N°d'ordre NNT : 2020LYSE1007

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Pathologies hépatiques et inflammation
Discipline : Biologie moléculaire et régulation traductionnelle

Soutenue publiquement le 30 Janvier 2020, par :
Romain BARNAULT

La nétrine-1 et son récepteur UNC5A en contexte de stress réticulaire et d'inflammation hépatiques

---

Devant le jury composé de :

Mr. Pr. **Fabien ZOULIM**, PU-PH, CRCL – HCL	Président du jury
Mr. Dr. **Martin DUTERTRE**, CR, Institut Curie	Rapporteur
Mme. Pr. **Valérie PARADIS**, PU-PH, Paris VII - Inserm	Rapporteure
Mme. Dr. **Hélène SRICK-MARCHAND**, CR, Institut Pasteur	Rapporteure
M. Dr. **Patrick MEHLEN**, DR, CRCL	Examinateur
M. Dr. **Romain PARENT**, CR, CRCL	Directeur de thèse
Mme. Dr. **Virginie MARCEL-TERRIER**, CR, CRCL	Invitée

Université Claude Bernard - Lyon 1

Président de l'université	M. Frédéric FLEURY
Président du conseil académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président de la Commission des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odonthologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des sciences et techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche	
En Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTE & DEPARTEMENT DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR – Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR STAPS	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	directeur : M. Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière de d'Assurance	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur provisoire : M. Pierre CHAREYRON

La nétrine-1 et son récepteur UNC5A en contexte de stress réticulaire et d'inflammation hépatiques

Résumé

Les pathologies hépatiques chroniques évoluent à plus ou moins long terme vers la cirrhose, qui est un facteur de risque majeur pour l'hépatocarcinome. Quelques soient les étiologies de ces pathologies : virale, métabolique ou, plus rarement génétique, des voies de signalisation assez similaires, même si non identiques, sont impliquées.

Parmi ces évènements, on trouve la réponse UPR (Unfolded Protein Response) déclenchée par le stress du réticulum endoplasmique, l'inflammation chronique due aux antigènes viraux présents et entretenue par la cytolyse des hépatocytes, et enfin, à un niveau plus moléculaire, la présence en quantité augmentée d'un ligand carcinogène : la nétrine-1.

Ce travail de thèse a exploré les liens entre ces différentes composantes en vue d'identifier de nouveaux déterminants de la carcinogénèse du foie. Nous avons pour cela considéré des échantillons cliniques, de souris, ainsi que issus de cellules primaires et de lignées en culture, lesquels ont été mis en œuvre dans des approches préparatives et analytiques.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'implication d'un récepteur de la nétrine-1 (UNC5A) au cours du processus d'UPR. La nétrine-1 voit son expression maintenue dans un tel contexte, et inhibe l'apoptose induite par l'UPR dans l'hépatocyte. Nous avons mis en évidence que la nétrine-1 inhibait l'apoptose via son récepteur à dépendance UNC5A, dont l'expression est aussi logiquement abaissée durant le stress du réticulum endoplasmique.

La nétrine-1, protéine sécrétée carcinogène, semble également régulée par l'inflammation, largement impliquée dans la carcinogénèse hépatique. Nous avons montré que la nétrine-1 est régulée topologiquement et traductionnellement via son transcrit par l'inflammation hépatocytaire in vitro, in vivo, et probablement chez les patients. Nous avons disséqué les modalités cellulaires et biochimiques de cette induction.

Dans leur ensemble, mes travaux de thèse suggèrent que la nétrine-1, via ses récepteurs à dépendance et, dans ce travail, UNC5A, joues des rôles délétères en physiopathologie hépatique, probablement en lien avec leur capacité, in fine, à inhiber la mort cellulaire dans un contexte de susceptibilité accrue à l'hépatocarcinome comme la cirrhose.

Netrin-1 and its cognate UNC5A receptor upon ER stress and inflammation in the liver

Abstract

Chronic liver diseases evolve, over a short to longer term basis, towards cirrhosis, which is a major risk factor for hepatocarcinoma. Regardless of the etiologies of these pathologies: viral, metabolic or, more rarely genetic, similar (though not identical) signaling pathways are involved.

These events include the UPR (Unfolded Protein Response) triggered by endoplasmic reticulum stress, chronic inflammation due to viral antigens or cytolysis of hepatocytes, and finally, at a more molecular level, the presence of increased amounts of a carcinogenic ligand: netrin-1.

My PhD training explored the links between these different components in order to identify new determinants of liver carcinogenesis. I considered clinical samples from mice, as well as from primary and cultured cells, which were used for preparative and analytical approaches.

I initially studied the involvement of a netrin-1 dependence receptor (UNC5A) during the UPR process. Netrin-1 expression is maintained in such a context, and inhibits UPR-induced apoptosis in the hepatocyte. I have shown that netrin-1 inhibits apoptosis via the same receptor UNC5A, the expression of which is also logically lowered during endoplasmic reticulum stress.

Netrin-1, a carcinogenic secreted protein, also appears to be regulated by inflammation, which is largely implicated in hepatic carcinogenesis. I have shown that netrin-1 is topologically and translationally upregulated via its transcript upon hepatic inflammation in vitro, in vivo, and likely in patients also. I dissected the cellular and biochemical modalities of this induction.

Overall, my work suggests that netrin-1, via its dependence receptors, UNC5A in my case, plays deleterious roles in liver pathophysiology. This is probably related to the ability of netrin-1 to ultimately impede cell death, in a context of increased susceptibility to hepatocarcinoma, such as during cirrhosis.

Table des matières

1 Le foie 17

1.1 Physiologie 17

1.2 Composition 17

1.2.1 L'unité fonctionnelle hépatique 17
1.2.2 Les différents types cellulaires du foie 19
1.2.3 Les hépatocytes 19
1.2.3.1 Les fonctions métaboliques 19
1.2.3.2 Les fonctions biliaires 21
1.2.4 Les cellules sinusoïdales 21
1.2.5 Les cellules stellaires 23
1.2.6 Les cellules de Kupffer 23

1.3 Pathologie 25

1.3.1 Pathologies virales 27
1.3.1.1 Les hépatites aigues A et E 27
1.3.1.2 Les hépatites chroniques B, C et Delta 27
1.3.2 Pathologies non virales 29
1.3.2.1 L'alcool 29
1.3.2.2 L'aflatoxine B1 30
1.3.2.3 Les maladies métaboliques 30
1.3.3 Des facteurs communs à toutes ces pathologies : Le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation hépatique 31
1.3.4 L'hépatocarcinome 31
1.3.4.1 Causes 32
1.3.4.2 Thérapies actuelles 32
1.3.4.3 Prévention 32

1.4 Les modèles d'études 33

1.4.1 In vitro 33
1.4.2 In vivo 33

2 Nétrine-1 et récepteurs à dépendance 35

2.1 Découverte 35

2.2 Phylogénie 35

2.3 Caractéristiques structurales 35

2.4 La nétrine-1 37

2.5 Profil d'expression 37

2.6 Principe des récepteurs à dépendance 39

2.7 Le récepteur UNC5A 39

2.7.1 Signalisation positive 43
2.7.1 Signalisation négative 47

2.8 Apoptose 47

2.8.1 La voie extrinsèque 49
2.8.2 La voie intrinsèque 49
2.8.3 La dégradation de l'ADN 49
2.8.4 Apoptose et pathologies associées 50

2.9 Pathologies associées aux récepteurs à dépendance 50

2.9.1 Equilibres ligand-récepteurs 51
2.9.2 Essai thérapeutique 51

2.10 Les modèles d'études 51
2.10.1 In Vitro 51
2.10.1 In Vivo 53

2.11 Pathologies hépatiques et nétrine-1 53

3 Synthèse des protéines et stress du réticulum endoplasmique 57

3.1 Généralités sur la synthèse protéique 57
3.1.1 La transcription 57
3.1.2 Modifications post-transcriptionnelles 57
3.1.3 Export des ARNm 58
3.1.4 La traduction 58
3.1.4.1 Initiation de la traduction 58
3.1.4.2 L'élongation 59
3.1.4.3 La terminaison 60
3.1.4.4 Régulation de la biosynthèse des protéines 60
3.1.5 La sécrétion 60
3.1.6 La dégradation 62
3.1.7 Les protéines dans la cellule : importance de la structure 62

3.2 Le réticulum endoplasmique 63
3.2.1 Structure du réticulum endoplasmique 63
3.2.2 Fonction du réticulum endoplasmique 63
3.2.3 Le stress du réticulum endoplasmique 67
3.2.4 La réponse aux protéines mal repliées ou UPR 67

3.3 Voies de signalisation de l'UPR 68
3.3.1 La voie de signalisation IREα 68
3.3.2 La voie de signalisation PERK 70
3.3.3 La voie de signalisation ATF6α 70
3.3.4 Induction de l'apoptose 72

3.4 UPR et pathologies hépatiques 72
3.4.1 Pathologies virales 72
3.4.2 Les pathologies non virales 73

3.5 Nétrine-1 et UPR 73

3.6 Les modèles d'étude 74
3.6.1 In vitro 74
3.6.1.1 Induction de l'UPR 74
3.6.1.2 Etude de la traduction 75
3.6.2 In vivo 75

4 L'inflammation 78

4.1 Généralités 78
4.1.1 Les récepteurs de l'immunité innée 78
4.1.2 Signalisation cellulaire 79
4.1.3 Réponse transcriptionnelle 79
4.1.4 L'inflammasome 82

4.2 Les cellules immunitaires hépatiques 82
4.2.1 Les hépatocytes 82
4.2.2 Les cellules étoilées 82
4.2.3 Les cellules endothéliales 84
4.2.4 Les cellules de Kupffer 84

4.3 Orchestration de l'inflammation hépatique 85
4.3.1 Les cellules immunitaires sanguines 86

4.3.2 Les macrophages dérivés de la moelle osseuse 86
4.3.3 Les polynucléaires neutrophiles 88
4.3.4 Les cellules dendritiques 88
4.3.5 Les cellules lymphocytaires T 89

