitement les échantillons en fonction de la présence ou de l'absence d'expression de DNAM1 dans les cellules NKT, et explique à 86% les différences d'expression génique observée. La deuxième composante (PC2) explique une proportion mineure (5%) de la variance comparée à la PC1 et présente une dispersion verticale des échantillons en fonction de l'individu : la dispersion des échantillons des individus 13 à 17 le long de cet axe vertical est similaire dans les deux groupes A et B, indiquant sur cet axe probablement la variabilité interindividuelle.

6. ANALYSES STATISTIQUES

Pour les expériences réalisées chez la souris, les analyses statistiques pour ont été produites sur le logiciel GraphPad Prism 6. Les données sont exprimées en tant que moyenne ± écart-type de la moyenne. La signification statistique a été déterminée par analyse des variances suivie d'un *t test* (test de Student). Les valeurs $P < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$.

III. Discussion

Dans cette étude, nous avons initié la caractérisation du système DNAM-1 en terme d'expression des ligands CD155 et CD112 et du récepteur DNAM-1 dans la tumorigenèse hépatique à la fois chez l'Homme et chez la souris.

Tout d'abord, nous montrons une augmentation de l'expression transcriptionnelle des ligands dans les CHC humains. Nous avons observé que l'expression de CD155 était significativement plus faible dans les groupes de CHC de meilleur pronostic (G4/G5/G6). De même, nous montrons que l'expression des ligands CD155 et CD112 est plus faible dans les CHC mutés β-caténine. A l'inverse, l'expression de ces deux ligands est significativement plus élevée dans les tumeurs associées à une instabilité chromosomique, une faible différenciation et mutées TP53. En utilisant des modèles murins récapitulant les deux groupes de CHC humains, nous montrons que l'expression de CD155 est uniquement augmentée dans les CHC mutés β-caténine comparativement aux foies contrôles. En revanche, nous avons observé que l'expression du ligand CD112 est augmentée dans les deux types de CHC avec une expression plus faible dans les CHC mutés β-caténine. Nous nous sommes par la suite intéressés à l'expression du récepteur DNAM-1 à la surface des cellules immunitaires à fort potentiel anti-tumoral, NK, NKT et T CD8+. Tout d'abord, nous montrons que ces trois populations expriment DNAM-1 à des niveaux différents (pourcentage et MFI) dans des conditions physiologiques (foies contrôles). Nous avons également observé que la quasi-totalité des cellules NKT expriment le récepteur DNAM-1. Dans le modèle de CHC induit par le DEN, seul le pourcentage de NKT DNAM-1 positives diminue de façon faible mais significative. Par ailleurs, l'expression de surface (MFI) de DNAM-1 diminue uniquement sur les populations NKT et NK. En revanche, nous avons observé que les trois populations NK, NKT, T CD8+ DNAM-1 positives ainsi que l'expression de DNAM-1 (MFI) diminuent dans les CHC mutés pour la β-caténine. Comme nous avons observé que les cellules NKT exprimaient toutes le récepteur DNAM-1 à leur surface dans des conditions physiologiques, la diminution de cette proportion dans le CHC se traduit par l'apparition d'une population de NKT DNAM-1 négative, absente des foies contrôles. Nous avons choisi d'étudier plus en détails ces deux populations de NKT DNAM-1 positives et DNAM-1 négatives dans les CHC mutés pour la β-caténine en raison du rôle anti-tumoral de ces cellules dans ce modèle (Anson et al., 2012). L'analyse de

ces populations par cytométrie en flux et RNAseq montre que cellules NKT DNAM-1 négatives arborent un phénotype de cellules épuisées ayant perdu leurs capacités anti-tumorales en terme d'expression de molécules de co-stimulation (CD3, CD28, Thy1), de cytotoxicité (perforine, granzyme B) et de ligands de mort (CD40L, FasL, TRAIL).

L'expression des ligands CD155 et CD112 est associée à des CHC de mauvais pronostic.

Dans cette étude, nous montrons une augmentation des ligands CD155 et CD112 dans le CHC confirmant leur implication dans la tumorigenèse et leur expression lors d'un stress oncogénique (Ardolino et al., 2011; Fionda et al., 2015; Soriani et al., 2009).

Chez l'Homme, l'expression du ligand CD155 est plus élevée dans les CHC arborant une forte instabilité chromosomique et associée à des mutations dans le gène *TP53*. Ainsi, nous montrons que l'expression du ligand CD155 est associée à des CHC de mauvais pronostic arborant une faible différenciation comme dans d'autres tumeurs solides (Bevelacqua et al., 2012; Huang et al., 2017a; Nishiwada et al., 2015).

De façon similaire aux CHC humains, nous montrons que l'expression du ligand CD112 est augmentée dans les deux types de CHC murins et plus fortement dans les CHC induit par le DEN. Toutefois, il a été montré que le ligand CD112, exprimé lors d'un stress oncogénique, ne se lie que très faiblement (Tahara-Hanaoka et al., 2004) ou pas au récepteur DNAM-1 chez la souris (Stanietsky et al., 2013). Ainsi, cette observation ne nous permet pas de conclure sur l'implication de ce ligand et requiert des analyses complémentaires.

A l'inverse, l'expression de CD155 n'est pas augmentée dans les CHC induit par le DEN mais uniquement dans les CHC mutés pour la β-caténine contrairement aux CHC humains. Ce résultat surprenant suggère une régulation différente de son expression chez l'Homme et chez la souris.

Le récepteur DNAM-1 présente une expression différente en fonction des cellules lymphocytaires et de leur localisation tissulaire.

Nous avons observé que l'expression de DNAM-1 est hétérogène au sein des populations immunitaires en conditions physiologiques (pourcentage et expression de surface). En effet, nous montrons au sein du tissu hépatique que la proportion de cellules DNAM-1 positives et leur expression de surface (MFI) diffèrent entre les populations NKT, NK et T CD8+. De plus, nous montrons que l'expression de DNAM-1 à la surface des populations immunitaires analysées (NK, T CD8+) diffèrent d'un organe à un autre (rate versus foie). L'ensemble de ces résultats suggère que DNAM-1 aurait un rôle distinct en fonction des populations immunitaires analysées et de leur location tissulaire.

Par ailleurs, nous avons également analysé par cytométrie en flux, les populations de cellules DNAM-1 positives et négatives au sein des cellules NK et T CD8+ ***(Figure 10)***.

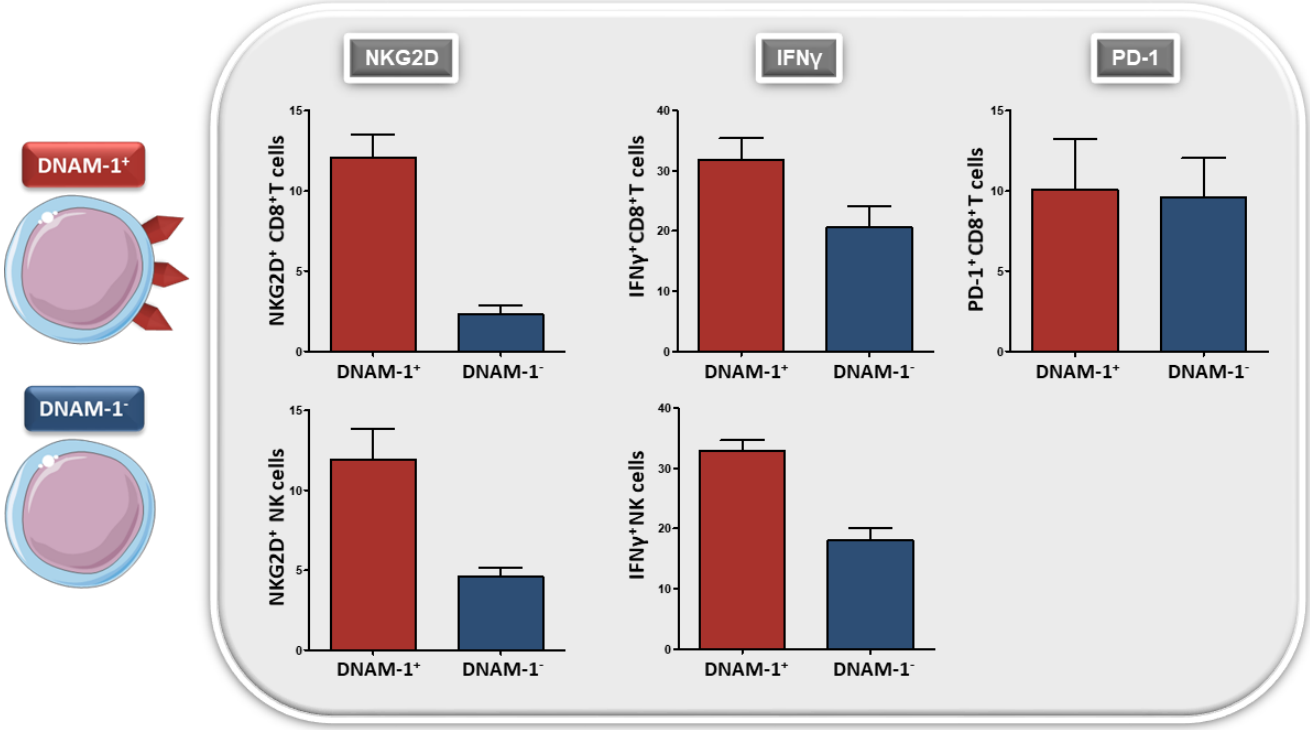


Figure 10 : Analyse des profils des populations DNAM-1 positives et négatives T CD8+ et NK par cytométrie en flux.

De façon intéressante, le phénotype de ces populations semble très proche de celui des cellules NKT. En effet, nous montrons que les populations de cellules NK et T CD8+ DNAM-1 négatives expriment très faiblement le récepteur NKG2D et produisent sensiblement moins d'IFNγ comparativement aux populations de cellules DNAM-1 positives ***(Figure 10)***. De plus, les lymphocytes T CD8+ DNAM-1 positives et

négatives expriment de façon hétérogène et similaire le marqueur d'immunosuppression PD-1 ***(Figure 10)***. Cependant, la distinction phénotypique et fonctionnelle entre les populations DNAM-1 positives et négatives au sein des cellules NK et T CD8+ est moins prononcée que pour les cellules NKT. Alors que l'expression de DNAM-1 sur les cellules NKT hépatiques détermine clairement deux profils phénotypiques et fonctionnels, la présence ou l'absence de DNAM-1 sur les populations NK et T CD8+ signerait plutôt un niveau d'activation.

Des travaux antérieurs ont montré que l'expression de DNAM-1 sur les cellules NK identifie deux profils phénotypiques et fonctionnels. En effet, les cellules NK DNAM-1 négatives présentent une capacité plus faible de production de cytokines et de prolifération (Martinet et al., 2015). Par ailleurs, ces travaux montrent que 70% des cellules NK spléniques expriment DNAM-1 alors que nous montrons son expression dans la rate sur seulement 45% de ces cellules. Ces résultats ayant été générés dans des souris de même fond génétique, cette différence pourrait être imputable à l'âge de la souris (6 à 12 semaines versus 15 mois) et/ou à son environnement (statut sanitaire).

Nous avons par ailleurs observé que l'expression de DNAM-1 (MFI) sur les cellules NKT et NK diminue dans la tumorigenèse hépatique. L'ensemble de ces résultats suggère qu'en plus de la présence de DNAM-1, son niveau d'expression serait le reflet du niveau d'activation de ces cellules. En revanche, la faible diminution de l'expression de DNAM-1 observée à la surface des cellules T CD8+ indique l'expression de DNAM-1 n'est que peu influencée à la surface de ces cellules dans la tumorigenèse hépatique suggérant un rôle mineur DNAM-1 sur cette population dans ce modèle.

La présence des ligands de DNAM-1 dans le CHC n'influencerait pas l'expression de DNAM-1.

D'autre part, nous avons montré que la proportion des cellules exprimant le récepteur DNAM-1 diminuait uniquement dans un contexte de CHC mutés pour la β-caténine et ceci pour les trois populations analysées. Nous avons aussi observé que l'expression du ligand CD112 était augmentée dans les deux modèles alors que CD155 était augmentée de façon significative mais faible dans les CHC mutés pour la β-caténine.

Dans ce contexte, nos observations suggèrent que la diminution de la proportion des cellules DNAM-1 positives serait spécifiquement liée à l'expression du ligand CD155.

De plus, nous avons également observé une diminution de l'expression de DNAM-1 à la surface des populations NKT et NK (MFI) dans les deux types de CHC sauf pour les lymphocytes T CD8+ dont l'expression de DNAM-1 ne diminue que très faiblement dans les CHC mutés pour la β-caténine. Ainsi, la régulation de l'expression de DNAM-1 à la surface des cellules NK et NKT serait soit dépendante de l'expression de CD112 et non du ligand CD155 soit indépendante de l'expression des ligands.

Néanmoins, nous montrons que l'expression de CD112 est drastiquement plus élevée dans les CHC induits par le DEN comparativement aux CHC mutés pour la β-caténine. L'expression de DNAM-1 diminuant de manière similaire entre les deux types de CHC, ces observations indiqueraient que son expression serait indépendante des ligands. En accord avec cette hypothèse, des travaux ont également montré que les fonctions des cellules NK DNAM-1 positives ne dépendent pas de l'interaction avec CD155 (Martinet et al., 2015).

L'expression de DNAM-1 à la surface des cellules NKT signe un profil de cellules épuisées ayant perdu leurs capacités anti-tumorales.

L'analyse par cytométrie en flux et par RNAseq des populations de NKT DNAM-1 positives et négatives a montré de façon intéressante que la population DNAM-1 négative un phénotype de cellules ayant perdu leurs capacités anti-tumorales de par leur faible expression de certains récepteurs activateurs (non montrés : Klra9, Klrb1c, Klrd1), d'IFNg, de molécules de lyse et de mort. Ces cellules perdent également l'expression des récepteurs à chimiokines CXCR6 et CXCR3 impliqués respectivement dans la résidence du tissu hépatique et/ou des tissus inflammatoires (Marra and Tacke, 2014). De façon intéressante, une étude récente par l'équipe du Dr Frank Tacke démontre que l'expression du récepteur CXCR6 par les cellules NKT permet le contrôle des hépatocytes sénescents et ainsi l'inhibition de la carcinogenèse hépatique (Mossanen et al., 2019). Nous avons également évalué l'expression des récepteurs inhibiteurs TIGIT et CD96 dans les populations de NKT DNAM-1 positives et négatives. Nous montrons que l'expression du récepteur CD96 est diminuée dans les cellules DNAM-1 négatives et que TIGIT est plus faiblement

exprimé dans les cellules NKT et aurait une tendance à diminuer dans les cellules DNAM-1 négatives. Ces résultats indiquent que la perte de l'expression de DNAM-1 signerait de la perte d'expression des récepteurs inhibiteurs CD96 et TIGIT suggérant que la perte de DNAM-1 dicterait la perte des récepteurs CD96 et TIGIT. Afin de valider notre hypothèse, nous étudierons par cytométrie l'expression de ces trois récepteurs à la surface des cellules NKT.

Nous nous sommes également intéressés à l'expression du marqueur PD-1 dont l'expression sur les lymphocytes signe une précédente activation et leur immunosuppression (Chikuma et al., 2009; Youngblood et al., 2011). De façon intéressante, nous avons observé que les cellules NKT DNAM-1 négatives (et T CD8+) exprimaient à un très faible pourcentage le marqueur PD-1 dans les CHC mutés pour la β-caténine. Dans ce contexte, ces résultats suggèrent que l'épuisement des cellules NKT observé dans notre modèle ne serait pas identité par l'expression de PD-1 mais par la perte de l'expression de DNAM-1. Enfin, le marqueur PD-1 ne pouvant être exprimé que par des cellules ayant déjà été activées, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la population de cellules DNAM-1 négatives émerge de la population de cellules NKT DNAM-1 positives au cours de la tumorigenèse.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les cellules NKT perdent l'expression de DNAM-1 sur au cours de la tumorigenèse traduisant leur épuisement et la perte de leurs capacités anti-tumorales. Ainsi, nous proposons que la perte de DNAM-1 serait une étape tardive de l'immunosuppression des cellules NKT dans le CHC.

IV. Perspectives

Afin de comprendre le rôle de ces cellules, nous allons effectuer une analyse plus précise de leur profil génique en tenant compte des signatures d'enrichissement de gènes par GSEA et confirmeront ces signatures au niveau protéique par cytométrie en flux. Nous étudierons notamment l'expression de facteurs de transcription permettant la régulation de l'expression de DNAM-1 et des profils géniques des cellules NKT comme EOMES (Shimizu et al., 2019), PLZF, T-bet, Gata-3 (Wang and Hogquist, 2018).

Afin de comprendre le rôle de DNAM-1 dans la tumorigenèse hépatique, nous allons étudier la perte de DNAM-1 dans les deux modèles murins récapitulant les deux groupes majoritaires de CHC humains. Pour ce faire, nous avons effectué un croisement entre notre modèle de CHC mutés pour la β-caténine et une souris DNAM-1 déficiente (collaboration Shibuya A., Japon). De plus, nous allons générer des tumeurs hépatiques par injection de DEN dans les souris DNAM-1 déficiences que l'on va comparer aux tumeurs contrôles. Ces modèles nous permettront ainsi de déterminer si la perte de DNAM-1 a un effet bénéfique ou délétère sur la tumorigenèse hépatique. Celle-ci sera suivi par échographie en collaboration avec la plateforme du petit animal à l'institut Cochin permettant d'évaluer dans le temps la survenue, la croissance et le nombre de nodules. De plus, nous analyserons les tumeurs en termes de prolifération, état de différentiation et infiltration immunitaire. Après extraction des cellules immunitaires des tumeurs, nous allons étudier l'impact de l'absence de DNAM-1 sur leur phénotype en se focalisant principalement sur leur état d'activation et leur polarisation. Nous allons principalement nous concentrer sur l'étude des cellules NKT et étendrons cette étude aux cellules NK et T CD8+.

Comme nous avons montré une augmentation de populations DNAM-1 négatives dans les CHC mutés pour la β-caténine, nous allons analyser l'expression de DNAM-1 chez les patients par imagerie multispectrale (Mantra) sur coupe de tissu afin d'évaluer la diminution de DNAM-1 dans les différents groupes de CHC. De façon conjointe, cette analyse permettra de corréler l'expression de DNAM-1 avec des marqueurs pronostiques comme PD-1, PD-L1 et CTLA-4 ainsi qu'avec la densité de cellules T CD8+/CD3+ (immunoscore) (Ali et al., 2014; Lee et al., 2018; Leman et al., 2018; Pagès et al., 2018; Reissfelder et al., 2015; de Ruiter et al., 2017; Schalper et

al., 2015) afin de déterminer la valeur pronostique de l'expression de DNAM-1 dans la cancérogenèse hépatique.

CONCLUSION GENERALE

Dans le CHC, il est maintenant bien établi que l'inflammation joue un rôle prépondérant tout au long de la tumorigenèse. En effet, dans les maladies hépatiques chroniques, l'inflammation induit des lésions hépatiques sévères dues à des boucles de lyse régénération associées à un stress oxydant (voir introduction Chapitre 3, III). Cet état nécro-inflammatoire est fortement délétère pour le foie et favorise l'émergence de nodules tumoraux. La chronicité de cette inflammation soutient la progression tumorale et son agressivité (Ringelhan et al., 2018). Les classifications des groupes de CHC retranscrivent l'impact de cette nécroinflammation en séparant les CHC en deux groupes de tumeurs : inflammatoires associées à une instabilité chromosomique et mutées TP53 et non inflammatoires de meilleur pronostic majoritairement associées à des mutations *CTNNB1*. Ainsi, l'ensemble de ces données illustre l'importance d'étudier le microenvironnement immunitaire dans la tumorigenèse hépatique.

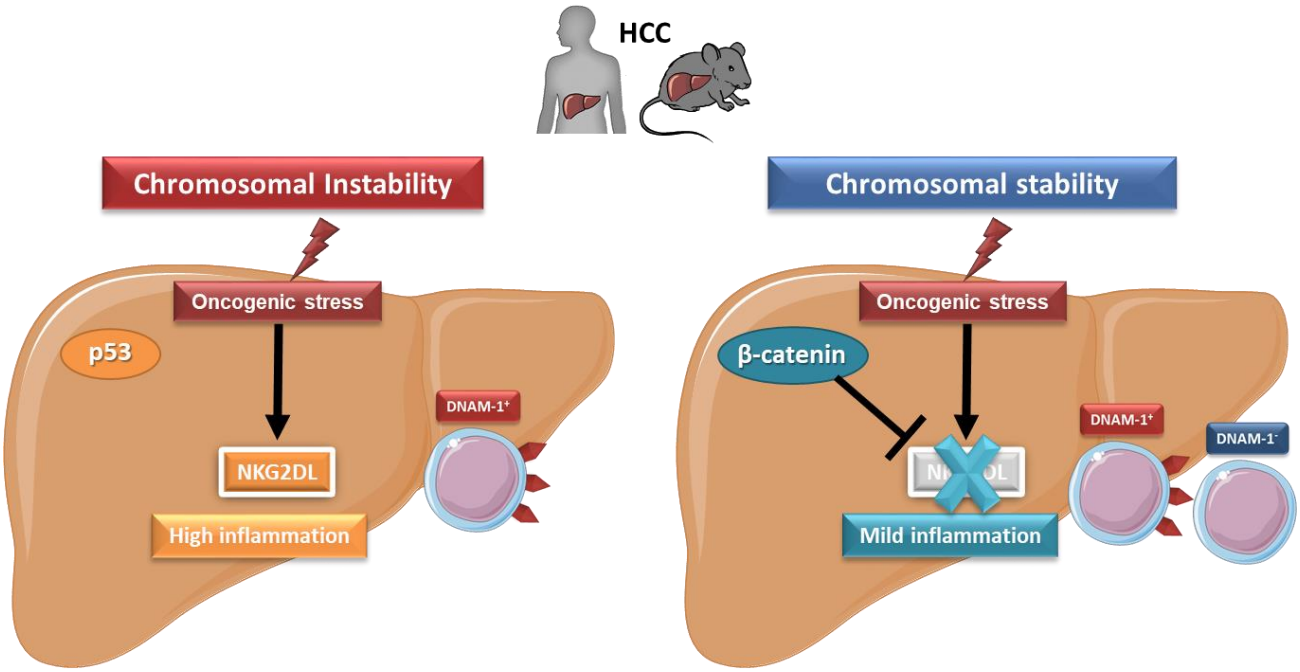


Figure 23 : les mécanismes d'immunosurveillance NKG2D et DNAM-1 dans la cancérogenèse hépatique chez l'Homme et la souris.

Mes travaux de thèse chez l'Homme et chez la souris ont permis de montrer que les systèmes NKG2D et DNAM-1 ont un rôle très important dans le CHC qui se traduit cependant de manière différente. En effet, nous montrons que ces deux systèmes sont plus fortement présents dans les CHC les plus agressifs et ceci en terme d'expression de ligands pour le système NKG2D et de récepteur pour le système DNAM-1. A l'inverse, nous montrons, dans les CHC de meilleur pronostic, une

diminution de l'expression des ligands de NKG2D suite à l'activation de la signalisation β-caténine et en parallèle l'augmentation de populations lymphocytaires DNAM-1 négatives épuisées. Décrit comme des mécanismes d'immunosurveillance dans de nombreux cancers, l'ensemble de ces travaux suggèrent néanmoins que les systèmes NKG2D et DNAM-1 sont délétères dans le CHC en induisant l'activation excessive des cellules immunitaires, favorisant une inflammation et aggravant ainsi la tumorigenèse.

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Misih, S.R.Z., and Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. Surg. Clin. North Am. *90*, 643–653.

Acebes-Huerta, A., Lorenzo-Herrero, S., Folgueras, A.R., Huergo-Zapico, L., Lopez-Larrea, C., López-Soto, A., and Gonzalez, S. (2016). Drug-induced hyperploidy stimulates an antitumor NK cell response mediated by NKG2D and DNAM-1 receptors. Oncoimmunology *5*, e1074378.

Alegre, M.L., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat. Rev. Immunol. *1*, 220–228.

Ali, H.R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Blows, F.M., Liu, B., Shah, M., Earl, H.M., Poole, C.J., Hiller, L., Dunn, J.A., et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *25*, 1536–1543.

Amicone, L., and Marchetti, A. (2018). Microenvironment and tumor cells: two targets for new molecular therapies of hepatocellular carcinoma. Transl. Gastroenterol. Hepatol. *3*, 24.

An, Q., and Liu, Z. (2019). Comparative efficacy and safety of combination therapies for advanced melanoma: a network meta-analysis. BMC Cancer *19*, 43.

de Andrade, L.F., Smyth, M.J., and Martinet, L. (2014). DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. Immunol. Cell Biol. *92*, 237–244.

Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Baud, V., Chereau, F., Gougelet, A., Terris, B., Yamagoe, S., Colnot, S., Viguier, M., Perret, C., et al. (2012). Oncogenic β-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. J. Clin. Invest. *122*, 586–599.

Apte, U., Zeng, G., Thompson, M.D., Muller, P., Micsenyi, A., Cieply, B., Kaestner, K.H., and Monga, S.P.S. (2007). beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. *292*, G1578-1585.

Arai, J., Goto, K., Stephanou, A., Tanoue, Y., Ito, S., Muroyama, R., Matsubara, Y., Nakagawa, R., Morimoto, S., Kaise, Y., et al. (2018). Predominance of regorafenib over sorafenib: Restoration of membrane-bound MICA in hepatocellular carcinoma cells. J. Gastroenterol. Hepatol. *33*, 1075–1081.

Aranda, F., Chaba, K., Bloy, N., Garcia, P., Bordenave, C., Martins, I., Stoll, G., Tesniere, A., Kroemer, G., and Senovilla, L. (2018). Immune effectors responsible for the elimination of hyperploid cancer cells. Oncoimmunology *7*, e1463947.

Ardolino, M., Zingoni, A., Cerboni, C., Cecere, F., Soriani, A., Iannitto, M.L., and Santoni, A. (2011). DNAM-1 ligand expression on Ag-stimulated T lymphocytes is mediated by ROS-dependent activation of DNA-damage response: relevance for NK-T cell interaction. Blood *117*, 4778–4786.

Atsumi, S., Matsumine, A., Toyoda, H., Niimi, R., Iino, T., and Sudo, A. (2013). Prognostic significance of CD155 mRNA expression in soft tissue sarcomas. Oncol. Lett. *5*, 1771–1776.

Audard, V., Grimber, G., Elie, C., Radenen, B., Audebourg, A., Letourneur, F., Soubrane, O., Vacher-Lavenu, M.-C., Perret, C., Cavard, C., et al. (2007). Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. J. Pathol. *212*, 345–352.

Baron, J.L., Gardiner, L., Nishimura, S., Shinkai, K., Locksley, R., and Ganem, D. (2002). Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. Immunity *16*, 583–594.

Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. J. Clin. Invest. *115*, 209–218.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science *285*, 727–729.

Bayard, Q., Meunier, L., Peneau, C., Renault, V., Shinde, J., Nault, J.-C., Mami, I., Couchy, G., Amaddeo, G., Tubacher, E., et al. (2018). Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. Nat. Commun. *9*, 5235.

Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. Annu. Rev. Immunol. *25*, 297–336.

Benedetti, A., Bassotti, C., Rapino, K., Marucci, L., and Jezequel, A.M. (1996). A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. J. Hepatol. *24*, 335–342.

Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., et al. (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev. Cell *10*, 759–770.

Bernhardt, G. (2014). TACTILE becomes tangible: CD96 discloses its inhibitory peculiarities. Nat. Immunol. *15*, 406–408.

Bevelacqua, V., Bevelacqua, Y., Candido, S., Skarmoutsou, E., Amoroso, A., Guarneri, C., Strazzanti, A., Gangemi, P., Mazzarino, M.C., D'Amico, F., et al. (2012). Nectin like-5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma. Oncotarget *3*, 882–892.

Bezbradica, J.S., Hill, T., Stanic, A.K., Van Kaer, L., and Joyce, S. (2005). Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 5114–5119.

Bi, J., Zhang, Q., Liang, D., Xiong, L., Wei, H., Sun, R., and Tian, Z. (2014). T-cell Ig and ITIM domain regulates natural killer cell activation in murine acute viral hepatitis. Hepatol. Baltim. Md *59*, 1715–1725.

Birchmeier, W. (2016). Orchestrating Wnt signalling for metabolic liver zonation. Nat. Cell Biol. *18*, 463–465.

Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. J. Cell Biol. *72*, 441–455.

Bosetti, C., Turati, F., and La Vecchia, C. (2014). Hepatocellular carcinoma epidemiology. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. *28*, 753–770.

Bou-Nader, M., Caruso, S., Donne, R., Celton-Morizur, S., Calderaro, J., Gentric, G., Cadoux, M., L'Hermitte, A., Klein, C., Guilbert, T., et al. (2019). Polyploidy spectrum: a new marker in HCC classification. Gut.

Bourgeois, E., Van, L.P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.-M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., et al. (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. Eur. J. Immunol. *39*, 1046–1055.

Boyault, S., Rickman, D.S., de Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Hérault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., et al. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatol. Baltim. Md *45*, 42–52.

Brown, E.J., and Baltimore, D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. Genes Dev. *17*, 615–628.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.-G., and Long, E.O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. Blood *107*, 159–166.

Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q.-H., Jia, H.-L., He, P., Zanetti, K.A., Kammula, U.S., Chen, Y., Qin, L.-X., Tang, Z.-Y., et al. (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*, 99–111.

Bui, J.D., and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Curr. Opin. Immunol. *19*, 203–208.

van der Burg, S.H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T., and Melief, C.J.M. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. Nat. Rev. Cancer *16*, 219–233.

Burnet, F.M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. Transplant. Rev. *7*, 3–25.

Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Lévy, L., Lamers, W.H., Kitajewski, J., Kahn, A., and Perret, C. (2002). New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene *21*, 8293–8301.

Calabrese, D.R., Lanier, L.L., and Greenland, J.R. (2019). Natural killer cells in lung transplantation. Thorax *74*, 397–404.

Calado, R.T., and Young, N.S. (2009). Telomere diseases. N. Engl. J. Med. *361*, 2353–2365.

Calderaro, J., Rousseau, B., Amaddeo, G., Mercey, M., Charpy, C., Costentin, C., Luciani, A., Zafrani, E.-S., Laurent, A., Azoulay, D., et al. (2016). Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features. Hepatol. Baltim. Md *64*, 2038–2046.

Calderaro, J., Couchy, G., Imbeaud, S., Amaddeo, G., Letouzé, E., Blanc, J.-F., Laurent, C., Hajji, Y., Azoulay, D., Bioulac-Sage, P., et al. (2017). Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. J. Hepatol. *67*, 727–738.

Calderaro, J., Ziol, M., Paradis, V., and Zucman-Rossi, J. (2019). Molecular and histological correlations in liver cancer. J. Hepatol. *71*, 616–630.

Cariani, E., Pilli, M., Zerbini, A., Rota, C., Olivani, A., Pelosi, G., Schianchi, C., Soliani, P., Campanini, N., Silini, E.M., et al. (2012). Immunological and molecular correlates of disease recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma. PloS One *7*, e32493.

Cartier, N., Miquerol, L., Tulliez, M., Lepetit, N., Levrat, F., Grimber, G., Briand, P., and Kahn, A. (1992). Diet-dependent carcinogenesis of pancreatic islets and liver in transgenic mice expressing oncogenes under the control of the L-type pyruvate kinase gene promoter. Oncogene *7*, 1413–1422.

Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G., and Desdouets, C. (2009). The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. J. Clin. Invest. *119*, 1880–1887.

Cerwenka, A., Baron, J.L., and Lanier, L.L. (2001). Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 11521–11526.

Chan, C.J., Andrews, D.M., McLaughlin, N.M., Yagita, H., Gilfillan, S., Colonna, M., and Smyth, M.J. (2010). DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 902–911.

Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., and Smyth, M.J. (2014). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. Nat. Immunol. *15*, 431–438.

Chang, Y.-T., Wu, C.-C., Shyr, Y.-M., Chen, T.-C., Hwang, T.-L., Yeh, T.-S., Chang, K.-P., Liu, H.-P., Liu, Y.-L., Tsai, M.-H., et al. (2011). Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection. PloS One *6*, e20029.

Chauvin, J.-M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., Kirkwood, J.M., Chen, T.T., Maurer, M., Korman, A.J., et al. (2015). TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific $CD8^+$ T cells in melanoma patients. J. Clin. Invest. *125*, 2046–2058.

Chen, B., Liu, L., Castonguay, A., Maronpot, R.R., Anderson, M.W., and You, M. (1993). Dose-dependent ras mutation spectra in N-nitrosodiethylamine induced mouse liver tumors and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced mouse lung tumors. Carcinogenesis *14*, 1603–1608.

Chen, Y., Lin, G., Guo, Z., Zhou, Z., He, Z., and Ye, Y. (2013). Effects of MICA expression on the prognosis of advanced non-small cell lung cancer and the efficacy of CIK therapy. PloS One *8*, e69044.

Chiang, D.Y., Villanueva, A., Hoshida, Y., Peix, J., Newell, P., Minguez, B., LeBlanc, A.C., Donovan, D.J., Thung, S.N., Solé, M., et al. (2008). Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. Cancer Res. *68*, 6779–6788.

Chikuma, S., Terawaki, S., Hayashi, T., Nabeshima, R., Yoshida, T., Shibayama, S., Okazaki, T., and Honjo, T. (2009). PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 6682–6689.

Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O., and Kabelitz, D. (2013). Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. Scand. J. Immunol. *78*, 120–129.

Cho, H., Chung, J.-Y., Kim, S., Braunschweig, T., Kang, T.H., Kim, J., Chung, E.J., Hewitt, S.M., and Kim, J.-H. (2014). MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. BMC Cancer *14*, 957.

Chung, B., Aoukaty, A., Dutz, J., Terhorst, C., and Tan, R. (2005). Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 3153–3157.

Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 17216–17221.

Constantinides, M.G., and Bendelac, A. (2013). Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. Curr. Opin. Immunol. *25*, 161–167.

Cowan, J.E., McCarthy, N.I., Parnell, S.M., White, A.J., Bacon, A., Serge, A., Irla, M., Lane, P.J.L., Jenkinson, E.J., Jenkinson, W.E., et al. (2014). Differential requirement for CCR4 and CCR7 during the development of innate and adaptive αβT cells in the adult thymus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 1204–1212.

Cressman, D.E., Diamond, R.H., and Taub, R. (1995). Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. Hepatol. Baltim. Md *21*, 1443–1449.

Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V., and Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. Science *274*, 1379–1383.

Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *168*, 1356–1361.

Crispe, I.N. (2014). Immune tolerance in liver disease. Hepatol. Baltim. Md *60*, 2109–2117.

Crosby, C.M., and Kronenberg, M. (2018). Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. Nat. Rev. Immunol. *18*, 559–574.

Crowe, N.Y., Coquet, J.M., Berzins, S.P., Kyparissoudis, K., Keating, R., Pellicci, D.G., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., and Smyth, M.J. (2005). Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. J. Exp. Med. *202*, 1279–1288.

Dansako, H., Imai, H., Ueda, Y., Satoh, S., Wakita, T., and Kato, N. (2018). ULBP1 is induced by hepatitis C virus infection and is the target of the NK cell-mediated innate immune response in human hepatocytes. FEBS Open Bio *8*, 361–371.

Davoli, T., and de Lange, T. (2012). Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. Cancer Cell *21*, 765–776.

Decaens, T., Godard, C., de Reyniès, A., Rickman, D.S., Tronche, F., Couty, J.-P., Perret, C., and Colnot, S. (2008). Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. Hepatol. Baltim. Md *47*, 247–258.

DeLeve, L.D., and Maretti-Mira, A.C. (2017). Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. Semin. Liver Dis. *37*, 377–387.

Deng, W., Gowen, B.G., Zhang, L., Wang, L., Lau, S., Iannello, A., Xu, J., Rovis, T.L., Xiong, N., and Raulet, D.H. (2015). Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. Science *348*, 136–139.

Devilder, M.-C., Allain, S., Dousset, C., Bonneville, M., and Scotet, E. (2009). Early triggering of exclusive IFN-gamma responses of human Vgamma9Vdelta2 T cells by TLR-activated myeloid and plasmacytoid dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 3625–3633.

Devisscher, L., Scott, C.L., Lefere, S., Raevens, S., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Geerts, A., Guilliams, M., and Van Vlierberghe, H. (2017). Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. Cell. Immunol. *322*, 74–83.

Dhar, P., and Wu, J.D. (2018). NKG2D and its ligands in cancer. Curr. Opin. Immunol. *51*, 55–61.