4.4 Les pathologies humaines 89

4.5 L'inflammation hépatique chez la souris 89

4.6 Les modèles d'étude 92
4.6.1 In vitro 92
4.6.2 In vivo 93

5 Netrin-1, UPR et inflammation 94

6 Objectifs 97

7 Projet 1 : UNC5A et UPR 100

Hepatocellular carcinoma-associated depletion of the netrin-1 receptor Uncoordinated Phenotype-5A (UNC5A) skews the hepatic unfolded protein response towards prosurvival outcomes. 100

8 Projet 2 : Inflammation hépatique et nétrine-1 108

9 Discussion 155

10 Perspectives 160

11 Bibliographie 161

Table des illustrations

Figure 1 : Physiologie hépatique 16
Figure 2 : Unité fonctionnelle hépatique: le lobule hépatique 18
Figure 3 : Les différents types cellulaires du foie 20
Figure 4 : Les fonctions des hépatocytes 22
Figure 5: Pathologies virales hépatiques 26
Figure 6: La nétrine-1 guide les axones pendant la neurogénèse 34
Figure 7: La famille des nétrines 36
Figure 8: Le concept de récepteur à dépendance 38
Figure 9 : La famille des récepteurs à dépendance 41
Figure 10: Les récepteurs de la nétrine-1 42
Figure 11: Les récepteurs UNC5A et UNC5B 44
Figure 12: Les voies de signalisation positives induites par les récepteurs UNC5A et B 45
Figure 13: Les voies de signalisation négatives induites par les récepteurs UNC5A et B 46
Figure 14: Les voies d'induction de l'apoptose 48
Figure 15: Perte de fonction pro-apoptotique des récepteurs à dépendance 52
Figure 16: Etapes et régulations de la synthèse des protéines 56
Figure 17: Le réticulum endoplasmique 64
Figure 18: Le cycle de la calnexine/calréticuline 66
Figure 19 : Les voies de signalisation de la réponse UPR 69
Figure 20: Les voies d'induction de l'apoptose par l'UPR 71
Figure 21: Etude de la traduction 76
Figure 22 : Voies de signalisation des TLRs, NLRs et inflammasomes 80
Figure 23 : Voies de signalisation des CLRs, des RLRs, et CDSs 81
Figure 24 : Les cellules et les composants de l'immunité innée et adaptatrice 83
Figure 25: La réponse immunitaire hépatique 87
Figure 26: Différence immunitaire entre l'homme et la souris 91
Figure 27: Inflammation, nétrine-1 et hépatocarcinogénèse 96
Figure 28: Inflammation, nétrine-1 et hépatocarcinogénèse 99

Table des tableaux

Tableau 1: Le score Métavir 24

Tableau 2: Les récepteurs à dépendance et leurs ligands 40

Abréviations

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ARNm: Acide RiboNucléique messager

ARNt: Acide RiboNucléique de transfert

ATF: Activating Transcription Factor

BiP: Binding Immunoglobuline Protein

bZip: Basic leucine ZIPper

CAD: Caspase activated Domain

CCL : CC Chemokine Ligands

CD : Cluster de Différentiation

CHOP : C/EBP-HOmologous Protein

CXCL: C-X-C motif Ligand

DAPK: Death Associated Protein Kinase

DCC: Deleted in Colorectal Cancer

DD: Death Domain

DTT: DiThioThréitol

eEF: eukaryotic translation elongation factor

EGF : Epithelial Growth factor

eIF: eukaryotic translation initiation factor

eRF: eukaryotic translation Release Factor

ERAD: ER-Associated Degradation

ERp57: Endoplasmic Reticulum protein 57

ETS-1: E26 Transformation Specific

GPI: Glucosyl-phosphatidyl-inositol

GRP: glucose Related Protein

GADD34: growth arrest and DNA Damage-inducible factor 34

HBs: Hepatits B virus small protein

HIF1α: Hypoxia inducible factor α

HSP : Heat Shock Protein

IL : Interleukine

IRE1α: Inositol requiring enzyme α

IRES : Internal Ribosome Entry Site

IRF : Interferon Regulatory Factor

kDa : kiloDalton

LPS: LipoPolySaccharide

MAPK: Mitose Associated Protein Kinase

MCP1: monocyte Chemoattactant protein 1

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF-κB: Nuclear Factor Kappa B

NK : Natural Killer

NLR : NOD-Like Receptor

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PABP : Poly(A) Binding Protein

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PI3K : PhosphatidylInositol-3 Kinase

Poly(I :C) : acide Polyinosinique-Polycytidylique

PRR : Pathogen Recognition Receptor

RANTES : Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RIDD : Regulated IRE1-Dependent Decay of mRNA

RLR : RIG-Like Receptor

ROS : reactive Oxygen Spicies

SIDA : Syndrome d'Immuno Déficience Acquise

TAK1 : Transforming growth factor β-Activated Kinase 1

TBK1 : TANK Binding Kinase 1

TGFα : Transforming growth Factor α

Th17: T Helper 17

TLR: Toll-Like receptor

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

TRAF: TNF Receptor associated Factor 2

Unc6: Uncoordinated 6

UNC5: Uncoordinated 5

UPR: Unfolded Protein Response

UTR: UnTranslated region

XBP1: X-Box Binding Protein 1

XIAP: X-linked IAP

ZU-5: Zona-occludens/Unc-5 homology Domain

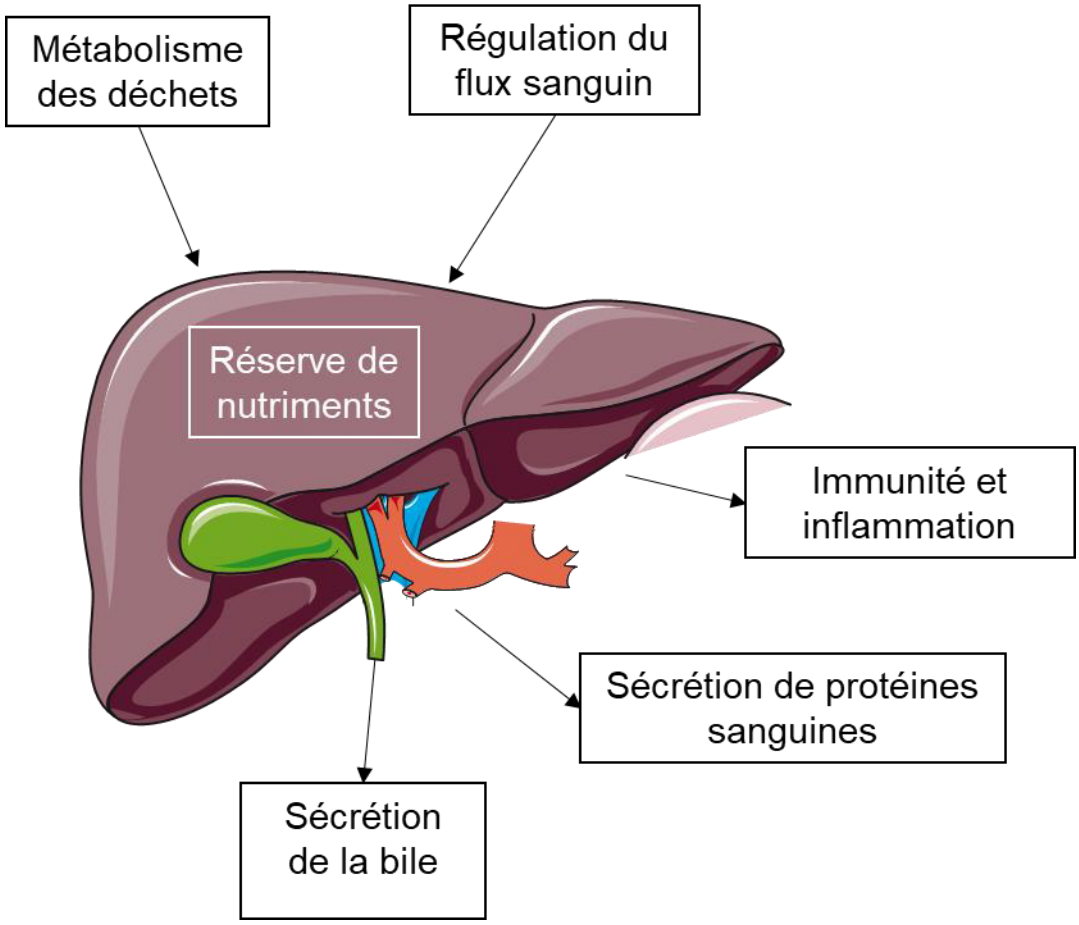


Figure 1 : Physiologie hépatique

Le foie est chargé du métabolisme du glucose, des déchets chimiques, de la régulation du flux sanguin, et sécrète les sels biliaires et les protéines sanguines. Il est impliqué dans la régulation de l'immunité innée et adaptative. (Textbook of Hepatology - From Basic Science to Clinical Practice - THIRD EDITION, Benhamou, Blackwell Edition 2007)

1 Le foie

1.1 Physiologie

Le foie est le plus gros organe glandulaire du corps humain. Il est composé de quatre lobes et de la vésicule biliaire. Il comprend deux activités sécrétrices, une exocrine (sécrétion de la bile pour l'activité digestive) et une endocrine (sécrétion de molécules dans les voies sanguines pour la signalisation dans l'organisme et la contribution à l'homéostasie sanguine)(Knell, 1980).

Le foie permet la mise en réserve et la redistribution des nutriments en particulier glucidiques et lipidiques provenant de l'intestin, la biotransformation et l'élimination des déchets endogènes et exogènes (membranes, médicaments…), la formation des sels biliaires, la régulation du flux sanguin et est impliqué dans les processus immunitaires **(Figure 1)** et de phase aigüe. (Textbook of Hepatology - From Basic Science to Clinical Practice - THIRD EDITION, Benhamou, Blackwell Edition 2007)

1.2 Composition

1.2.1 L'unité fonctionnelle hépatique

L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. L'organe en est composé de plus de près d'un million. Ces lobules présentent un arrangement tridimensionnel permettant au sang circulant dans le foie d'avoir un contact optimal avec les hépatocytes qui peuvent alors assurer leurs fonctions de détoxification et de sécrétion.

Les lobules hépatiques sont entourés d'espaces portes, composés d'une branche de la veine porte, d'une branche de l'artère hépatique, et d'un canal biliaire. Le sang provenant de l'espace porte (70% issu de la veine porte et 30% de l'artère hépatique) traverse les lobules hépatiques via des vaisseaux sanguins perméables, les sinusoïdes, qui bordent les travées d'hépatocytes qui composent les lobules. Le sang rejoint la veine centrolobulaire, et la circulation générale par la veine sushépatique. Les canaux biliaires permettent l'écoulement de la bile formée par les hépatocytes et son accumulation dans la vésicule biliaire. **(Figure 2)** (Saxena et al., 1999)

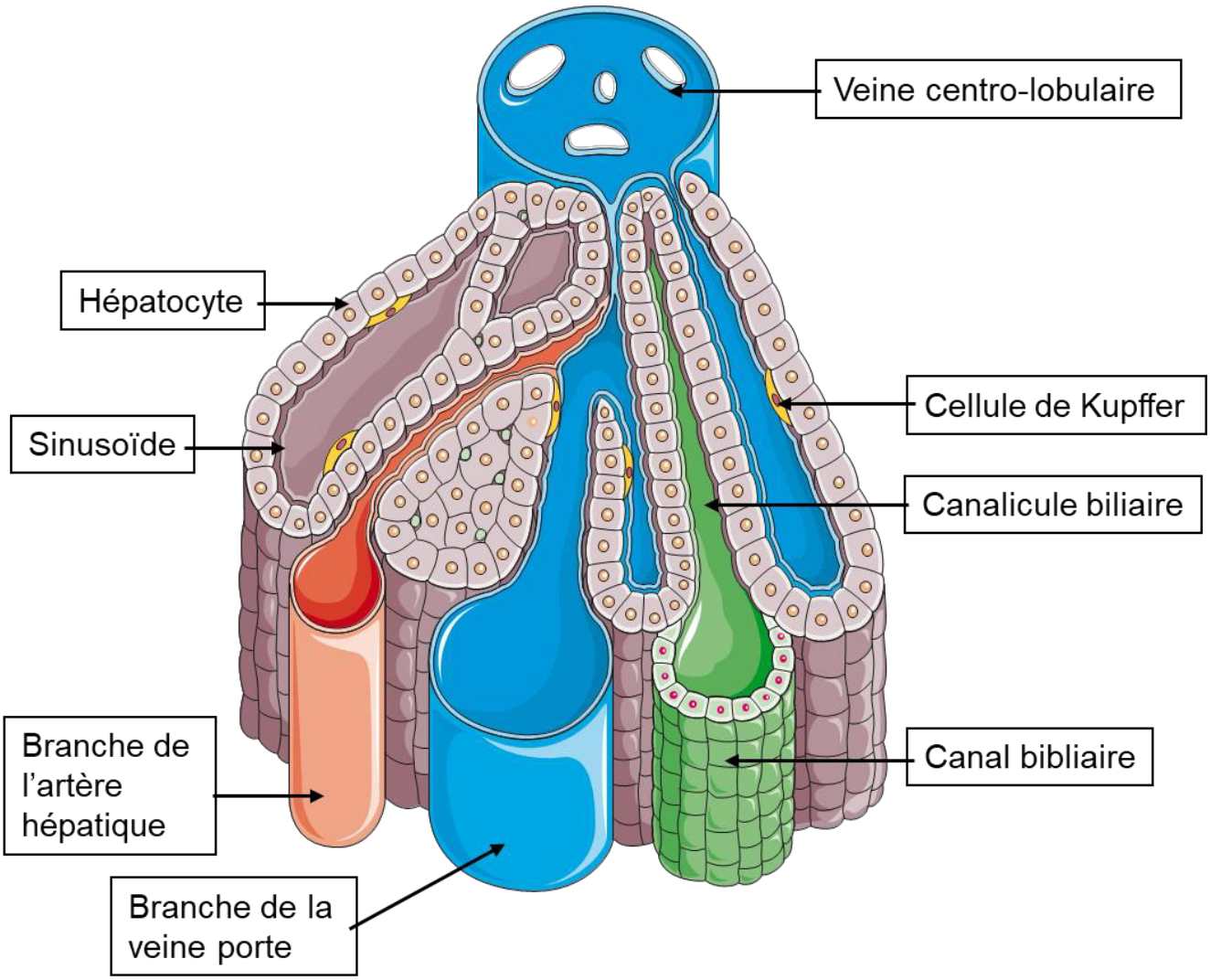


Figure 2 : Unité fonctionnelle hépatique: le lobule hépatique

Le sang s'écoule de l'espace porte (defini par la juxtaposition du canal biliaire, de la branche de la veine porte et de la branche de l'artère hépatique) vers la veine centro-lobulaire le long des sinusoïdes et des travées d'hépatocytes. (Textbook of Hepatology - From Basic Science to Clinical Practice - THIRD EDITION, Benhamou, Blackwell Edition 2007)

1.2.2 Les différents types cellulaires du foie

Les hépatocytes sont les cellules hépatiques les plus représentées. Avec les cholangiocytes qui forment les canaux biliaires, et les cellules étoilées présentes dans l'espace de Disse, elles forment le parenchyme hépatique, délimité par les cellules endothéliales sinusoïdales,
qui bordent donc les sinusoïdes. Les cellules de Kupffer sont des macrophages résidents du foie, issus d'un processus ontogénétique distinct de celui de la lignée myéloïde circulante, et sont enchâssés dans la paroi sinusoïdale. **(Figure 3)**

1.2.3 Les hépatocytes

Les hépatocytes sont, à un niveau de 80%, les cellules les plus représentées dans le foie. Elles sont organisées en travées au seins des lobules hépatiques et sont bordées par les sinusoïdes, permettant un échange facilité avec le compartiment sanguin, via les fenestrations. Les hépatocytes assurent différentes fonctions physiologiques dans le foie. **(Figure 2-3)**

1.2.3.1 Les fonctions métaboliques

L'une des fonctions principales des hépatocytes est de réguler le métabolisme des glucides. Ils ont en effet la capacité de stocker du glucose sous forme de glycogène durant les moments où l'apport en glucose est supérieur aux besoins de l'organisme (glycogenèse). Lorsque les besoins sont supérieurs aux apports, la glycogénolyse permet la libération du glycogène stocké dans les hépatocytes en glucose dans le sang. Ces mécanismes contribuent à la régulation de la glycémie et sont sous le contrôle d'hormones produites par le pancréas : l'insuline et le glucagon. Lorsque les besoins de l'organisme augmentent et qu'il n'y a plus de glycogène à dégrader dans le foie, la néoglucogenèse se met en place. Ce processus métabolique possible dans les hépatocytes permet la fabrication de glucose à partir de composés non glucidiques comme les acides aminés ou les acides gras.
En plus de leur activité régulatrice de la glycémie, les hépatocytes sécrètent un grand nombre de protéines plasmatiques, tant en diversité (80% du protéome plasmatique) qu'en quantité, comme l'albumine, les protéines impliquées dans la coagulation sanguine, les lipoprotéines plasmatiques, les protéines du système du complément, de l'inflammation, de