Di Tommaso, L., Franchi, G., Park, Y.N., Fiamengo, B., Destro, A., Morenghi, E., Montorsi, M., Torzilli, G., Tommasini, M., Terracciano, L., et al. (2007). Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. Hepatol. Baltim. Md *45*, 725–734.

Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. Nature *413*, 165–171.

Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., and Nagy, L.E. (2013). Kupffer cells in the liver. Compr. Physiol. *3*, 785–797.

Dow, M., Pyke, R.M., Tsui, B.Y., Alexandrov, L.B., Nakagawa, H., Taniguchi, K., Seki, E., Harismendy, O., Shalapour, S., Karin, M., et al. (2018). Integrative genomic analysis of mouse and human hepatocellular carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *115*, E9879–E9888.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity *21*, 137–148.

Eagle, R.A., and Trowsdale, J. (2007). Promiscuity and the single receptor: NKG2D. Nat. Rev. Immunol. *7*, 737–744.

Eagle, R.A., Traherne, J.A., Hair, J.R., Jafferji, I., and Trowsdale, J. (2009). ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. Eur. J. Immunol. *39*, 3207–3216.

Egawa, T., Eberl, G., Taniuchi, I., Benlagha, K., Geissmann, F., Hennighausen, L., Bendelac, A., and Littman, D.R. (2005). Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. Immunity *22*, 705–716.

El-Khoueiry, A.B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T.S., Kudo, M., Hsu, C., Kim, T.-Y., Choo, S.-P., Trojan, J., Welling, T.H., et al. (2017). Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. Lancet Lond. Engl. *389*, 2492–2502.

Fabregat, I., and Caballero-Díaz, D. (2018). Transforming Growth Factor-β-Induced Cell Plasticity in Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. Front. Oncol. *8*, 357.

Fang, L., Gong, J., Wang, Y., Liu, R., Li, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, C., Song, C., Yang, A., et al. (2014). MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *33*, 76.

Farazi, P.A., Glickman, J., Jiang, S., Yu, A., Rudolph, K.L., and DePinho, R.A. (2003). Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. Cancer Res. *63*, 5021–5027.

Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. Blood *115*, 2167–2176.

Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. Hepatol. Baltim. Md *43*, S45-53.

Fernández-Messina, L., Reyburn, H.T., and Valés-Gómez, M. (2012). Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. Front. Immunol. *3*, 299.

Finnberg, N., Stenius, U., and Högberg, J. (2004). Heterozygous p53-deficient (+/-) mice develop fewer p53-negative preneoplastic focal liver lesions in response to treatment with diethylnitrosamine than do wild-type (+/+) mice. Cancer Lett. *207*, 149–155.

Fionda, C., Abruzzese, M.P., Zingoni, A., Soriani, A., Ricci, B., Molfetta, R., Paolini, R., Santoni, A., and Cippitelli, M. (2015). Nitric oxide donors increase PVR/CD155 DNAM-1 ligand expression in multiple myeloma cells: role of DNA damage response activation. BMC Cancer *15*, 17.

Frazao, A., Rethacker, L., Messaoudene, M., Avril, M.-F., Toubert, A., Dulphy, N., and Caignard, A. (2019). NKG2D/NKG2-Ligand Pathway Offers New Opportunities in Cancer Treatment. Front. Immunol. *10*, 661.

Friedman, S.L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. Physiol. Rev. *88*, 125–172.

Friemel, J., Frick, L., Unger, K., Egger, M., Parrotta, R., Böge, Y.T., Adili, A., Karin, M., Luedde, T., Heikenwalder, M., et al. (2019). Characterization of HCC Mouse Models: Towards an Etiology-Oriented Subtyping Approach. Mol. Cancer Res. MCR *17*, 1493–1502.

Fuertes, M.B., Woo, S.-R., Burnett, B., Fu, Y.-X., and Gajewski, T.F. (2013). Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. Trends Immunol. *34*, 67–73.

Fuhrman, C.A., Yeh, W.-I., Seay, H.R., Saikumar Lakshmi, P., Chopra, G., Zhang, L., Perry, D.J., McClymont, S.A., Yadav, M., Lopez, M.-C., et al. (2015). Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *195*, 145–155.

Galon, J., Pagès, F., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., Zlobec, I., Berger, A., Bifulco, C., Botti, G., et al. (2012). Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. J. Transl. Med. *10*, 205.

Galon, J., Angell, H.K., Bedognetti, D., and Marincola, F.M. (2013). The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. Immunity *39*, 11–26.

Gao, C., Wang, Y., Broaddus, R., Sun, L., Xue, F., and Zhang, W. (2018). Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. Oncotarget *9*, 5492–5508.

Gao, J., Zheng, Q., Xin, N., Wang, W., and Zhao, C. (2017). CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. Cancer Sci. *108*, 1934–1938.

Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D., and Kronenberg, M. (2001). NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. Nat. Immunol. *2*, 971–978.

Garg, A.D., and Agostinis, P. (2017). Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. Immunol. Rev. *280*, 126–148.

Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin. Liver Dis. *21*, 311–335.

Geissmann, F., Cameron, T.O., Sidobre, S., Manlongat, N., Kronenberg, M., Briskin, M.J., Dustin, M.L., and Littman, D.R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. PLoS Biol. *3*, e113.

Gentric, G., and Desdouets, C. (2014). Polyploidization in liver tissue. Am. J. Pathol. *184*, 322–331.

Gentric, G., Maillet, V., Paradis, V., Couton, D., L'Hermitte, A., Panasyuk, G., Fromenty, B., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2015). Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin. Invest. *125*, 981–992.

Georgiev, H., Ravens, I., Papadogianni, G., and Bernhardt, G. (2018). Coming of Age: CD96 Emerges as Modulator of Immune Responses. Front. Immunol. *9*, 1072.

Germanov, E., Veinotte, L., Cullen, R., Chamberlain, E., Butcher, E.C., and Johnston, B. (2008). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in homeostasis and activation of CD1d-restricted NKT cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 81–91.

Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. Nat. Immunol. *3*, 1150–1155.

Gilgenkrantz, H., and Collin de l'Hortet, A. (2018). Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. Am. J. Pathol. *188*, 1316–1327.

Glaser, S.S., Gaudio, E., Miller, T., Alvaro, D., and Alpini, G. (2009). Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. Expert Rev. Mol. Med. *11*, e7.

Godfrey, D.I., Stankovic, S., and Baxter, A.G. (2010). Raising the NKT cell family. Nat. Immunol. *11*, 197–206.

Gong, J., Fang, L., Liu, R., Wang, Y., Xing, J., Chen, Y., Zhuang, R., Zhang, Y., Zhang, C., Yang, A., et al. (2014). UPR decreases CD226 ligand CD155 expression and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity in hepatoma cells. Eur. J. Immunol. *44*, 3758–3767.

Goossens, N., Sun, X., and Hoshida, Y. (2015). Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. Hepatic Oncol. *2*, 371–379.

Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I.B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., et al. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. Nat. Genet. *44*, 694–698.

Guidotti, J.-E., Brégerie, O., Robert, A., Debey, P., Brechot, C., and Desdouets, C. (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. J. Biol. Chem. *278*, 19095–19101.

Guillot, A., and Tacke, F. (2019). Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights. Hepatol. Commun. *3*, 730–743.

Guo, C., Zhao, H., Wang, Y., Bai, S., Yang, Z., Wei, F., and Ren, X. (2019). Prognostic Value of the Neo-Immunoscore in Renal Cell Carcinoma. Front. Oncol. *9*, 439.

Gupta, S. (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. Semin. Cancer Biol. *10*, 161–171.

Hanada, T., Lin, L., Tibaldi, E.V., Reinherz, E.L., and Chishti, A.H. (2000). GAKIN, a novel kinesin-like protein associates with the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor in T lymphocytes. J. Biol. Chem. *275*, 28774–28784.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell *21*, 309–322.

Harding, J.J., Nandakumar, S., Armenia, J., Khalil, D.N., Albano, M., Ly, M., Shia, J., Hechtman, J.F., Kundra, R., El Dika, I., et al. (2019). Prospective Genotyping of Hepatocellular Carcinoma: Clinical Implications of Next-Generation Sequencing for Matching Patients to Targeted and Immune Therapies. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *25*, 2116–2126.

Harmon, C., Robinson, M.W., Fahey, R., Whelan, S., Houlihan, D.D., Geoghegan, J., and O'Farrelly, C. (2016). Tissue-resident Eomes(hi) T-bet(lo) CD56(bright) NK cells with reduced proinflammatory potential are enriched in the adult human liver. Eur. J. Immunol. *46*, 2111–2120.

Hartmann, D., Srivastava, U., Thaler, M., Kleinhans, K.N., N'Kontchou, G., Scheffold, A., Bauer, K., Kratzer, R.F., Kloos, N., Katz, S.-F., et al. (2011). Telomerase gene mutations are associated with cirrhosis formation. Hepatology *53*, 1608–1617.

Hedlund, M., Nagaeva, O., Kargl, D., Baranov, V., and Mincheva-Nilsson, L. (2011). Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. PloS One *6*, e16899.

Heindryckx, F., Colle, I., and Van Vlierberghe, H. (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. Int. J. Exp. Pathol. *90*, 367–386.

Heinemann, A., Zhao, F., Pechlivanis, S., Eberle, J., Steinle, A., Diederichs, S., Schadendorf, D., and Paschen, A. (2012). Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. Cancer Res. *72*, 460–471.

Heller, N.M., Berga-Bolanos, R., Naler, L., and Sen, J.M. (2018). Natural Killer T (NKT) Cells in Mice and Men. In Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function, J. Soboloff, and D.J. Kappes, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), p.

Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006). Soluble MICA in malignant diseases. Int. J. Cancer *118*, 684–687.

Hoshida, Y., Villanueva, A., Kobayashi, M., Peix, J., Chiang, D.Y., Camargo, A., Gupta, S., Moore, J., Wrobel, M.J., Lerner, J., et al. (2008). Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med. *359*, 1995–2004.

Hosomi, S., Grootjans, J., Huang, Y.-H., Kaser, A., and Blumberg, R.S. (2018). New Insights Into the Regulation of Natural-Killer Group 2 Member D (NKG2D) and NKG2D-Ligands: Endoplasmic Reticulum Stress and CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. Front. Immunol. *9*, 1324.

Hou, J., Zhang, H., Sun, B., and Karin, M. (2019). The Immunobiology of Hepatocellular Carcinoma in Humans and Mice: Basic Concepts and Therapeutic Implications. J. Hepatol.

Huang, D.-W., Huang, M., Lin, X.-S., and Huang, Q. (2017a). CD155 expression and its correlation with clinicopathologic characteristics, angiogenesis, and prognosis in human cholangiocarcinoma. OncoTargets Ther. *10*, 3817–3825.

Huang, W., He, W., Shi, X., He, X., Dou, L., and Gao, Y. (2018). The Role of CD1d and MR1 Restricted T Cells in the Liver. Front. Immunol. *9*, 2424.

Huang, W.-C., Easom, N.J., Tang, X.-Z., Gill, U.S., Singh, H., Robertson, F., Chang, C., Trowsdale, J., Davidson, B.R., Rosenberg, W.M., et al. (2017b). T Cells Infiltrating Diseased Liver Express Ligands for the NKG2D Stress Surveillance System. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *198*, 1172–1182.

Huang, X., Qu, P., Chen, Y., Zhou, X., Wu, Y., Liu, F., Wang, D., Zhang, J., and An, J. (2014). Low expression of CD112 is associated with poor overall survival in patients with hepatocellular carcinoma. Hum. Pathol. *45*, 1944–1950.

Hudspeth, K., Donadon, M., Cimino, M., Pontarini, E., Tentorio, P., Preti, M., Hong, M., Bertoletti, A., Bicciato, S., Invernizzi, P., et al. (2016). Human liver-resident CD56(bright)/CD16(neg) NK cells are retained within hepatic sinusoids via the engagement of CCR5 and CXCR6 pathways. J. Autoimmun. *66*, 40–50.

Iguchi-Manaka, A., Kai, H., Yamashita, Y., Shibata, K., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Yasui, T., Kikutani, H., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2008). Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. J. Exp. Med. *205*, 2959–2964.

Ikeda, K., Brown, J.A., Yagi, T., Norrander, J.M., Hirono, M., Eccleston, E., Kamiya, R., and Linck, R.W. (2003). Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar A-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules. J. Biol. Chem. *278*, 7725–7734.

de Jaime-Soguero, A., Abreu de Oliveira, W.A., and Lluis, F. (2018). The Pleiotropic Effects of the Canonical Wnt Pathway in Early Development and Pluripotency. Genes *9*.

Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R., and Raulet, D.H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. Immunity *17*, 19–29.

Jia, B., Tan, L., Jin, Z., Jiao, Y., Fu, Y., and Liu, Y. (2017). MiR-892a Promotes Hepatocellular Carcinoma Cells Proliferation and Invasion Through Targeting CD226. J. Cell. Biochem. *118*, 1489–1496.

Johnston, B., Kim, C.H., Soler, D., Emoto, M., and Butcher, E.C. (2003). Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 2960–2969.

Johnston, R.J., Comps-Agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., Yang, Y., Park, S., Javinal, V., Chiu, H., Irving, B., et al. (2014). The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. Cancer Cell *26*, 923–937.

Joller, N., Lozano, E., Burkett, P.R., Patel, B., Xiao, S., Zhu, C., Xia, J., Tan, T.G., Sefik, E., Yajnik, V., et al. (2014). Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. Immunity *40*, 569–581.

Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu. Rev. Nutr. *16*, 179–203.

Kahraman, A., Schlattjan, M., Kocabayoglu, P., Yildiz-Meziletoglu, S., Schlensak, M., Fingas, C.D., Wedemeyer, I., Marquitan, G., Gieseler, R.K., Baba, H.A., et al. (2010). Major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MIC A/B): a novel role in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol. Baltim. Md *51*, 92–102.

Kamei, R., Yoshimura, K., Yoshino, S., Inoue, M., Asao, T., Fuse, M., Wada, S., Kuramasu, A., Furuya-Kondo, T., Oga, A., et al. (2018). Expression levels of UL16 binding protein 1 and natural killer group 2 member D affect overall survival in patients with gastric cancer following gastrectomy. Oncol. Lett. *15*, 747–754.

Kamimura, H., Yamagiwa, S., Tsuchiya, A., Takamura, M., Matsuda, Y., Ohkoshi, S., Inoue, M., Wakai, T., Shirai, Y., Nomoto, M., et al. (2012). Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. J. Hepatol. *56*, 381–388.

von Karstedt, S., Montinaro, A., and Walczak, H. (2017). Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. Nat. Rev. Cancer *17*, 352–366.

Kelley, R.K., Verslype, C., Cohn, A.L., Yang, T.-S., Su, W.-C., Burris, H., Braiteh, F., Vogelzang, N., Spira, A., Foster, P., et al. (2017). Cabozantinib in hepatocellular carcinoma: results of a phase 2 placebo-controlled randomized discontinuation study. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *28*, 528–534.

Kennedy, P.T.F., Gehring, A.J., Nowbath, A., Selden, C., Quaglia, A., Dhillon, A., Dusheiko, G., and Bertoletti, A. (2008). The expression and function of NKG2D molecule on intrahepatic CD8+ T cells in chronic viral hepatitis. J. Viral Hepat. *15*, 901–909.

Khoo, L.T., and Chen, L.-Y. (2018). Role of the cGAS-STING pathway in cancer development and oncotherapeutic approaches. EMBO Rep. *19*.

Kim, J.S., Shin, B.R., Lee, H.K., Lee, J.H., Kim, K.H., Choi, J.E., Ji, A.Y., Hong, J.T., Kim, Y., and Han, S.-B. (2017). Cd226-/- natural killer cells fail to establish stable contacts with cancer cells and show impaired control of tumor metastasis in vivo. Oncoimmunology *6*, e1338994.

Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., et al. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. Nature *436*, 709–713.

Koch, C., Kim, Y., Zöller, T., Born, C., and Steinle, A. (2017). Chronic NKG2D Engagement In Vivo Differentially Impacts NK Cell Responsiveness by Activating NK Receptors. Front. Immunol. *8*, 1466.

Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Ishida, H., Miyagi, T., Hosui, A., and Hayashi, N. (2010). Sorafenib inhibits the shedding of major histocompatibility complex class I-related chain A on hepatocellular carcinoma cells by down-regulating a disintegrin and metalloproteinase 9. Hepatol. Baltim. Md *51*, 1264–1273.

Kong, Y., Zhu, L., Schell, T.D., Zhang, J., Claxton, D.F., Ehmann, W.C., Rybka, W.B., George, M.R., Zeng, H., and Zheng, H. (2016). T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *22*, 3057–3066.

Kozai, M., Kubo, Y., Katakai, T., Kondo, H., Kiyonari, H., Schaeuble, K., Luther, S.A., Ishimaru, N., Ohigashi, I., and Takahama, Y. (2017). Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. J. Exp. Med. *214*, 1925–1935.

de Kruijf, E.M., Sajet, A., van Nes, J.G.H., Putter, H., Smit, V.T.H.B.M., Eagle, R.A., Jafferji, I., Trowsdale, J., Liefers, G.J., van de Velde, C.J.H., et al. (2012). NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. BMC Cancer *12*, 24.

Kulik, L., and El-Serag, H.B. (2019). Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology *156*, 477-491.e1.

de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.A., Buendia, M.A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., et al. (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 8847–8851.

Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T.H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., et al. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. J. Clin. Invest. *119*, 1251–1263.

Lam, A.R., Bert, N.L., Ho, S.S., Shen, Y.J., Tang, L.F., Xiong, G.M., Croxford, J.L., Koo, C.X., Ishii, K.J., Akira, S., et al. (2014). RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. Cancer Res. *74*, 2193–2203.

Lanier, L.L. (2005). NK cell recognition. Annu. Rev. Immunol. *23*, 225–274.

Lawson, V. (2012). Turned on by danger: activation of CD1d-restricted invariant natural killer T cells. Immunology *137*, 20–27.

Lee, J.-S., Chu, I.-S., Mikaelyan, A., Calvisi, D.F., Heo, J., Reddy, J.K., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer. Nat. Genet. *36*, 1306–1311.

Lee, J.S., Won, H.S., Sun, D.S., Hong, J.H., and Ko, Y.H. (2018). Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore) *97*, e11769.

Leite-De-Moraes, M.C., Hameg, A., Arnould, A., Machavoine, F., Koezuka, Y., Schneider, E., Herbelin, A., and Dy, M. (1999). A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 5871–5876.

Leman, J.K., Sandford, S.K., Rhodes, J.L., and Kemp, R.A. (2018). Multiparametric analysis of colorectal cancer immune responses. World J. Gastroenterol. *24*, 2995–3005.

Leung, W. (2014). Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *20*, 3390–3400.

L'Hermitte, A., Pham, S., Cadoux, M., Couchy, G., Caruso, S., Anson, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Celton-Morizur, S., Yamagoe, S., Zucman-Rossi, J., et al. (2019). Lect2 Controls Inflammatory Monocytes to Constrain the Growth and Progression of Hepatocellular Carcinoma. Hepatol. Baltim. Md *69*, 160–178.

Li, X.-Y., Das, I., Lepletier, A., Addala, V., Bald, T., Stannard, K., Barkauskas, D., Liu, J., Aguilera, A.R., Takeda, K., et al. (2018). CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. J. Clin. Invest. *128*, 2613–2625.

Liu, S., Zhang, H., Li, M., Hu, D., Li, C., Ge, B., Jin, B., and Fan, Z. (2013). Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. Cell Death Differ. *20*, 456–464.

Liu, Y., Guo, X., Xing, M., Zhao, K., Luo, L., and Du, J. (2018). Prognostic value of serum levels of soluble MICA (sMICA) in patients with prostate cancer. Br. J. Biomed. Sci. *75*, 98–100.

Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. Annu. Rev. Immunol. *31*, 227–258.

Long, J., Qu, T., Pan, X.F., Tang, X., Wan, H.H., Qiu, P., and Xu, Y.-H. (2018). Expression of programmed death ligand-1 and programmed death 1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. J. Cancer Res. Ther. *14*, S1188–S1192.

Longhese, M.P. (2008). DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. Genes Dev. *22*, 125–140.

López-Soto, A., Gonzalez, S., Smyth, M.J., and Galluzzi, L. (2017). Control of Metastasis by NK Cells. Cancer Cell *32*, 135–154.

Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V., and Hafler, D.A. (2012). The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *188*, 3869–3875.

Ma, C., Kesarwala, A.H., Eggert, T., Medina-Echeverz, J., Kleiner, D.E., Jin, P., Stroncek, D.F., Terabe, M., Kapoor, V., ElGindi, M., et al. (2016). NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. Nature *531*, 253–257.

Madjd, Z., Spendlove, I., Moss, R., Bevin, S., Pinder, S.E., Watson, N.F.S., Ellis, I., and Durrant, L.G. (2007). Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. Cancer Immun. *7*, 17.

Mafra, K., Nakagaki, B.N., Castro Oliveira, H.M., Rezende, R.M., Antunes, M.M., and Menezes, G.B. (2019). The liver as a nursery for leukocytes. J. Leukoc. Biol.

Marcus, A., Gowen, B.G., Thompson, T.W., Iannello, A., Ardolino, M., Deng, W., Wang, L., Shifrin, N., and Raulet, D.H. (2014). Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. Adv. Immunol. *122*, 91–128.

Maréchal, A., and Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*.

Margall-Ducos, G., Celton-Morizur, S., Couton, D., Brégerie, O., and Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. J. Cell Sci. *120*, 3633–3639.

Margini, C., and Dufour, J.F. (2016). The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment. Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver *36*, 317–324.

Marra, F., and Tacke, F. (2014). Roles for chemokines in liver disease. Gastroenterology *147*, 577-594.e1.

Marrero, I., Maricic, I., Feldstein, A.E., Loomba, R., Schnabl, B., Rivera-Nieves, J., Eckmann, L., and Kumar, V. (2018). Complex Network of NKT Cell Subsets Controls Immune Homeostasis in Liver and Gut. Front. Immunol. *9*, 2082.

Martin, B., and Märkl, B. (2019). Immunologic Biomarkers and Biomarkers for Immunotherapies in Gastrointestinal Cancer. Visc. Med. *35*, 3–10.

Martinet, L., Ferrari De Andrade, L., Guillerey, C., Lee, J.S., Liu, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Hutchinson, D.S., Kolesnik, T.B., Nicholson, S.E., Huntington, N.D., et al. (2015). DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. Cell Rep. *11*, 85–97.

Masson, D., Jarry, A., Baury, B., Blanchardie, P., Laboisse, C., Lustenberger, P., and Denis, M.G. (2001). Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. Gut *49*, 236–240.

Matsuda, J.L., Gapin, L., Sidobre, S., Kieper, W.C., Tan, J.T., Ceredig, R., Surh, C.D., and Kronenberg, M. (2002). Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. Nat. Immunol. *3*, 966–974.

McGilvray, R.W., Eagle, R.A., Watson, N.F.S., Al-Attar, A., Ball, G., Jafferji, I., Trowsdale, J., and Durrant, L.G. (2009). NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 6993–7002.

McGilvray, R.W., Eagle, R.A., Rolland, P., Jafferji, I., Trowsdale, J., and Durrant, L.G. (2010). ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. Int. J. Cancer *127*, 1412–1420.

McNab, F.W., Berzins, S.P., Pellicci, D.G., Kyparissoudis, K., Field, K., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2005). The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 3762–3768.

Mehrfeld, C., Zenner, S., Kornek, M., and Lukacs-Kornek, V. (2018). The Contribution of Non-Professional Antigen-Presenting Cells to Immunity and Tolerance in the Liver. Front. Immunol. *9*, 635.

Melsen, J.E., Lugthart, G., Lankester, A.C., and Schilham, M.W. (2016). Human Circulating and Tissue-Resident CD56(bright) Natural Killer Cell Populations. Front. Immunol. *7*, 262.

Michalopoulos, G.K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. Hepatol. Baltim. Md *65*, 1384–1392.

Mittal, D., Lepletier, A., Madore, J., Aguilera, A.R., Stannard, K., Blake, S.J., Whitehall, V.L.J., Liu, C., Bettington, M.L., Takeda, K., et al. (2019). CD96 Is an Immune Checkpoint That Regulates CD8+ T-cell Antitumor Function. Cancer Immunol. Res. *7*, 559–571.

Molfetta, R., Quatrini, L., Santoni, A., and Paolini, R. (2017). Regulation of NKG2D-Dependent NK Cell Functions: The Yin and the Yang of Receptor Endocytosis. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Montaldo, E., Juelke, K., and Romagnani, C. (2015). Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. Eur. J. Immunol. *45*, 2171–2182.

Morimoto, K., Satoh-Yamaguchi, K., Hamaguchi, A., Inoue, Y., Takeuchi, M., Okada, M., Ikeda, W., Takai, Y., and Imai, T. (2008). Interaction of cancer cells with platelets mediated by Necl-5/poliovirus receptor enhances cancer cell metastasis to the lungs. Oncogene *27*, 264–273.

Mossanen, J.C., Kohlhepp, M., Wehr, A., Krenkel, O., Liepelt, A., Roeth, A.A., Möckel, D., Heymann, F., Lammers, T., Gassler, N., et al. (2019). CXCR6 Inhibits Hepatocarcinogenesis by Promoting Natural Killer T- and CD4+ T-Cell-Dependent Control of Senescence. Gastroenterology *156*, 1877-1889.e4.

Movita, D., Kreefft, K., Biesta, P., van Oudenaren, A., Leenen, P.J.M., Janssen, H.L.A., and Boonstra, A. (2012). Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages. J. Leukoc. Biol. *92*, 723–733.

Mueller, S., and Wimmer, E. (2003). Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. J. Biol. Chem. *278*, 31251–31260.

Naito, M., Hasegawa, G., and Takahashi, K. (1997). Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. Microsc. Res. Tech. *39*, 350–364.

Nakai, R., Maniwa, Y., Tanaka, Y., Nishio, W., Yoshimura, M., Okita, Y., Ohbayashi, C., Satoh, N., Ogita, H., Takai, Y., et al. (2010). Overexpression of Necl-5 correlates with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Cancer Sci. *101*, 1326–1330.

Naugler, W.E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A.M., and Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. Science *317*, 121–124.

Nault, J.C., and Zucman Rossi, J. (2013). Molecular classification of hepatocellular adenomas. Int. J. Hepatol. *2013*, 315947.

Nault, J.-C., De Reyniès, A., Villanueva, A., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Decaens, T., Franco, D., Imbeaud, S., Rousseau, F., et al. (2013). A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. Gastroenterology *145*, 176–187.

Nault, J.-C., Ningarhari, M., Rebouissou, S., and Zucman-Rossi, J. (2019a). The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. *16*, 544–558.

Nault, J.-C., Martin, Y., Caruso, S., Hirsch, T.Z., Bayard, Q., Calderaro, J., Charpy, C., Copie-Bergman, C., Ziol, M., Bioulac-Sage, P., et al. (2019b). Clinical Impact of Genomic Diversity From Early to Advanced Hepatocellular Carcinoma. Hepatol. Baltim. Md.

Nausch, N., and Cerwenka, A. (2008). NKG2D ligands in tumor immunity. Oncogene *27*, 5944–5958.

Nishiwada, S., Sho, M., Yasuda, S., Shimada, K., Yamato, I., Akahori, T., Kinoshita, S., Nagai, M., Konishi, N., and Nakajima, Y. (2015). Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. Anticancer Res. *35*, 2287–2297.

O'Donnell, J.S., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. Nat. Rev. Clin. Oncol. *16*, 151–167.

Oliviero, B., Varchetta, S., Paudice, E., Michelone, G., Zaramella, M., Mavilio, D., De Filippi, F., Bruno, S., and Mondelli, M.U. (2009). Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. Gastroenterology *137*, 1151–1160, 1160.e1-7.

Ovejero, C., Cavard, C., Périanin, A., Hakvoort, T., Vermeulen, J., Godard, C., Fabre, M., Chafey, P., Suzuki, K., Romagnolo, B., et al. (2004). Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of beta-catenin in the liver. Hepatol. Baltim. Md *40*, 167–176.

Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.-S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T.T., Berger, M.D., et al. (2018). International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. Lancet Lond. Engl. *391*, 2128–2139.

Park, S.-H., Kyin, T., Bendelac, A., and Carnaud, C. (2003). The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *170*, 1197–1201.

Paschen, A., Sucker, A., Hill, B., Moll, I., Zapatka, M., Nguyen, X.D., Sim, G.C., Gutmann, I., Hassel, J., Becker, J.C., et al. (2009). Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 5208–5215.

Pasquier, B., Yin, L., Fondanèche, M.-C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G., and Latour, S. (2005). Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. J. Exp. Med. *201*, 695–701.

Pediaditakis, P., Lopez-Talavera, J.C., Petersen, B., Monga, S.P., and Michalopoulos, G.K. (2001). The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. Hepatol. Baltim. Md *34*, 688–693.

Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., and Fallowfield, J.A. (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. Nat. Rev. Immunol. *14*, 181–194.

Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., et al. (2001). Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. Eur. J. Immunol. *31*, 1076–1086.

Peng, H., and Tian, Z. (2015). Re-examining the origin and function of liver-resident NK cells. Trends Immunol. *36*, 293–299.

Pfeiffer, M., Seitz, G., Ruck, P., Mueller, C., Steinle, A., Lang, P., Handgretinger, R., Fuchs, J., and Warmann, S. (2011). CD155 is involved in NK-cell mediated lysis of human hepatoblastoma in vitro. Front. Biosci. Elite Ed. *3*, 1456–1466.

Pinyol, R., Sia, D., and Llovet, J.M. (2019). Immune Exclusion-Wnt/CTNNB1 Class Predicts Resistance to Immunotherapies in HCC. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *25*, 2021–2023.

Postow, M.A., Callahan, M.K., Barker, C.A., Yamada, Y., Yuan, J., Kitano, S., Mu, Z., Rasalan, T., Adamow, M., Ritter, E., et al. (2012). Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. N. Engl. J. Med. *366*, 925–931.

Prager, I., and Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. J. Leukoc. Biol. *105*, 1319–1329.

Prajapati, K., Perez, C., Rojas, L.B.P., Burke, B., and Guevara-Patino, J.A. (2018). Functions of NKG2D in CD8+ T cells: an opportunity for immunotherapy. Cell. Mol. Immunol. *15*, 470–479.

Qi, Y., Chen, X., Chan, C., Li, D., Yuan, C., Yu, F., Lin, M.C., Yew, D.T., Kung, H.-F., and Lai, L. (2008). Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. Int. J. Cancer *122*, 2682–2688.

Qu, P., Huang, X., Zhou, X., Lü, Z., Liu, F., Shi, Z., Lü, L., Wu, Y., and Chen, Y. (2015). Loss of CD155 expression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Histopathology *66*, 706–714.

Raffaghello, L., Prigione, I., Airoldi, I., Camoriano, M., Levreri, I., Gambini, C., Pende, D., Steinle, A., Ferrone, S., and Pistoia, V. (2004). Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. Neoplasia N. Y. N *6*, 558–568.

Ralston, K.J., Hird, S.L., Zhang, X., Scott, J.L., Jin, B., Thorne, R.F., Berndt, M.C., Boyd, A.W., and Burns, G.F. (2004). The LFA-1-associated molecule PTA-1 (CD226) on T cells forms a dynamic molecular complex with protein 4.1G and human discs large. J. Biol. Chem. *279*, 33816–33828.

Ranson, T., Vosshenrich, C.A.J., Corcuff, E., Richard, O., Laloux, V., Lehuen, A., and Di Santo, J.P. (2003). IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 2663–2668.

Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Lougheed, W.M., and Lotto, W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. Anat. Rec. *119*, 11–33.

Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nat. Rev. Immunol. *3*, 781–790.

Reissfelder, C., Stamova, S., Gossmann, C., Braun, M., Bonertz, A., Walliczek, U., Grimm, M., Rahbari, N.N., Koch, M., Saadati, M., et al. (2015). Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. J. Clin. Invest. *125*, 739–751.

Rhost, S., Löfbom, L., Rynmark, B.-M., Pei, B., Månsson, J.-E., Teneberg, S., Blomqvist, M., and Cardell, S.L. (2012). Identification of novel glycolipid ligands activating a sulfatide-reactive, CD1d-restricted, type II natural killer T lymphocyte. Eur. J. Immunol. *42*, 2851–2860.

Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., and Heikenwalder, M. (2018). The immunology of hepatocellular carcinoma. Nat. Immunol. *19*, 222–232.

Rudolph, K.L., Chang, S., Millard, M., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (2000). Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. Science *287*, 1253–1258.

de Ruiter, E.J., Ooft, M.L., Devriese, L.A., and Willems, S.M. (2017). The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. Oncoimmunology *6*, e1356148.

Ruiz de Galarreta, M., Bresnahan, E., Molina-Sánchez, P., Lindblad, K.E., Maier, B., Sia, D., Puigvehi, M., Miguela, V., Casanova-Acebes, M., Dhainaut, M., et al. (2019). β-Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. Cancer Discov. *9*, 1124–1141.

Saïd-Sadier, N., and Ojcius, D.M. (2012). Alarmins, inflammasomes and immunity. Biomed. J. *35*, 437–449.

Saito, T., Okumura, A., Watanabe, H., Asano, M., Ishida-Okawara, A., Sakagami, J., Sudo, K., Hatano-Yokoe, Y., Bezbradica, J.S., Joyce, S., et al. (2004). Increase in hepatic NKT cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-deficient mice contributes to severe concanavalin A-induced hepatitis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 579–585.

Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. Blood *102*, 1389–1396.

Sanoff, H.K., Chang, Y., Lund, J.L., O'Neil, B.H., and Dusetzina, S.B. (2016). Sorafenib Effectiveness in Advanced Hepatocellular Carcinoma. The Oncologist *21*, 1113–1120.

Satyanarayana, A., Manns, M.P., and Rudolph, K.L. (2004). Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. Hepatol. Baltim. Md *40*, 276–283.

Scanlon, S.T., and McKenzie, A.N.J. (2012). Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. Curr. Opin. Immunol. *24*, 707–712.

Schäfer, M., and Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 628–638.

Schalper, K.A., Brown, J., Carvajal-Hausdorf, D., McLaughlin, J., Velcheti, V., Syrigos, K.N., Herbst, R.S., and Rimm, D.L. (2015). Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. J. Natl. Cancer Inst. *107*.

Schmiedel, D., and Mandelboim, O. (2018). NKG2D Ligands-Critical Targets for Cancer Immune Escape and Therapy. Front. Immunol. *9*, 2040.

Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L.B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., et al. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. Nat. Genet. *47*, 505–511.

Schulze, K., Nault, J.-C., and Villanueva, A. (2016). Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. J. Hepatol. *65*, 1031–1042.

Sène, D., Levasseur, F., Abel, M., Lambert, M., Camous, X., Hernandez, C., Pène, V., Rosenberg, A.R., Jouvin-Marche, E., Marche, P.N., et al. (2010). Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. PLoS Pathog. *6*, e1001184.

Senovilla, L., Vitale, I., Martins, I., Tailler, M., Pailleret, C., Michaud, M., Galluzzi, L., Adjemian, S., Kepp, O., Niso-Santano, M., et al. (2012). An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. Science *337*, 1678–1684.

Seth, S., Maier, M.K., Qiu, Q., Ravens, I., Kremmer, E., Förster, R., and Bernhardt, G. (2007). The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *364*, 959–965.

Sheppard, S., Guedes, J., Mroz, A., Zavitsanou, A.-M., Kudo, H., Rothery, S.M., Angelopoulos, P., Goldin, R., and Guerra, N. (2017). The immunoreceptor NKG2D promotes tumour growth in a model of hepatocellular carcinoma. Nat. Commun. *8*, 13930.

Sheppard, S., Ferry, A., Guedes, J., and Guerra, N. (2018). The Paradoxical Role of NKG2D in Cancer Immunity. Front. Immunol. *9*, 1808.

Sherman, M. (2008). Recurrence of hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med. *359*, 2045–2047.

Sheth, K., and Bankey, P. (2001). The liver as an immune organ. Curr. Opin. Crit. Care *7*, 99–104.

Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., et al. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. Immunity *4*, 573–581.

Shibuya, K., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Ochs, H.D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H., and Shibuya, A. (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. Immunity *11*, 615–623.

Shimizu, K., Sato, Y., Kawamura, M., Nakazato, H., Watanabe, T., Ohara, O., and Fujii, S.-I. (2019). Eomes transcription factor is required for the development and differentiation of invariant NKT cells. Commun. Biol. *2*, 150.