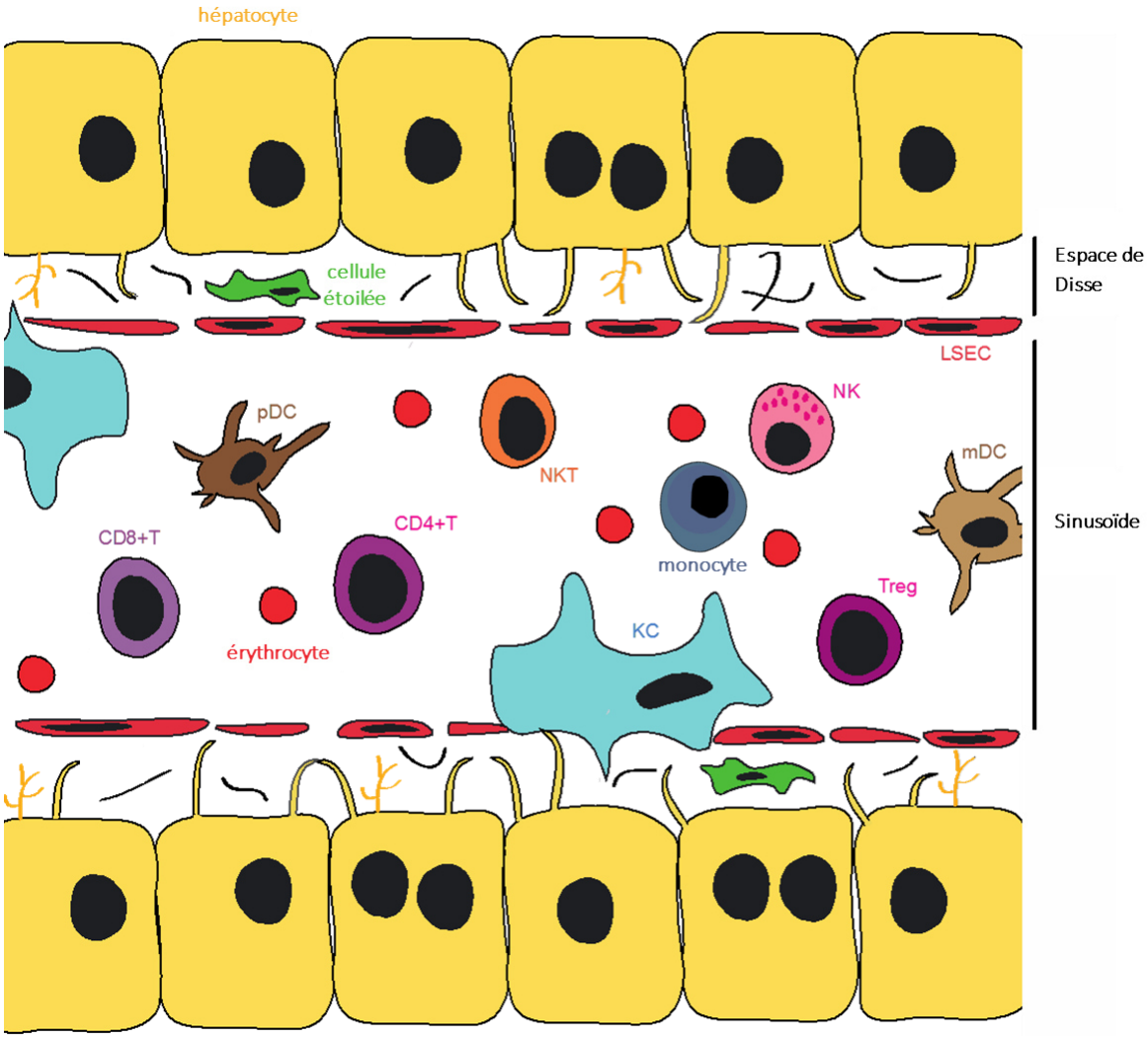


Figure 3 : Les différents types cellulaires du foie

On trouve dans le parenchyme les hépatocytes (jaune) et les cellules étoilées (vert). Les cellules sinusoïdales (rouge) forment la limite du parenchyme. Se trouvent majoritairement dans le compartiment sanguin les cellules immunitaires, non circulantes comme les cellules de Kupffer (bleu clair) ou circulantes comme les monocytes (bleu foncé), les cellules T CD8+ et CD4+ (violet), les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules Natural Killer et Natural Killer T (NK-NKT) ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). (Textbook of Hepatology - From Basic Science to Clinical Practice - THIRD EDITION, Benhamou, Blackwell Edition 2007) (Réalisé par le Dr. Julie Lucifora, Thèse de Suzanne FAURE—DUPUY)

la matrice extracellulaire, et les facteurs impliquées dans le transfert d'ions ou de molécules. Les hépatocytes sont également impliqués dans le métabolisme et le catabolisme des acides aminés, ainsi que le métabolisme et le stockage des lipides. (Textbook of Hepatology - From Basic Science to Clinical Practice - THIRD EDITION, Benhamou, Blackwell Edition 2007)

1.2.3.2 Les fonctions biliaires

Les hépatocytes sont également impliqués dans la synthèse des sels biliaires à partir de dérivés du cholestérol. Le métabolisme de la bilirubine, issue du cholestérol, est aussi assuré dans le foie par les hépatocytes. La bilirubine est conjuguée à un acide glucuronique, puis relarguée dans la circulation sanguine jusqu'à être filtrée par le rein. Une partie de la bilirubine conjuguée est recaptée au cours du cycle entérohépatique puis par les hépatocytes et sécrétée dans la bile. Les hépatocytes sont responsables de la synthèse des sels biliaires comme la biliverdine, qui forment la bile entre autres composés. **(Figure 4)**

Ces sels biliaires s'écoulent entre les hépatocytes dans les canalicules biliaires, avant de rejoindre les canaux biliaires de l'espace porte (les cholangiocytes forment ces canaux) puis la vésicule biliaire ou ils vont former la bile. La bile est composée à 65% de sels biliaires primaires, de cholestérol, de phospholipides et de pigments biliaires (bilirubine, biliverdine principalement). La bile, lorsqu'elle est déversée dans l'intestin, permet une digestion facilitée des graisses. En effet, les sels biliaires sont des composés amphipathiques qui émulsifient les graisses en micelles et augmentent la surface d'accessibilité des lipases intestinales. Les sels biliaires permettent également une meilleure assimilation des vitamines liposolubles comme la vitamine A, stockée dans les cellules étoilées.

1.2.4 Les cellules sinusoïdales

Les cellules sinusoïdales sont l'interface entre le tissu sanguin et le tissu hépatique. Ce sont des cellules endothéliales formant les sinusoïdes. Elles représentent environ 15-20% des cellules hépatiques, mais seulement 3% de son volume. Elles ont une architecture discontinue, un cytoplasme fenêtré et ne comporte pas de membrane basale. Ces caractéristiques permettent donc des échanges faciles entre le sang et les hépatocytes sous-jacents à la barrière endothéliale(Poisson et al., 2017)

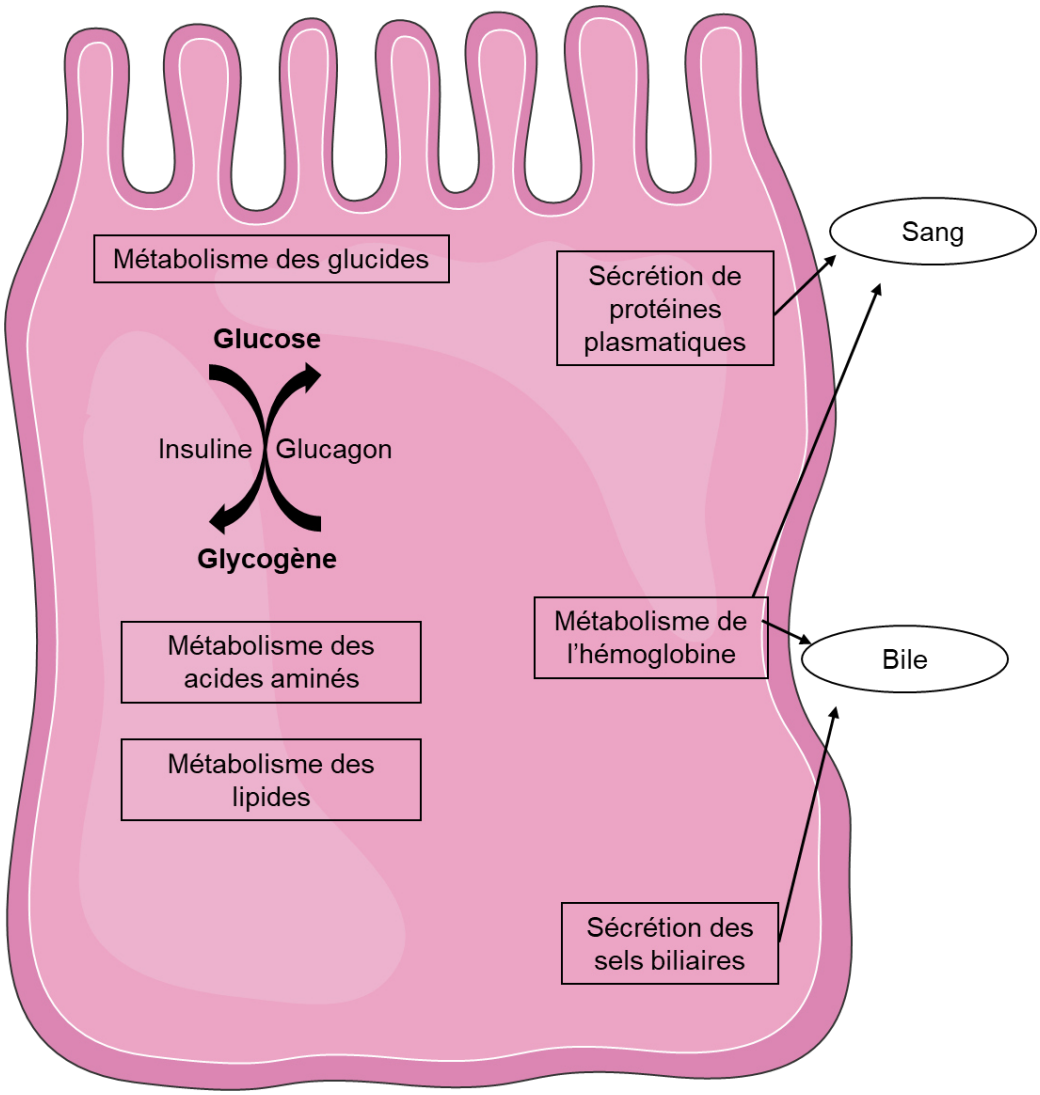


Figure 4 : Les fonctions des hépatocytes

Les hépatocytes prennent en charge le métabolisme des glucides, des acides aminés et des lipides. Ils sont responsables du stockage du glucose sous forme de glycogène. Les hépatocytes sont également responsables de la synthèse des protéines plasmatiques, et du métabolisme de l'hémoglobine. L'élimination est prise en charge en grande partie par filtration rénale, et par l'évacuation dans la bile, avec les sels biliaires synthétisés par les hépatocytes. (Textbook of Hepatology - From Basic Science to Clinical Practice - THIRD EDITION, Benhamou, Blackwell Edition 2007)

1.2.5 Les cellules stellaires

Les cellules stellaires ou étoilées sont des cellules présentes dans le parenchyme hépatique, entre les hépatocytes et les cellules endothéliales, dans l'espace dit 'de Disse'. Ces cellules constituant 15% du foie sont aujourd'hui les moins étudiées. Ces cellules forment un groupe hétérogène ayant une morphologie et des fonctions différentes, de par l'expression de filaments du cytosquelette spécifiques, de leur contenu en acide rétinoïque (vitamine A) et leur potentiel de synthèse de matrice extracellulaire (Yin et al., 2013).

Elles sont principalement connues pour leur capacité à stocker la vitamine A, et à synthétiser les fibres de la matrice extracellulaire du foie. Lors d'une sur-activation de ces cellules (infection hépatique chronique ou lésion chimique ou physique), elles subissent une transdifférentiation en myofibroblastes (Higashi et al., 2017). Elles produisent alors de grandes quantités de matrice extracellulaire, notamment de collagène fibrillaire, tissu cicatriciel, impliqué dans la fibrose hépatique. Ces cellules sont également impliquées dans la régulation de l'immunité hépatique, notamment par l'amplification de la réponse inflammatoire, en induisant l'initiation de l'infiltration des leucocytes mononucléaires et polynucléaires préalablement circulants (Higashi et al., 2017).

Lorsque les cellules stellaires sont activées, elles sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance, notamment du TGF-α et de l'EGF, responsables de la prolifération des hépatocytes durant la régénération du foie (Higashi et al., 2017). Ces deux ligands sont également impliqués dans la stimulation de la mitose des cellules stellaires.

D'autres facteurs, tels que MCP-1, CCL21, et RANTES sont sécrétées par les cellules étoilées après leur activation. Les cellules étoilées peuvent être elles-mêmes activées par des cytokines pro-inflammatoires, mais également par des molécules issues de la dégradation des cellules en cours d'apoptose telles que l'ADN des cellules, riches en CpG. Ces ADN peuvent activer les cellules stellaires via le récepteur TLR9 (Gäbele et al., 2008).

1.2.6 Les cellules de Kupffer

Dans la lumière des sinusoïdes, on trouve les cellules de Kupffer, des macrophages résidents du foie. Ces cellules jouent un rôle dans l'épuration du sang, par la phagocytose de composés/particules endogènes (hématies en fin de vie, noyau prosthétique de l'hème…) ou exogènes qui ne sont pas arrêtées par la barrière intestinale (endotoxines bactériennes,

Activité (grade)	Fibrose (stade)
A0: sans activité	F0: sans fibrose
A1: activité minime	F1: Fibrose portale sans septa
A2: Activité modérée	F2: Fibrose portale et quelques septa
A3: Activité sévère	F3: Fibrose septale sans cirrhose
	F4: Cirrhose

Tableau 1: Le score Métavir

Le score Métavir est un score d'anatomopathologie permettant de mesurer le stade d'avancement des pathologies hépatiques à partir de la description des biopsies. L'activité reflète l'activité immunitaire et histologique de la biopsie. L'évaluation de la fibrose permet de décrire l'état d'avancement fibrotique du foie, et la gravité de la pathologie. (Bedossa, 1996)

particules minérales ou virales). Ces cellules jouent un rôle important dans l'inflammation hépatique (immunité innée) ainsi que dans la présentation d'antigène.(Crispe, 2011; Krenkel and Tacke, 2017)

1.3 Pathologie

Les atteintes du foie peuvent perturber gravement l'homéostasie de l'organisme humain du fait de ses nombreuses fonctions. Ces atteintes peuvent être d'origines virales ou non virales, aigües ou chroniques. Une atteinte hépatique aigüe va conduire dans la plupart des cas à une cytolyse massive mais réversible, grâce au pouvoir régénératif important du foie. En revanche, une atteinte chronique du foie, qu'elle soit virale ou non, va mener à une inflammation chronique, responsable de l'activation des cellules stellaires et de la surproduction de matrice extracellulaire par ces dernières. L'accumulation de tissu cicatriciel fibreux dans le parenchyme est à l'origine de la fibrose hépatique. Cette fibrose peut s'intensifier jusqu'à perturber complètement la physiologie hépatique, lorsque les hépatocytes ne parviennent pas à se régénérer correctement, ou qu'il n'y a pas assez de zone de contact entre le sang et les hépatocytes (Textbook of Hepatology - From Basic Science to Clinical Practice - THIRD EDITION, Benhamou, Blackwell Edition 2007). Il existe un score permettant de mesurer le stade de fibrose hépatique **(Tableau 1)**, allant de F0 pour les individus sains à F4 pour les individus cirrhotiques. F0 indique une absence de fibrose, F1 une fibrose portale et périportale légère sans septum fibreux, F2 une fibrose portale et périportale modérée avec de rares septa fibreux, F3 une fibrose portale et périportale avec de nombreux septa fibreux, et F4 une cirrhose, indiquant l'incapacité relative ou sévère du foie à remplir ses fonctions physiologiques. Ce score de fibrose, déterminé par un anatomopathologiste à partir de l'observation au microscope de biopsies hépatiques, est couplé au score d'activité (pour les patients atteint d'hépatite C et d'hépatite B ou B/D) représentatif du niveau d'infiltration de cellules inflammatoires et de la nécrose hépatique (activité histologique) (Bedossa, 1996). Le score A0 décrit des hépatites chroniques sans activité histologique, le score A1 des hépatites chroniques avec une activité histologique légère, le score A2 pour une activité histologique modérée, et le score A3 (le plus haut) pour les biopsies présentant des activités histologiques sévères. Le couplage de ces deux scores permet de définir le score Métavir.

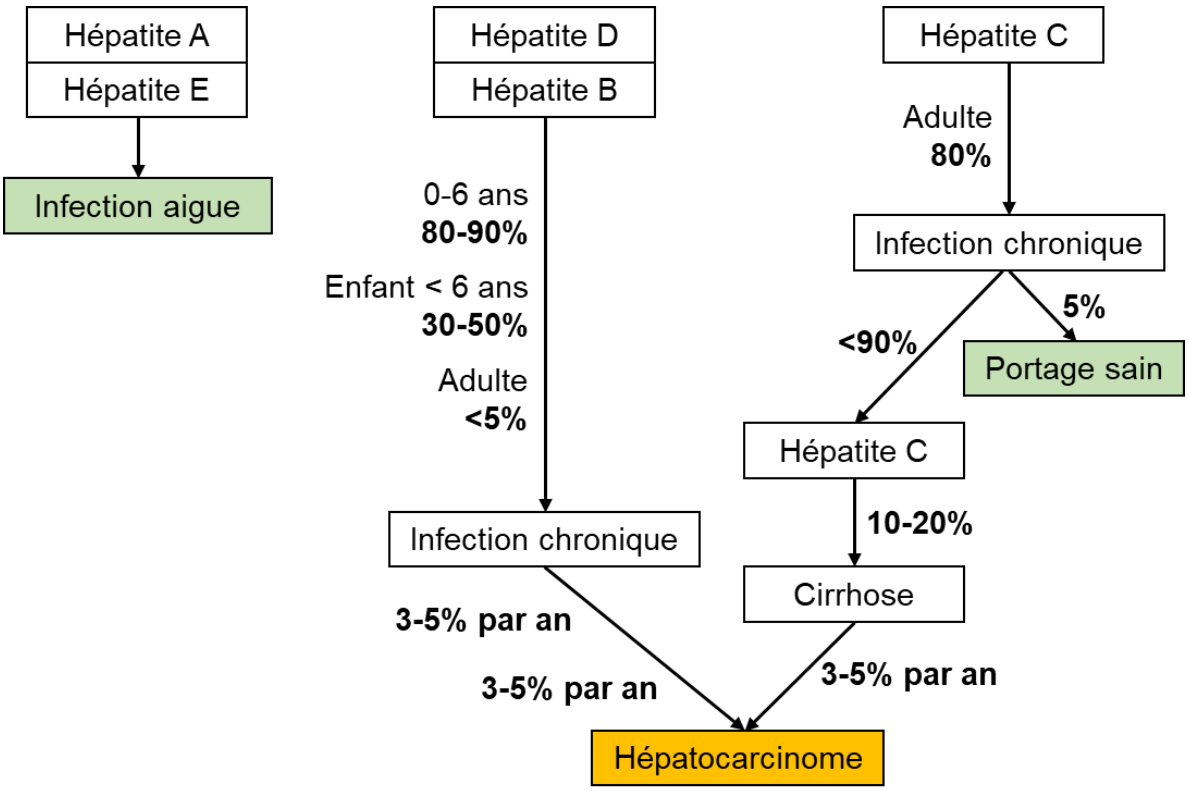


Figure 5: Pathologies virales hépatiques

Les hépatites A et E n'induisent pas de pathologie chronique. L'infection dure quelques semaines, le temps pour l'organisme de mettre en place une réponse immunitaire adaptative et de supprimer les cellules infectées.

Les virus de l'hépatite B et D peuvent devenir chroniques principalement chez les enfants en bas âge. L'hépatite C devient chronique chez l'adulte dans une proportion beaucoup plus grande. Ces deux virus vont induire des dommages hépatiques menant jusqu'à la fibrose et l'hépatocarcinome (Ringehan et al., 2017).

Ce score est utilisé pour définir les options thérapeutiques de suivi des patients, en vue d'apprécier l'évolution des pathologies chronique au cours du temps **(Tableau 1)**.

1.3.1 Pathologies virales

Le foie peut être infecté par différents virus hépatotropes, tels que les hépatites A, B, C, D et E.

1.3.1.1 Les hépatites aigues A et E

Les virus d'hépatite A et d'hépatite E (Ankcorn and Tedder, 2017) ne provoquent pas d'infection chronique, sauf immunosuppression sous-jacente dans le cas du virus E. Ces deux virus vont infecter le foie après avoir rejoint la circulation sanguine en passant à travers l'épithélium du pharynx ou de l'intestin. Ces deux virus peuvent infecter les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Ces virus ne semblent pas cytopathogènes par eux-mêmes. L'atteinte hépatique et la lyse des cellules infectées interviendraient après la réaction immunitaire de l'organisme. Une infection par l'un de ces virus est suivi par une réaction immunitaire adaptative de l'organisme menant à la synthèse d'anticorps dirigés contre ces virus. Les symptômes sont principalement dus à la lyse des hépatocytes infectés, par le système immunitaire.

Ces infections sont guéries par le système immunitaire, sans besoin de traitement supplémentaires (Walker, 2019) .Néanmoins une infection par le virus E lors d'une grossesse peut se révéler redoutable pour la mère et l'enfant. Les traitements administrés permettent de diminuer les symptômes de l'infection. **(Figure 5)**

1.3.1.2 Les hépatites chroniques B, C et Delta

Les virus des hépatites B, C et Delta peuvent eux, mener à l'apparition de pathologies chroniques.

L'infection d'un adulte par l'hépatite B va déboucher sur une pathologie chronique dans moins de 5% des cas, contre plus de 95% de cas d'infection chronique *in utero* ou chez le nourrisson. 5 à 10% des adultes présentant une pathologie hépatique virale chronique développeront un carcinome hépatocellulaire (Singal and El-Serag, 2015).

Il existe un vaccin contre le virus de l'hépatite B, conférant une protection à vie contre une infection par ce virus(Osiowy, 2018). Chez les individus non vaccinés qui contractent une infection, l'utilisation d'antiviraux directs comme le Ténofovir ou l'Entécavir sont utilisés pour ralentir l'évolution de l'infection chronique à virus B en empêchant la formation des particules infectieuses du virus (phenomène de virosuppression)(Levrero et al., 2018). Néanmoins ce traitement ne permet pas d'accéder à une guérison définitive de l'infection, du fait de la présence d'une forme épisomique très stable du virus B au niveau nucléaire, intrinsèquement insensible aux antiviraux(Levrero et al., 2018).