Sia, D., Jiao, Y., Martinez-Quetglas, I., Kuchuk, O., Villacorta-Martin, C., Castro de Moura, M., Putra, J., Camprecios, G., Bassaganyas, L., Akers, N., et al. (2017). Identification of an Immune-specific Class of Hepatocellular Carcinoma, Based on Molecular Features. Gastroenterology *153*, 812–826.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. CA. Cancer J. Clin. *69*, 7–34.

Singh, A.K., Tripathi, P., and Cardell, S.L. (2018). Type II NKT Cells: An Elusive Population With Immunoregulatory Properties. Front. Immunol. *9*, 1969.

Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., and Duncan, S.A. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. Hepatol. Baltim. Md *51*, 297–305.

Skov Olsen, P., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S., and Nexø, E. (1988). Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Hepatol. Baltim. Md *8*, 992–996.

Sloan, K.E., Eustace, B.K., Stewart, J.K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J.E., Unger, C., Louis, D.N., Ilag, L.L., et al. (2004). CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. BMC Cancer *4*, 73.

Sloan, K.E., Stewart, J.K., Treloar, A.F., Matthews, R.T., and Jay, D.G. (2005). CD155/PVR enhances glioma cell dispersal by regulating adhesion signaling and focal adhesion dynamics. Cancer Res. *65*, 10930–10937.

Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., and Godfrey, D.I. (2002). NKT cells - conductors of tumor immunity? Curr. Opin. Immunol. *14*, 165–171.

Sørensen, K.K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R.S., and Smedsrød, B. (2015). Liver Sinusoidal Endothelial Cells. Compr. Physiol. *5*, 1751–1774.

Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M.L., Ricciardi, M.R., Di Gialleonardo, V., Cippitelli, M., Fionda, C., Petrucci, M.T., Guarini, A., et al. (2009). ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. Blood *113*, 3503–3511.

Spear, P., Wu, M.-R., Sentman, M.-L., and Sentman, C.L. (2013). NKG2D ligands as therapeutic targets. Cancer Immun. *13*, 8.

Stahl, S., Ittrich, C., Marx-Stoelting, P., Köhle, C., Altug-Teber, O., Riess, O., Bonin, M., Jobst, J., Kaiser, S., Buchmann, A., et al. (2005). Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. Hepatol. Baltim. Md *42*, 353–361.

Stamm, H., Wellbrock, J., and Fiedler, W. (2018). Interaction of PVR/PVRL2 with TIGIT/DNAM-1 as a novel immune checkpoint axis and therapeutic target in cancer. Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc. *29*, 694–702.

Stanietsky, N., Simic, H., Arapovic, J., Toporik, A., Levy, O., Novik, A., Levine, Z., Beiman, M., Dassa, L., Achdout, H., et al. (2009). The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 17858–17863.

Stanietsky, N., Rovis, T.L., Glasner, A., Seidel, E., Tsukerman, P., Yamin, R., Enk, J., Jonjic, S., and Mandelboim, O. (2013). Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. Eur. J. Immunol. *43*, 2138–2150.

Stegmann, K.A., Robertson, F., Hansi, N., Gill, U., Pallant, C., Christophides, T., Pallett, L.J., Peppa, D., Dunn, C., Fusai, G., et al. (2016). CXCR6 marks a novel subset of T-bet(lo)Eomes(hi) natural killer cells residing in human liver. Sci. Rep. *6*, 26157.

Stengel, K.F., Harden-Bowles, K., Yu, X., Rouge, L., Yin, J., Comps-Agrar, L., Wiesmann, C., Bazan, J.F., Eaton, D.L., and Grogan, J.L. (2012). Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 5399–5404.

Stöcker, E., and Heine, W.D. (1971). Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. Beitr. Pathol. *144*, 400–408.

Sulli, G., Di Micco, R., and d'Adda di Fagagna, F. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. Nat. Rev. Cancer *12*, 709–720.

Sun, H., Sun, C., Xiao, W., and Sun, R. (2019a). Tissue-resident lymphocytes: from adaptive to innate immunity. Cell. Mol. Immunol. *16*, 205–215.

Sun, H., Liu, L., Huang, Q., Liu, H., Huang, M., Wang, J., Wen, H., Lin, R., Qu, K., Li, K., et al. (2019b). Accumulation of Tumor-Infiltrating CD49a+ NK Cells Correlates with Poor Prognosis for Human Hepatocellular Carcinoma. Cancer Immunol. Res.

Sun, H., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Lin, R., Zheng, M., Qu, K., Li, K., Wei, H., Xiao, W., et al. (2019c). Human CD96 Correlates to Natural Killer Cell Exhaustion and Predicts the Prognosis of Human Hepatocellular Carcinoma. Hepatol. Baltim. Md *70*, 168–183.

Syn, W.-K., Oo, Y.H., Pereira, T.A., Karaca, G.F., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R.P., Choi, S.S., Guy, C.D., Fearing, C.M., et al. (2010). Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol. Baltim. Md *51*, 1998–2007.

Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Onoda, Y., Zhang, H., Yamazaki, S., Miyamoto, A., Honda, S.-I., Lanier, L.L., and Shibuya, A. (2004). Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). Int. Immunol. *16*, 533–538.

Tajiri, K., Shimizu, Y., Tsuneyama, K., and Sugiyama, T. (2009). Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. *21*, 673–680.

Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., and Ikeda, W. (2003). Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. Cancer Sci. *94*, 655–667.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. Nat. Med. *7*, 94–100.

Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrelos, E., Luo, J.-H., Ranganathan, S., Monga, D.K., Bell, A., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P.S. (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. Gastroenterology *129*, 285–302.

Tang, Q., Wang, Q., Zhang, Q., Lin, S.-Y., Zhu, Y., Yang, X., and Guo, A.-Y. (2017). Gene expression, regulation of DEN and HBx induced HCC mice models and comparisons of tumor, para-tumor and normal tissues. BMC Cancer *17*, 862.

Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (2002). A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatol. Baltim. Md *35*, 1072–1081.

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 836–847.

Totoki, Y., Tatsuno, K., Covington, K.R., Ueda, H., Creighton, C.J., Kato, M., Tsuji, S., Donehower, L.A., Slagle, B.L., Nakamura, H., et al. (2014). Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. Nat. Genet. *46*, 1267–1273.

Toutirais, O., Cabillic, F., Le Friec, G., Salot, S., Loyer, P., Le Gallo, M., Desille, M., de La Pintière, C.T., Daniel, P., Bouet, F., et al. (2009). DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. Eur. J. Immunol. *39*, 1361–1368.

Tugues, S., Ducimetiere, L., Friebel, E., and Becher, B. (2019). Innate lymphoid cells as regulators of the tumor microenvironment. Semin. Immunol. 101270.

Tyznik, A.J., Tupin, E., Nagarajan, N.A., Her, M.J., Benedict, C.A., and Kronenberg, M. (2008). Cutting edge: the mechanism of invariant NKT cell responses to viral danger signals. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 4452–4456.

Umansky, V., Sevko, A., Gebhardt, C., and Utikal, J. (2014). Myeloid-derived suppressor cells in malignant melanoma. J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG *12*, 1021–1027.

Varchetta, S., Oliviero, B., Francesca Donato, M., Agnelli, F., Rigamonti, C., Paudice, E., Arosio, E., Berra, M., Rossi, G., Tinelli, C., et al. (2009). Prospective study of natural killer cell phenotype in recurrent hepatitis C virus infection following liver transplantation. J. Hepatol. *50*, 314–322.

Vulpis, E., Cecere, F., Molfetta, R., Soriani, A., Fionda, C., Peruzzi, G., Caracciolo, G., Palchetti, S., Masuelli, L., Simonelli, L., et al. (2017). Genotoxic stress modulates the release of exosomes from multiple myeloma cells capable of activating NK cell cytokine production: Role of HSP70/TLR2/NF-kB axis. Oncoimmunology *6*, e1279372.

Wagner, A.K., Kadri, N., Snäll, J., Brodin, P., Gilfillan, S., Colonna, M., Bernhardt, G., Höglund, P., Kärre, K., and Chambers, B.J. (2017). Expression of CD226 is associated to but not required for NK cell education. Nat. Commun. *8*, 15627.

Walker, J.A., Barlow, J.L., and McKenzie, A.N.J. (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them? Nat. Rev. Immunol. *13*, 75–87.

Wang, H., and Hogquist, K.A. (2018). How Lipid-Specific T Cells Become Effectors: The Differentiation of iNKT Subsets. Front. Immunol. *9*, 1450.

Wang, Y., and Zhang, C. (2019). The Roles of Liver-Resident Lymphocytes in Liver Diseases. Front. Immunol. *10*, 1582.

Wang, F., Hou, H., Wu, S., Tang, Q., Liu, W., Huang, M., Yin, B., Huang, J., Mao, L., Lu, Y., et al. (2015a). TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. Eur. J. Immunol. *45*, 2886–2897.

Wang, H., Wang, H., Powell, S.N., Iliakis, G., and Wang, Y. (2004). ATR affecting cell radiosensitivity is dependent on homologous recombination repair but independent of nonhomologous end joining. Cancer Res. *64*, 7139–7143.

Wang, P.L., O'Farrell, S., Clayberger, C., and Krensky, A.M. (1992). Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *148*, 2600–2608.

Wang, X., Yamamoto, Y., Wilson, L.H., Zhang, T., Howitt, B.E., Farrow, M.A., Kern, F., Ning, G., Hong, Y., Khor, C.C., et al. (2015b). Cloning and variation of ground state intestinal stem cells. Nature *522*, 173–178.

Weibel, E.R., Stäubli, W., Gnägi, H.R., and Hess, F.A. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. J. Cell Biol. *42*, 68–91.

Wesley, J.D., Tessmer, M.S., Chaukos, D., and Brossay, L. (2008). NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection. PLoS Pathog. *4*, e1000106.

Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. J. Ultrastruct. Res. *31*, 125–150.

Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.-A., Reed, K., et al. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N. Engl. J. Med. *369*, 122–133.

Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., et al. (2014). Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. Cancer Cell *26*, 549–564.

Woo, S.-R., Corrales, L., and Gajewski, T.F. (2015). Innate immune recognition of cancer. Annu. Rev. Immunol. *33*, 445–474.

Wu, J., and Wang, X. (2011). NKG2D-Based Cancer Immunotherapy. In Current Cancer Treatment - Novel Beyond Conventional Approaches, O. Ozdemir, ed. (InTech), p.

Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. Science *285*, 730–732.

Wu, K., Kryczek, I., Chen, L., Zou, W., and Welling, T.H. (2009). Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. Cancer Res. *69*, 8067–8075.

Xiao, P., Xue, L., Che, L., Wu, H., and Qiao, H. (2007). [Expression of membrane/soluble MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor in osteosarcoma and its clinical significance]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi *36*, 596–599.

Yamagoe, S., Mizuno, S., and Suzuki, K. (1998a). Molecular cloning of human and bovine LECT2 having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver. Biochim. Biophys. Acta *1396*, 105–113.

Yamagoe, S., Watanabe, T., Mizuno, S., and Suzuki, K. (1998b). The mouse Lect2 gene: cloning of cDNA and genomic DNA, structural characterization and chromosomal localization. Gene *216*, 171–178.

Yang, D., Han, Z., and Oppenheim, J.J. (2017). Alarmins and immunity. Immunol. Rev. *280*, 41–56.

Youngblood, B., Oestreich, K.J., Ha, S.-J., Duraiswamy, J., Akondy, R.S., West, E.E., Wei, Z., Lu, P., Austin, J.W., Riley, J.L., et al. (2011). Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. Immunity *35*, 400–412.

Zhang, C., Wang, X.-M., Li, S.-R., Twelkmeyer, T., Wang, W.-H., Zhang, S.-Y., Wang, S.-F., Chen, J.-Z., Jin, X., Wu, Y.-Z., et al. (2019). NKG2A is a NK cell exhaustion checkpoint for HCV persistence. Nat. Commun. *10*, 1507.

Zhang, H., Li, N., Zhang, J., Jin, F., Shan, M., Qin, J., and Wang, Y. (2016). The influence of miR-34a expression on stemness and cytotoxic susceptibility of breast cancer stem cells. Cancer Biol. Ther. *17*, 614–624.

Zhao, P., Chen, D., and Cheng, H. (2018). Prognostic significance of soluble major histocompatibility complex class I-related chain A (sMICA) in gastric cancer. Br. J. Biomed. Sci. *75*, 203–205.

Zhu, A.X., Finn, R.S., Edeline, J., Cattan, S., Ogasawara, S., Palmer, D., Verslype, C., Zagonel, V., Fartoux, L., Vogel, A., et al. (2018). Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial. Lancet Oncol. *19*, 940–952.

Zhuo, B., Li, Y., Gu, F., Li, Z., Sun, Q., Shi, Y., Shen, Y., Zhang, F., Wang, R., and Wang, X. (2018). Overexpression of CD155 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. Oncol. Lett. *15*, 7312–7318.

Zingoni, A., Molfetta, R., Fionda, C., Soriani, A., Paolini, R., Cippitelli, M., Cerboni, C., and Santoni, A. (2018). NKG2D and Its Ligands: “One for All, All for One.” Front. Immunol. *9*, 476.

Zucman-Rossi, J., Benhamouche, S., Godard, C., Boyault, S., Grimber, G., Balabaud, C., Cunha, A.S., Bioulac-Sage, P., and Perret, C. (2007). Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. Oncogene *26*, 774–780.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C., and Llovet, J.M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology *149*, 1226-1239.e4.

Zuo, J., Mohammed, F., and Moss, P. (2018). The Biological Influence and Clinical Relevance of Polymorphism Within the NKG2D Ligands. Front. Immunol. *9*, 1820.

ANNEXE

HEPATOLOGY

HEPATOLOGY, VOL. 69, NO. 1, 2019

Lect2 Controls Inflammatory Monocytes to Constrain the Growth and Progression of Hepatocellular Carcinoma

Antoine L'Hermitte,[1-3] Sandrine Pham,[1-3*] Mathilde Cadoux,[1-3*] Gabrielle Couchy,[3-6] Stefano Caruso,[3-6] Marie Anson,[2,3] Anne-Marie Crain-Denoyelle,[1-3] Séverine Celton-Morizur,[1-3] Satoshi Yamagoe,[7] Jessica Zucman-Rossi,[3-6] Chantal Desdouets,[1-3] and Jean-Pierre Couty[1-4*]

Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (LECT2) was originally identified as a hepatocyte-secreted chemokine-like factor and a positive target of β-catenin signaling. Here, we dissected out the mechanisms by which LECT2 modulates hepatocellular carcinoma (HCC) development using both HCC mouse models and human HCC samples. We have demonstrated that LECT2 exhibits dual abilities as it has profound repercussions on the tumor phenotype itself and the immune microenvironment. Its absence confers Ctnnb-1-mutated tumor hepatocytes a stronger ability to undergo epithelial to mesenchymal transition and fosters the accumulation of pejorative inflammatory monocytes harboring immunosuppressive properties and strong tumor-promoting potential. Consistent with our HCC mouse model, a low level of LECT2 in human HCC is strongly associated with high tumor grade and the presence of inflammatory infiltrates, emphasizing the clinical value of LECT2 in human liver tumorigenesis. *Conclusion:* Our findings have demonstrated that LECT2 is a key player in liver tumorigenesis because its absence reshapes the tumor microenvironment and the tumor phenotype, revealing LECT2 as a promising immunotherapeutic option for HCC. (Hepatology 2019;69:160-178).

Hepatocellular carcinoma (HCC) has emerged as the second leading cause of cancer-related death worldwide.[1,2] HCC-related mortality is rapidly increasing in Western populations, with a minority of patients diagnosed at an early stage. Treatment options for HCC remain very limited, although the multikinase inhibitor sorafenib and more recently regorafenib have improved survival in advanced cases.[3-5] Our understanding of the molecular pathogenesis of HCC has recently progressed, providing an accurate picture of the landscape of genetic alterations in HCC. These studies have defined core pathways deregulated in HCC, with *TP53* and *CTNNB1* the most prevalent mutations after *TERT* promoter mutations.[6,7] HCC is a model of inflammation-associated cancer, as inflammation is involved

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; EMT, epithelial to mesenchymal transition; FACS, fluorescence-activated cell sorting; HCC, hepatocellular carcinoma; LECT2, leukocyte cell-derived chemotaxin-2; SPIA, Single Primer Isothermal Amplification; TME, tumor microenvironment.

Received December 12, 2017; accepted June 9, 2018.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30140/suppinfo.

**These authors contributed equally to this work.*

Supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut National du Cancer (INCa), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer), The Association Française pour l'Etude du Foie, AFEF and the Laboratoire ROCHE, Ligue Contre le Cancer, comité de Paris, Agence Nationale de Recherche ANR "Vie, Santé et Bien être," EVA-Plan Cancer INSERM HTE (ASC16084KSA). A.L. was supported by a fellowship from Ecole Doctorale de Cancérologie-Paris Saclay, Université Paris Sud and the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC).

© 2018 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.30140

Potential conflict of interest: Nothing to report.

in all stages, from tumor initiation to progression and dissemination.[8-10] Indeed, several studies provided significant evidence regarding the predominant role of inflammatory signaling pathways (see He et al.[11] for review). Over the last 10 years, considerable attention has also focused on the concept of the tumor microenvironment (TME).[12] The TME is now recognized as a key actor in the carcinogenesis of most solid tumors. It plays a crucial role in liver cancer because more than 80% of HCCs emerge from a disrupted microenvironment. In several murine models of HCC, both innate and adaptive immune system components have been shown to participate in tumor development and progression, highlighting the intricate nature of the crosstalk between the immune system and tumor cells.[13-15] Approaches targeting TME composition are therefore considered an exciting prospect for HCC treatment.

In this context, we recently identified the chemokine-like factor leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (Lect2) secreted by hepatocytes as a key player in the immune microenvironment during mouse liver tumorigenesis that controlled tumor aggressiveness.[16]

In the present study, we evaluated *LECT2* expression in a large human HCC data set and showed that HCC with lower *LECT2* expression correlated with HCC of more advanced tumor grade and immune infiltrates. We further explored the role of *Lect2* using our ß-catenin-induced HCC mouse model and found that it fosters a permissive immune microenvironment highly abundant in inflammatory monocytes able to sustain tumor growth and progression.

Materials and Methods

MICE

The different HCC mouse models used in the study that modeled HCC tumorigenesis were previously described in Anson et al.[16] The *Lpk-myc*+ transgenic mice, which express the oncogene c-*myc* gene in the liver under the control of rat L-PK regulatory regions, developed HCC mutated for *Ctnnb1*.[17] To obtain *Ctnnb1*-HCC deficient in *Lect2*, we crossed the *Lpk-myc*+ with *Lect2*$^{-/-}$ mice.[18] HCC development was studied at 12 months in *Lpk*-myc+ and *Lpk*-myc+, Lect2$^{-/-}$ mice. Homogeneous groups of mice consisting exclusively of littermates were established. To analyze the early stage of *Ctnnb1*-induced HCC tumorigenesis, we used the inducible hepatocyte-specific inactivation of the *Apc* gene, named Apc^{LKO} (*Apc* $^{flox/flox}$, *TTR-Cre Tam*); control mice were (*Apc* $^{flox/flox}$, Cre negative).[19,20] Apc^{LKO} mice were crossed with *Lect2*$^{-/-}$ mice to generate mice with liver deficient in both *Apc* and *Lect2* (*Apc* $^{flox/flox}$, *TTR-Cre Tam, Lect2*$^{-/-}$); their respective controls were (*Apc* $^{flox/flox}$, Cre negative x *Lect2*$^{-/-}$ and *Apc* $^{flox/flox}$, Cre negative x *Lect2*$^{+/+}$). Inactivation of the *Apc* gene was done by a single intraperitoneal injection of 1.5 mg tamoxifen (MP Biomedicals, France) in 9- to 12-week-old mice. All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and food pellets.

HUMAN LIVER SAMPLES

A series of 243 liver tumor samples and corresponding nontumor liver samples were collected from

ARTICLE INFORMATION:

From the [1]INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France; [2]CNRS, UMR8104, Paris, France; [3]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [4]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [5]INSERM, Unité mixte de recherche, UMR 1162 - Génétique fonctionnelle des tumeurs solides, Paris, France; [6]Institut Universitaire d'Hématologie (IUH), Paris, France; [7]Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Jean-Pierre Couty, Ph.D.
Institut Cochin, INSERM U1016
UMR CNRS 8104, Université René Descartes
Département Développement
Reproduction et Cancer (DRC)
Bâtiment Faculté
24 Rue du Faubourg Saint-Jacques
75014 Paris, France
E-mail: jean-pierre.couty@inserm.fr
Tel.: +33-1-44-41-24-39

patients treated by surgery in Europe: 193 cases from France (Créteil and Bordeaux), 9 cases from Spain (Barcelona), and 41 cases from Italy (Milan).

Clinical Data, Biological and Histological Parameters

Clinical and pathological data were available for all cases (see Supporting Material).

NONPARENCHYMAL CELL ISOLATION

Nonparenchymal cells (NPC) were extracted from livers according to previously described method[16] using percoll gradient density (See Supporting Material). Red blood cells were removed by incubation with lysis buffer ACK (0.15 M NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$ and 0.1 mM Na_2EDTA, pH 7.2). Cells were resuspended in serum-containing medium and viable NPCs were counted by a trypan blue exclusion method, and stored on ice until further use.

FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING

Cells were incubated with anti-CD16/CD32 antibodies (Fcγ III/II receptor, clone 2.4G2, eBiosciences) before staining with labeled antibodies, according to the manufacturer's recommendations. Cells were subjected to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis with specific antibodies (see Supporting Material). Data were acquired with an LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc.). For functional and microarray analyses, hepatic myeloid cells were stained with specific antibodies and then sorted according to the marker combinations described in Fig. 4B, on an ARIA3 flow cytometer (BD Biosciences) with DIVA software (BD Biosciences). For microarrays, cells were sorted directly in the lysis buffer provided with the QIAGEN RNA extraction kit.

ANTIBODY DEPLETION EXPERIMENT

Mice received a single intraperitoneal injection of 1.5 mg tamoxifen. Two days later, they received a single intraperitoneal injection of a cocktail of anti-Ccl2 (clone 2H5, Bio X Cell) antibody at a dose of 7.5 mg/kg and anti-Ccl5 antibody (clone 53405, R&D systems) at a dose of 1.0 mg/kg or control antibody (Polyclonal Armenian Hamster IgG, Bio X Cell; Normal Rat IgG control, R&D Systems). The efficacy of antibody depletion was evaluated by flow cytometry 8 days after tamoxifen injection.

T-CELL STIMULATION

Naïve T cells sorted from the spleen of wild-type (WT) mice were labeled with 5 μM CellTrace Violet (CTV) (Molecular Probes, Life Technologies). Cells were washed and transferred to U-bottomed plates at a concentration of 2×10^4 cells per well. Each well was previously coated with 2 μg/mL anti-CD3ε antibody (clone 145-2C11, BD-Pharmingen), and 4 μg/mL soluble anti-CD28 antibody (clone 37.57, eBioscience) was added to stimulate T cells. Sorted myeloid cells from mouse tumors were added to the culture at a concentration of 4×10^3 cells per well. After 4 days in culture, T cells were stained for extracellular marker. Proliferation was assessed by evaluating the loss of CTV staining by flow cytometry.

PRIMARY CULTURE OF HEPATOCYTES

Primary mouse hepatocytes were isolated by *in situ* liver perfusion with a collagenase blend (Sigma-Aldrich). After isolation, cells were collected in complete medium (William's medium E supplemented with bovine serum albumin (0.1%), penicilin/streptomycin (100 U/mL), Fungizone B (100 g/mL), dexamethasone (25 nM), and insulin (4 g/mL). The hepatocytes were collected by three rounds of centrifugation for 3 minutes each at 400 rpm and resuspended in complete medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Hepatocytes were counted by a trypan blue exclusion method, and their viability was found to be >90%. Cells were used to seed 60-mm plastic dishes (6×10^5 cells per plate) containing complete medium supplemented with 10% FBS, which were then incubated at 37°C under an atmosphere containing 5% CO_2, for 4 hours, to allow the cells to adhere. The medium was then removed and replaced with fresh serum-free complete medium, or complete medium supplemented with 5 ng/mL TGF1 for stimulation. The cells were incubated for

36 hours. In coculture experiments, sorted myeloid cells from tumor mice were added at a density of 4×10^4 cells per dish to the hepatocyte primary culture until 48 hours.

IMMUNOHISTOLOGICAL STAINING

Immediately after mouse sacrifice, liver tissues were removed from the mouse and fixed by incubation in 4% formol overnight at 4°C for embedding in paraffin wax. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was carried out on 3-m-thick paraffin sections. For immunohistochemistry, 5-m-thick sections were stained according to the procedure described in Supporting Material. Images were acquired with an Olympus BX63F microscope at ×4 and ×10 magnification, Uplan FLN objectives, an Olympus DP73 (CCD Bayer filter) camera, and Metamorph7.8.8.0 software (Molecular Devices).

IMMUNOFLUORESCENCE STAINING

For immunofluorescence staining, 7-m cryosections were stained according to the procedure described in Supporting Material. Images were acquired with an Olympus BX63F microscope at ×10 and ×40 magnification, with Uplan FLN objectives, a Hamamatsu ORCA-Flash4.0 LT C11440-42U (CMOS) camera, and Metamorph7.8.8.0 software (Molecular Devices).

IN SITU HYBRIDIZATION

In situ hybridization was performed on 10-m paraffin-embedded sections of liver tissue. Sections were deparaffinized and treated with proteinase K (5 μg/mL) in Tris/ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) buffer (1 M/0.5 M). Sections were washed in phosphate-buffered saline, treated with acetic acid (0.25%) and triethanolamine (0.10 M), and prehybridized by incubation for 2 hours at 68°C in saline-sodium buffer (2 M) with Denhardt's solution (100 g/mL), dextran sulfate (10%) and EDTA (0.05 M) before adding *Afp*-digoxygenin-labeled probes (sense 5'—CAT GGT CGA CGC CAT GAA GTG GAT CAC ACC C; antisense 5'- CAT GGT CGA CTT AAA CGC CCA AAG CAT CAC G) at a concentration of 500 ng/mL overnight at 68°C. Slides were washed once, for 5 minutes, in saline-sodium buffer (5 M) at 68°C; twice, for 30 minutes each, in saline-sodium buffer (0.2 M) at 68°C; and once for 5 minutes in saline-sodium buffer (0.2 M) at room temperature. Signals were detected with antidioxygenin antibody (Roche) and Nitro Blue Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatate (Roche).

WESTERN BLOTTING

Protein extracts were prepared from nontumoral and tumoral liver samples by lysis in radio immunoprecipitation assay buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics). They were diluted in 2× Laemmli buffer (Sigma-Aldrich, S3401) and analyzed by western blotting, as previously described.

GENE EXPRESSION ANALYSIS

Total RNA was extracted from frozen liver tissue or isolated hepatocytes with the RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted from NPCs with the RNeasy Micro Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was then reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed with the Fast Start SYBR green I Master kit (Roche) and a LightCycler 480 Instrument (Roche Applied Science). Gene expression was normalized relative to ribosomal *18s* RNA levels. Expression levels in the various mouse liver samples were calculated for all genes, by the 2-delta-delta cycle qualification (Cq) method, and were compared with the level of expression of the corresponding gene in control liver tissues (expression as an n-fold ratio).

RNA Isolation and Microarray Analysis

For the comparison of nodules, HCC/LECT2 knockout mice harboring differentiated and poorly differentiated nodules were selected on the basis of H&E staining on frozen sections. Differentiated and poorly differentiated nodules were macrodissected for each mouse, and total RNA was extracted in parallel

from these two subsets with the RNeasy Mini Kit (Qiagen). For the comparison of myeloid cells, a micro RNeasy PLUS Kit (Qiagen) was used to extract total RNA from FACS-sorted myeloid cells. All RNA processing steps, microarrays, and statistical analysis were carried out by the Genom'IC facility (Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France). RNA quality was checked with a Bioanalyzer 2100 (with the Agilent RNA6000 pico chip kit), and 400 pg of total RNA was reverse-transcribed with Ovation Pico WTA System V2 (Nugen). The resulting double-stranded complementary DNA (cDNA) was used for amplification with Single Primer Isothermal Amplification (SPIA) technology. The DNA was purified according to the Nugen protocol, and 5 μg of sense target DNA was fragmented and labeled with biotin, with the Encore Biotin Module kit (Nugen). Fragmentation was checked on a Bioanalyzer 2100, and the cDNA was then hybridized to GeneChip MTA1.0 (Affymetrix) at 45°C for 17 hours. The chips were washed on an FS450 fluidic station, according to specific protocols (Affymetrix), and scanned with a GCS3000 7G. The scanned images were then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (CEL Intensity files) and metrics for quality control. Observations of these metrics and the distribution of raw data revealed no outliers.

Data Submission

All the data obtained by microarray analysis have been deposited on the Gene Expression Omnibus NCBI site under accession number GSE 99570 and will be made available upon publication.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are expressed as means ± standard deviation of the mean. Statistical significance was determined by two-way analysis of variance followed by a Student *t* test in Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). We considered *P* values <0.05 to be statistically significant.

STUDY APPROVAL

All reported animal procedures were carried out in accordance with the rules of the French Institutional Animal Care and Use Committee. All animal studies were approved by the regional veterinary services of the Paris police headquarters (agreement no. 75-956). For human samples, the study was approved by the relevant institutional review boards (CCPRB Paris Saint-Louis, 1997, 2004 and 2010, approval number 01-037; Bordeaux, 2010-A00498-31).

Results

LOW LECT2 EXPRESSION IN HUMAN HCC IS STRONGLY ASSOCIATED WITH A HIGHER TUMOR GRADE AND THE PRESENCE OF INFLAMMATORY INFILTRATES

We first investigated the clinical relevance of *LECT2* during human liver tumorigenesis, by studying the levels of *LECT2* mRNA in a large cohort of patients with HCC. We found that *LECT2* expression was significantly downregulated in both benign and malignant hepatocellular tumors when compared with normal liver tissue (Fig. 1A). We next assessed *LECT2* expression according to the molecular classification of human HCC on the basis of clinical and genomic features.[21,22] Groups G1 to G3 are characterized by chromosomal instability, whereas groups G4 to G6 are associated with chromosomal stability. We observed that *LECT2* expression level was significantly lower in G1-G3 groups compared with G4-G6; G5-G6 harbored activating mutations into beta-catenin gene (*CTNNB1*) (Fig. 1B; Supporting Fig. S1). Importantly, we found that *LECT2* expression was inversely correlated with tumor grade because highly malignant nodules classified as stage III to IV according to the Edmondson-Steiner classification showed a low expression of *LECT2* (Fig. 1C). In addition, we found that human HCCs with inflammatory infiltrates had the lowest levels of *LECT2* (Fig. 1D). This was corroborated by the strong correlation between the expression of *LECT2* and *IKBKE* gene (Fig. 1E).

Altogether, our findings showed that low *LECT2* expression level in human HCC correlated with a more advanced histological grade and containing inflammatory infiltrates.

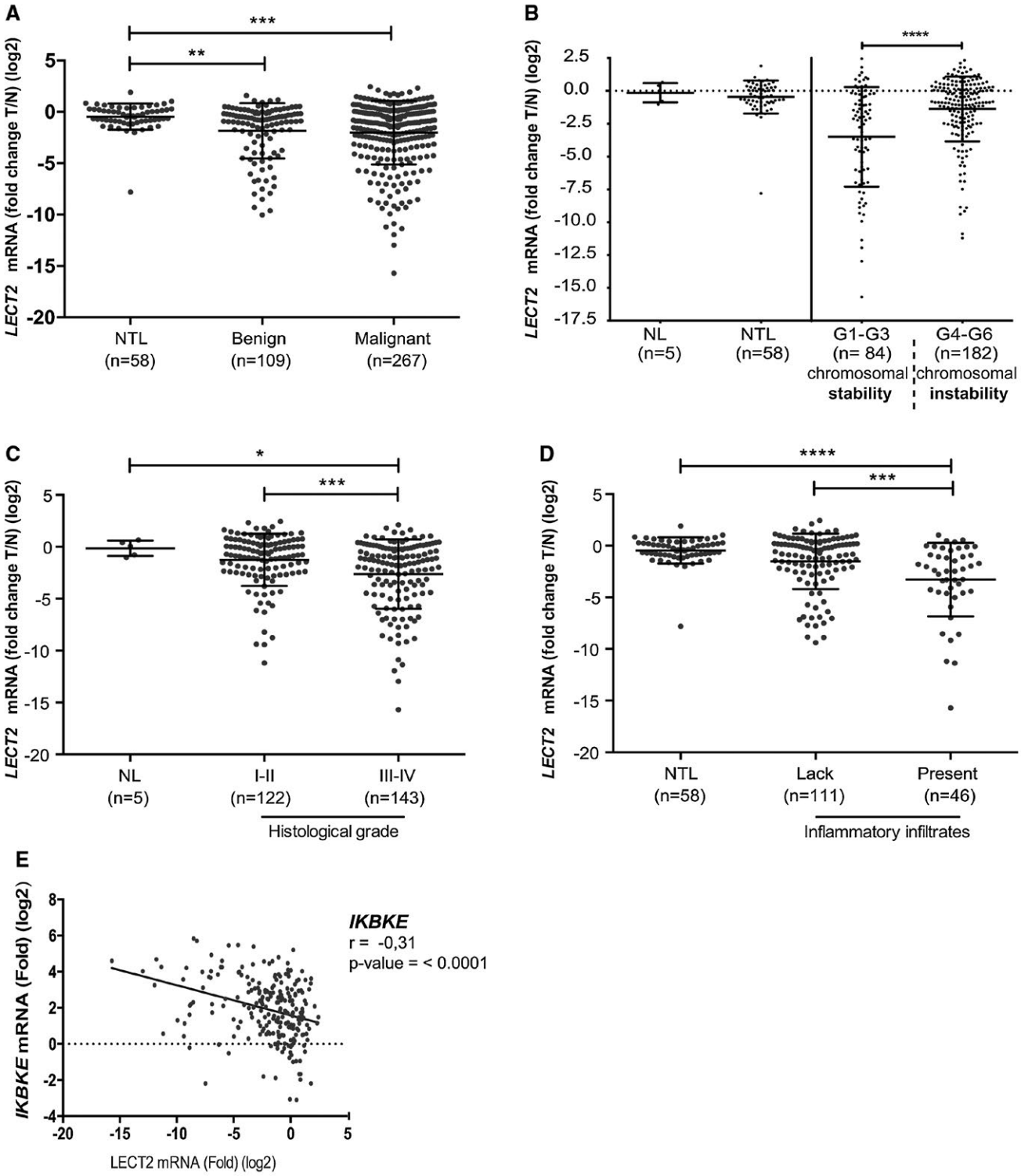

A
***
**
LECT2 mRNA (fold change T/N) (log2)
5
0
-5
-10
-15
-20
NTL (n=58)
Benign (n=109)
Malignant (n=267)
B
****
LECT2 mRNA (fold change T/N) (log2)
2.5
0.0
-2.5
-5.0
-7.5
-10.0
-12.5
-15.0
-17.5
NL (n=5)
NTL (n=58)
G1-G3 (n= 84) chromosomal stability
G4-G6 (n=182) chromosomal instability
C
*
***
LECT2 mRNA (fold change T/N) (log2)
5
0
-5
-10
-15
-20
NL (n=5)
I-II (n=122)
III-IV (n=143)
Histological grade
D
****
***
LECT2 mRNA (fold change T/N) (log2)
5
0
-5
-10
-15
-20
NTL (n=58)
Lack (n=111)
Present (n=46)
Inflammatory infiltrates
E
IKBKE mRNA (Fold) (log2)
8
6
4
2
0
-2
-4
-20
-15
-10
-5
0
5
LECT2 mRNA (Fold) (log2)
IKBKE
r = -0,31
p-value = < 0.0001

FIG. 1. Low LECT2 expression in human HCC is strongly associated with a higher tumor grade and the presence of inflammatory infiltrates. (A) Levels of *LECT2* mRNA were determined in benign and malignant tumors. Benign = hepatocellular adenoma (*n* = 109); Malignant = HCC (n = 267). The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to expression in NTL (n = 58), on the *y* axis. Error bars represent the SD. A significant difference in expression was defined as $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ in the Wilcoxon rank-sum test. (B) Levels of *LECT2* mRNA were assessed in liver tumor samples from patients, according to the molecular classification of HCC, and were compared with those for NTL. G1-G6 classification according to Laurent-Puig and Zucman-Rossi, 2006. G1-G3 (n = 84) are associated with chromosomal instability, whereas G4-G6 (n = 182) are associated with chromosomal stability. The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to expression in NTL (n = 58), on the *y* axis. Error bars represent the SD. A significant difference in expression was defined as $^{****}P < 0.0001$ in the Wilcoxon rank-sum test. (C) Levels of *LECT2* mRNA were assessed in HCCs classified according to Edmonson Steiner grade. Grade I-II = well-differentiated HCC (n = 122); Grade III-IV: poorly differentiated HCC (n = 143). The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to expression in NL samples, on the *y* axis. Error bars represent the SD. A significant difference in expression was defined as $^{*}P < 0.05$; $^{***}P < 0.001$ in the Wilcoxon rank-sum test. (D) Levels of *LECT2* mRNA were assessed in HCCs classified according to the presence (n = 46) or not (n = 111) of inflammatory infiltrates (histological identification). The fold change (log_2) in gene expression is presented relative to expression in NTL, on the *y* axis. A significant difference in expression was defined as $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ in the Wilcoxon rank-sum test. (E) Correlation between the expression of *LECT2* and *IKBKE* mRNA levels in human HCC samples (*n* = 513). Single values were plotted and the correlation was assessed by calculating Pearson's product-moment correlation coefficient. Statistical significance was assessed in Student *t* tests. Abbreviations: NL, normal liver; NTL, nontumor liver samples.