Le virus de l'hépatite Delta est un virus satellite du virus de l'hépatite B qui a besoin de l'antigène HBs de ce dernier pour s'envelopper. Une infection chronique par le virus de l'hépatite Delta ne peut donc survenir qu'en co-infection avec l'hépatite B, ou en sur-infection d'une hépatite B. L'OMS considère que 5% des patients atteints d'une hépatite B chroniques sont également infectés par le virus de l'hépatite Delta. La double infection B/Delta est considérée comme la forme d'infection hépatique la plus grave en raison de son évolution rapide vers une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire (Fattovich et al., 2000)(Fattovich et al., 2000).

Le virus de l'hépatite C peut entraîner des hépatites aigues évoluant vers la chronicité dans 80% des cas. Dans le cas d'infections chroniques, c'est la cause majeure de la survenue de la cirrhose hépatique ou d'un carcinome hépatocellulaire dans le monde. Parmi ces 80% de porteurs chroniques, 5% deviendront porteurs sains, et ne montreront aucun signe clinique de l'infection. En revanche, 90% développeront une hépatite chronique, prédisposant à la cirrhose hépatique et au développement d'un hépatocarcinome dans un délai de 10 à 30 ans en général. L'OMS estime le nombre de patient atteints par une hépatite C chronique à 71 millions actuellement. Lorsque l'infection devient chronique (définie comme plus durable que 12 semaines), un traitement avec des antiviraux à action directe (Sofosbuvir/Ledipasvir ou Sofosbuvir/Ribavirine) est nécessaire, et vise à guérir le patient de l'infection contractée.(Zoulim et al., 2015)

Ces trois virus infectent les hépatocytes et détournent leur machinerie cellulaire afin de se répliquer. Les nouveaux virions libérés sont alors relargués dans le micro-environnement hépatique, puis dans le sang.

1.3.2 Pathologies non virales

L'homéostasie hépatique peut également être chroniquement perturbée par l'ingestion de substances toxiques comme l'alcool, le tabac, l'aflatoxine B1 ou par des maladies métaboliques.

1.3.2.1 L'alcool

La consommation excessive d'alcool peut être la cause d'une hépatite aigüe. Lorsque cette consommation devient chronique et s'étale sur plusieurs années, l'apparition de pathologies hépatiques telle que la stéatohépatite alcoolique est observée (Rocco et al., 2014)(Rocco et al., 2014).

L'alcool est métabolisé par le foie au niveau des hépatocytes. Deux oxydations successives de la molécule d'éthanol forment de l'acétate via l'acétaldéhyde, excrété dans la circulation sanguine et dégradé dans les tissus extrahépatiques en dioxyde de carbone et en eau. Ce métabolisme de l'éthanol dans les hépatocytes génère une augmentation du NADH, la production d'acétaldéhyde et la génération de radicaux libres. La perturbation de l'équilibre NADH/NAD+ est à l'origine de perturbation du métabolisme des glucides et des lipides dans le foie.

L'acétaldéhyde et les radicaux libres générés sont des métabolites très toxiques du fait de leurs réactivités importantes. Ces molécules sont capables de générer des adduits sur les molécules environnantes avec lesquelles elles peuvent réagir. Les adduits formés sur des protéines peuvent modifier les propriétés de ces dernières, en diminuant leurs activités enzymatiques si ce sont des enzymes, ou en générant des protéines immunogènes à l'origine de réactions inflammatoires. Les radicaux libres sont également à l'origine de la lipopéroxydation, et de la déstabilisation des potentiels de membranes mitochondriaux nécessaires pour l'homéostasie respiratoire de la cellule. La cytotoxicité induite par ces métabolites va induire une cytolyse des hépatocytes et de l'inflammation. Les cellules stellaires vont secréter du tissu cicatriciel en réponse à la cytolyse et à l'inflammation.

La consommation chronique d'alcool induit une sécrétion de matrice extracellulaire fibreuse chronique, aggravant la fibrose hépatique jusqu'à la cirrhose. L'inflammation concomitante génère un stress carcinogène dans lequel les hépatocytes sont forcés de se répliquer pour maintenir la fonctionnalité hépatique. Tous ces éléments concourent donc au développement du carcinome hépatocellulaire (Lade et al., 2014) par le biais de la cirrhose hépatique.

1.3.2.2 L'aflatoxine B1

L'aflatoxine B1 est une mycotoxine produite par des moisissures du genre *Aspergillus*, qui évolue principalement dans les régions chaudes et humides en Afrique et en Asie. La contamination du consommateur se fait par ingestion de céréales contaminées. Cette toxine va être prise en charge dans le foie par les hépatocytes chargés de la détoxification du sang. Les cytochromes hépatocytaires vont métaboliser l'aflatoxine, menant à la génération de métabolites carcinogènes. Le principal métabolite en cause est un dérivé époxyde capable de se fixer aux macromolécules, de former des adduits menant à une cytotoxicité importante en cas d'exposition à de forte dose. Lorsque le dérivé époxyde parvient à former des adduits sur l'ADN, il a une action carcinogène en favorisant l'apparition de mutations lors de la réplication des hépatocytes dans un environnement inflammatoire (à cause de la cytolyse). De plus, l'aflatoxine B1 possède des propriété immunomodulatrices, notamment par inhibition de la synthèse protéique (Rushing and Selim, 2019).

1.3.2.3 Les maladies métaboliques

La stéatohépatite métabolique est une maladie hépatique provoquée majoritairement par un régime alimentaire déséquilibré et un manque d'activité physique(El-Agroudy et al., 2019), même si des cofacteurs génétiques ont pu être identifiés. La définition de cette maladie est histologique, où est observée sur les biopsies une stéatose (accumulation de graisse dans les hépatocytes) ainsi que des lésions hépatocytaires tels que de la nécrose. Une inflammation importante est également mise en évidence dans cette pathologie (Korf et al., 2019).

1.3.3 Des facteurs communs à toutes ces pathologies : Le stress du réticulum endoplasmique et l'inflammation hépatique

Les fonctions sécrétrices du foie en font un organe sensible à la régulation des processus de traduction. Lors de l'une des pathologies décrites ci-dessus, différentes réponses moléculaires impliqués dans la gestion de ces stress se mettent en place. Parmi ces réponses, on peut trouver la réponse UPR, mise en place lors du stress du réticulum endoplasmique (détaillé dans le chapitre 3 de ce document), et l'inflammation.

Ces deux mécanismes vont être étudiés dans cette thèse.

Toutes les pathologies précédemment citées sont impliquées dans une cytolyse des hépatocytes, qui sont les cellules fonctionnelles du foie, cibles des virus, et prenant en charge la métabolisation des molécules telles que l'alcool et des apports caloriques inadéquats ou excessifs. Cette cytolyse peut être la conséquence d'un stress du réticulum endoplasmique non résolu (détaillé dans le chapitre 3) et va initier l'inflammation hépatique, qui va elle-même activer les cellules étoilées, entraînant alors la production et l'accumulation de matrice extracellulaire. Cette accumulation de tissu cicatriciel définit la fibrose hépatique, évoluant parfois jusqu'à la cirrhose. Durant l'évolution de la pathologie, les cellules, principalement les hépatocytes, se régénèrent afin de combler la cytolyse parfois massive et de permettre au foie de garder une activité physiologique normale. L'inflammation joue d'ailleurs un rôle important dans la régénération hépatique, à la fois en terme d'apparition de tissu fibreux, mais également de prolifération cellulaire.

La prolifération cellulaire intervenant dans un microenvironnement riche en molécules toxiques, réactives, et en cytokines inflammatoires, ainsi qu'au sein de réseaux de matrice extracellulaire remaniée en termes de profils de collagènes et d'intégrines, et transduisant des signaux atypiques est favorable *in fine* à la transformation tumorale des cellules en réplication à long terme.

1.3.4 L'hépatocarcinome

Le carcinome hépatocellulaire est le cancer le cinquième cancer le plus répandu chez les hommes, et le septième chez les femmes avec plus de 700 000 nouveaux cas par an. Il occasionne plus de 600 000 morts par an dans le monde. C'est un cancer primitif du foie survenant dans les cas de maladies hépatiques chroniques (Kulik and El-Serag, 2019).

1.3.4.1 Causes

Les principaux facteurs de risque menant au développement d'un carcinome hépatocellulaire sont les pathologies chroniques telles que la cirrhose hépatique, une infection chronique par le virus de l'hépatite B, une infection chronique par le virus de l'hépatite C, une co-infection avec les virus des hépatites B et D, ou des hépatites B et C, l'ingestion chronique d'aflatoxine-B1, la consommation chronique d'alcool, l'obésité, la consommation de tabac et le diabète de type II. Enfin, la co-infection par le virus HIV semble accélérer l'évolution délétère de ces maladies hépatiques chroniques, suggérant fortement qu'une immunité dégradée contribue à une évolution histologique et cytologique défavorable du foie.

1.3.4.2 Thérapies actuelles

Les thérapies proposées aux patients dépendent de la taille et de la localisation de la tumeur, de la fonctionnalité hépatique sous-jacente, et de l'état de santé général du patient.

La greffe hépatique peut être envisagée chez les patients ayant un hépatocarcinome diagnostiqué à un stade précoce, non métastatique, en bon état de santé général. Cette thérapie, la plus efficace aujourd'hui, reste malgré tout limitée par la quantité de greffons disponibles.

Les hépatocarcinomes sont souvent diagnostiqués chez des patients dont le foie est déjà parvenu à un stade fibrotique avancé. Les hépatocytes en général, et les cellules tumorales en particulier sont alors peu exposées à la circulation sanguine du fait de la présence abondante de tissu cicatriciel. De plus, l'index mitotique de ces tumeurs est souvent bas, ce qui rend les cellules impliquées peu sensibles aux cytotoxiques. Ceci expliquerait la faible efficacité des chimiothérapies utilisées dans ce contexte.

1.3.4.3 Prévention

L'infection avec le virus de l'hépatite B reste la principale cause de carcinome hépatocellulaire dans le monde. La vaccination demeure donc le meilleur moyen disponible en vue de sa prévention. De leur côté, les pathologies provoquées par la consommation d'alcool, des régimes alimentaires inadéquats, et le manque d'activité physique (probables facteurs de

comorbidité d'une infection chronique à HBV) gagnent donc à être discutées avec les populations cibles, afin de prévenir leur apparition.

1.4 Les modèles d'études

1.4.1 In vitro

Nos études sont basées sur deux types de cellules humaines :

- Les PHH, ou hépatocytes primaires humains, qui sont issus de résections de foie de patients. Ces résections sont réalisées chez des patients atteints de métastases hépatiques de tumeurs colorectales primaires la plupart du temps. Après purification, les hépatocytes sont non transformés, quiescent, polarisés, et fonctionnellement différenciés(LeCluyse and Alexandre, 2010).

- La lignée HepaRG est une lignée de cellules hépatiques progénitrice d'hépatocytes et de cholangiocytes. Cette lignée cellulaire a été purifiée à partir de la région péri-tumorale d'un foie cirrhotique de patiente infectée par le virus de l'hépatite C. Ces cellules sont non transformées, prolifératives mais sensibles à l'inhibition de contact, et différenciables par un protocole défini (Parent et al., 2004).

1.4.2 In vivo

Chez la souris, le foie se structure sous une forme comparable à celle de l'homme. On y retrouve les mêmes fonctions, la même architecture, et les mêmes types cellulaires que chez l'homme. La macro-organisation reste néanmoins différente puisque le nombre de lobes et leur emplacement n'est pas identique à l'homme. L'observation des phénomènes étudiés *in vitro* peut alors s'envisager relativement aisément *in vivo* chez la souris, en particulier lorsque des infections virales ne sont pas nécessaires, afin d'appréhender sous des rapports de causalité des éléments initialement décrits de manière corrélative chez des patients.

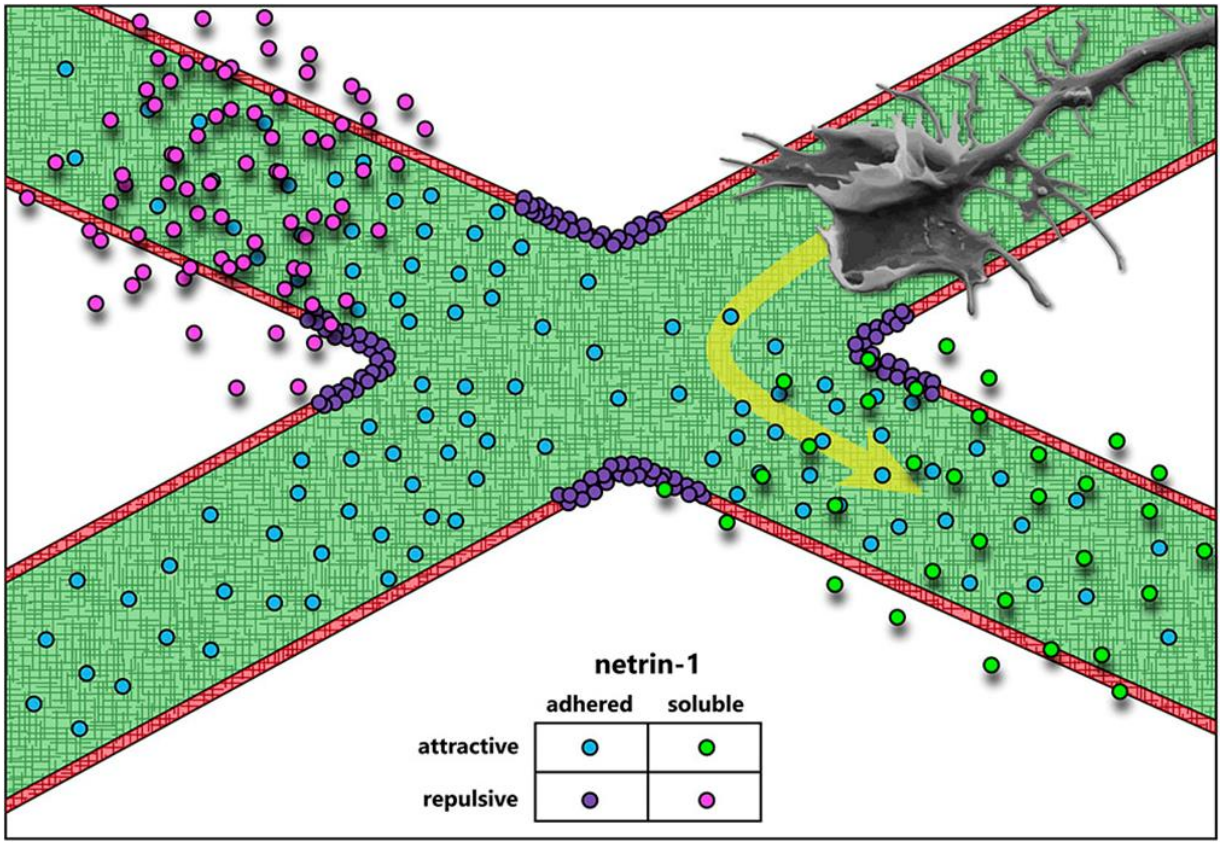


Figure 6: La nétrine-1 guide les axones pendant la neurogénèse

La nétrine-1 a d'abord été identifiée comme guide des cônes neuronaux en expansion. Elle peut être soluble ou adhérente dans la matrice cellulaire de l'organisme en formation, et avoir des propriétés attractives ou répulsives en fonction des récepteurs auxquels elles se lie.

Adapté de (Boyer and Gupton, 2018)

2 Nétrine-1 et récepteurs à dépendance

2.1 Découverte

Le développement du système nerveux des animaux nécessite que chaque neurone se connecte à ses propres cellules cibles durant l'embryogenèse. Les axones sont des projections neuronales qui permettent la communication entre le système nerveux et les tissus cibles, parfois situés à plus d'un mètre de distance. Durant l'embryogenèse, l'élongation des axones doit être guidée. Certaines protéines, telle que la nétrine-1, ont été identifiées comme des molécules guides pour les axones durant l'embryogénèse **(Figure 6)**. Les nétrines sont des protéines extracellulaires d'une taille moyenne de 70kDa. Ces protéines très conservées au cours de l'évolution appartiennent à la superfamille des laminines, principales composantes des membranes basales. Le terme nétrine provient du sanskrit « netr » signifiant « celui qui guide ».

2.2 Phylogénie

Une étude menée chez *Caenorhabditis elegans* a identifié la première nétrine, alors appelée Unc-6 (Uncoordinated-6). Cette protéine a été identifiée comme étant impliquée dans le guidage axonal et la migration neuronale (Hedgecock, 1990). Des protéines homologues d'Unc-6 ont dès lors été identifiées chez d'autres invertébrés et chez les vertébrés. Chez l'homme, cinq nétrines ont pu être identifiées. Les nétrine-1, 2 et 4 sont sécrétées, alors que les nétrines-G1 et G2 sont encrées à la membrane plasmique (Rajasekharan and Kennedy, 2009). **(Figure 7)**

2.3 Caractéristiques structurales

Les nétrines sont composées de 3 domaines principaux : un peptide signal, deux domaines VI et V en N-terminal et le domaine C-terminal. Les domaines VI et I des nétrines sont homologues au domaines VI et V des laminines. Les domaines VI et V des nétrines-1, -2 et -3 sont similaires à la chaine γ des laminines, alors que ces domaines des nétrines-4, G1 et G2 sont similaires à la chaine β des laminines. Le domaine V des nétrines comporte trois motifs EGF (V-1, V-2, V-3). Les nétrines G1 et G2 comportent en plus un domaine GPI (Glucosyl-

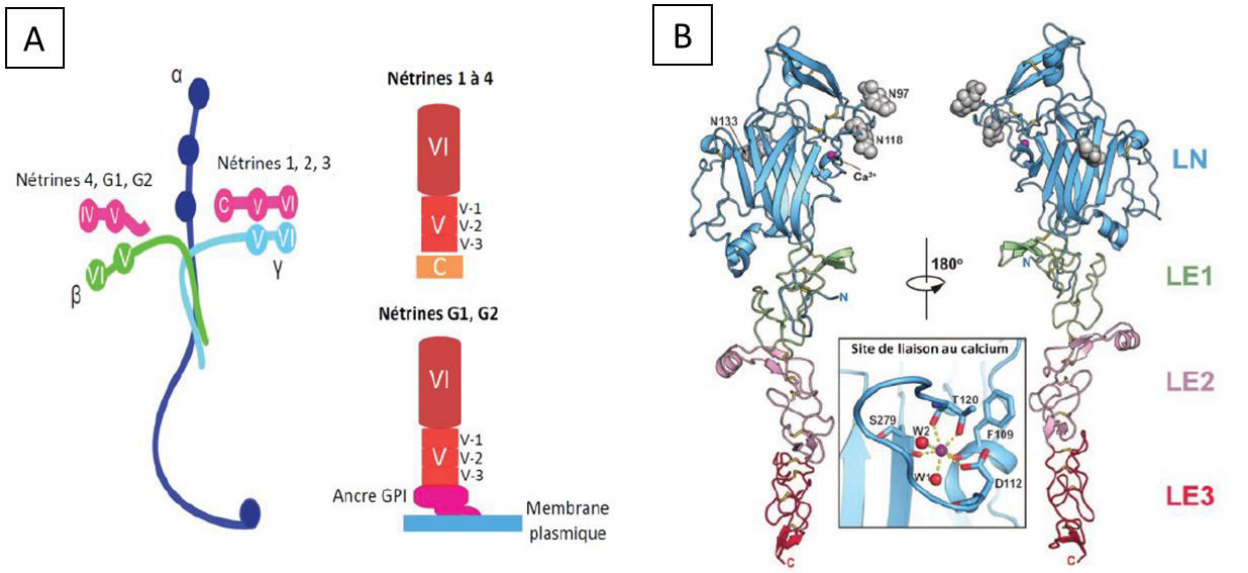


Figure 7: La famille des nétrines

(A) Les nétrines sont des protéines apparentées aux laminines. Les nétrines 1 à 4 sont solubles et diffusibles, alors que les protéines G1 et G2 sont ancrées à la membrane. Elles sont constituées de trois domaines VI, V et C en C-terminal. Les domaines VI et V sont homologues aux domaines globulaires VI et V des laminines. Le domaines V des nétrines comporte trois motif EGF appelés V-1, V-2 et V-3. Les nétrines G possèdent une ancre GPI en C-terminal leur permettant un ancrage à la membrane plasmique.