POORLY DIFFERENTIATED NODULES ARISING IN LECT2-DEFICIENT HCC HAVE AN EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION/PROGENITOR/METASTASIS SIGNATURE

We used the Lpk-myc$^+$ mouse model that developed *Ctnnb1*-mutated HCC of well-differentiated phenotype, overexpressing Lect2 (see Materials and Methods). We previously showed that the deletion of *Lect2* in Lpk-myc$^+$ mice (*Lpk-myc*+, *Lect2*$^{-/-}$) elicited the development of heterogeneous tumors harboring different tumor grades including invasive HCC[16] (see Materials and Methods and Supporting Fig. S2A).

To identify actors that participate in tumor aggressiveness in *Lect2*-deficient HCC, we compared the transcriptional profiles of macrodissected poorly differentiated nodules with those of well-differentiated adjacent nodules. Our results showed, in poorly differentiated tumors, signatures of cell invasiveness, extracellular matrix (ECM) remodeling, and immune response (Fig. 2A; Supporting Fig. S2B). Gene set enrichment analysis (GSEA) revealed an enrichment in genes relating to ECM and collagens, immune response, and angiogenesis (Fig. 2B; Supporting Fig. S2C). Accordingly, reverse-transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis showed a strong up-regulation of markers linked to progenitor cell features, epithelial to mesenchymal transition (EMT) process, and TGFβ signaling (Fig. 2C). Immunohistochemistry and *in situ* hybridization analyses showed that the poorly differentiated nodules up-regulated hepatic progenitor cell markers (*Sox9*, *Afp)* and down-regulated the hepatocyte differentiation marker *Hnf4α* (Fig. 2D). Cell invasiveness and EMT were confirmed by immunofluorescence staining and western blot analysis. We found an up-regulation of the phosphorylated and active forms of c-Met and Smad2/3, an increase of *Snail* and N-Cadherin expression in the poorly differentiated nodules (Fig. 2E). Invasiveness was also supported by PECAM-1 staining surrounding the poorly differentiated structures (Fig. 2E).

Collectively, our data evidenced that the loss of *Lect2* triggered the emergence of poorly differentiated HCC harboring progenitor cell traits and EMT features.

LOSS OF LECT2 FOSTERS THE AMPLIFICATION OF INFLAMMATORY MONOCYTES IN HCC

Because Lect2 is an immune modulator, we analyzed the immune infiltrate in the vicinity of the poorly differentiated nodules that developed in *Lect2*-deficient HCC. Pan-CD45 immunofluorescence staining revealed that the immune infiltrate was predominantly located close to these structures and contained

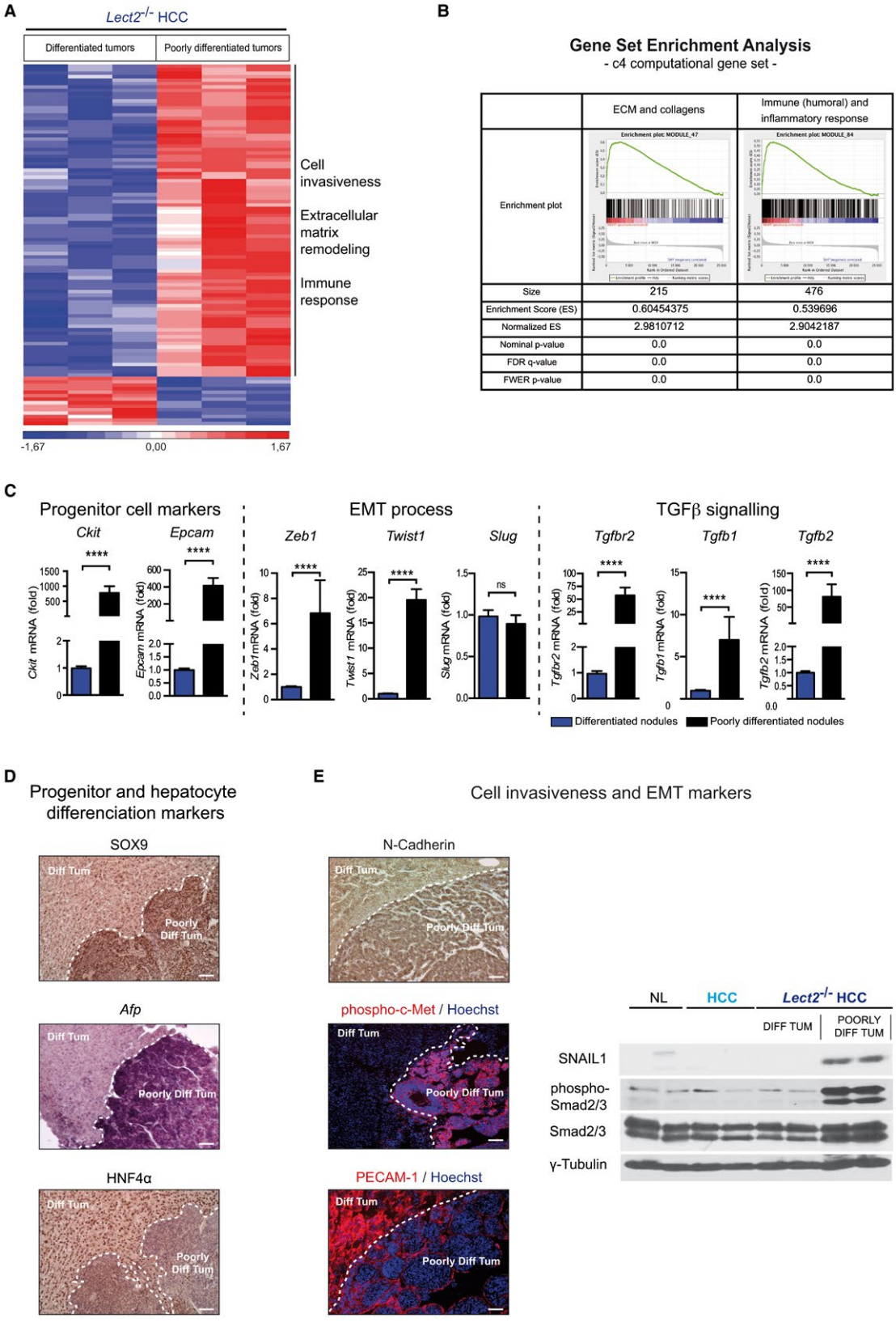

A
Lect2-/- HCC
Differentiated tumors
Poorly differentiated tumors
Cell invasiveness
Extracellular matrix remodeling
Immune response
-1,67
0,00
1,67
B
Gene Set Enrichment Analysis
- c4 computational gene set -
ECM and collagens
Immune (humoral) and inflammatory response
Enrichment plot
Size 215 476
Enrichment Score (ES) 0.60454375 0.539696
Normalized ES 2.9810712 2.9042187
Nominal p-value 0.0 0.0
FDR q-value 0.0 0.0
FWER p-value 0.0 0.0
C
Progenitor cell markers
Ckit
Epcam
EMT process
Zeb1
Twist1
Slug
TGFβ signalling
Tgfbr2
Tgfb1
Tgfb2
Differentiated nodules
Poorly differentiated nodules
D
Progenitor and hepatocyte differenciation markers
SOX9
Afp
HNF4α
Diff Tum
Poorly Diff Tum
E
Cell invasiveness and EMT markers
N-Cadherin
phospho-c-Met / Hoechst
PECAM-1 / Hoechst
NL
HCC
Lect2-/- HCC
DIFF TUM
POORLY DIFF TUM
SNAIL1
phospho-Smad2/3
Smad2/3
γ-Tubulin

FIG. 2. Poorly differentiated nodules arising in Lect2-deficient HCC have an EMT/progenitor/metastasis molecular signature. (A) The heat map shows the genes differentially expressed between well- and poorly differentiated nodules from *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers, linked to cell invasiveness, extracellular matrix remodeling, and immune response. Representative data from three mice per group are shown. (B) Enrichment plots showing the GSEA of the transcriptomic profiles of poorly differentiated nodules from *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers based on computational gene sets (C4). The enrichment dot plots shown correspond to the top two signatures in this gene set: "ECM and collagens" and "Immune (humoral) and inflammatory response" signatures. (C) The expression of genes associated with progenitor markers, EMT process, and TGFβ-related signaling was assessed by RT-qPCR on well- and poorly differentiated nodules from *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. Representative data from three mice per group, in three independent experiments, are shown. ****$P < 0.0001$; error bars represent the SD. (D) The expression of progenitor and hepatocyte differentiation markers was assessed by IHC staining for HNF4α and SOX9 and *in situ* hybridization for *Afp RNA* in poorly (Poorly Diff Tum) and well-differentiated (Diff Tum) tumor nodules from *Lect2*$^{-/-}$ HCC. Scale bars: 100 μm. Representative data for nine mice are shown. (E) The expression of cell invasiveness and EMT markers was assessed by immunostaining and western blot. *Left panel*: IHC staining for N-cadherin and immunofluorescence staining for PECAM-1 phosphorylated-c-Met in poorly (Poorly Diff Tum) and well-differentiated (Diff Tum) tumor nodules from *Lect2*$^{-/-}$ HCC. Scale bars: 100 μm. Representative data for eight mice are shown. *Right panel*: Immunoblotting for SNAIL1, phosphorylated Smad2/3, and Smad2/3 in NL, well-differentiated tumors from HCC, well- and poorly differentiated from *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. γ-Tubulin was used as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates. Abbreviations: ES, enrichment score; FDR, false discovery rate; FWER, family-wise error rate; IHC, immunohistochemistry; NL, normal liver.

several F4/80-positive cells together with Gr1-positive cells and few T lymphocytes (β-TCR-positive cells) (Fig. 3A). These results prompted us to characterize in detail the myeloid F4/80-positive populations in *Lect2*-deficient HCC, as these immune cells are critical players in solid tumor development and progression.[23-25] FACS analysis revealed a stronger accumulation in both the number and proportion of F4/80$^+$CD11b$^+$ cells in *Lect2*-deficient HCC compared with Lect2-proficient HCC livers (Fig. 3B). Moreover, we found an increase in the proportion of cells expressing Ly6C marker among the F4/80$^+$CD11b$^+$ population of cells, defining these latter as inflammatory monocytes (Fig. 3B).

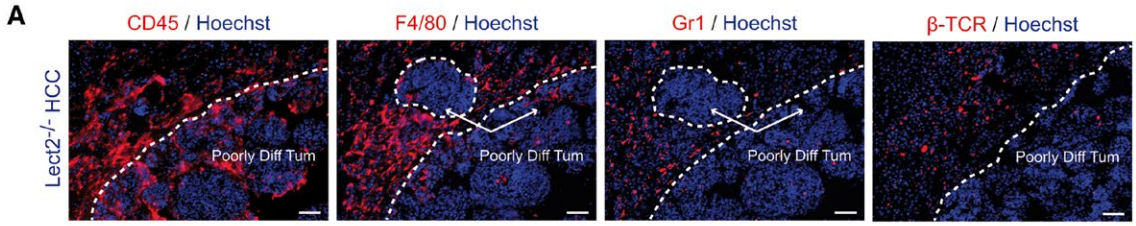
Furthermore, we investigated chemokines and chemokine receptors expression to determine whether the loss of *Lect2* modified chemotactic signals of the TME, favoring the attraction of inflammatory monocytes. We found that the major myeloid-related chemokines (*Ccl2*, *Ccl5*, *Cx3cl1*) were significantly higher in *Lect2*-deficient HCC compared with *Lect2*-proficient HCC (Fig. 3C). Chemokine/growth factor receptors (*Ccr2*, *Csf1r*, *Cx3cr1*) were highly expressed by the inflammatory monocytes infiltrating *Lect2*-deficient HCC (Fig. 3D).

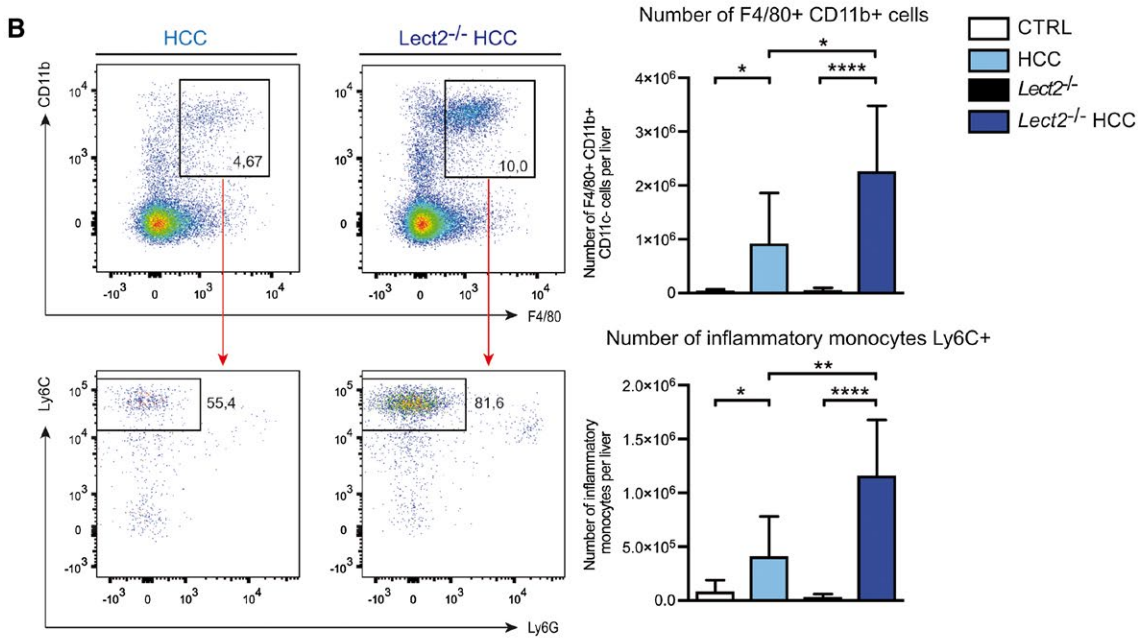
Our data showed an amplification of inflammatory monocytes in *Lect2*-deficient HCC that might be recruited in response to chemotactic signals secreted by *Lect2*-deficient HCC cells.

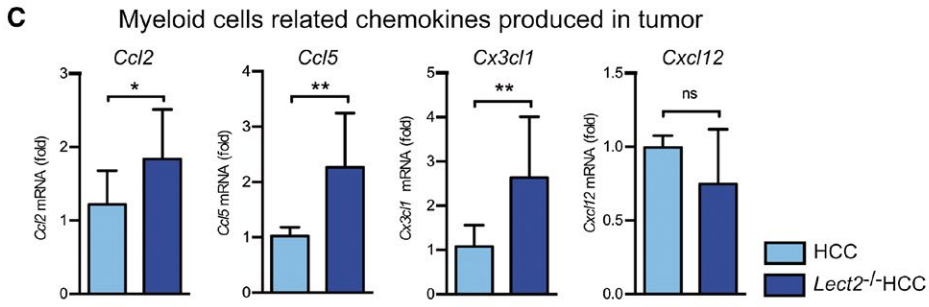
THE INFLAMMATORY MONOCYTES INFILTRATING LECT2-DEFICIENT HCC HARBOR AN IMMATURE PHENOTYPE WITH IMMUNOSUPPRESSIVE CAPACITIES AND TUMOR-PROMOTING POTENTIAL

Myeloid cells have been reported to act as pejorative immunosuppressive agents in many solid tumors and have been associated with poor patient outcome.[23-25] We thus characterized the inflammatory monocytes infiltrating *Lect2*-deficient HCC. We found that both the percentage and the relative expression level of several maturation markers (MHC II, CD1d, and the costimulatory molecule CD86) were lower in inflammatory monocytes from *Lect2*-deficient HCC compared with *Lect2*-proficient HCC (Fig. 4A). Interestingly, we monitored the expression of CD209a, recently shown as a functional receptor for LECT2,[26] and found that it was expressed by the inflammatory monocytes (Fig. 4B).

We assessed their immunosuppressive equipment by RT-qPCR analyses on cell-sorted inflammatory monocytes. In the absence of *Lect2*, inflammatory monocytes drastically up-regulated expression of *Arg1*, *S100a8/S100a9*, and *IL-10*, but no significant difference was observed for *Nos2* (Fig. 4C). We then tested functionally their suppressive potential against naïve


A
CD45 / Hoechst
F4/80 / Hoechst
Gr1 / Hoechst
β-TCR / Hoechst
Lect2-/- HCC
Poorly Diff Tum
Poorly Diff Tum
Poorly Diff Tum
Poorly Diff Tum


B
HCC
Lect2-/- HCC
CD11b
4,67
10,0
F4/80
Ly6C
55,4
81,6
Ly6G
Number of F4/80+ CD11b+ cells
Number of F4/80+ CD11b+ CD11c- cells per liver
Number of inflammatory monocytes Ly6C+
Number of inflammatory monocytes per liver
CTRL
HCC
Lect2-/-
Lect2-/- HCC


C
Myeloid cells related chemokines produced in tumor
Ccl2
Ccl5
Cx3cl1
Cxcl12
Ccl2 mRNA (fold)
Ccl5 mRNA (fold)
Cx3cl1 mRNA (fold)
Cxcl12 mRNA (fold)
ns
HCC
Lect2-/-HCC

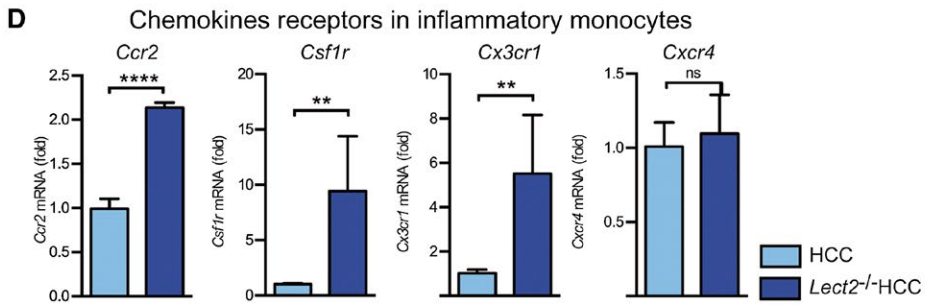

D
Chemokines receptors in inflammatory monocytes
Ccr2
Csf1r
Cx3cr1
Cxcr4
Ccr2 mRNA (fold)
Csf1r mRNA (fold)
Cx3cr1 mRNA (fold)
Cxcr4 mRNA (fold)
ns
HCC
Lect2-/-HCC

FIG. 3. Loss of Lect2 fosters the amplification of inflammatory monocytes in HCC. (A) Representative immunofluorescence staining for CD45, F4/80, Gr1, and β-TCR on cryosections in the surroundings of poorly differentiated tumor (Poorly Diff Tum) in *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. Scale bars: 100 μm. (B) NPCs were isolated from HCC and *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. Dead cells and doublets were excluded, and the remaining CD45^{+} cells were analyzed by flow cytometry for the expression of CD11c. CD11c negative cells were further analyzed for F4/80 and CD11b expression (*upper panel*). The F4/80^{+} CD11b^{+} fraction was segregated on the basis of Ly6C and Ly6G expression, defining a population of CD11c^{-} F4/80^{+} CD11b^{+} Ly6Chi Ly6G^{-} cells corresponding to inflammatory monocytes (*lower panel*). The percentages of cells found in each of the specified gates are indicated. Absolute numbers of CD11c^{-} F4/80^{+} CD11b^{+} cells (*upper panel*) and inflammatory monocytes (*lower panel*) in *Lect2*$^{-/-}$ HCC, HCC, *Lect2*$^{-/-}$, and CTRL livers. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; *****P* < 0.0001; error bars represent the SD. The data shown are representative of three independent experiments with three mice per group. (C) The expression of genes associated with myeloid cell chemotaxis was assessed by RT-qPCR in HCC and *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. The data shown are representative of three independent experiments with three mice per group. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; error bars represent the SD. (D) The expression of genes associated with chemokine receptors was assessed by RT-qPCR in inflammatory monocytes sorted from HCC and *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. The data shown are representative of two independent experiments with three mice per group. ***P* < 0.01; *****P* < 0.0001; error bars represent the SD. Abbreviations: CTRL, control; ns, nonsignificant.

T cells. Interestingly, inflammatory monocytes from *Lect2*-deficient HCC were able to impair the naïve T-cell proliferation triggered by specific anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, whereas inflammatory monocytes isolated from *Lect2*-proficient HCC failed to do so (Fig. 4D).

We next evaluated the tumor-promoting potential of inflammatory monocytes isolated from *Lect2*-deficient HCC by studying their genetic program by microarray analysis (Fig. 5A; Supporting Fig. S3). GSEA highlighted significant enrichment in signatures linked to TGFβ and Vegf-A signaling as well as ECM and collagen (Fig. 5B). Accordingly, we found by RT-qPCR analysis a strong upregulation of *Vegfa*, *Mmp9*, and *Thbs1*, which have been widely studied as major players in extracellular matrix remodeling and angiogenesis (Fig. 5C). We then characterized their polarization status through expression of several cytokines and transcription factors. We observed a higher expression of both M1 (*Il1β*, *Il6, Stat5a*) and M2-like factors (*Tgfβ1, Stat3*, *Ym1*) in inflammatory monocytes of *Lect2*-deficient HCC (Fig. 5C).

Finally, we benefited from our preneoplastic Apc^{LKO} model that mimics the early steps of β-catenin-induced tumorigenesis (see Anson et al.[16] and Material and Methods). We found that the inflammatory monocyte population was also increased in Apc^{LKO} and significantly more in liver of Apc^{LKO} deficient in *Lect2* (Fig. 6A). However, the inflammatory monocytes isolated from liver of *Lect2*-deficient Apc^{LKO} mice did not exhibit a drastic difference in terms of maturation markers and were not endowed with strong immunosuppressive equipment (Fig. 6B,C). To confirm the role of the chemokines Ccl2 and Ccl5 identified in *Lect2*-deficient HCC for the recruitment of inflammatory monocytes, we used specific neutralizing antibodies in our Apc^{LKO} mice. FACS analysis revealed that both the proportion and the number of inflammatory monocytes were significantly reduced when blocking antibodies were injected in Apc^{LKO} mice (Fig. 6D,E).

Collectively, these data evidenced that Lect2 shapes the HCC immune microenvironment with a recruitment of immature inflammatory monocytes harboring immunosuppressive properties and tumor-promoting potential.

LECT2 DISPLAYS DUAL FUNCTIONS TO CONTROL AN EMT PROGRAM IN B-CATENIN-ACTIVATED HEPATOCYTES

Finally, according to the poorly differentiated tumor phenotype seen in the *Lect2*-deficient Lpk-myc mice, we investigated whether Lect2 could affect the EMT response of the tumor cells. EMT response was analyzed *in vitro* by measuring *Zeb1*, *Snail1*, and *Tgfβ1* levels after Tgfb1 treatment of primary hepatocyte cultures isolated from *Lect2*-proficient and -deficient Apc^{LKO} mice (Fig. 7A). Strikingly, the EMT response was significantly higher in *Lect2*-deficient compared with Lect2-proficient hepatocytes in response to Tgfb1 stimulation (Fig. 7B). Of note, Tgfb1-induced EMT response was not different between *Lect2*-deficient and WT primary hepatocytes, showing that Lect2 did not impact the Tgfb1-dependent EMT response without beta-catenin-activated condition (Supporting Fig. 4A,B). These results suggested that *Lect2,* in a cell autonomous manner, kept down the EMT response in

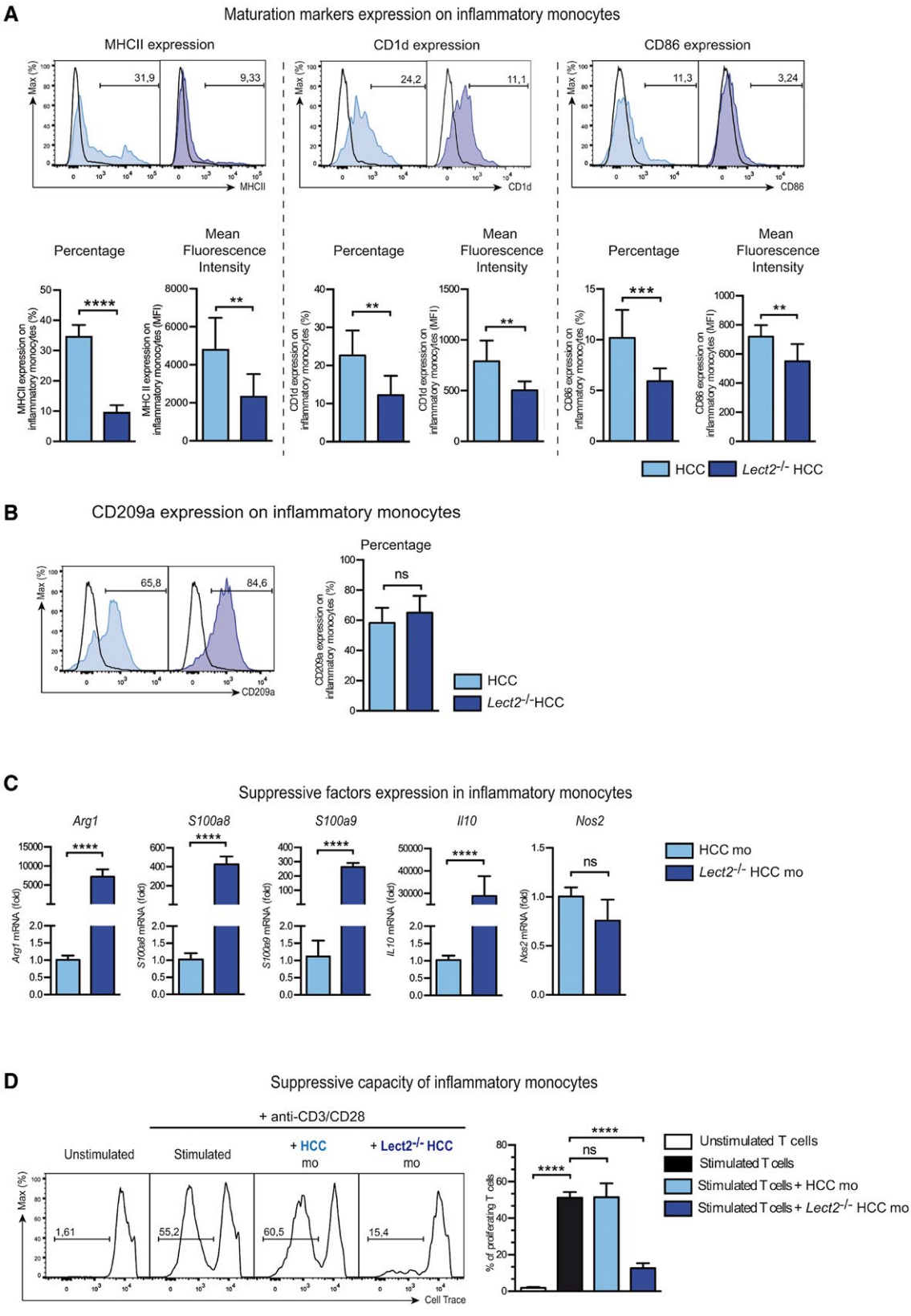

A
Maturation markers expression on inflammatory monocytes
MHCII expression
CD1d expression
CD86 expression
31,9
9,33
24,2
11,1
11,3
3,24
Max (%)
MHCII
CD1d
CD86
Percentage
Mean Fluorescence Intensity
MHCII expression on inflammatory monocytes (%)
MHC II expression on inflammatory monocytes (MFI)
CD1d expression on inflammatory monocytes (%)
CD1d expression on inflammatory monocytes (MFI)
CD86 expression on inflammatory monocytes (%)
CD86 expression on inflammatory monocytes (MFI)
HCC
Lect2-/- HCC
B
CD209a expression on inflammatory monocytes
65,8
84,6
CD209a
Percentage
CD209a expression on inflammatory monocytes (%)
ns
HCC
Lect2-/-HCC
C
Suppressive factors expression in inflammatory monocytes
Arg1
S100a8
S100a9
Il10
Nos2
Arg1 mRNA (fold)
S100a8 mRNA (fold)
S100a9 mRNA (fold)
IL10 mRNA (fold)
Nos2 mRNA (fold)
HCC mo
Lect2-/- HCC mo
D
Suppressive capacity of inflammatory monocytes
+ anti-CD3/CD28
Unstimulated
Stimulated
+ HCC mo
+ Lect2-/- HCC mo
1,61
55,2
60,5
15,4
Cell Trace
% of proliferating T cells
Unstimulated T cells
Stimulated T cells
Stimulated T cells + HCC mo
Stimulated T cells + Lect2-/- HCC mo

FIG. 4. The inflammatory monocytes infiltrating Lect2-deficient HCC have an immature phenotype with immunosuppressive capacities. (A) The expression of MHCII (*left panel*), CD1d (*middle panel*), and CD86 (*left panel*) was assessed by flow cytometry. FACS profiles, percentages, and the mean fluorescence intensity of the corresponding maturation marker gated on the inflammatory monocyte fraction of *Lect2*$^{-/-}$ HCC (*dark blue profiles*) and HCC (*light blue profiles*) livers are represented. The numbers shown indicate the proportion of cells positive for this marker relative to isotype-matched antibodies (*black profiles*). Representative data for three independent experiments with three mice/group are shown. (B) Pattern of CD209a expression on inflammatory monocytes infiltrating HCC (*light blue profiles*) and *Lect2*$^{-/-}$ HCC (*dark blue profiles*) livers, was assessed by flow cytometry. FACS profiles and percentages of CD209a gated on the inflammatory monocyte fraction are shown. The numbers indicate the mean of proportion of cells expressing CD209a relative to the isotype-matched antibodies (*black profiles*). The data shown are representative of three independent experiments with three mice per group. Error bars represent the SD. (C) The expression of genes associated with immunosuppressive mediators was assessed by RT-qPCR in inflammatory monocytes sorted from HCC and *Lect2*$^{-/-}$ HCC liver tumors. Representative data for two independent experiments with three mice per group are shown. **P* < 0.05; *****P* < 0.0001; error bars represent the SD. (D) *Left panel:* The inflammatory monocytes were sorted from HCC and *Lect2*$^{-/-}$ HCC liver tumors and cultured together with CTV-labeled T cells sorted from WT mice spleen and stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. After 4 days of culture, proliferation was assessed by CTV dilution. The percentages of dividing cells are indicated for each set of conditions. *Right panel*: Quantification of naïve T-cell proliferation. The data shown are representative of three independent experiments with three mice per group. *****P* < 0.0001; error bars represent the SD. Abbreviation: ns, nonsignificant.

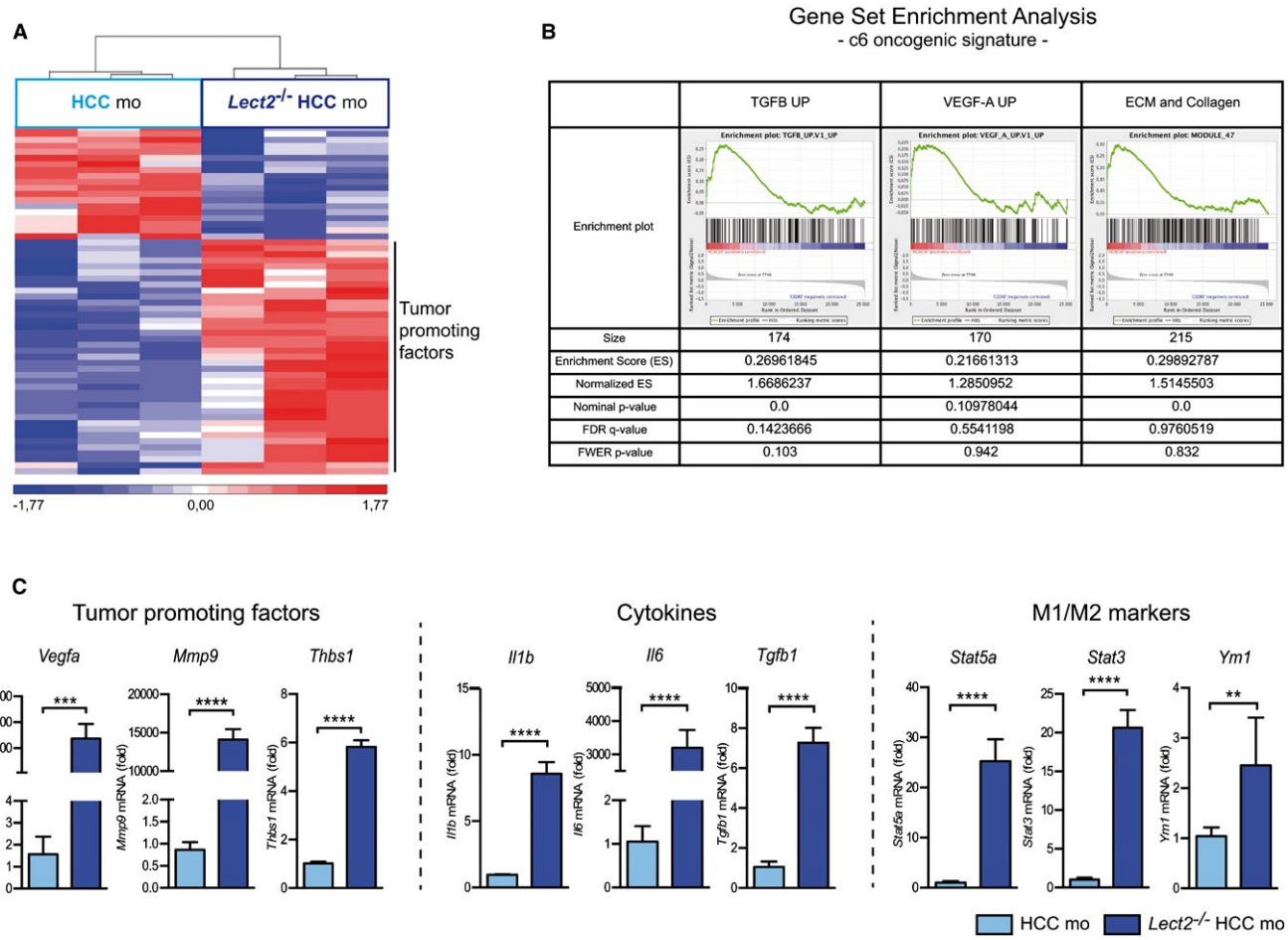


FIG. 5. The inflammatory monocytes infiltrating Lect2-deficient HCC have an immature phenotype with tumor-promoting potential. (A) The heat map shows the genes differentially expressed between inflammatory monocytes isolated from HCC and HCC and *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. The data shown are representative of three independent experiments of three mice per group. (B) Enrichment plots showing GSEA for the transcriptomic profiles of inflammatory monocytes isolated from *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers, based on the oncogenic signature (C6). *Lect2*$^{-/-}$ HCC inflammatory monocytes are enriched in TGFβ, VEGFA ECM/collagen signatures. (C) The expression of genes encoding tumor-promoting factors, cytokines, and M1/M2 markers was assessed by RT-qPCR in inflammatory monocytes isolated from HCC and *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers. All data are representative of two independent experiments with three mice per group. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001; error bars represent the SD. Abbreviations: ES, enrichment score; FDR, false discovery rate; FWER, family-wise error rate.

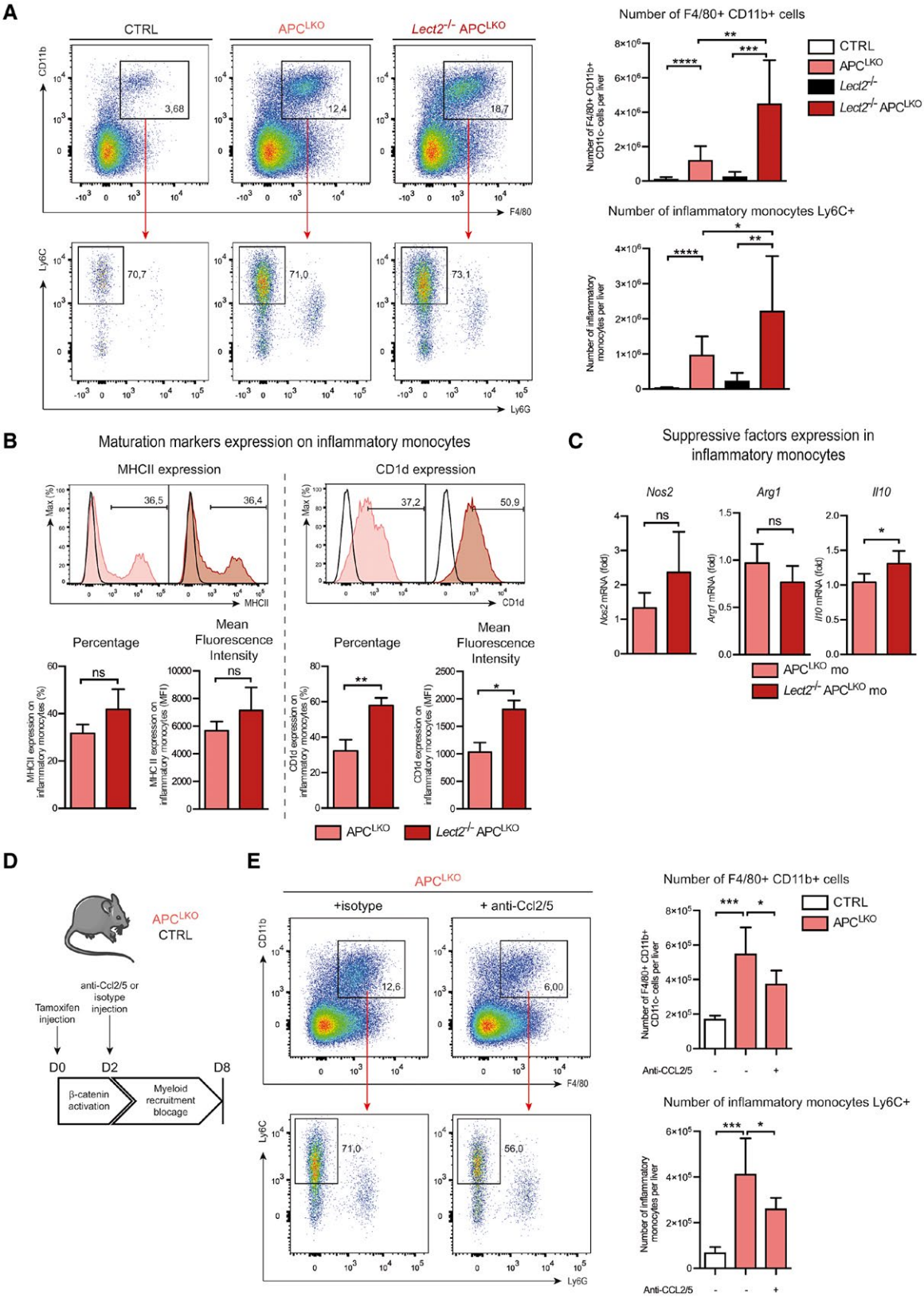

A
CTRL
APC^LKO
Lect2^-/- APC^LKO
CD11b
F4/80
Ly6C
Ly6G
3,68
12,4
18,7
70,7
71,0
73,1
Number of F4/80+ CD11b+ cells
Number of F4/80+ CD11b+ CD11c- cells per liver
CTRL
APC^LKO
Lect2^-/-
Lect2^-/- APC^LKO
Number of inflammatory monocytes Ly6C+
Number of inflammatory monocytes per liver
B
Maturation markers expression on inflammatory monocytes
MHCII expression
CD1d expression
Max (%)
36,5
36,4
37,2
50,9
MHCII
CD1d
Percentage
Mean Fluorescence Intensity
ns
MHCII expression on inflammatory monocytes (%)
MHC II expression on inflammatory monocytes (MFI)
CD1d expression on inflammatory monocytes (%)
CD1d expression on inflammatory monocytes (MFI)
APC^LKO
Lect2^-/- APC^LKO
C
Suppressive factors expression in inflammatory monocytes
Nos2
Arg1
Il10
Nos2 mRNA (fold)
Arg1 mRNA (fold)
Il10 mRNA (fold)
APC^LKO mo
Lect2^-/- APC^LKO mo
D
APC^LKO
CTRL
anti-Ccl2/5 or isotype injection
Tamoxifen injection
D0
D2
D8
β-catenin activation
Myeloid recruitment blocage
E
APC^LKO
+isotype
+ anti-Ccl2/5
12,6
6,00
71,0
56,0
Number of F4/80+ CD11b+ cells
Anti-CCL2/5
Number of inflammatory monocytes Ly6C+

FIG. 6. Inflammatory monocytes infiltrating livers at the initiation step of liver tumorigenesis harbor a different phenotype in the absence of Lect2. (A) NPCs were isolated from *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO}, APC^{LKO}, *Lect2*$^{-/-}$, and CTRL livers. *Left panel:* The same gating strategy as in HCC livers was used to monitor the proportion of inflammatory monocytes. The percentages of cells found in each of the specified gates are indicated. *Right panel:* Absolute number of CD11c^{-} F4/80^{+} CD11b^{+} cells and inflammatory monocytes in *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO}, APC^{LKO}, *Lect2*$^{-/-}$, and CTRL livers. The data shown are representative of three independent experiments with three mice per group. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001. Error bars represent the SD. (B) The expression of MHCII (*left panel*) and CD1d (*right panel*) was assessed by flow cytometry. FACS profiles, percentages, and mean fluorescence intensities for the corresponding maturation marker gated on the inflammatory monocyte fraction from APC^{LKO} (*light red profiles*) and *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO} (*dark red profiles*) livers are shown. The numbers indicate the proportion of cells positive for this marker relative to isotype-matched antibodies (*black profiles*). (C) The expression of genes encoding immunosuppressive mediators was assessed by RT-qPCR in NPCs isolated from APC^{LKO} and *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO} livers. The data shown are representative of three independent samples per condition. **P* < 0.05; error bars represent the SD. (D) Protocol for Ccl2 and Ccl5 blockade. Tamoxifen was injected into APC^{LKO} mice, which were then treated, 2 days later, with a single injection of a cocktail of anti-Ccl2 and anti-Ccl5 antibodies or IgG isotype-matched antibodies. Mice were killed 8 days after tamoxifen injection. (E) NPCs were isolated from APC^{LKO} mice treated with anti-Ccl2/anti-Ccl5 antibodies or IgG isotype antibody. The same gating strategy was applied to monitor F4/80^{+} CD11b^{+} cells and inflammatory monocytes. The percentages of cells found in each of the specified gates are indicated. Absolute numbers of CD11c^{-} F4/80^{+} CD11b^{+} cells and inflammatory monocytes in APC^{LKO} livers from mice treated with anti-Ccl2/anti-Ccl5 antibodies or IgG isotype antibody. The data shown are representative of three independent experiments with three mice per group. **P* < 0.05; ****P* < 0.001. Error bars represent the SD. Abbreviations: CTRL, control; ns, nonsignificant.

β-catenin-activated hepatocytes. Because the inflammatory compartment can also control EMT in tumor cells, we further investigated the role of Lect2 in this phenomenon. Coculture experiments were used to test the ability of the inflammatory monocytes isolated from both deficient- and proficient-*Lect2* HCC to induce EMT program on beta-catenin-activated hepatocytes (Fig. 7C). Interestingly, inflammatory monocytes isolated from *Lect2*-deficient HCC were able to induce EMT program on *Lect2*-deficient Apc^{LKO} hepatocytes, whereas inflammatory monocytes isolated from *Lect2*-proficient HCC failed to do so (Fig. 7D). These results showed that loss of *Lect2* conferred to the inflammatory monocytes the capacity to induce epithelial EMT in Lect2-deficient beta-catenin-activated hepatocytes.

Altogether, these findings showed that Lect2 curtailed EMT process in β-catenin-activated HCC by impacting both on the tumor cells and the immune microenvironment.

Discussion

HCC is a life-threatening disease for which current treatments are largely ineffective.[27] Therefore, there is an urgent need to develop new strategies for treating liver cancer. The extensive development of immunotherapy and the objective clinical results obtained with other tumor types[28] suggest that manipulation of the immune system should be considered a valuable treatment for HCC.[29] We previously identified the chemokine-like Lect2 in dialogue with liver natural killer T cells as a key actor that controls HCC tumor aggressiveness of β-catenin-activated HCC.[16] Here, we further explored the role of Lect2 *per se* and found that it could constitute a pertinent immune target for HCC treatment. In our cohort of patients with HCC, we demonstrated that the level of *LECT2* inversely correlated with tumor grade and the presence of inflammatory infiltrates regardless of the *CTNNB1* mutational status. Using dedicated β-catenin-activated HCC model, we showed that Lect2 controls the tumor progression by targeting both the hepatic immune microenvironment and tumoral hepatocytes. Indeed, we evidenced that Lect2 prevents the recruitment and the acquisition of immunosuppressive properties and EMT induction capacities of inflammatory monocytes. Moreover, we showed that Lect2 has the ability to keep down the EMT response in beta-catenin-activated hepatocytes. Thus, our results demonstrate that loss of Lect2 fosters a permissive immune microenvironment highly abundant in inflammatory monocytes able to sustain tumor growth and progression (Fig. 8).

Interestingly, in most solid tumors, myeloid cells have been demonstrated as the major part of the immune cell infiltrates.[30] They support chronic inflammation, which is carcinogenic in itself, suppress anticancer immune responses, sustain tumor growth by neo-angiogenesis, and contribute to form niches that enable metastasis.[31,32] The significance

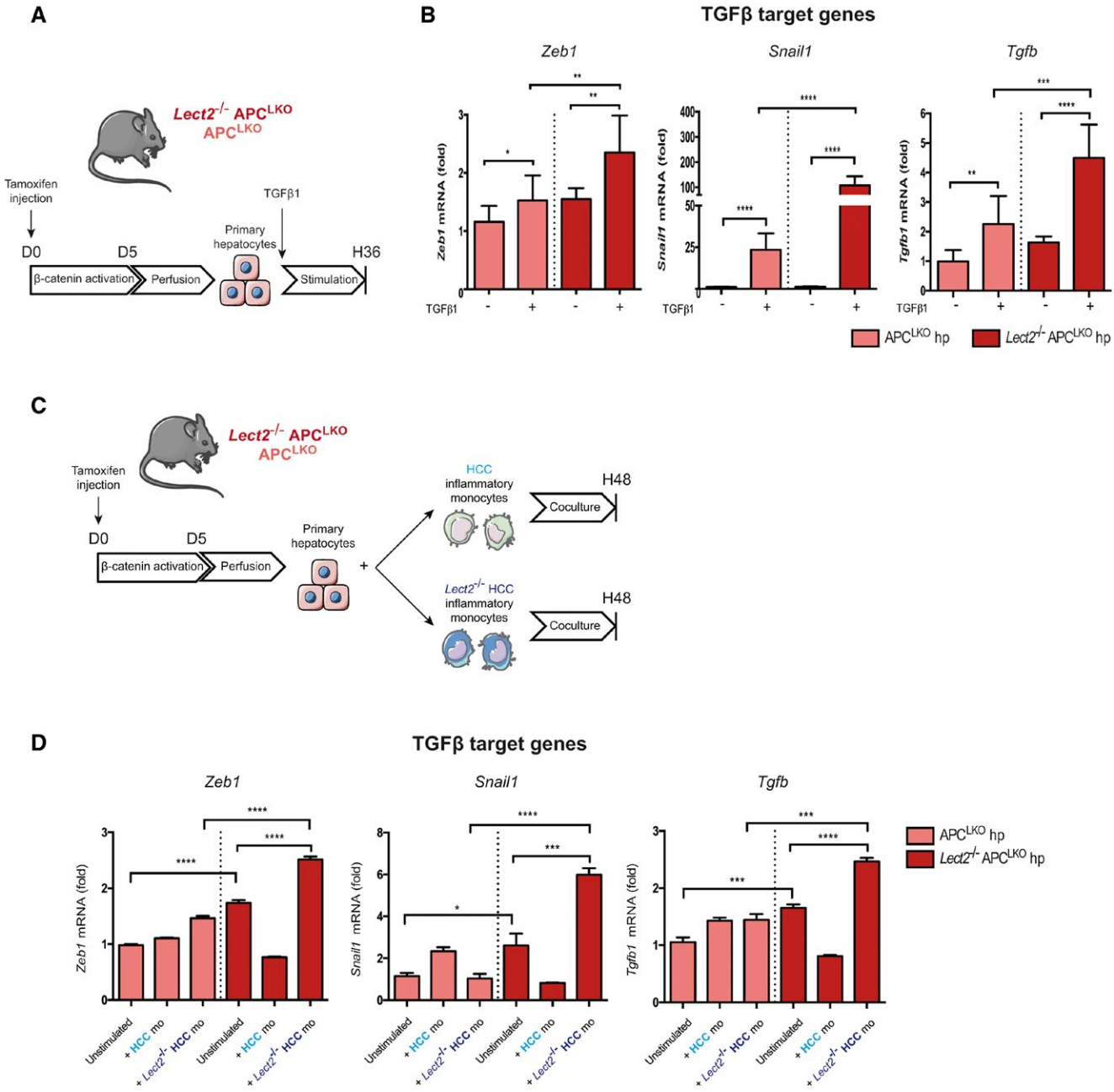


FIG. 7. Inflammatory monocytes infiltrating LECT2-deficient HCC livers are cellular actors inducing EMT in β-catenin-activated hepatocytes. (A) Protocol for culture experiments of primary hepatocytes stimulated with TGFβ1. Tamoxifen was injected to *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO}, APC^{LKO} mice. Primary hepatocytes were isolated 5 days after tamoxifen injection and stimulated with TGFβ1 for 36 hours. (B) The expression of TGFβ target genes was assessed by RT-qPCR in primary hepatocytes isolated from *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO}, APC^{LKO} livers and treated with TGFβ1 for 36 hours. (C) Protocol for coculture experiments of inflammatory monocytes with primary hepatocytes. Tamoxifen was injected to *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO} and APC^{LKO}. Primary hepatocytes were isolated 5 days after tamoxifen injection. Inflammatory monocytes were sorted from HCC or *Lect2*$^{-/-}$ HCC livers and incubated with primary hepatocytes for 48 hours. (D) The expression of TGFβ target genes was assessed by RT-qPCR in primary hepatocytes isolated from *Lect2*$^{-/-}$ APC^{LKO} and APC^{LKO} livers and cocultured for 48 hours with inflammatory monocytes isolated from *Lect2*$^{-/-}$ HCC and HCC livers. All data are representative of three independent experiments, with three mice per group for hepatocytes and six mice per group for inflammatory monocyte pools. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; $^{****}P < 0.0001$; error bars represent the SD.

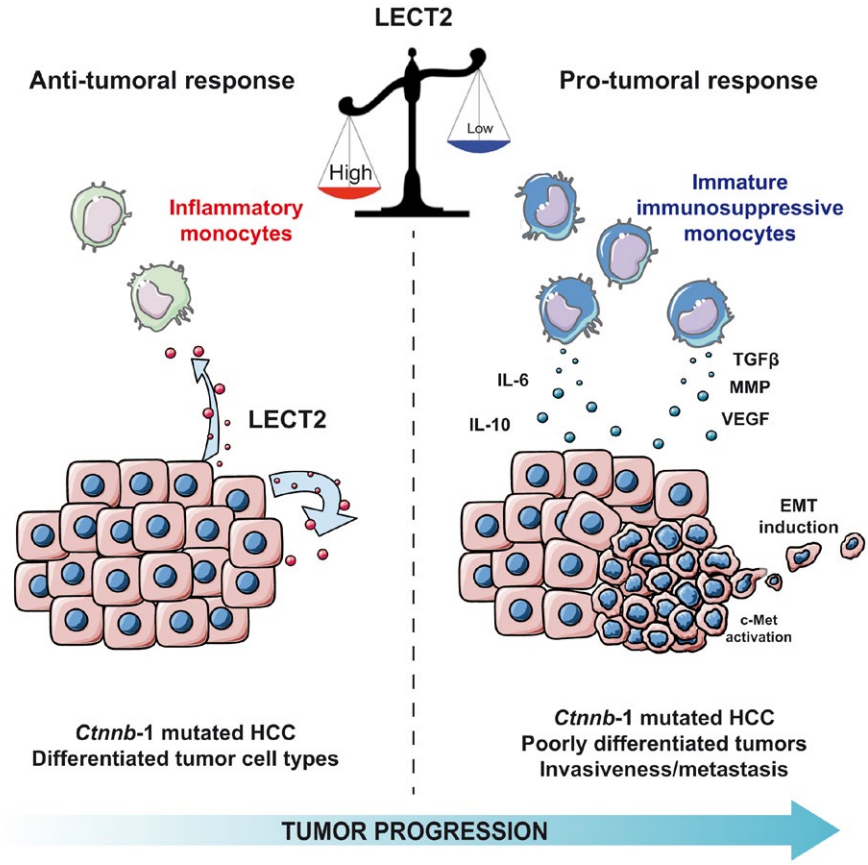


FIG. 8. Graphical abstract illustrating the modifications of the immune microenvironment during liver tumorigenesis according to the level of expression of Lect2.

of macrophage infiltration of tumors is frequently demonstrated by its evaluation as a prognostic marker. In human liver tumorigenesis, their presence is consistently associated with a poor HCC prognosis.[23,24,33] Here, we extended these data and found that the loss of Lect2 polarizes inflammatory monocytes into immunosuppressive players able to provoke EMT in beta-catenin-activated hepatocytes. We identified that these cells express several factors known to act in synergy in cell differentiation, EMT, and metastasis, such as TGFβ and IL-6.[34,35] These observations are supported by recent findings demonstrating the involvement of IL6 derived from tumor-associated macrophages in the promotion of human HCC.[36] Beyond the previously used M1/M2-based dichotomy, which *per se* cannot accurately recapitulate the phenotype and function of macrophages seen *in vivo*,[37,38] our data revealed that Lect2 regulates the cytokine secretion profiles of inflammatory monocytes that in turn conditioned tumor hepatocyte fate.

The important finding of our work is that Lect2 harbors both cell-autonomous and extrinsic properties during β-catenin-induced HCC. Indeed, the expression of EMT markers that we characterized in the poorly differentiated HCC developed in *Lect2*-deficient mice resulted from signals of the inflammatory compartment but also from the removal of an intrinsic brake controlled by Lect2 in the tumor cells. Based on this dual ability and based on the fact that EMT is connected to a pejorative tumorigenesis with drug resistance and immunosuppression, we defined Lect2 as a crucial actor that prevents tumor aggressiveness. In a recent study using HuH7 cell line, LECT2 was found to bind to c-Met receptor, turning off its signaling.[39] Our study corroborates these findings, as we found an activation of c-Met signaling in the

poorly differentiated nodules of *Lect2*-deficient HCC livers but not in differentiated ones, emphasizing the complexity of Lect2 signaling in liver tumorigenesis. Therefore, how Lect2 impacts on hepatocyte is still an open question and remains to be investigated.

Recent data showed that LECT2 could be involved in vascular invasion in xenograft models[40] and an HCC cohort of Asian patients.[41] Our work supports these findings further, as we observed in both inflammatory monocytes and poorly differentiated structures in *Lect2*-deficient HCC an up-regulation of genes involved in angiogenesis/vascular remodeling. Moreover, we provided evidence that inflammatory monocytes from *Lect2*-deficient HCC livers expressed a high level of VEGFA. Collectively, our findings revealed that Lect2 curtailed EMT and angiogenesis processes in β-catenin-activated HCC by impacting both on the tumor cells and the immune microenvironment.

Finally, our work raises questions about HCC treatment to control the effects of infiltrating myeloid cells on HCC tumor cells. In terms of targeting myeloid cells during tumorigenesis, several approaches have been investigated, mostly in murine preclinical models, with various degrees of success depending on the tumor types and vascularization through the blockade of their recruitment or function.[42] Few clinical trials have been carried out on solid tumors in humans, but no data are currently available for human liver cancer. Targeting of these cells during liver tumorigenesis represents a future challenge. The re-education of myeloid cells in the tumor is currently considered a very promising approach.[43] It consists in the reprogramming of inflammatory monocytes/macrophages to limit their pro-tumoral potential. In this context, strategies designed to reintroduce Lect2 in preclinical HCC models could be interesting and should be tested.

Impacting on the crosstalk between tumor cells and inflammatory monocytes represents an important challenge to be met, as it would greatly attenuate liver tumor aggressiveness. In this context, LECT2 appears to be a promising immunotherapeutic option for the treatment of HCC.

Acknowledgments: We thank the core facilities of the Institut Cochin, INSERM U1016 UMR CNRS8104, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot; Dr. Agnès Lebon and Ms. Nadia Boussetta for mice breeding and genotyping; Dr. Sandrine Henry for her critical expertise on cell-sorting of myeloid cells from the liver; Dr. Delphine Javelaud for EMT study; Maryline Favier and Cécile Godard for their technical and scientific expertise in histological studies; Emmanuelle Maillard, Karine Bailly, and Muriel Andrieu for their strong help in flow cytometry and cell-sorting; Florent Dumont, Franck Letourneur, and Sébastien Jacques for genomic studies, Dr. Angélique Gougelet and Dr. Sabine Colnot for their expertise and critical reading of the manuscript; and Dr. Christine Perret for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1) Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. Nat Rev Dis Primers 2016;2:16018.
2) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015;136:E359-E386.
3) Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. J Hepatol 2008;48(Suppl. 1):S20-S37.
4) Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2008;68:6779-6788.
5) Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 2017;389:56-66.
6) Nault JC, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation. J Hepatol 2014;60:224-226.
7) Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L, Balabaud C, Zafrani ES, Bioulac-Sage P, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. Hepatology 2014;60:1983-1992.
8) Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell 2010;140:883-899.
9) Finkin S, Yuan D, Stein I, Taniguchi K, Weber A, Unger K, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. Nat Immunol 2015;16:1235-1244.
10) Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8(+) T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. Cancer Cell 2014;26:549-564.
11) He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. Cell Res 2011;21:159–168.
12) Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell 2012;21:309-322.
13) Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. Nature 2011;479:547-551.

14) Mohs A, Kuttkat N, Reissing J, Zimmermann HW, Sonntag R, Proudfoot A, et al. Functional role of CCL5/RANTES for HCC progression during chronic liver disease. J Hepatol 2017;66:743-753.
15) Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, et al. Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression. Cancer Cell 2016;30:533-547.
16) Anson M, Crain-Denoyelle AM, Baud V, Chereau F, Gougelet A, Terris B, et al. Oncogenic beta-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. J Clin Invest 2012;122:586-599.
17) de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:8847-8851.
18) Saito T, Okumura A, Watanabe H, Asano M, Ishida-Okawara A, Sakagami J, et al. Increase in hepatic NKT cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-deficient mice contributes to severe concanavalin A-induced hepatitis. J Immunol 2004;173:579-585.
19) Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev Cell 2006;10:759-770.
20) Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:17216-17221.
21) Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology 2007;45:42-52.
22) Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouze E, Blanc JF, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. J Hepatol 2017;67:727-738.
23) Dong P, Ma L, Liu L, Zhao G, Zhang S, Dong L, et al. CD86(+)/CD206(+), diametrically polarized tumor-associated macrophages, predict hepatocellular carcinoma patient prognosis. Int J Mol Sci 2016;17:320.
24) Ding T, Xu J, Wang F, Shi M, Zhang Y, Li SP, et al. High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. Hum Pathol 2009;40:381-389.
25) Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 2009;9:162-174.
26) Lu XJ, Chen J, Yu CH, Shi YH, He YQ, Zhang RC, et al. LECT2 protects mice against bacterial sepsis by activating macrophages via the CD209a receptor. J Exp Med 2013;210:5-13.
27) Giannini EG, Farinati F, Ciccarese F, Pecorelli A, Rapaccini GL, Di Marco M, et al. Prognosis of untreated hepatocellular carcinoma. Hepatology 2015;61:184-190.
28) Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med 2010;363:711-723.
29) Prieto J, Melero I, Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2015;12:681-700.
30) Elliott LA, Doherty GA, Sheahan K, Ryan EJ. Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity. Front Immunol 2017;8:86.
31) Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. Nat Rev Cancer 2013;13:759-771.
32) Marelli G, Sica A, Vannucci L, Allavena P. Inflammation as target in cancer therapy. Curr Opin Pharmacol 2017;35:57-65.
33) Kapanadze T, Gamrekelashvili J, Ma C, Chan C, Zhao F, Hewitt S, et al. Regulation of accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in different murine models of hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2013;59:1007-1013.
34) Dubois-Pot-Schneider H, Fekir K, Coulouarn C, Glaise D, Aninat C, Jarnouen K, et al. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. Hepatology 2014;60:2077-2090.
35) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. Cell 2013;155:384-396.
36) Wan S, Zhao E, Kryczek I, Vatan L, Sadovskaya A, Ludema G, et al. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells. Gastroenterology 2014;147:1393-1404.
37) Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. Immunity 2016;44:439-449.
38) Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol 2012;12:253-268.
39) Chen CK, Yang CY, Hua KT, Ho MC, Johansson G, Jeng YM, et al. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 antagonizes MET receptor activation to suppress hepatocellular carcinoma vascular invasion by protein tyrosine phosphatase 1B recruitment. Hepatology 2014;59:974-985.
40) Chen CK, Yu WH, Cheng TY, Chen MW, Su CY, Yang YC, et al. Inhibition of VEGF165/VEGFR2-dependent signaling by LECT2 suppresses hepatocellular carcinoma angiogenesis. Sci Rep 2016;6:31398.
41) Ong HT, Tan PK, Wang SM, Hian Low DT, Ooi LL, Hui KM. The tumor suppressor function of LECT2 in human hepatocellular carcinoma makes it a potential therapeutic target. Cancer Gene Ther 2011;18:399-406.
42) Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. Cancer. Immunol Res 2017;5:3-8.
43) Schupp J, Krebs FK, Zimmer N, Trzeciak E, Schuppan D, Tuettenberg A. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment. Cell Immunol 2017 Nov 2. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.10.013. [Epub ahead of print].

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30140/suppinfo.

OPEN ACCESS

ORIGINAL ARTICLE

Polyploidy spectrum: a new marker in HCC classification

Myriam Bou-Nader,[1] Stefano Caruso,[2] Romain Donne,[1] Séverine Celton-Morizur,[1] Julien Calderaro,[3,4] Géraldine Gentric,[5,6] Mathilde Cadoux,[1] Antoine L'Hermitte,[7] Christophe Klein,[8] Thomas Guilbert,[9] Miguel Albuquerque,[10] Gabrielle Couchy,[2] Valérie Paradis,[11] Jean-Pierre Couty,[1] Jessica Zucman-Rossi,[2] Chantal Desdouets[1]

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318021).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Chantal Desdouets, Team Proliferation Stress and Liver Physiopathology, Genome and Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris 75006, France;
chantal.desdouets@inserm.fr

RD and SC-M contributed equally.
MB-N and SC contributed equally.

Received 29 November 2018
Revised 25 February 2019
Accepted 24 March 2019

Check for updates

© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Bou-Nader M, Caruso S, Donne R, *et al*. *Gut* Epub ahead of print: [*please include* Day Month Year]. doi:10.1136/gutjnl-2018-318021

ABSTRACT

Objectives Polyploidy is a fascinating characteristic of liver parenchyma. Hepatocyte polyploidy depends on the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy) and the number of nuclei per cell (cellular ploidy). Which role can be assigned to polyploidy during human hepatocellular carcinoma (HCC) development is still an open question. Here, we investigated whether a specific ploidy spectrum is associated with clinical and molecular features of HCC.

Design Ploidy spectra were determined on surgically resected tissues from patients with HCC as well as healthy control tissues. To define ploidy profiles, a quantitative and qualitative in situ imaging approach was used on paraffin tissue liver sections.

Results We first demonstrated that polyploid hepatocytes are the major components of human liver parenchyma, polyploidy being mainly cellular (binuclear hepatocytes). Across liver lobules, polyploid hepatocytes do not exhibit a specific zonation pattern. During liver tumorigenesis, cellular ploidy is drastically reduced; binuclear polyploid hepatocytes are barely present in HCC tumours. Remarkably, nuclear ploidy is specifically amplified in HCC tumours. In fact, nuclear ploidy is amplified in HCCs harbouring a low degree of differentiation and *TP53* mutations. Finally, our results demonstrated that highly polyploid tumours are associated with a poor prognosis.

Conclusions Our results underline the importance of quantification of cellular and nuclear ploidy spectra during HCC tumorigenesis.

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Polyploidy, the existence of cells containing more than two homologous sets of chromosomes, is a well-known feature of mammalian hepatocytes.
- Polyploidy is defined on the basis of the DNA content of each nucleus (eg, 2n, 4n, 8n) called nuclear ploidy and on the number of nuclei per cell called cellular ploidy.
- The liver is the unique organ that modifies its ploidy content during normal homeostasis, regeneration and under damage insults.

What are the new findings?

- Binuclear polyploid hepatocytes are the major components of the polyploid fraction in normal human liver parenchyma.
- Quantification of cellular and nuclear ploidy is sufficient to distinguish between normal liver parenchyma and hepatocellular carcinoma (HCC).
- *TP53* mutation is a factor accounting for a higher percentage of mononuclear polyploid hepatocytes when compared with both *TERT* promoter and *CTNNB1* mutated HCC tumours.
- Highly polyploid HCC tumours are associated with worse prognosis.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- Quantification of cellular and nuclear ploidy spectra could be an accurate test for HCC prognosis.

INTRODUCTION

Polyploidy is the state in which cells contain additional sets of homologous chromosomes. In mammals, whole organism polyploidy is usually lethal; however, some tissues develop a certain degree of polyploidy.[1 2] Polyploid cells arise through a variety of cell division errors. Defects in mitosis and cytokinesis are thought to be the most common routes, however polyploid cells can also develop as a consequence of chromosome endoreplication (absence of karyogenesis), telomere erosion and oncogene activation.[1 3 4] Different studies have demonstrated a major role of 'diploid-polyploid conversion' during physiological processes (eg, embryogenesis, terminal differentiation) but also during pathological conditions (eg, mechanical, genotoxic or metabolic stress).[2 5 6] Alarmingly, proliferating polyploid cells have been demonstrated to be genetically unstable and could facilitate tumour development.[1 7] Accumulating evidence points to a significant contribution of polyploid intermediates in the shaping and the composition of cancer genomes. The majority of solid tumours exhibit polyploid or near polyploid karyotypes.[8 9]

Polyploidy is a defining feature of the liver.[2] Polyploid hepatocytes are characterised by the number of nuclei per cell named cellular ploidy (mononuclear/binuclear hepatocytes) as well as the ploidy of each nucleus named nuclear ploidy (diploid, tetraploid,

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

octoploid nucleus). In rodents, hepatocytes are mainly tetraploid (binuclear with two diploid nuclei or mononuclear with one tetraploid nucleus) and octoploid (binuclear with two tetraploid nuclei or mononuclear with one octoploid nucleus).[10] During postnatal development, a scheduled division programme characterised by cytokinesis failure results in the genesis of binuclear tetraploid hepatocytes, which subsequently play a pivotal role in liver polyploidisation.[11 12] This physiological polyploidisation is now considered as a form of liver maturation.[2 13] Different studies have demonstrated that hepatic polyploidy can be also modified under stress settings as metabolic overload, DNA damage and chemical-induced liver injury.[14–16] Recently, we identified a new mechanism regulating polyploidy during liver disease, where in the setting of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), nuclear ploidy is altered with the genesis of highly mononuclear polyploid hepatocytes.[17 18] We demonstrated that this pathological polyploidisation is promoted by endoreplication cycles.[17 18] Interestingly, endoreplication is now considered as an alternative division programme in a context of genomic stress.[3] It is important to note that a long-term consequence of switching to the polyploidisation mode during liver pathological growth is still under debate. Whether or not polyploidy is a risk factor or protective against human liver cancer is largely unknown.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most deadly cancers worldwide and has no effective treatment.[19] More than 90% of HCCs in western countries develop on a cirrhotic background as a result of chronic HBV or HCV infection, high alcohol intake, haemochromatosis or NAFLD. A better understanding of the early events of liver carcinogenesis will help outline the pathogenesis of the disease, and improve diagnostic procedures and curative treatment. In this study, we aimed to determine whether polyploid spectrum could constitute a potent prognostic marker of human HCC.

RESULTS

Hepatocytes become polyploid with no specific zonation in human liver parenchyma

Polyploid hepatocytes have been extensively characterised and recent studies in mouse models have defined their implication in liver homeostasis.[2 5 13] Data on human hepatic polyploidisation are more limited. In this study, we first investigated whether human liver polyploidy originates from the accumulation of binuclear polyploid hepatocytes and/or the accumulation of mononuclear polyploid hepatocytes. Labelling of nuclear (Hoechst) and plasma membrane (β-catenin/KL1) compartments was performed to investigate cellular ploidy (mononuclear/binuclear fraction) (figure 1A). As previously described, nuclear ploidy was determined by measuring the nucleus area.[18 20 21] Using a specific imaging program, we assigned a colour code to each nuclei contingent (2n, purple; 4n, green; ≥8n, red), allowing a better visualisation of nuclei within the liver parenchyma (figure 1B). First, we analysed the global ploidy distribution (cellular/nuclear) in normal human liver samples (n=13) (table 1). The fractions of 2n, 4n (binuclear 2×2n, mononuclear 4n) and ≥8n (binuclear 2×≥4n, mononuclear ≥8n) hepatocytes were 73.5 (±3.12)%, 21.7 (±2.18)% and 5.43 (±1.48)%, respectively (figure 1C). We next assessed whether polyploid hepatocytes are preferentially mononuclear or binuclear cells. In normal liver parenchyma, 55% of polyploid hepatocytes are binuclear indicating that cellular ploidy was predominant (figure 1D). Considering the binuclear contingent, we revealed that these hepatocytes were mainly tetraploid (figure 1E). Although the mononuclear polyploid contingent was also essentially tetraploid, we noticed a specific enrichment of octoploid fraction compared with binuclear population (figure 1E). Finally, we observed that ageing has no effect on both cellular and nuclear ploidy spectra (table 1, online supplementary figure S1).

Studies in rodents have demonstrated that there is a dynamic change in the spatial distributions of polyploid classes across the liver lobule.[21 22] Here, we investigated whether this was also relevant in human liver parenchyma. Notably, liver zonation is reflected by the heterogeneity of hepatocytes along the porto-central axis of the liver lobules. Importantly, periportal hepatocytes do not express the same metabolic enzymes compared with pericentral hepatocytes.[23 24] Glutamine synthetase (GS) immunostaining was performed to visualise pericentral hepatocytes (figure 1A). Porto-venous axis was arbitrary separated: centrilobular, mid-lobular and periportal regions (figure 1A). We first observed that a similar proportion of diploid hepatocytes are present in the three regions (figure 1F). Moreover, our analysis showed that neither mononuclear (4n, ≥8n) (figure 1F) nor binuclear (2×2n, ≥2×4n) (figure 1G) polyploid hepatocytes have specific zonal distribution in hepatic lobules. Altogether, these findings show that human liver polyploidy is mainly cellular (binuclear fraction) with no specific parenchyma zonation.

Alteration of cellular and nuclear ploidy during liver tumorigenesis

To analyse whether polyploid profile is modified during liver tumorigenesis a cohort of patients surgically treated for HCC was selected (table 2). Out of 75 tumours analysed, 86% were male and 14% were female with the main risk factors being alcohol intake (27%), HBV infection (27%), HCV infection (27%) and metabolic syndrome (16%) (table 2). Tumours were mostly large with a mean of 71 mm and with macrovascular and/or microvascular invasion (53%) (table 2). Regarding tumour differentiation, 18% were well differentiated, 66% moderately differentiated and 16% poorly differentiated (table 2). Finally, in this series of surgically resected HCC, scores of fibrosis in non-neoplastic liver tissue were 27% F0-F1, 36% F2 and 37% F4, respectively (table 2). We first focused to define whether cellular ploidy changes during liver tumorigenesis. For this purpose, we quantified binuclear polyploid hepatocytes in resected HCC livers in both non-tumorous tissue (NTT) and tumorous tissue (TT). Our results showed that binuclear polyploid fraction is drastically reduced in both NTT and HCC TT in comparison to normal liver (figure 2A). This reduction is more pronounced in TT compared with the non-tumorous surrounding tissue (figure 2A). Notably, the ratio between binuclear fractions (2×2n/2×≥4n) was similar between normal liver, NTT and TT (online supplementary figure S2A). We next quantified the percentage of mononuclear fractions. The percentage of mononuclear 2n, 4n and ≥8n hepatocytes was equivalent in normal liver parenchyma and non-tumorous surrounding tissue (figure 2B). In contrast, the ploidy spectrum in HCCs was altered with more mononuclear 4n and ≥8n populations (figure 2B). To complement our results, we analysed the distribution of mononuclear 2n, 4n and ≥8n hepatocytes in both tumour and non-tumour samples. We observed a clear bimodal distribution of these populations, with TT being enriched in mononuclear 4n and ≥8n populations (online supplementary figure S2B). Finally, we confirmed as observed in normal liver that there is no modification of nuclear ploidy spectra related to ageing in NTT and TT samples (online supplementary figure S1). In summary, our data

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

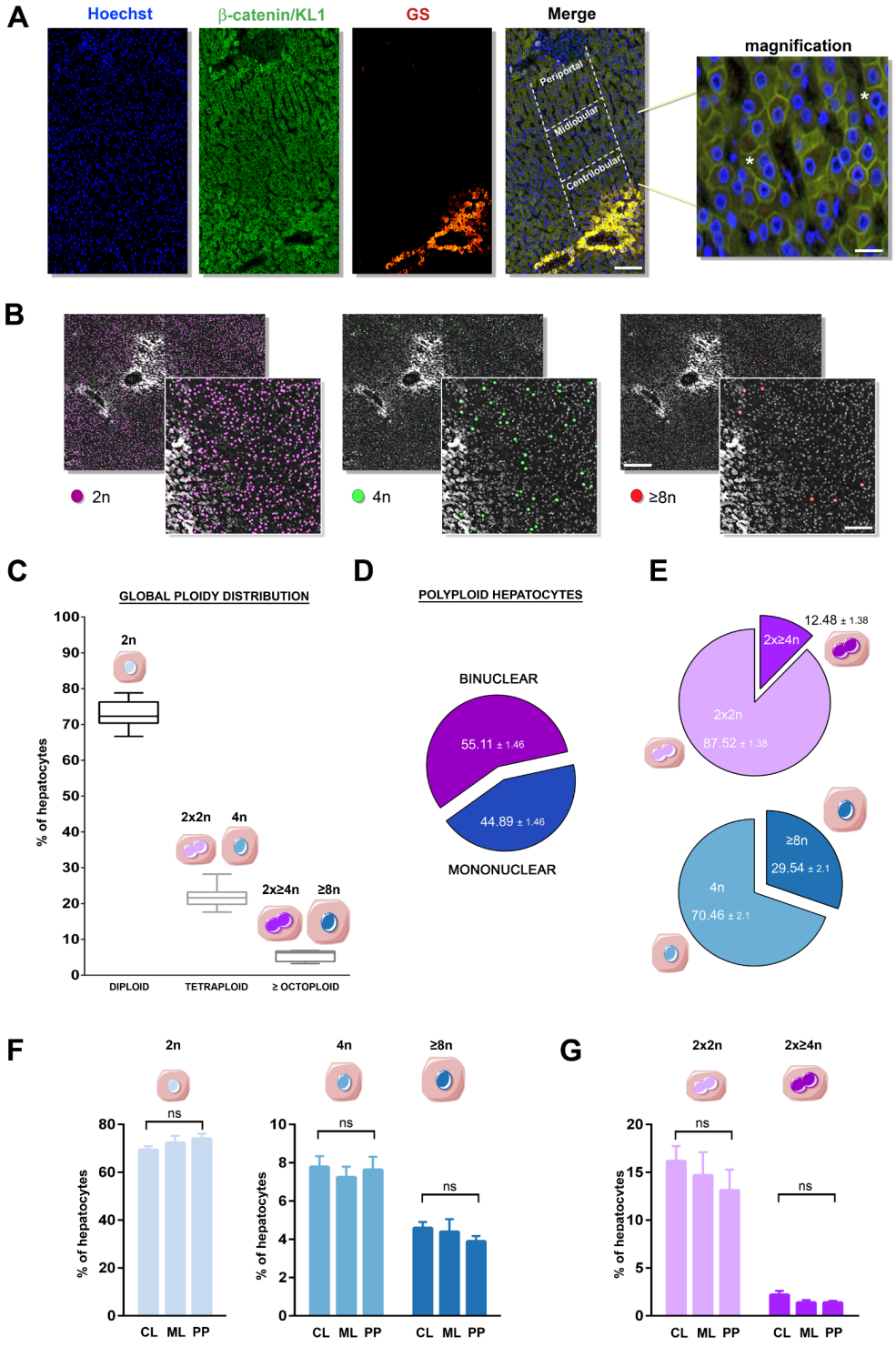


Figure 1 Cellular and nuclear ploidy: distribution and zonation in adult human liver lobule. (A) Images of human liver section immunostained with pan keratin/β-catenin (plasma membrane labelling, green), glutamine synthetase (centrilobular zone labelling, red) and Hoechst (nucleus labelling, blue). Liver lobules were divided into three regions (periportal (PP), mid-lobular (ML), centrilobular (CL)) as indicated (merge image). Cellular and nuclear ploidy profiles were quantified in each zone (scale bar: 200 µm). Magnification image highlights binuclear and mononuclear hepatocytes (* indicates binuclear hepatocytes) (scale bar: 40 µm). (B) Images of a nuclear ploidy map: nuclei are artificially coloured according to their ploidy content: 2n/purple, 4n/green, ≥8n/red. Centrilobular zones appear as white staining (scale bar: 40 µm). Higher magnification images: scale bar=150 µm. (C) Global ploidy (cellular and nuclear) distribution in adult livers (n=13): 2n hepatocytes, 4n hepatocytes (binuclear 2×2n and mononuclear 4n), ≥8n hepatocytes (binuclear 2×≥4n and mononuclear ≥8n). (D) Distribution of binuclear (purple: binuclear 2×2n and 2×≥4n) and mononuclear (blue: mononuclear 4n and ≥8n) fractions in normal human livers (n=13). (E) Binuclear polyploid fraction (light purple: 2×2n, dark blue: 2×≥4n) and nuclear ploidy content in mononuclear fraction (light blue: 4n, dark blue: ≥8n) in normal human livers (n=13). (F) Quantification of diploid hepatocytes according to human liver zonation (centrilobular [CL]/mid-lobular [ML]/periportal [PP] regions). (G) Quantification of mononuclear polyploid hepatocytes (4n, ≥8n) and binuclear polyploid hepatocytes (2×2n, 2×≥4n) according to human liver zonation (CL, ML, PP regions). Data were compared using Kruskal-Wallis test. GS, glutamine synthetase; ns, not significant.

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

Table 1 Control patients

Variable		Total
Age (n=13) (years)	(mean, min-max)	57 (24–86)
Gender	Male:female	7 (53%):6 (46%)

Table 2 Clinical and molecular characteristics of patients

Variable	Total
Age (n=74) (years)	
(mean, min-max)	63 (27–83)
Gender	
Male:female	64 (86%):10 (14%)
Aetiology (including 12 patients with ≥2 aetiologies)	
Alcohol	20 (27%)
Hepatitis B	20 (27%)
Hepatitis C	20 (27%)
Haemochromatosis	7 (9%)
Metabolic syndrome	12 (16%)
Without known aetiology	6 (8%)
Tumour features (n=74)	
Tumour size (mm) (mean, min-max)	71 (11–190)
Macrovascular and/or microvascular invasion	39 (53%)
Edmondson grading (n=74)	
Edmondson I–II	30 (41%)
Edmondson III–IV	44 (59%)
Differentiation WHO (n=74)	
Good	13 (18%)
Medium	49 (66%)
Weak	12 (16%)
Non-tumorous liver: fibrosis according to METAVIR (n=73)	
F0–F1	20 (27%)
F2–F3	26 (36%)
F4	27 (37%)
G1G6 classification (n=70)	
G1–G3	28 (40%)
G4–G5	42 (60%)
TERT mutations (n=72)	
Mutated	51 (71%)
Non-mutated	21 (29%)
CTNNB1 mutations (n=71)	
Mutated	32 (45%)
Non-mutated	39 (55%)
TP53 mutations (n=72)	
Mutated	23 (32%)
Non-mutated	49 (68%)
ALBUMIN mutations (n=64)	
Mutated	9 (14%)
Non-mutated	55 (86%)
AXIN1 mutations (n=71)	
Mutated	4 (5.6%)
Non-mutated	67 (94.4%)
ARID1A mutations (n=71)	
Mutated	8 (11.3%)
Non-mutated	63 (88.7%)
ARID2 mutations (n=71)	
Mutated	3 (4.2%)
Non-mutated	68 (95.8%)

support the concept that binuclear polyploid fraction is drastically reduced during human liver tumorigenesis, and, conversely, mononuclear polyploid fraction is specifically amplified in HCC tumours.

Alteration of nuclear ploidy spectrum is associated with specific histological and molecular features of HCC tumours

We looked deeper for correlations between nuclear ploidy spectrum and HCC features. First, we quantified the percentage of mononuclear polyploid hepatocytes (4n, ≥8n) within HCC according to differentiation grade. We observed that hepatocytes were 15.2% mono 4n and 1.7% mono ≥8n in well-differentiated HCCs, 28.8% mono 4n and 3.7% mono ≥8n in moderately differentiated HCC, and 43.1% mono 4n and 7.8% mono ≥8n in poorly differentiated HCC (figure 3A). Thus, remarkably, amplification of nuclear ploidy is related to HCC histological grade. We performed additional analyses in order to define whether modification of nuclear ploidy spectrum could be related to aetiologies (HBV, HCV, alcohol, haemochromatosis, metabolic syndrome). We found a significant increase in mononuclear polyploid fractions (4n and ≥8n) in HCC related to HBV infection (online supplementary figure S3). To go further, we defined whether modification of nuclear ploidy spectrum could be related to inflammatory infiltrates. We found a trend towards reduced diploid hepatocytes fraction and an increase in mononuclear polyploid hepatocytes in HCC with immune infiltrates (figure 3B). We finally identified whether amplification of nuclear ploidy could be assigned to a specific HCC genotype. Whole-exome sequencing has been performed on each HCC.[25 26] The major mutations in HCC are *TERT* promoter (≈56%), *CTNNB1* (≈36%) and *TP53* (≈33%).[26 27] Other mutations as *ALBUMIN*, *AXIN 1*, *ARID1A* and *ARID2*, affecting less than 15% of HCCs, contribute also to development of HCC. Table 2 recapitulates the ratio of these mutations found in our cohort (table 2). We observed that nuclear ploidy spectrum is not significantly different between HCCs mutated (M) or non-mutated (NM) for *TERT* promoter and *CTNNB1*, respectively (figure 3C) but also for *ALBUMIN*, *AXIN 1* and ARID1A (online supplementary figure S4). For *ARID2*, we observed a slight reduction of nuclear polyploid fraction in mutated HCC (online supplementary figure S4). Notably, HCC mutated for *TP53* had a specific ploidy spectrum with amplification of mononuclear 4n and ≥8n populations and in correlation a decrease in diploid fraction (figure 3C). Multivariate analysis showed that *TP53* mutation accounted for a higher percentage of mononuclear polyploid hepatocytes when compared with both *TERT* and *CTNNB1* mutated tumours (online supplementary figure S5). These results revealed a difference in the spectrum of mononuclear polyploid distribution between patients with different histopathological and molecular features, and suggest that nuclear ploidy spectrum could be a useful parameter in redefining the HCC classification.

Highly polyploid HCC tumours are associated with bad prognosis and high proliferation rate

In other tissues, it has been demonstrated that polyploid tumour cells facilitate tumour progression, with these tumours being associated with higher rate of disease recurrence.[28] In order to determine whether the nuclear ploidy spectrum may have a prognostic value in HCC, we used the density distribution of the proportion of mononuclear polyploid hepatocytes (4n, ≥8n) to define two groups of tumours: poorly polyploid (% polyploid hepatocytes <50%, n=49) and highly polyploid (% polyploid

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

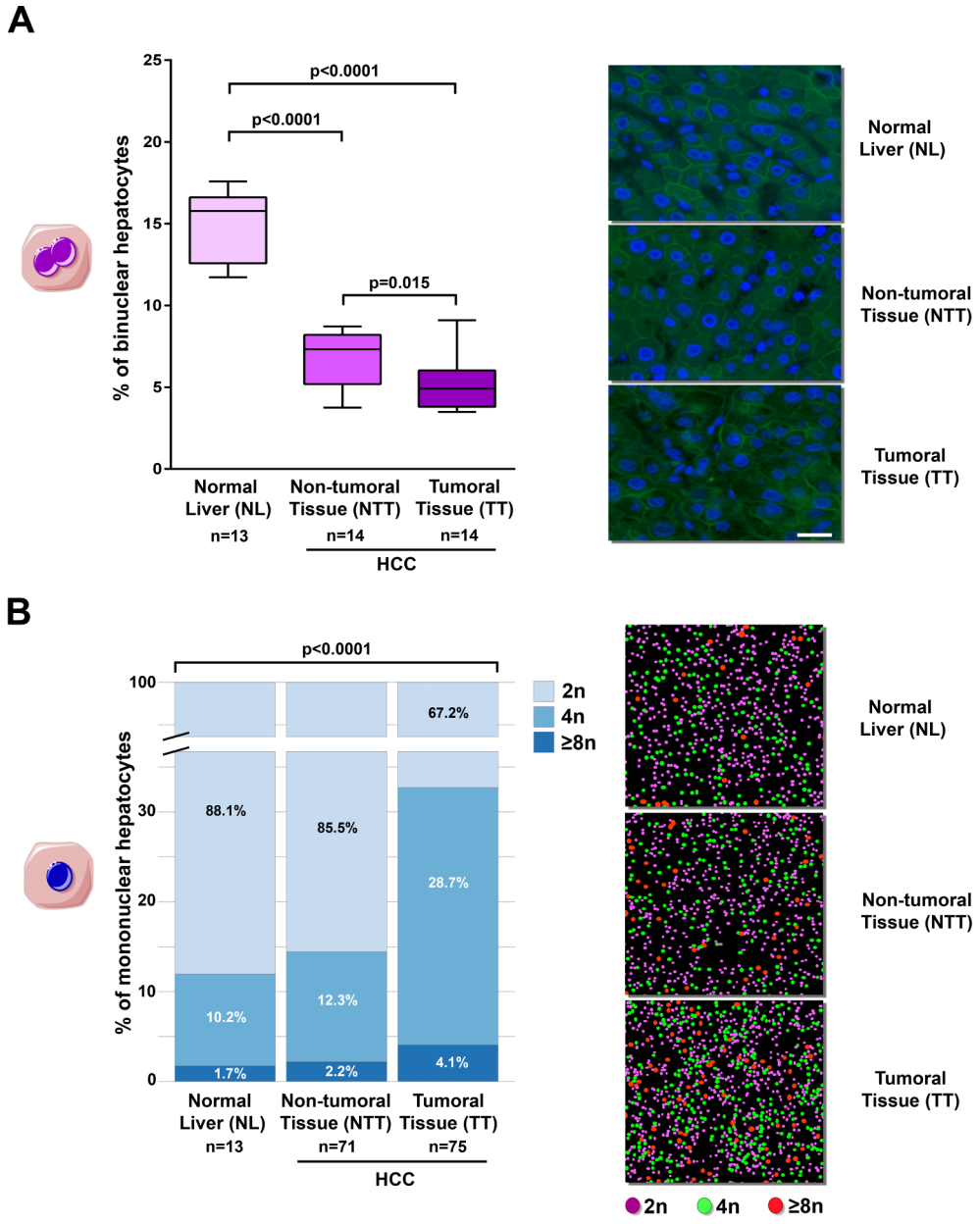


Figure 2 Cellular and nuclear ploidy spectra during human liver carcinogenesis. (A) Left panel: box plots for the percentage of binuclear hepatocytes (2×2n and 2×≥4n) relative to total hepatocytes population. The bottom, central and top lines of each box represent the first quartile, median and third quartile of the distribution, respectively (n=13 for normal liver [NL], n=14 for non-tumorous tissue [NTT] and HCC tumorous tissue [TT]). Values represent the mean±SEM. Data were compared using Kruskal-Wallis test. Right panel: representative magnification images (scale bar: 40 µm) highlight binuclear and mononuclear hepatocytes in NL, NTT and HCC TT. (B) Left panel: percentage of mononuclear 2n, 4n and ≥8n hepatocytes relative to total mononuclear hepatocytes in each group (NL, NLT and TT); n corresponds to the number of patients analysed. Data were compared using multivariate analysis of variance (MANOVA). Right panel: representative higher magnification images of nuclear ploidy spectrum (NL, NTT, TT). HCC, hepatocellular carcinoma.

hepatocytes >50%, n=20) (figure 4A,B, online supplementary figure S6A). We observed that tumours with high polyploid content were significantly associated with a reduced 2-year and 5-year disease-free survival (DFS) (p=0.01 and p=0.02, respectively) compared with poorly polyploid tumours. These findings demonstrated the closed relationship between high DNA ploidy pattern and disease relapse in human liver (figure 4C). We next analysed an association with overall specific survival (OSS). These observations revealed only a trend towards full significance, probably due to the effectiveness of our cohort (online supplementary figure S6B). Correlation between nuclear ploidy spectrum and tumour growth rate was also determined. For this purpose, we used Spearman rank correlation to test possible relationships between the nuclear ploidy content and the expression levels of five genes related to cellular proliferation (MKI67, PCNA, CDC20, BIRC5, AURKA) which were assessed by qPCR. These genes are either global markers of proliferation (MKI67, PCNA) or identified as overexpressed in HCCs (CDC20, BIRC5, AURKA).[27 29] Interestingly, we found a negative correlation between the diploid cell contingent and the expression of these proliferation markers (figure 5A). In contrast, the proportion of mononuclear polyploid cells (4n, ≥8n) was positively associated

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

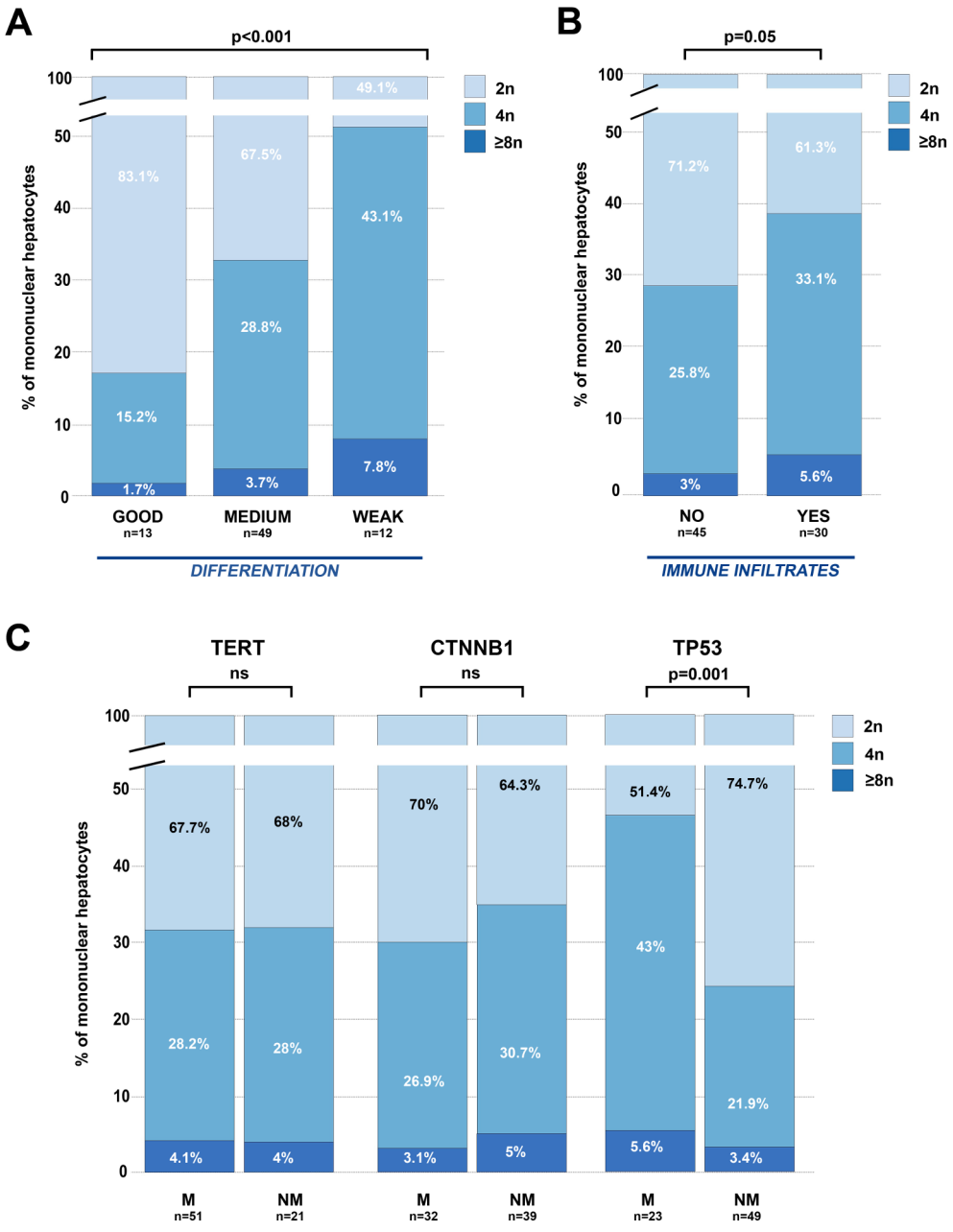


Figure 3 Alteration of nuclear ploidy spectrum related to histological and molecular features of hepatocellular carcinoma (HCC). (A, B) Comparison of the percentage of mononuclear diploid (2n), tetraploid (4n) and highly polyploid (≥8n) hepatocytes in HCC tumours according to tumour differentiation (A) (good n=13, medium n=49 and weak n=12), to the presence of inflammatory infiltrates (B) (no infiltrates n=45, infiltrates n=30). (C) Comparison of the percentage of mononuclear diploid (2n), tetraploid (4n) and highly polyploid (≥8n) hepatocytes in HCC tumours mutated (M) or non-mutated (NM) for *TERT* promoter, *CTNNB1* and *TP53*. n corresponds to the number of patients analysed. Data were compared using multivariate analysis of variance (MANOVA). ns, not significant.

with the expression of the five genes (figure 5A). Finally, in line with our previous observations demonstrating that nuclear ploidy is amplified in HCCs harbouring *TP53* mutation, we analysed whether there was a qualitative difference in the *TP53* mutations in poorly and highly polyploid tumours. Both groups showed mutations at the classical hotspot at the codon 249, characteristic of aflatoxin B1 exposure (online supplementary figure S7). Interestingly, we observed that highly polyploid tumours showed an enrichment of *TP53* mutations in the DNA-binding domain compared with poorly polyploid tumours (15/15 vs 4/7, p=0.02, Fisher's exact test) (online supplementary figure S7). Altogether, our results highlight a clear association between nuclear ploidy spectrum and HCCs harbouring a low grade of differentiation, a high proliferation rate, *TP53* mutations and a poor prognosis (figure 5B). We propose that nuclear ploidy spectrum could be an additional accurate test for human HCC prognosis.

DISCUSSION

Although polyploidisation is a part of normal development in some tissues, alarmingly in others transient polyploidisation is known to occur in tumorigenesis giving rise to aneuploid cells.[1 2 6 30] A major challenge in this field is to understand whether the genesis of polyploid cells can be beneficial or detrimental

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

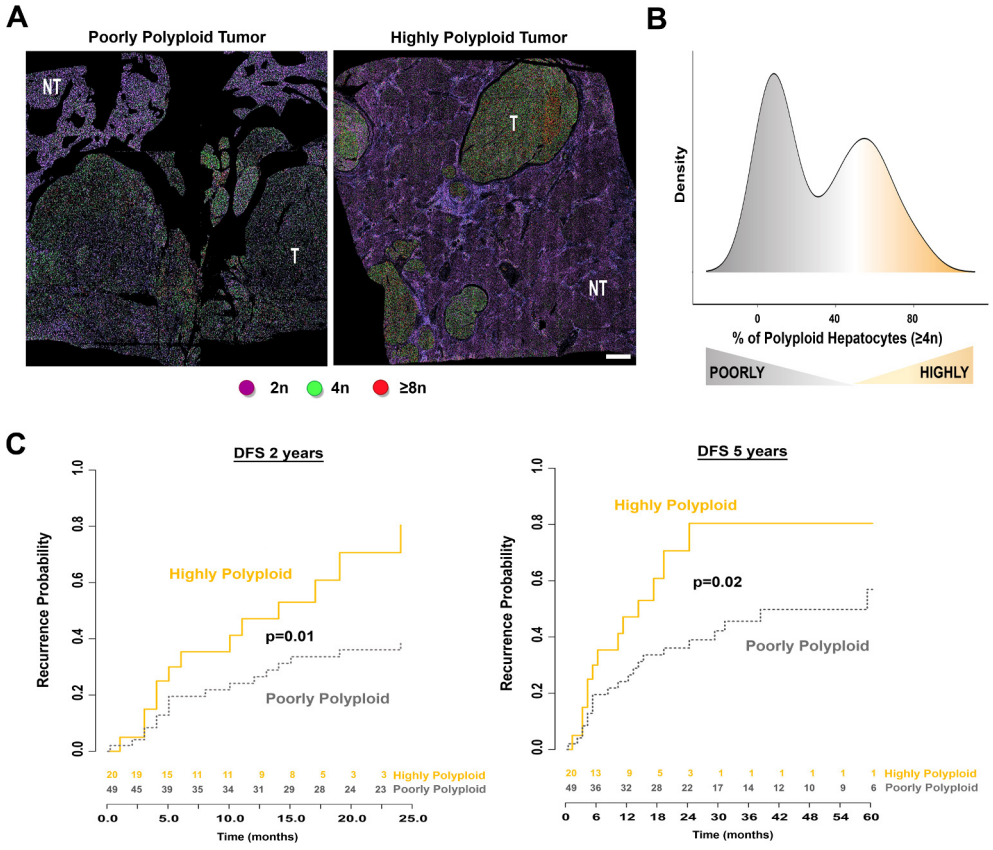


Figure 4 Patients with poorly or highly polyploid hepatocellular carcinoma (HCC) show a significant difference in disease-free survival. (A) Representative nuclear ploidy mapping of a poorly and a highly polyploid HCC (scale bar: 500 µm). T indicates HCC tumours, NT non-tumorous surrounding tissue. Mononuclear hepatocytes are coloured according to their ploidy class: purple 2n, green 4n, red, ≥8n. (B) Density plot represents the distribution of per cent of mononuclear polyploid hepatocytes (≥4n) in tumour tissue samples with the distinction of poorly polyploid HCCs (<50% of polyploid contingent) and highly polyploid HCCs (>50% of polyploid contingent). (C) Disease-free survival (DFS) probability (at 2 and 5 years) in patients with HCC tumours. Data were compared using Kaplan-Meier curves with log-rank test.

to specific tissues. Remarkably, the liver is a unique organ that modifies its ploidy content during normal homeostasis, regeneration and damage repair.[2 5 15] We know that hepatocyte ploidy depends on the DNA content of each nucleus (nuclear ploidy) plus the number of nuclei per cell (cellular ploidy). Whether or not polyploidy is a risk factor or is protective in liver cancer is still under debate. Here, we developed an in situ imaging approach to determine whether cellular and nuclear ploidy content is altered during human liver tumorigenesis.

In agreement with previous studies,[31–33] we first found that polyploid hepatocytes are the major components of human liver parenchyma although this population is presented in a reduced proportion compared with murine hepatic parenchyma (around 30% and 90%, respectively). In mice, it is well known that physiological hepatic polyploidisation takes place during postnatal growth when proliferating diploid hepatocytes fail to complete cytokinesis and produce binuclear tetraploid hepatocytes (2×2n).[10–12 34] If these hepatocytes proliferate again, they can undergo cytokinesis, leading to the genesis of mononuclear tetraploid hepatocytes (4n). This process can continue to generate octoploid and even higher polyploid hepatocytes. We observed that human polyploid hepatocytes are mainly binuclear and tetraploid (2×2n). These data suggest that human liver parenchyma has a lower proliferation rate during postnatal growth compared with rodent liver parenchyma. Surprisingly, our results also showed that human polyploid hepatocytes have no specific parenchyma zonation. Recently, it was reported that, in rodents, the spatial distribution of polyploid hepatocytes in the central vein (CV)-periportal vein (PV) axe correlates with metabolic zonation.[21 22] This suggests that this specific zonation is not conserved in different mammalian species. However, further experiments are necessary to determine whether human hepatic polyploidy functions as a growth suppressor to restrict proliferation or metabolic adaptation, as it has only been demonstrated in rodent models.[13 35]

It is important to note that, during postnatal development, hepatocytes undergo only cytokinesis failure to generate polyploid hepatocytes.[10 12 34] Different studies have now clearly demonstrated that this specific cell cycle programme is physiologically induced to generate differentiated polyploid hepatocytes. We demonstrated that binuclear polyploid hepatocytes are barely present in human HCC strongly suggesting that cytokinesis defects are not present when malignant hepatocytes divide. The re-establishment of the cytokinesis programme is also observed in mice models, during liver regeneration after two-thirds partial hepatectomy.[36] Thus, at least in mice, loss of binuclearity is not necessarily associated with pathogenesis. Interestingly, recent studies reveal molecular links between cytokinesis machinery and proliferation of cancer cells.[37 38] Thus, cytokinesis regulatory proteins such as Anillin (ANLN) and Rac GTPase activating protein 1 are commonly overexpressed in HCC.[37 38] In this condition, malignant hepatocytes are less prone to generate binuclear polyploid hepatocytes. Interestingly and from a translational point of view, knockdown of at least

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

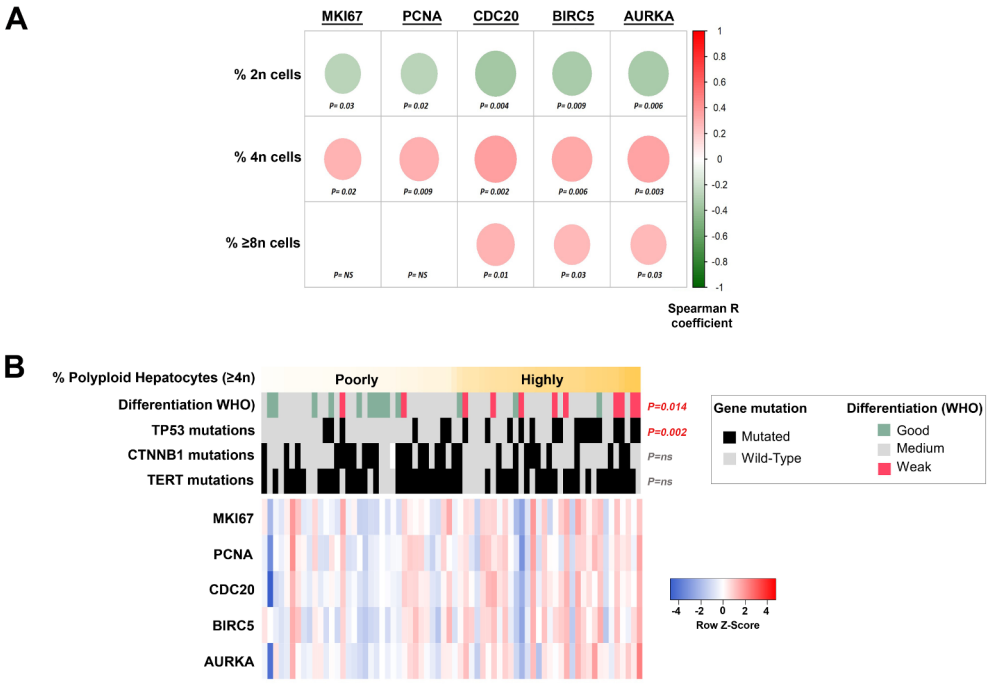


Figure 5 Highly polyploid hepatocellular carcinomas (HCC) are more proliferative than poorly polyploid HCCs. (A) Corrplot showing Spearman's rank correlations between the proportion of mononuclear diploid (2n) or polyploid (4n, ≥8n) hepatocytes and the expression of five proliferation markers in 68 HCC samples. Red circles indicate significant positive correlations. Green circles indicate negative correlations. Colour intensities reflect the rho correlation coefficient. (B) Poorly and highly polyploid tumours have different histological and molecular features. Figure summarising associations between the polyploid contingent of the tumour and the histological and molecular characteristics of 68 HCC samples analysed by qPCR. Samples are sorted into columns according to their proportion of polyploid cells (≥4n). Upper panel shows the associations with gene mutations and tumour differentiation grade. Statistical analysis was performed using Fisher's exact tests and χ^2 test for gene mutations and differentiation, respectively. Bottom panel represents the heat map showing colour-coded gene expression levels of five proliferation markers. Upregulated and downregulated genes are represented in shades of red and blue, respectively.

ANLN in multiple HCC murine models was shown to reduce liver tumour development.[37 38] Thus, we suggest that reduction of cellular ploidy could be a good marker of human premalignant liver parenchyma. Future work will unravel whether cytokinesis inhibition and re-establishment of cellular ploidy could be used as a preventive therapy for patients.[39]

Finally, one of the major findings of our study is that nuclear ploidy spectrum is a marker of HCC aggressiveness. Interestingly, previous studies have described that HCCs were predominantly diploid.[40–42] Here, for the first time to our knowledge, we compared polyploid spectrum according to histological and molecular features of HCC tumours. We first uncovered that nuclear ploidy is sufficient to distinguish between premalignant and malignant liver parenchyma. Furthermore, we demonstrated that mononuclear polyploid hepatocytes are enriched in HCCs harbouring low grade of differentiation, higher proliferation rate and poor prognosis. Interestingly, in multiple cancer models, the polyploid state presented tumour-suppressive functions; acquiring multiple sets of chromosomes functioning to buffer against gene inactivating mutations.[30 43 44] In this line, an elegant study by Zhu and collaborators demonstrated in HCC murine models that polyploid state may be a gatekeeper of liver tumorigenesis.[45] It is important to note that polyploidy protection was studied in a *TP53* wild-type background.[45] Of note, in different cancers, direct evidence of the oncogenic nature of polyploidy was demonstrated in a background of non-functional TP53 tumour suppressor protein.[1 4 46] We suggested that in human liver parenchyma, polyploidisation could be a driver of HCC development at least in a *TP53* mutated context.

In summary, in this study we underline the importance of quantification of cellular and nuclear ploidy spectra during human liver tumorigenesis. We propose that the amplification of mononuclear polyploid hepatocytes might be a marker of HCC with poor prognosis. Future studies will discover whether these new insights could provide more clues for therapeutic strategies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Clinical data, biological and histological parameters

We retrospectively included 75 patients who underwent surgical resection for HCC at Henri Mondor University hospitals. Exclusion criteria were R1 or R2 resection, extrahepatic metastasis at the time of surgery, preoperative antitumorous treatment, unavailable histological slides or follow-up data, equivocal histological features suggestive of combined hepatocellular-cholangiocellular carcinoma and inadequate material for histological analysis (necrosis >90%). The following clinical and biological features were systematically recorded: age, gender, liver disease aetiology (infection by HBV or HCV, alcohol intake, metabolic syndrome, hereditary haemochromatosis or undetermined), Barcelona Clinic of Liver Cancer stage, preoperative alpha-fetoprotein serum levels and follow-up (early relapse and disease-specific survival). Two pathologists specialised in liver diseases and blinded to the clinical and molecular characteristics independently reviewed all samples. Cases with disagreement were analysed using a multipipe microscope, and a consensus was reached. The following histological features were systematically assessed: tumour differentiation (according

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

to Edmondson-Steiner grade), fibrosis stage (assessed with the METAVIR scoring system[47]), macrovascular or microvascular invasion, tumour capsule and inflammatory infiltrates. The definitions of early, small and progressed, classic and poor prognosis HCC were based on the histological criteria for HCC proposed by the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Small and progressed HCC was defined by a distinctly nodular lesion with a diameter ≤2 cm and well-differentiated (G1) to moderately differentiated (G2) histological features, with malignancy recognised at first glance; no portal tracts were detectable. Poor prognosis HCC was defined as HCC case displaying recurrence within 2 years. Classic HCC was defined as non- early, non-small, non-poor prognosis HCC. For genetic features, we extracted data from our former whole-exome sequencing study and selected genes mutated (*TERT* promoter, *TP53*, *CTNNB1, ALBUMIN, AXIN1, ARID1A, ARID2*).[26] Control patients (n=13) underwent liver resection for benign tumours. All patients gave their written informed consent in accordance with French legislation.

Immunofluorescence

Liver sections (5 µm) were deparaffinised and incubated in citrate buffer at 95°C for 20 min for antigen retrieval. Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies including anti-β-catenin (1:200 dilution, BD Biosciences, 610154), anti-pan keratin C11 antibody (1:200 dilution, Cell Signaling, 4545) and GS antibody (1:200 dilution, BD Biosciences, 610518). Anti-mouse or anti-rabbit IgG antibodies (1:500) conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher) were used as secondary antibodies. Hoechst 33342 (0.2 µg/mL) purchased from Sigma-Aldrich was included in the final wash to counterstain nuclei. All images were collected with the slide imager NanoZoomer 2.0-HT (Hamamatsu).

Quantification of cellular and nuclear ploidy profiles in human liver sections

For nuclear ploidy, we developed a method implemented from ImageJ (Rasband, WS, ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2016) to infer ploidy from Hoechst staining.

Ploidy classification was based on the diameter of the hepatocyte nuclei. Nuclei were stained by Hoechst and automatically detected and their area (pixel^2) was assessed as previously described.[18 20 21] First, we extracted the area of each nucleus and fit a Gaussian mixture model to the distribution of nuclear diameters. We selected nuclei according to their nuclear circularity (≥0.7). Nuclei of non-epithelial cells present a lower circularity. Second, we designed thresholds to separate the different populations, located between areas of 30–60 pixel^2, 65–90 pixel^2 and 95–500 pixel^2 to separate the 2n, 4n and ≥8n nuclei, respectively. Nuclei with an estimated area <30 pixel^2 or >500 pixel^2 were excluded (neither non-hepatocytes population nor incorrect Hoechst segmentation). Each region of interest is assigned to a specific colour: 2n nuclei/purple, 4n/green and ≥8n/red. For each patient, around 500 000 nuclei were analysed.

For cellular ploidy, mononuclear and binuclear fractions were quantified on 10 random high-power fields (about 5000 cells) on scans of stained liver sections.

Quantitative RT-PCR

We assessed mRNA expression levels in 68 HCCs and five normal liver tissue samples. Total RNA from frozen surgical samples was extracted using Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega). Reverse transcription of 500 ng of total RNA was performed using the High-Capacity Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Then, expression levels of five proliferation markers were assessed using specific TaqMan predesigned assays (Hs01032443_m1, Hs00696863_g1, Hs00415851_g1, Hs00153353_m1, Hs01582073_m1; Thermo Fisher Scientific) on Fluidigm 96 Dynamic Arrays with the BioMark Real-Time PCR System. The relative amount of RNA was calculated with the ΔΔCT method using 18S ribosomal RNA and the expression level of the corresponding gene in five normal liver samples.

Statistics

Statistical analysis and data visualisation were performed using R software V.3.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, https://www.R-project.org) and Bioconductor packages. Continuous variables were compared using non-parametric Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test to compare two groups and more than two groups, respectively. Analysis of multivariate data was performed using a multivariate analysis of variance with semiparametric designs in order to avoid the assumptions of multivariate normality and covariance homogeneity. Correlation analysis between continuous data was performed using Spearman's rank-order correlation. Qualitative data were compared using the Fisher's exact test to compare two groups and X^2 test to compare more than two groups. Univariate survival analysis was performed using Kaplan-Meier curves with log-rank statistics to assess the difference in 2-year and 5-year DFS and overall survival (OSS) in two groups. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Author affiliations
[1]Team Proliferation Stress and Liver Physiopathology, Genome and Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France
[2]Team Functional Genomics of Solid Tumors, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Labex Immuno-Oncology, Équipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Paris, France
[3]INSERM U1162, Paris, France
[4]Department of Pathology, Hopital Henri Mondor, Creteil, France
[5]Stress and Cancer Laboratory, Équipe Labelisée LNCC, Institut Curie, Paris, France
[6]INSERM U830, Paris, France
[7]Cancer Metabolism and Signaling Networks Program, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, California, USA
[8]INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris 06, Paris, France
[9]Institut Cochin, Paris, France
[10]Department of Pathology, Beaujon Hospital, Clichy, France
[11]Hopital Beaujon, Clichy, France

Acknowledgements We thank the Tumor Biobank of Henri Mondor University Hospital and the Réseau National Centre de Ressources Biologiques (CRB) Foie for contributing to the tissue collection. We also thank the facilities of Cochin Institute (Histology, Immunostaining, Laser Microdissection [HistIM], Imaging Facility of Necker Institute and Imaging Photonic [IMAG'IC]) and CHIC (Center of Histology Imaging and Cytometry) facility of the Centre de Recherche des Cordeliers. Finally, we thank Benedict E Monteiro for the English language editing of this manuscript.

Contributors MBN designed, performed and analysed the experiments, compiled the figures and wrote the manuscript. SC analysed the experiments, compiled the data with statistical analysis /designed the figures and wrote the manuscript. JC designed and analysed the experiments, and compiled the data. RD, GG, CM, LA, TG, CK, MA and GC performed experimental research. VP and JPC analysed the data and provided critical help on the manuscript. SCM analysed the data, designed the figures and provided critical help on the manuscript. JZR analysed the experiments, funded the project and provided critical help on the manuscript. CD designed and performed the experiments, analysed the data, funded the project and wrote the manuscript.

Funding This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut National du Cancer (PRTK-2017, PLBIO 2018-140), Fondation ARC (Association de Recherche sur le Cancer), Ligue

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

Contre le Cancer (Comité de Paris), the Cancéropôle Ile-de-France (Emergence 2015), The Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF-SUBV 2017), EVA-Plan Cancer INSERM HTE and the Agence Nationale de Recherche ANR (ANR-16-CE14).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Obtained.

Ethics approval The study was approved by the Institutional Review Board committees (CCPRB Paris Saint Louis, 1997, 2004 and 2010)

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

REFERENCES

1 Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:585–610.
2 Gentric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol* 2014;184:322–31.
3 Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* 2013;140:3–12.
4 Ganem NJ, Storchova Z, Tetraploidy PD. aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:157–62.
5 Gentric G, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:29–34.
6 Pandit SK, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 2013;23:556–66.
7 Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, *et al*. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005;437:1043–7.
8 Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, *et al*. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;376:2109–21.
9 Zack TI, Schumacher SE, Carter SL, *et al*. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet* 2013;45:1134–40.
10 Guidotti JE, Brégerie O, Robert A, *et al*. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 2003;278:19095–101.
11 Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, *et al*. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest* 2009;119:1880–7.
12 Margall-Ducos G, Celton-Morizur S, Couton D, *et al*. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J Cell Sci* 2007;120:3633–9.
13 Wilkinson PD, Delgado ER, Alencastro F, *et al*. The Polyploid State Restricts Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration in Mice. *Hepatology* 2019;69.
14 Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidization of liver cells. *Adv Exp Med Biol* 2010;676:123–35.
15 Duncan AW. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24:347–56.
16 Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* 2000;10:161–71.
17 Gentric G, Desdouets C. Liver polyploidy: Dr Jekyll or Mr Hide? *Oncotarget* 2015;6:8430–1.
18 Gentric G, Maillet V, Paradis V, *et al*. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2015;125:981–92.
19 Forner A, Llovet JM, Bruix J. Chemoembolization for intermediate HCC: is there proof of survival benefit? *J Hepatol* 2012;56:984–6.
20 Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, *et al*. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 2012;22:1166–75.
21 Tanami S, Ben-Moshe S, Elkayam A, *et al*. Dynamic zonation of liver polyploidy. *Cell Tissue Res* 2017;368:405–10.
22 Morales-Navarrete H, Segovia-Miranda F, Klukowski P, *et al*. A versatile pipeline for the multi-scale digital reconstruction and quantitative analysis of 3D tissue architecture. *Elife* 2015;4.
23 Benhamouche S, Decaens T, Godard C, *et al*. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 2006;10:759–70.
24 Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992;53:275–354.
25 Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, *et al*. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol* 2017;67:727–38.
26 Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, *et al*. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015;47:505–11.
27 Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, *et al*. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149:1226–39.
28 Coward J, Harding A. Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. *Front Oncol* 2014;4:123.
29 Rebouissou S, La Bella T, Rekik S, *et al*. Proliferation markers are associated with met expression in hepatocellular carcinoma and predict tivantinib sensitivity *In Vitro*. *Clin Cancer Res* 2017;23:4364–75.
30 Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:45–54.
31 Kudryavtsev BN, Kudryavtseva MV, Sakuta GA, *et al*. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993;64:387–93.
32 Saeter G, Lee CZ, Schwarze PE, *et al*. Changes in ploidy distributions in human liver carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:1480–4.
33 Toyoda H, Bregerie O, Vallet A, *et al*. Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* 2005;54:297–302.
34 Hsu SH, Delgado ER, Otero PA, *et al*. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology* 2016;64:599–615.
35 Miettinen TP, Pessa HK, Caldez MJ, *et al*. Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. *Curr Biol* 2014;24:598–608.
36 Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, *et al*. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 2012;22:1166–75.
37 Yang XM, Cao XY, He P, *et al*. Overexpression of Rac GTPase Activating Protein 1 contributes to proliferation of cancer cells by reducing hippo signaling to promote cytokinesis. *Gastroenterology* 2018;155:1233–1249.
38 Zhang S, Nguyen LH, Zhou K, *et al*. Knockdown of anillin actin binding protein blocks cytokinesis in hepatocytes and reduces liver tumor development in mice without affecting regeneration. *Gastroenterology* 2018;154:1421–34.
39 Desdouets C, Avila MA. Inhibiting cytokinesis in the liver: a new way to reduce tumor development. *Gastroenterology* 2018;154:1229–31.
40 Anti M, Marra G, Rapaccini GL, *et al*. DNA ploidy pattern in human chronic liver diseases and hepatic nodular lesions. Flow cytometric analysis on echo-guided needle liver biopsy. *Cancer* 1994;73:281–8.
41 Nagasue N, Kohno H, Hayashi T, *et al*. Lack of intratumoral heterogeneity in DNA ploidy pattern of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1993;105:1449–54.
42 Saeter G, Schwarze PE, Nesland JM, *et al*. Diploid nature of hepatocellular tumours developing from transplanted preneoplastic liver cells. *Br J Cancer* 1989;59:198–205.
43 Davoli T, de Lange T. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell* 2012;21:765–76.
44 Otto SP. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 2007;131:452–62.
45 Zhang S, Zhou K, Luo X, *et al*. The polyploid state plays a tumor-suppressive role in the liver. *Dev Cell* 2018;47:390.
46 Aylon Y. p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol* 2011;5:315–23.
47 Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289–93.

Gut: first published as 10.1136/gutjnl-2018-318021 on 12 April 2019. Downloaded from http://gut.bmj.com/ on 13 August 2019 at Agence Bibliographique de l Enseignement Superieur (ABES). Protected by copyright.

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

OPEN

Hepatospecific ablation of p38α MAPK governs liver regeneration through modulation of inflammatory response to CCl_4-induced acute injury

Received: 18 March 2019
Accepted: 29 August 2019
Published online: 10 October 2019

Manon Fortier[1,2], Mathilde Cadoux[1,2], Nadia Boussetta[2], Sandrine Pham[1,2], Romain Donné[1,2], Jean-Pierre Couty[1,2], Chantal Desdouets[1,2] & Séverine Celton-Morizur[1,2]

Mammalian p38α MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) transduces a variety of extracellular signals that regulate cellular processes, such as inflammation, differentiation, proliferation or apoptosis. In the liver, depending of the physiopathological context, p38α acts as a negative regulator of hepatocyte proliferation as well as a promotor of inflammatory processes. However, its function during an acute injury, in adult liver, remains uncharacterized. In this study, using mice that are deficient in p38α specifically in mature hepatocytes, we unexpectedly found that lack of p38α protected against acute injury induced by CCl_4 compound. We demonstrated that the hepatoprotective effect alleviated ROS accumulation and shaped the inflammatory response to promote efficient tissue repair. Mechanistically, we provided strong evidence that Ccl2/Ccl5 chemokines were crucial for a proper hepatoprotective response observed secondary to p38α ablation. Indeed, antibody blockade of Ccl2/Ccl5 was sufficient to abrogate hepatoprotection through a concomitant decrease of both inflammatory cells recruitment and antioxidative response that result ultimately in higher liver damages. Our findings suggest that targeting p38α expression and consequently orientating immune response may represent an attractive approach to favor tissue recovery after acute liver injury.

Acute liver injuries (ALI) can be caused by drug, virus, alcohol, toxic chemical, and several other factors and is a common pathway to many liver diseases[1–5]. The pathogenesis of ALI involves inflammation, oxidative stress coupled to the production of reactive oxygen species (ROS) and hepatocyte cell death (apoptosis and necrosis)[6–9]. ALI are characterized by a rapid resolution and a complete restitution of normal organ architecture and function after the elimination of the cause. However, in some cases, ALI may progress to chronic liver injury, hepatic fibrosis, or even hepatocellular carcinoma[10,11]. Therefore, searching for new therapeutic strategies improving recovery process is critical for a better handling of liver diseases.

p38 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are essential for the cellular response against injury by integrating a plethora of pathways including growth, inflammation, metabolism and apoptosis[12–14]. Among all p38 isoforms, p38α (MAPK14) is the best characterized and expressed in most cell types[15]. As mice lacking p38α isoform die in utero due to angiogenic defects in the placenta and peripheral vessels[16–18], mice models harboring tissue-specific deletion of p38α have been developed. During liver regeneration following partial hepatectomy, mice with specific ablation of p38α in hepatocytes early in life exhibited enhanced hepatocyte proliferation revealing that p38α acts as an inhibitor of hepatocyte proliferation by antagonizing the activity of the JNK–c-Jun pathway[19–21]. By contrast, liver-specific ablation of p38α during chronic biliary cirrhosis reduced hepatocyte cell growth, caused mitotic blockade and cytokinesis failure impairing dramatically mice lifespan[22]. Studies in

[1]Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Team (Proliferation, Stress and Liver Physiopathology), F-75006, Paris, France. [2]Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris Descartes University, Paris, France. Chantal Desdouets and Séverine Celton-Morizur contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C.-M. (email: severine.morizur@inserm.fr)

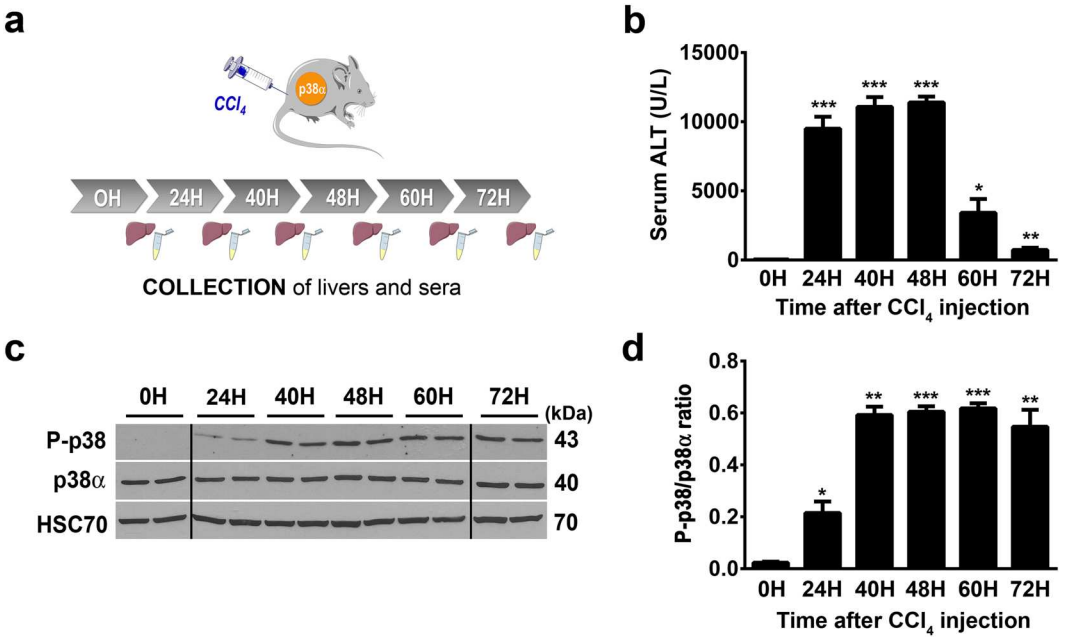


Figure 1. p38α is activated during acute CCl_4 exposure. (**a**) Schematic representation of experimental procedure for CCl_4 injection in control mice (CTR). (**b**) Average alanine aminotransferase (ALT) levels in CTR sera samples before (0H) and after (24H to 72H) CCl_4 exposure. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group); *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (two-tailed t-test), as compared to 0H. (**c**) Phospho-p38 and p38α expression in liver of CTR mice before (0H) and after (24H to 72H) CCl_4 exposure. HSC70 served as a loading control. Lanes showed samples from independent biological replicates and were noncontiguous (black line). The displayed figure was cropped and the original images are part of the Supplementary Data. (**d**) Densitometry analysis of P-p38 vs p38α protein levels before (0H) and after (24H to 72H) CCl_4 injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (two-tailed t-test) as compared to 0H.

thioacetamide (TAA) and DiEthyl-Nitrosamine (DEN)-induced HCC mice models revealed that p38α acts as a tumor suppressor by curtailing ROS accumulation protecting against cell death, subsequent compensatory hepatocyte proliferation and liver tumor development[23–25]. Collectively, these studies highlight that p38α displays several functions that critically depend on the physiopathological context. However, the impact of p38α deletion during acute liver injury in completely mature adult hepatocytes is still an open question.

In that context, to determine the role of p38α in the adult liver, we developed a mice model allowing the deletion of p38α in mature hepatocytes. Using acute liver injury model, our findings reveal quite unexpectedly that p38α deletion is translated into a potent hepatoprotective response against liver injury. Interestingly, we demonstrated that p38α deficiency instructs the inflammatory response to promote efficient tissue repair.

Results

p38α deletion protects mice against acute hepatocellular damage. Acute administration of carbon tetrachloride (CCl_4), is widely used in experimental animal models of liver failure that mimics human hepatic response against toxic compounds[26,27]. CCl_4 is a strong hepatotoxin that induces overproduction of ROS, lipid peroxidation of membranes, causes hepatocyte death and inflammation, resulting to severe hepatotoxicity[28,29]. Protection against apoptosis, inflammation and oxidative stress associated with a pro-regenerative response of the hepatocytes are crucial to ensure efficient tissue repair after detrimental CCl_4 exposure. First, to evaluate the activity of p38α during acute liver injury, control mice were injected by a single dose of CCl_4 and liver and sera were collected during time course kinetic (Fig. 1a). A single-dose of CCl_4 induced significant liver injuries reflected by hepatocyte cytolysis that we monitored by the evaluation of ALT (Alanine Transaminase) plasma level (Fig. 1b). Indeed, ALT level picked from 24 and 48 hours (injury phase) post-injection of CCl_4 and gradually decreased at 60 and 72 hours (recovery phase) (Fig. 1b). In that context, we investigated the profile of p38α phosphorylation/activation in the injured liver. To that end, p38α and Thr180/Tyr182 phospho-p38 protein levels were measured by western blot analysis in a time course experiment (Fig. 1c,d). We first observed that the expression of p38α was stable all along the kinetic (Fig. 1c). Second, whereas in the resting liver (0H) we detected a weaker signal of P-p38, the phosphorylation of p38 increased gradually after CCl_4 exposure, concomitant with the increasing tissue injury observed in the liver (Figs 1b and 2b,c) and reached a plateau at 40 hours until the end of the kinetic (Fig. 1c,d). These findings indicated that acute liver injury mediated by CCl_4 exposure induced specific activation of p38α.

To better characterize the role of p38α during CCl_4 injury, hepatocyte-specific deletion of p38α ($p38\alpha^{\Delta H}$) was achieved by crossing mice carrying conditional loxP-flanked p38α alleles ($p38\alpha^{fl/fl}$[30];) with transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the hepatospecific transthyretin promoter (TTR-Cre

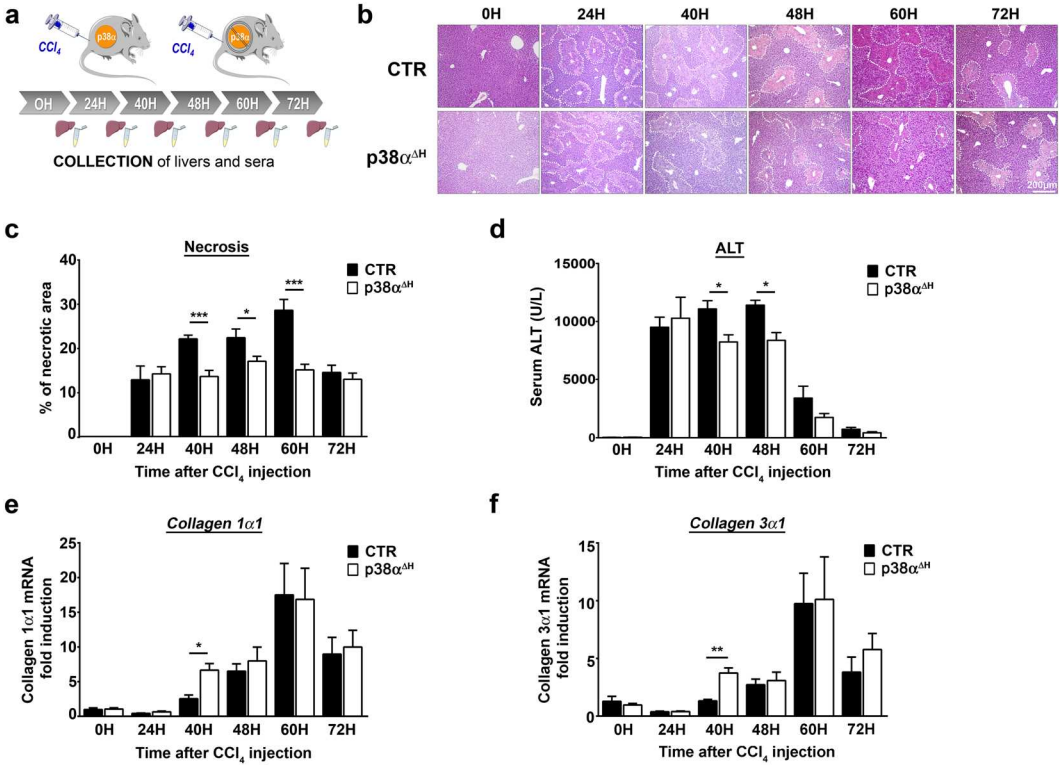


Figure 2. p38α ablation in mature hepatocyte is hepatoprotective against CCl_4-induced liver injury. (**a**) Schematic representation of experimental procedure for CCl_4 injection in control mice (CTR) and p38α$^{\Delta H}$ mice. (**b**) Representative haematoxylin and eosin (H&E) staining of liver tissue sections from CTR and p38α$^{\Delta H}$ mice at different time points after CCl_4 injection. (**c**) Quantification of necrotic area from H&E stained CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at indicated time points after CCl_4 injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 7$ per group); *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$ (two-tailed t-test). Average alanine aminotransferase (ALT) levels in CTR and p38α$^{\Delta H}$ sera samples at indicated time points after CCl_4 injection. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group); *$p < 0.05$ (two-tailed t-test). (**e,f**) Relative mRNA level of *Collagen 1α1* (**e**) and *Collagen 3α1* (**f**) measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl_4 injection. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group); *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ (two-tailed t-test).

Tam[31];). Tamoxifen diet induces very efficient ablation of p38α expression in the liver of p38α$^{\Delta H}$ mice even though some remaining expression of p38α was visible due to the presence of nonparenchymal cells that are not targeted by the TTR-Cre transgene (Supplementary Fig. 1a). Interestingly, following p38α hepatospecific deletion (p38α$^{\Delta H}$) and under steady state conditions, we did not observe any signs of alterations within liver parenchyma. From these results, we concluded that p38α expression in adult hepatocyte is not absolutely required to maintain liver homeostasis during steady-state conditions.

p38α$^{\Delta H}$ mice and their respective controls were challenged by a single CCl_4 injection and we monitored in time the hepatocyte cytolysis and liver damage (Fig. 2a). H&E staining of liver sections indicate that significant necrosis was already present from 24 hours in the liver of p38α$^{\Delta H}$ and control mice (Fig. 2b,c, Supplementary Fig. 1b). Interestingly, necrotic areas increased gradually and peaked at 60 hours post-CCl_4, to diminish at 72 hours in the liver of control mice (Fig. 2b,c). However, although necrotic areas were still evident between 40 and 48 hours in the liver of p38α$^{\Delta H}$ mice, the intensity of necrosis was markedly reduced as compared to the controls (Fig. 2b,c). Accordingly, ALT levels in p38α$^{\Delta H}$ mice remained strictly lower compared to control mice at these time points (Fig. 2d). Furthermore, cleaved caspase-3 staining was used to examine apoptosis of hepatocytes in both group of mice at 24, 40 and 48 hours post-CCl_4 treatment (Supplementary Fig. 1c). Our observations revealed that apoptotic response consecutive to CCl_4 challenge was not impaired in p38α$^{\Delta H}$ liver and could not account for the decrease of both necrotic areas and ALT levels observed in p38α-related deficiency context (Supplementary Fig. 1c,d). To rule out the possibility that differential CCl_4 bioactivation could be responsible for the variation in the liver injury between control and p38α$^{\Delta H}$ mice, we measured mRNA level of cyp2e1, a major CCl_4-metabolizing enzyme. First, we did not find difference in the mRNA level of cyp2e1 under steady state conditions between both groups of mice (Supplementary Fig. 1e). Moreover, consistent with previous reports[32,33], the CCl_4 treatment resulted in a decrease of cyp2e1 mRNA level between 12 and 24 hours, indicating the same metabolization process of CCl_4 compound in both groups of mice (Supplementary Fig. 1e). Interestingly, we monitored collagens 1α1 (Fig. 2e) and 3α1 (Fig. 2f) mRNA levels and we found an up-regulation at 40 hours in the liver of p38α$^{\Delta H}$ mice as compared to control one (Fig. 2e,f), reflecting an earlier tissue repair response under

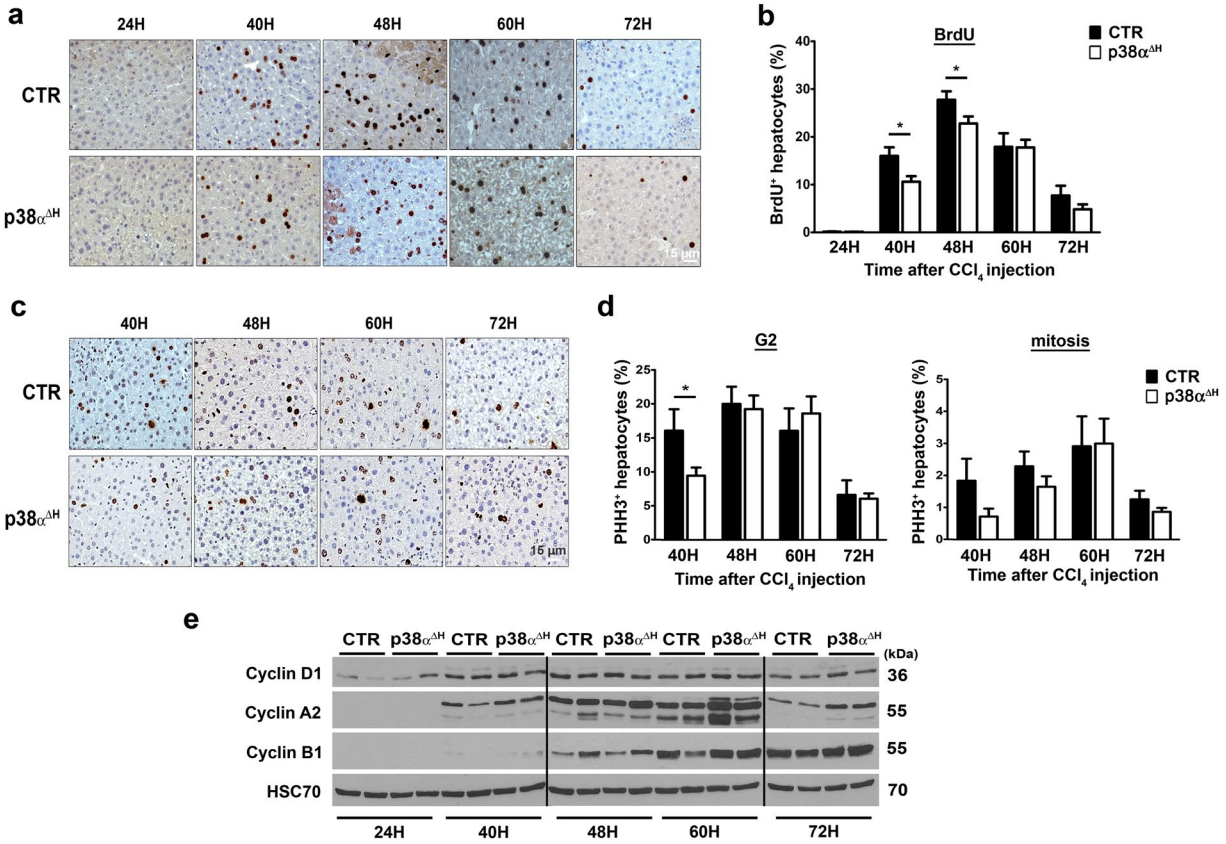


Figure 3. p38α deficiency does not favor hepatocyte proliferation during acute injury. (**a**) Representative BrdU immunochemistry of control (CTR) and p38α$^{\Delta H}$ liver tissue at indicated time points after CCl_4 injection. (**b**) Quantitative analysis of BrdU labeled CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections (percentage of BrdU$^+$ hepatocytes). Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group); *$p < 0.05$ (two-tailed t-test). (**c**) Representative Phospho-Histone H3 (PHH3) immunochemistry of CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver tissue at indicated time points after CCl_4 injection. (**d**) Quantitative analysis of PHH3$^+$ hepatocytes in G2 phase (left panel) and mitosis (right panel) in CTR and p38α$^{\Delta H}$ livers (histologic distinction of PHH3$^+$ hepatocytes). Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group). *$p < 0.05$ (two-tailed t-test). (**e**) Immunoblot of proteins regulating cell cycle progression (Cyclin D1, A2 and B1) in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl_4 injection. Two representative samples are shown for each analyzed point. HSC70 served as a loading control. Lanes were noncontiguous (black line). The displayed figure was cropped and the original images are part of the Supplementary Data.

p38α deficiency. These findings suggest that p38α ablation in adult hepatocytes both buffers liver injury and favors a better response in tissue recovery.

Proliferative response induced by acute CCl_4 was not affected by p38α ablation. Since p38α MAPK has been largely reported as a negative regulator of cellular proliferation controlling the induction of both G1/S and G2/M cell cycle checkpoints[34–37], we checked the consequences of p38α deficiency on hepatocyte proliferative response after CCl_4 exposure. We monitored bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (Fig. 3a) in both control and p38α$^{\Delta H}$ livers during time-course kinetic. BrdU-positive hepatocytes were detected as soon as 40 hours post-CCl_4 and the percentage of BrdU-positive hepatocytes peaked at 48 hours, to gradually decrease afterward, in both mice groups (Fig. 3b). Contrary to what we expected, we did not observe a global enrichment of BrdU-positive hepatocytes in p38α$^{\Delta H}$ livers. In fact, BrdU immune-reactive cells were modestly decreased in p38α$^{\Delta H}$ livers compared to control livers at 40 and 48 hours post-CCl_4 exposure (Fig. 3b). To reinforce these interesting results, we analyzed G2 phase and mitosis progression using PHH3 labeling (Fig. 3c,d). In lines with the assessment of BrdU analysis in p38α$^{\Delta H}$ livers, the percentage of PHH3-positive hepatocytes was slightly reduced at 40 hours after CCl_4 exposure compared to control livers (Fig. 3d). Moreover, molecular analysis of key drivers of cell cycle progression (cyclin D1 (G1 phase), A2 (S phase) and B1 (G2/M)), did not reveal significant differences between the two groups of mice (Fig. 3e). Altogether, these data revealed that p38α deficiency does not impact on hepatocyte cell cycle during acute injury. Importantly, our findings revealed that the hepatoprotective response driven by p38α deletion is largely independent of its known role of cell cycle checkpoint.

Enhancement of antioxidative response protect against CCl_4-mediated injury in the absence of p38α. Since CCl_4 causes severe liver cell damages through a strong elevation of oxidative stress response[38,39]

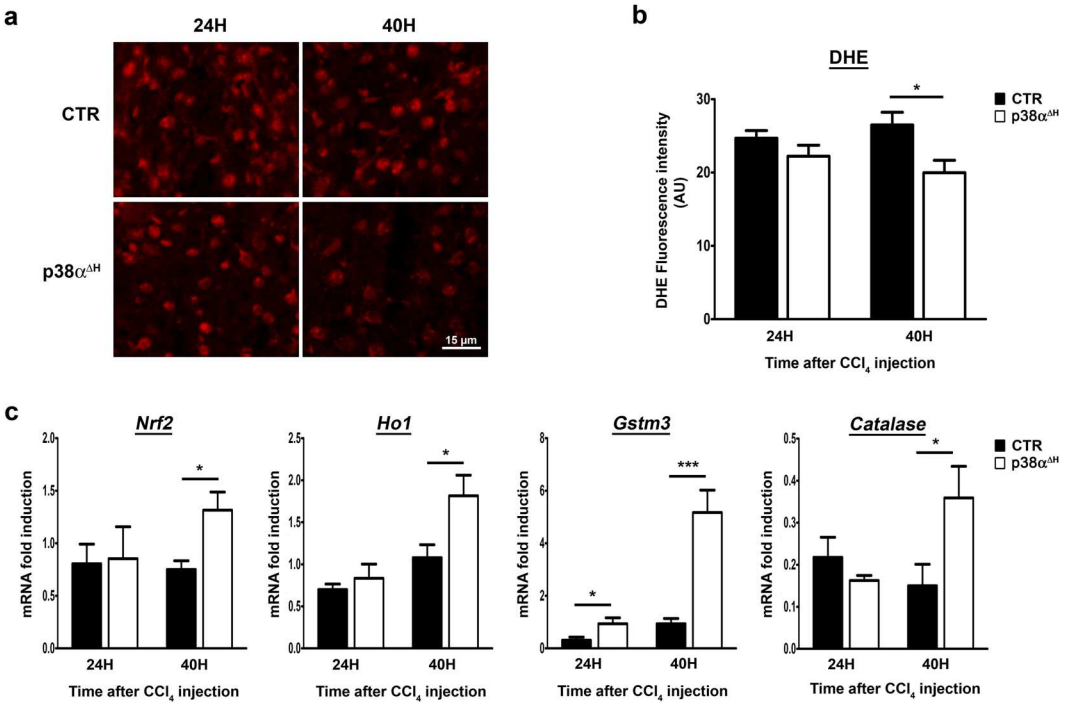


Figure 4. Enhancement of the anti-oxidant response in the liver of p38α$^{\Delta H}$ mice after acute CCl_4 exposure. (**a**) Representative images of Dihydroethidium (DHE) staining of control (CTR) and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at 24 and 40 hours post-CCl_4. (**b**) Quantification of DHE fluorescence intensity (arbitrary unit) obtained from staining of CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at 24 and 40 hours post-CCl_4. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *$p < 0.05$ (two-tailed t-test). (**c**) Relative mRNA level of antioxidant genes (*Nrf2*, *Ho1*, *Gstm3* and *Catalase*) measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples at 24 and 40 hours post-CCl_4. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 6$ per group). *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$ (two-tailed t-test).

and that p38α is a mediator of the cellular redox balance in hepatocytes[24,25,40], we tested whether the hepatoprotective effect observed after p38α ablation could be attributable to an enhancement of the antioxidative response.

The general level of hepatic ROS was assessed by the fluorescent dye dihydroethidine (DHE) on fresh frozen liver sections from both control and p38α$^{\Delta H}$ mice (Fig. 4a,b). Whereas no significant differences in ROS levels were observed at 24 hours post-CCl_4 in the liver of both p38α$^{\Delta H}$ and control mice, we did notice, at 40 hours, that ROS accumulation was largely decreased in p38α$^{\Delta H}$ livers (Fig. 4a,b). This observation indicated that p38α deficiency dampened oxidative stress. To gain insights into the signaling pathway, we investigated the Nrf2-mediated signaling as an essential component for the inhibition of oxidative stress in mice during acute liver injury[41–43]. Interestingly, we found that Nrf2 transcripts (Fig. 4c) and its downstream effectors Ho-1, Catalase and Gstm3 (Fig. 4c) were significantly enhanced in p38α$^{\Delta H}$ compared to control livers at 40 hours post-CCl_4 injury. These findings suggested that p38α deficiency is translated into a protective effect against CCl_4-induced ROS formation at least through Nrf2 pathway.

p38α deletion impacts on the inflammatory response during acute liver injury. Interestingly, at the level of H&E staining, we observed along the kinetic read-out, a substantial increase of inflammatory cells within necrotic areas in p38α$^{\Delta H}$ compared to control livers (Fig. 5a). We then extracted immune cells from the livers and confirmed their increase in p38α$^{\Delta H}$ mice compared to control mice at 40 hours after CCl_4 injury (Fig. 5b). Interestingly, at 60 hours, the number of immune cells decreased in p38α$^{\Delta H}$ liver but still remained higher than in control liver (Fig. 5b). To go further, we monitored chemotactic signals, which play an essential role during acute liver injury by managing the migration of immune cells[44]. We found a significant up-regulation of both Ccl2 (Fig. 5c) and Ccl5 (Fig. 5d) at 40 hours post-CCl_4 challenge, suggesting that these chemokines favor the drastic immune cell recruitment in p38α$^{\Delta H}$ livers.

Next, we evaluated common genes involved in inflammation on whole liver tissue from both groups of mice. Importantly, at 40 hours post-injury, we found a concomitant up-regulation of *Tnfα* (Fig. 5e) and *Tgfβ* (Fig. 5f) expression without modifications in *Il1β* mRNA level (Fig. 5g) suggesting a particular inflammatory flavor sustaining tissue repair. Altogether, our data suggested that the increase in immune cells could be involved into the hepatoprotective response driven by p38α ablation.

To finally prove that the recruitment of the immune cells mediated the hepatoprotective response driven by p38α deletion, we blocked Ccl2/Ccl5 signals using specific neutralizing antibodies 5 hours before CCl_4 exposure (Fig. 6a). We validated the effect of antibodies blockade by counting immune populations extracted from the

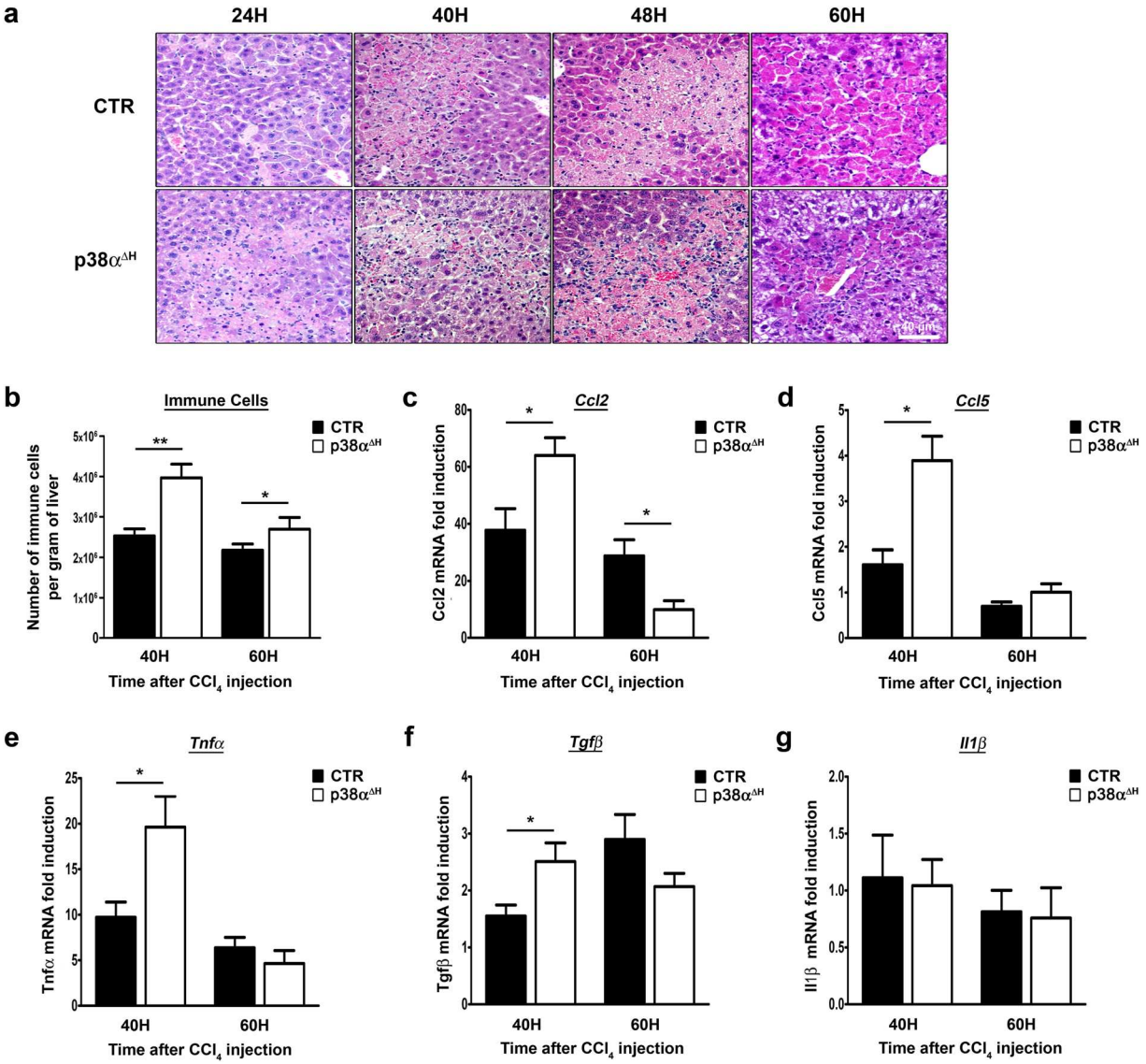


Figure 5. p38α deficiency instructs the inflammatory response to promote efficient tissue repair.(**a**) Representative photomicrographs of immune infiltration with H&E staining in control (CTR) and p38α$^{\Delta H}$ liver sections at different time points after CCl_4 injection. (**b**) Number of hepatic immune cells per gram of liver in CTR and p38α$^{\Delta H}$ mice at 40 and 60 hours post-CCl_4. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ (two-tailed t-test). (**c–g**) Relative mRNA level of *Ccl2, Ccl5, Tnfα, Tgfβ and Il1β* measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ liver samples at indicated time points after CCl_4 injection. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *$p < 0.05$ (two-tailed t-test).

livers and found a drastic decrease in the total number of immune cells (Fig. 6b) in both groups of mice. In the meantime, we showed that antibody blockade provoked a dramatic abolishment of hepatoprotection in p38α$^{\Delta H}$ livers through an amplification of necrotic regions (Fig. 6c) associated with a reduced anti-oxidative response (Fig. 6d). Moreover, we also found an accentuation of liver injury in control mice (Fig. 6c), suggesting that these hepatoprotective immune cells were already present in p38-proficient livers (Fig. 6b) but were massively recruited under p38α deficiency. Interestingly, we found a clear reduction in the level of *Tnfα* and *Tgfβ* transcripts (Fig. 6e) in both groups of mice concomitantly upregulated at 40 hours post-CCl_4 challenge after Ccl2/Ccl5 blockade (Fig. 6e,f). These findings indicated that the combination of these two signaling (Tnfα and Tgfβ) participate to the hepatoprotective response. Accordingly, downregulation of *Collagen* 1α1 level was also observed after Ccl2/Ccl5 blockade (Fig. 6f), confirming the attenuation of liver tissue repair.

Altogether, our data clearly demonstrated the crucial requirement of these two chemotactic signals favoring the recruitment of immune cells to mediate the hepatoprotective response driven by p38α ablation.

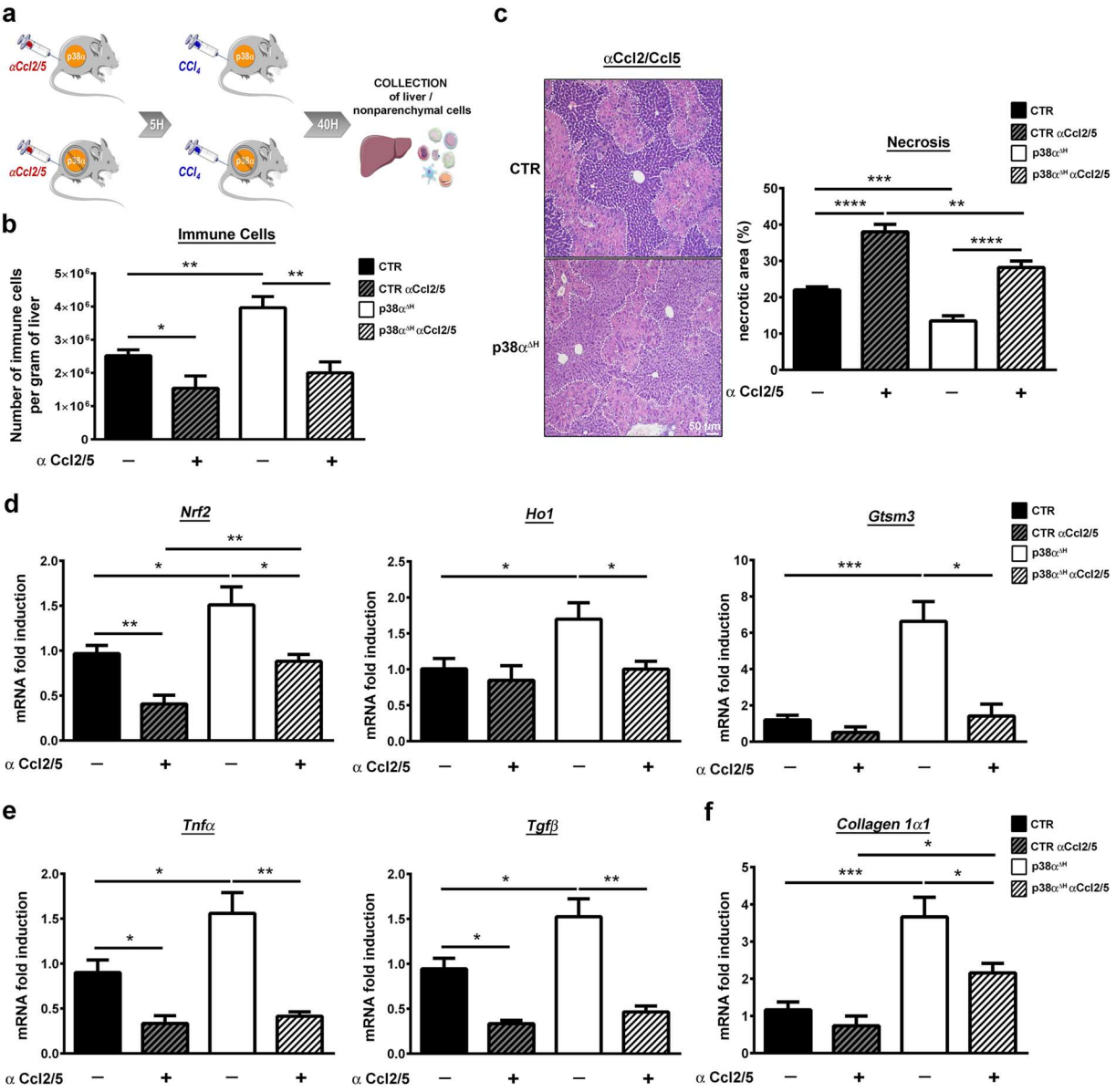


Figure 6. Blockade of Ccl2/Ccl5 chemotactic signals impairs hepatoprotective effect coupled to p38α deficiency during acute liver injury. (**a**) Schematic representation of experimental procedure for Ccl2 and Ccl5 blockade. Control (CTR) and p38α$^{\Delta H}$ mice were sacrificed at 40 hours after CCl_4 injection. (**b**) Number of immune cells per gram of liver in CTR and p38α$^{\Delta H}$ mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies, 40 hours after CCl_4 exposure. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). *p < 0.05, **p < 0.01 (two-tailed t-test). (**c**) Necrotic area analysis by liver section H&E staining of CTR and p38α$^{\Delta H}$ mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl_4. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 5$ per group). **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (two-tailed t-test). (**d**) Relative mRNA level of antioxidant genes (*Nrf2*, *Ho1* and *Gstm3*) measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ livers issued from mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl_4. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18 s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (two-tailed t-test). (**e,f**) Relative mRNA level of *Tnfα* and *Tgfβ* (E) and *Collagen 1α1* (F) measured by quantitative PCR in CTR and p38α$^{\Delta H}$ livers issued from mice treated or not by Ccl2/Ccl5 antibodies and its quantification at 40 hours post-CCl_4. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18 s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM ($n \geq 3$ per group). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (two-tailed t-test).

Discussion

Drug-induced liver injury and acute liver failure (ALF) remains a major problem in Western societies[45,46]. While significant progress has been made in the understanding of intracellular signaling mechanisms of toxicity related to various compounds in hepatocytes, e.g. paracetamol[47], there is still an urgent need to develop potent

therapeutic strategies to circumvent ALI and ALF. ALI can be studied in animal models and in isolated hepatocytes and most mechanisms are translatable to humans[27,48]. Due to its strong ability to integrate a variety of signaling pathways, previous reports highlighted p38 Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) as potential appealing targets to improve ALI outcome. Most of these studies were done by using a hepatospecific ablation of p38α isoform arising either during foetal (hepatoblasts) or neonatal (immature hepatocytes) development. As p38α plays a crucial role in cellular differentiation[18,49,50], we supposed that earlier deletion could impaired differentiation of hepatocytes and terminal liver maturation. In the present study, we developed a new inducible and hepatospecific mice model in which p38α isoform was completely deleted in mature hepatocytes. Until now, p38α ablation in the liver was shown as deleterious in different models of liver injury[22,25,51]. In this study, using the CCl_4 model of acute liver injury, we demonstrate for the first time that p38α deletion generated a pro-hepatoprotective response against liver injury. Remarkably, we showed that p38α deficiency after CCl_4 exposure, shaped the inflammatory response to promote efficient tissue repair. Finally, we evidenced that hepatoprotective response driven by p38α ablation was critically dependent on Ccl2/Ccl5 chemotactic signals, as their blockade dramatically exacerbated liver injury.

Following injuries, p38α MAPK displayed a wide range of cellular responses to ensure the maintenance of tissue homeostasis. Due to its major role as a negative regulator of cellular proliferation[20,21,36], we expected to observe an extensive enhancement of hepatocytes proliferation secondary to p38α ablation. Differently, we found a lower proliferative response, reflecting buffered injuries (concomitant decrease in necrotic areas and ALT levels) in $p38\alpha^{\Delta H}$ liver as compared to control one. Importantly, our data showed that p38α ablation did not increase the proliferation of hepatocytes after CCl_4 exposure and also revealed that the function of p38α as a cell cycle checkpoint does not account for the hepatoprotective effect. Our findings are quite novel, since increased proliferation has been until now considered a hallmark of p38α deficient cells[23].

Interestingly, we demonstrated that the deletion of p38α isoform in adult hepatocytes has strong repercussions on the immune microenvironment to mediate a potent hepatoprotective response favoring efficient hepatic tissue repair. Indeed, we found a drastic infiltration of immune cells mediated by Ccl2/Ccl5 chemokines. In addition, we clearly identified that Ccl2/Ccl5 chemotactic signals were crucial in that response as their neutralization sensitized to increase liver injury. Therefore, our findings highlight a new aspect in the pleiotropic role of p38α in hepatocytes during acute liver injury, as until now the beneficial effect of p38α deletion was strictly observed when performed in immune effectors such as liver myeloid cells or T/NKT cells[51,52]. Furthermore, the work of Kang and collaborators provided evidence that p38α ablation in hepatocytes was fueled by a drastic accentuation of liver injury associated with a massive inflammatory cell recruitment[51]. This study was conducted using a different model of acute liver injury (e.g. ConA). Collectively, these data underlie that the nature of stimuli-induced injury greatly influences the cellular response of p38α, as it does not trigger the same immune effectors involving preferentially either myeloid cells (e.g. CCl_4, APAP) or lymphoid T cell reservoir (ConA)[53]. Therefore, it turns out that depending on the initial stimuli, the flavor of the inflammatory response dictates the outcome of tissue response. Our work clearly strengthens the critical connection between hepatocyte and immune system during acute liver injury and calls into question about the nature of the effectors involved in hepatoprotection. Further experiments are required to elucidate the molecular support of this dialogue. It is noteworthy that we found that the antioxidative response was determinant in the mediation of hepatoprotection in $p38\alpha^{\Delta H}$ liver. Interestingly, Ccl2/Ccl5 antibody blockade considerably diminished this antioxidative response in our model. These observations are of importance as they illustrated that immune system could behave also as an additional partner to adapt the redox balance during liver injury[54].

Finally, due to very limited therapeutic options for the treatment of acute liver injury, our work provides another field of treatment targeting specifically p38α in hepatocyte and manipulating immune response.

Materials and Methods

Generation of conditional knockout mice and animal care. Mice carrying two loxP sites flanking (floxed) exons 2 and 3 of the p38α gene ($p38\alpha^{fl/fl}$)[30] were interbred with TTR-Cre-Tam mice expressing a tamoxifen-inducible Cre recombinase under the control of the hepatocyte-specific transthyretin promoter[31] to generate $p38\alpha^{\Delta H}$ mice ($p38\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre^{+}-Tam) on the C57Bl6J genetic background. In all experiments, littermate carrying the respective loxP-flanked alleles but lacking expression of the Cre recombinase were used as controls ($p38\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre^{-}-Tam). Mice were maintained at a constant temperature and humidity in light-controlled room with a 12 hours light cycle. They had free access to food (SAFE Laboratory) and tap water. To induce specific hepatocyte p38α deletion, four weeks old male $p38\alpha^{\Delta H}$ were fed with tamoxifen diet (+1000 mg/kg TAM A115-T7100, Ssniff, Germany) during five days as well as their control littermates ($p38\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre^{-}-Tam). All experiments were conducted in accordance with the institutional guidelines and the recommendations for the care and use of laboratory animals put forward by the Directive 2010/63/EU. This revises Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes. All animal studies were approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) and the Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris (agreement No. 75–956) and by the Mouse Facility Core laboratories (Institut Cochin, Inserm U1016/ CRC UMRS1138).

Acute liver injury model. Experiments were performed both on control ($p38\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre^{-}-Tam) and $p38\alpha^{\Delta H}$ ($p38\alpha^{fl/fl}$ TTR-Cre^{+}-Tam) male mice between 8 and 10 weeks of age. CCl_4 (Merck, Germany) dissolved with sunflower oil [1:9] was administered intraperitoneally (IP) at 0.56 g/kg of body weight. Two hours before tissue harvest, mice were intraperitoneally injected with 50 mg/kg of Bromodeoxyuridine (BrdU) (Merck, Germany). Mice were euthanized at 0, 12, 24, 40, 48, 60 and 72 hours post-CCl_4. After sacrifice, part of liver tissue was fixed in 4% neutral buffered formalin for immunohistochemistry analysis. The remaining liver tissue was flash frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until used.

Gene	Forward	Reverse
18S	GTA-ACC-CGT-TGA-ACC-CCA-TT	CCA-TCC-AAT-CGG-TAG-TAG-CG
Catalase	ACA-TGG-TCT-GGG-ACT-TCT-GG	CAA-GTT-TTT-GAT-GCC-CTG-GT
Ccl2	TCT-GGG-CCT-GCT-GTT-CAC-A	GGA-TCA-TCT-TGC-TGG-TGA-ATG-A
Ccl5	GCT-GCT-TTG-CCT-ACC-TCT-CC	TCG-AGT-GAC-AAA-CAC-GAC-TGC
Collagen 1α1	GAG-CGG-AGA-GTA-CTG-GAT-CG	GCT-TCT-TTT-CCT-TGG-GGT-TC
Collagen 3α1	GAA-GTC-TCT-GAA-GCT-GAT-GGG	TTG-CCT-TGC-GTG-TTT-GAT-ATT-C
Cyp2e1	CGT-TGC-CTT-GCT-TGT-CTG-GA	AAG-AAA-GGA-ATT-GGG-AAA-GGT-CC
Gstm3	TAT-GAC-ACT-GGG-CTA-TTG-GAA-CAC	GGG-CAT-CCC-CCA-TGA-CA
Ho1	AAG-CCC-AGA-ATG-CTG-AGT-TC	GCC-GTG-TAA-TAT-GGT-ACA-AGG-A
IL1β	GCC-CAT-CCT-CTG-TGA-CTC-AT	AGG-CCA-CAG-GTA-TTT-TGT-CG
Nrf2	AGG-ACA-TGG-AGC-AAG-TTT-GG	TCT-GTC-AGT-GTG-GCT-TCT-GG
Tgfβ1	TGG-CGT-TAC-CTT-GGT-AAC-C	GGT-GCT-GGG-CCC-TTT-CCA-G
Tnfα	CAT-CTT-CTC-AAA-ATT-CGA-GTG-ACA-A	TGG-GAG-TAG-ACA-AGG-TAC-ACC-CC

Table 1. Primer Sequences.

Antibody depletion experiment. Five hours before CCl_4 treatment, mice received a single IP injection of a cocktail of anti-Ccl2 (clone 2H5, Bio X Cell) antibody at a dose of 7.5 mg/kg and anti-Ccl5 antibody (clone 53405, R&D systems) at a dose of 1.0 mg/kg or control antibody (Polyclonal Armenian Hamster IgG, Bio X Cell; Normal Rat IgG control, R&D Systems). The efficacy of antibody depletion was evaluated 40 hours after CCl_4 treatment.

Serum Transaminase activity. Blood was collected from intracardiac puncture on anesthetized mice during time-course kinetic after CCl_4 treatment and the activity of serum alanine aminotransferase [ALT] was measured using the AU400 chemistry analyzer (Olympus) (Biochemistry Facility, CRI Institute, Paris, France).

Nonparenchymal cell isolation. As previously described[55], livers were harvested and perfused with Hank's balanced salt solution (1X HBSS) containing 10 mM HEPES, to remove circulating blood cells. The liver was passed through a stainless steel mesh in RPMI 1640 supplemented with 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco, ThermoFisher Scientific), 5 mM HEPES, 2 mM Glutamax (Gibco, ThermoFisher Scientific), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 5×10^{-5} M β-mercaptoethanol (Gibco, ThermoFisher Scientific). The liver cell suspension was collected and parenchymal cells were separated from nonparenchymal cells (NPCs) by centrifugation for 3 min at 800 rpm. The supernatant containing the NPCs was collected and centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The pellet was then resuspended in 35% Percoll (GE Healthcare) diluted in RPMI 1640 supplemented with 2% FCS, 20 min at room temperature, at 2,000 rpm. The NPC fraction was collected at the bottom and the cells were collected by two rounds of centrifugation in ice-cold PBS. Red blood cells were removed by incubation with lysis buffer ACK (0.15 M NH4Cl, 10 mM KHCO3 and 0.1 mM Na2EDTA, pH 7.2). Cells were then washed in RPMI 1640 containing 10% FCS and centrifuged for 10 min at 1,500 rpm. Cells were resuspended in serum-containing medium and viable NPCs were counted by a trypan blue exclusion method, and stored on ice until further use.

Gene expression analysis. Total RNA from mouse liver tissue was extracted using Trizol (ThermoFisher Scientific). Purified RNA was then reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR (q-PCR) was performed using a SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR master mix (ThermoFisher Scientific) and specific primers (see Table 1). The reactions were performed in 96-well plates in a LightCycler 480 instrument (Roche) with 40 cycles. We determined the relative amounts of the mRNAs studied by means of the second-derivative maximum method, with LightCycler 480 analysis software and 18 s mRNA as the invariant control for all studies.

Western blotting analysis. Total proteins were extracted from snap-frozen livers as described previously[56]. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Bio-Rad Protein Assay). Proteins (40 µg) were resolved by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes (0.45-µm pore size), which were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. Primary antibodies used for western blotting are referenced in Table 2. The proteinbound primary antibodies were detected with an appropriate horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody (ThermoFisher Scientific). Immunoreactive bands were revealed using the "Clarity Western ECL Substrate" purchased from Bio-Rad. Blots were exposed to Amersham Hyperfilm (GE Healthcare Life Sciences). In all immunoblotting, HSC70 was used to normalize the results. For protein quantification, densitometry analysis was performed using Image J 1.8.0_112. Data are presented as relative units, which represent the densitometric value for the phosphoprotein of interest that was normalized to the total levels of the same protein.

Histology, immunohistochemistry. Tissue was fixed by incubation in 4% formol overnight at 4 °C and embedded in paraffin wax. Hematoxylin/eosin staining was carried out on 5-µm paraffin sections. For immunohistochemistry, liver sections (5 µm) were de-paraffinized and incubated in citrate buffer at 95 °C for 20 min for antigen retrieval. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 15 min at room temperature and then

Antibody	Dilution	Manufacter and Reference
BrdU	1/400	Thermo Fisher #MA5-12502
Cleaved-Caspase 3	1/100	Cell Signaling #9664
Cyclin A2	1/2000	Abcam #32386
Cyclin B1	1/1000	Cell Signalling #4138
Cyclin D1	1/3000	Pierce MA1-39546
HSC70	1/25000	Santa Cruz #7298
p38α	1/4000	ThermoFisher Scientific #PA5-17713
PHH3	1/500	Millipore #06-570
phospho-p38	1/4000	Cell Signalling #4511

Table 2. Antibodies used in immunohistochemistry or western blot experiments.

incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies referenced in Table 2. After three washes in PBS1X, tissue sections were incubated with biotinylated anti-mouse/rabbit or rat IgG (1/200 dilution, Vector Laboratories, CA, USA) for 1 hr at RT and then washed three times in PBS1X, after which streptavidin–horseradish peroxidase conjugates (Vector Laboratories, CA, USA) were added and the slides incubated for 45 min. After three washes with PBS1X, DAB solution (Vector Laboratories, CA, USA) was added and the slides were counterstained with haematoxylin.

***In situ* detection of ROS.** Fresh cross sections (8 μm) of unfixed, frozen mouse livers were immediately incubated with 5 μM DHE at 37 °C for 30 minutes in a humidified chamber, subsequently washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, and coverslipped[57]. The fluorescence intensity of DHE staining was measured with ImageJ software.

Image acquisition and analysis. Concerning HE, BrdU and PHH3 labelling, images were taken using a Nikon Statif Eclipse E600 microscope with x10 and x20 magnification, 1.4–0.7 NA PL-APO objectives, a DXM1200 cooled CCD camera (Nikon), and ACT-1 (version 2.63; Universal Imaging). For cleaved-caspase 3 labelling, images were taken using an Olympus BX63F, at 4x magnification Uplan FLN objective, an Olympus DP73 camera and Metamorph software. Necrotic area were quantified by morphometric analysis using an open-source ImageJ software in 5 fields at x10 magnification. For BrdU/PHH3 staining, 4000 hepatocytes (for each liver sample analyzed) were counted; at least 10 areas of 33,500 μm^2 were analyzed. Cleaved-caspase 3 immunostaining was quantified by color segmentation using an open-source ImageJ software in 5 fields at 4x magnification. Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Software) was used for figure construction.

Statistical analysis. Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's t test performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc). All data are representative of 3 to 10 animals of each genotype and are expressed as mean ± SEM. A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

References

1. Bernal, W. & Wendon, J. Acute Liver Failure. *New England Journal of Medicine* **369**, 2525–2534 (2013).
2. Björnsson, E. S., Bergmann, O. M., Björnsson, H. K., Kvaran, R. B. & Olafsson, S. Incidence, Presentation, and Outcomes in Patients With Drug-Induced Liver Injury in the General Population of Iceland. *Gastroenterology* **144**, 1419–1425.e3 (2013).
3. Franco, E. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries. *World Journal of Hepatology* **4**, 68 (2012).
4. Ingawale, D. K., Mandlik, S. K. & Naik, S. R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **37**, 118–133 (2014).
5. Rutherford, A. & Chung, R. Acute Liver Failure: Mechanisms of Hepatocyte Injury and Regeneration. *Seminars in Liver Disease* **28**, 167–174 (2008).
6. Bantel, H. & Schulze-Osthoff, K. Mechanisms of Cell Death in Acute Liver Failure. *Frontiers in Physiology* **3** (2012).
7. Diehl, A. M. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* **174**, 160–171 (2000).
8. Jaeschke, H., Williams, C. D., Ramachandran, A. & Bajt, M. L. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity: Acetaminophen hepatotoxicity and repair. *Liver International* **32**, 8–20 (2012).
9. Kaplowitz, N. Mechanisms of liver cell injury. *J. Hepatol.* **32**, 39–47 (2000).
10. Cordero-Espinoza, L. & Huch, M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **128**, 85–96 (2018).
11. Malhi, H. & Gores, G. J. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology* **134**, 1641–1654 (2008).
12. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37–40 (2001).
13. Cuenda, A. & Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1358–75 (2007).
14. Nebreda, A. R. & Porras, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 257–260 (2000).
15. Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100–3112 (2007).
16. Adams, R. H. *et al*. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol. Cell* **6**, 109–116 (2000).
17. Mudgett, J. S. *et al*. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10454–10459 (2000).
18. Tamura, K. *et al*. Requirement for p38α in Erythropoietin Expression. *Cell* **102**, 221–231 (2000).
19. Campbell, J. S., Argast, G. M., Yuen, S. Y., Hayes, B. & Fausto, N. Inactivation of p38 MAPK during liver regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**, 180–188 (2011).

20. Hui, L. *et al*. p38α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK–c-Jun pathway. *Nature Genetics* **39**, 741–749 (2007).
21. Stepniak, E. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes & Development* **20**, 2306–2314 (2006).
22. Tormos, A. M. *et al*. Liver-specific p38α deficiency causes reduced cell growth and cytokinesis failure during chronic biliary cirrhosis in mice. *Hepatology* **57**, 1950–1961 (2013).
23. Hui, L., Bakiri, L., Stepniak, E. & Wagner, E. F. p38α: A Suppressor of Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Cell Cycle* **6**, 2429–2433 (2007).
24. Sakurai, T. *et al*. p38 Inhibits Liver Fibrogenesis and Consequent Hepatocarcinogenesis by Curtailing Accumulation of Reactive Oxygen Species. *Cancer Research* **73**, 215–224 (2013).
25. Sakurai, T. *et al*. Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1α Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis. *Cancer Cell* **14**, 156–165 (2008).
26. Liedtke, C. *et al*. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **6**, 19 (2013).
27. Maes, M., Vinken, M. & Jaeschke, H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicology and Applied Pharmacology* **290**, 86–97 (2016).
28. Martínez, M., Mourelle, M. & Muriel, P. Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by CCl4. Role of cytochrome P-450. *J Appl Toxicol* **15**, 49–52 (1995).
29. Recknagel, R. O., Glende, E. A., Dolak, J. A. & Waller, R. L. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther.* **43**, 139–154 (1989).
30. Heinrichsdorff, J., Luedde, T., Perdiguero, E., Nebreda, A. R. & Pasparakis, M. p38α MAPK inhibits JNK activation and collaborates with IκB kinase 2 to prevent endotoxin-induced liver failure. *EMBO reports* **9**, 1048–1054 (2008).
31. Tannour-Louet, M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology* **35**, 1072–1081 (2002).
32. Knockaert, L. *et al*. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Laboratory Investigation* **92**, 396–410 (2012).
33. Tierney, D. J., Haas, A. L. & Koop, D. R. Degradation of cytochrome P450 2E1: selective loss after labilization of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 9–16 (1992).
34. Ambrosino, C. & Nebreda, A. R. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell* **93**, 47–51 (2001).
35. Lee, K., Kenny, A. E. & Rieder, C. L. P38 Mitogen-activated Protein Kinase Activity Is Required during Mitosis for Timely Satisfaction of the Mitotic Checkpoint But Not for the Fidelity of Chromosome Segregation. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 2150–2160 (2010).
36. Thornton, T. M. & Rincon, M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 44–51 (2009).
37. Wong, E. S. M. *et al*. p38MAPK Controls Expression of Multiple Cell Cycle Inhibitors and Islet Proliferation with Advancing Age. *Developmental Cell* **17**, 142–149 (2009).
38. Cichoż-Lach, H. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 8082 (2014).
39. Weber, L. W. D., Boll, M. & Stampfl, A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology* **33**, 105–136 (2003).
40. Tormos, A. M., Taléns-Visconti, R., Nebreda, A. R. & Sastre, J. p38 MAPK: A dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. *Free Radical Research* **47**, 905–916 (2013).
41. Cai, Z. *et al*. N-acetylcysteine protects against liver injure induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 8655–8662 (2015).
42. Jadeja, R. N., Upadhyay, K. K., Devkar, R. V. & Khurana, S. Naturally Occurring Nrf2 Activators: Potential in Treatment of Liver Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1–13 (2016).
43. Xu, W. *et al*. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Laboratory Investigation* **88**, 1068–1078 (2008).
44. Karlmark, K. R., Wasmuth, H. E., Trautwein, C. & Tacke, F. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **2**, 233–242 (2008).
45. Bernal, W., Lee, W. M., Wendon, J., Larsen, F. S. & Williams, R. Acute liver failure: A curable disease by 2024? *Journal of Hepatology* **62**, S112–S120 (2015).
46. Lee, W. M. Drug-induced Acute Liver Failure. *Clinics in Liver Disease* **17**, 575–586 (2013).
47. Ye, H., Nelson, L. J., Moral, M. G., del, Martínez-Naves, E. & Cubero, F. J. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology* **24**, 1373–1385 (2018).
48. Jaeschke, H., Xie, Y. & McGill, M. R. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *J Clin Transl Hepatol* **2**, 153–161 (2014).
49. Segalés, J., Perdiguero, E. & Muñoz-Cánoves, P. Regulation of Muscle Stem Cell Functions: A Focus on the p38 MAPK Signaling Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **4** (2016).
50. Séverin, S., Ghevaert, C. & Mazharian, A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **8**, 17–26 (2010).
51. Kang, Y. J., Bang, B.-R., Otsuka, M. & Otsu, K. Tissue-Specific Regulation of p38α-Mediated Inflammation in Con A-Induced Acute Liver Damage. *J. Immunol.* **194**, 4759–4766 (2015).
52. Liu, J. *et al*. Deficiency of p38α in macrophage ameliorates D -galactosamine/TNF-α-induced acute liver injury in mice. *The FEBS Journal* **284**, 4200–4215 (2017).
53. Khan, H. A., Ahmad, M. Z., Khan, J. A. & Arshad, M. I. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. *HBPD INT* **16**, 245–256 (2017).
54. Li, S., Hong, M., Tan, H.-Y., Wang, N. & Feng, Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1–21 (2016).
55. L'Hermitte, A. *et al*. Lect2 controls inflammatory monocytes to constrain the growth and progression of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, https://doi.org/10.1002/hep.30140 (2018).
56. Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G. & Desdouets, C. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest* **119**, 1880–7 (2009).
57. Gentric, G. *et al*. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* **125**, 981–92 (2015).

Acknowledgements

We thank Manolis Pasparakis for giving us the mice p38α$^{fl/fl}$. We thank the core facilities of the Institut Cochin, INSERM U1016 UMR CNRS 8104, Université Paris Descartes. We gratefully acknowledge the Centre d'Explorations Fonctionnelles staff for their technical assistance with mice. Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, F75006 Paris, France.

This work was supported by a grant from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). M.F. was supported by a fellowship from Ecole Doctorale BioSPC, Université Paris Descartes and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20170437207).

Author Contributions

M.F.: design, acquisition of all data, analysis and interpretation of all data, drafting of manuscript. M.C.: design, acquisition of data, analysis and interpretation of data (immune part of the study), critical reading of the manuscript. N.B.: performed experiments and technical support. S.P.: performed experiments (immune part of the study). R.D.: performed experiments and technical support. J.P.C.: study concept and experiments design (immune part of the study), critical reading of the manuscript. C.D.: study concept, funding and critical reading of the manuscript. S.C.M.: study concept, study supervision, planned the experiments, interpreted data, designed the figures and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-51175-z.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019