(B) Structure cristallographique de la nétrine-1 obtenue avec une résolution de 2,6A. LN: domaine laminine, LE: motif EGF

Adapté de (Xu et al., 2014)

phosphatidyl-inositol) en C-terminal, permettant leur ancrage dans la membrane (Rajasekharan and Kennedy, 2009). Le domaine C-terminal de la nétrine-1 est riche en acide aminés basiques, entraînant son intéraction avec l'héparine, les héparanes sulfates et les glycolipides, ainsi que des intéractions non spécifiques avec différents composants de la matrice extracellulaire tels que les intégrines. Le domaine VI de la nétrine-1 reconnait spécifiquement les domaines globulaires extracellulaires des récepteurs de type UNC5 et DCC **(Figure 7)** .

2.4 La nétrine-1

La nétrine-1 est le membre le plus étudié de la famille des nétrines. Le gène de la nétrine-1 se trouve sur le chromosome 17p13-p12. Ce gène code pour un transcrit de 5954 bases, composé de 7 exons.

Le promoteur de la nétrine-1 n'a pas été cartographié, mais la séquence de 1.7kb en amont de l'exon 1 est suffisante pour la transcription de ce gène(Paradisi et al., 2008). Des travaux ont mis en évidence l'activation de la transcription de la nétrine-1 chez l'homme par NF-κB, ETS-1, HIF1-α and p53. Chez la souris, il a récemment été démontré que la transcription de la nétrine-1 était contrôlée par méthylation du promoteur (Kalani, 2019).

La traduction est initiée à partir du codon ATG^{108} situé dans l'exon 2.

Un promoteur alternatif a été mis en évidence dans l'intron 1. Ce promoteur alternatif induit l'expression d'un transcrit tronqué, dont la traduction est initiée sur le codon ATG^{658} et forme une protéine tronquée ΔN-nétrine. L'expression de cette protéine tronquée a été retrouvée uniquement dans un contexte tumoral, dans les cancers colorectaux, les cancers du pancréas ou les neuroblastomes. Cette nétrine tronquée a une expression nucléolaire et semble impliquée dans la prolifération des cellules tumorales (Delloye-Bourgeois et al., 2012)

2.5 Profil d'expression

De par son activité de guide des axones, la nétrine-1 est fortement exprimée lors de l'embryogenèse, dans le système nerveux central et le système nerveux périphérique (Hamasaki et al., 2001; Jiang et al., 2003; Livesey and Hunt, 1997). Son rôle dans la morphogénèse et l'angiogenèse des organes périphétiques l'impliquent dans l'épithélium

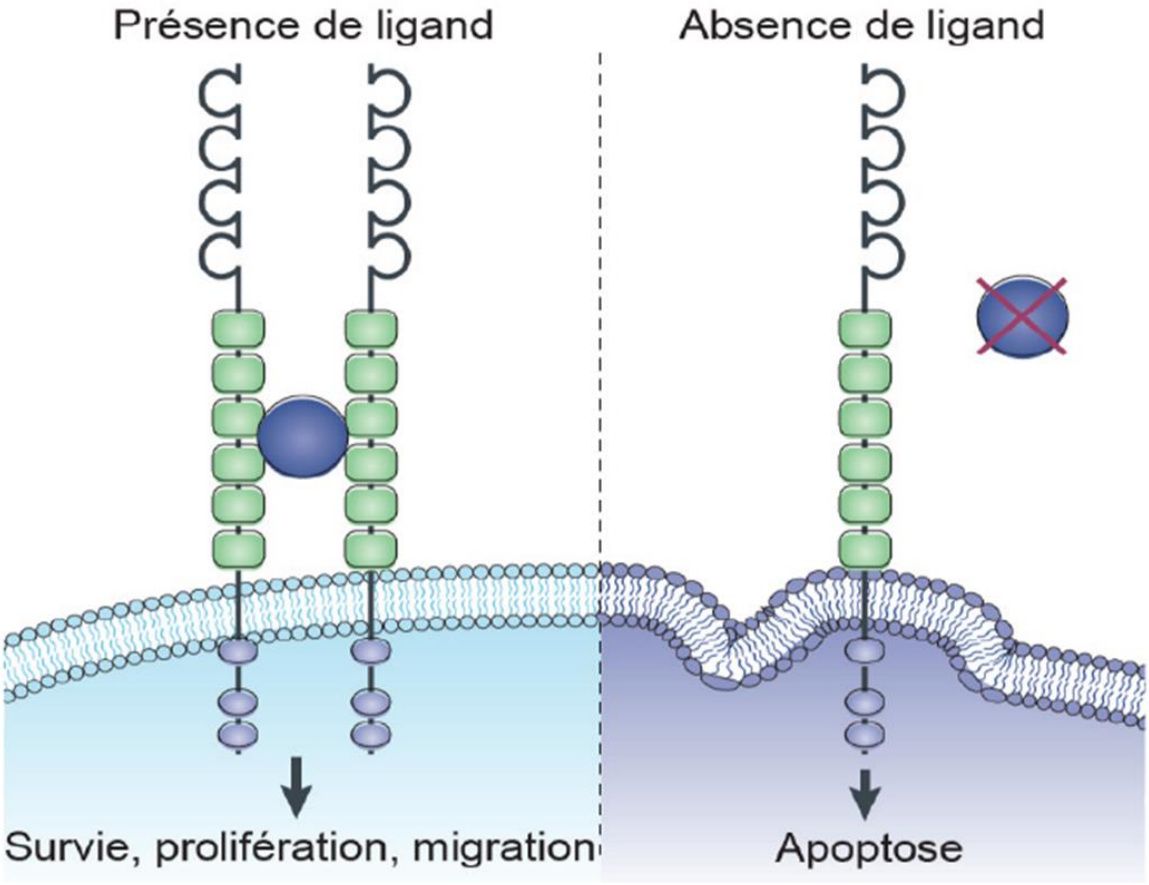


Figure 8: Le concept de récepteur à dépendance

Les récepteurs à dépendance sont capables d'induire deux voies de signalisation différentes. En présence de leur ligand, les récepteurs vont induire des signaux de survie, de prolifération et de migration, alors qu'en absence de ligand, ces récepteurs sont impliqués dans la signalisation apoptotique. La cellule est donc dépendante de ce ligand pour sa survie.

Adapté de (Mehlen et al., 2011)

pancréatique, mammaire et pulmonaire. Chez l'adulte, la nétrine-1 n'est pratiquement plus exprimée, sauf dans certains organes ou elle resterait encore détectable à bas niveaux comme le côlon, l'intestin grêle, le cœur, le pancréas, les reins, le poumon, les ovaires et le foie (Meyerhardt et al., 1999).

2.6 Principe des récepteurs à dépendance

Les récepteurs classiques activent des voies de signalisation intracellulaire lorsqu'ils se fixent à leurs ligands. A l'inverse, ils ont longtemps été considérés inactifs en absence de ligand. Le concept de récepteur à dépendance a été approché il y a plus de 20 ans, et met en jeu des récepteurs qui activent des voies de signalisation spécifiques en présence du ligand, et activent des voies apoptotiques en absence de ligand. C'est cette signalisation inversée, favorisant la mort des cellules en absence de ligand, qui détermine un certain niveau de dépendance de la cellule vis-à-vis de son ligand pour sa survie(Mehlen, 1998). **(Figure 8)**

La famille des récepteurs à dépendance se compose de récepteurs liant la nétrine-1 comme les récepteurs DCC (Deleted in Colorectal Cancer), UNC5Hs (UNCoordinated 5 Homologs, chez la souris) aussi connu sous les noms UNC5A, -B, -C et –D (chez l'homme), et bien que de manière controversée, la néogénine. Appartiennent également à cette famille le récepteur aux neurotrophines $p75^{NTR}$, les recepteurs au morphogène Sonic HedgeHog, Ptch1 et CDON, le récepteur à la semaphorin3E, Plexin-D1, les récepteurs à activité Tyrosine Kinase, RET, TrkA et TrkC, EphA4, MET, et les recepteurs à l'insuline. Plus récemment, Kremen-1, Notch3 et la latrophiline, ont été cités. **(Tableau 2 – Figure 9)**

La nétrine-1 est capable de lier la partie extracellulaire des récepteurs UNC5H et DCC au niveau de leur domaine fibronectine (pour DCC) ou de leurs domaines immunoglobuline (pour UNC5H) 26859457. La nétrine peut aussi se lier à d'autres récepteurs qui ne comporte pas d'activité pro-apoptotique telle que celle des récepteurs à dépendance. C'est le cas des récepteurs DSCAM, néogénine, A2b, APP et des intégrines α3β1 et α6β4. **(Figure 10)**

2.7 Le récepteur UNC5A

Le récepteur UNC5A fait partie de la famille des récepteurs à dépendance de type UNC5. Ce sont les premiers récepteurs à dépendance, avec DCC, à avoir été découverts dans les années 1990.

Récepteurs à Dépendance	Ligand	Référence
$p75^{NTR}$	NGF	(Rabizadeh et al., 1993)
DCC	Nétrine-1	(Mehlen, 1998)
UNC5A/B/C/D	Nétrine-1	(Llambi et al., 2001; Wang et al., 2008)
AR	androgène	(Bordeaux et al., 2000)
RET	GDNF	(Bordeaux et al., 2000)
MET	HGF/SF	(Tulasne et al., 2004)
ALK	Jelly/Belly	(Mourali et al., 2006)
TrkC	NT-3	(Nikoletopoulou et al., 2010; Tauszig-Delamasure et al., 2007)
TrkA	NGF	(Nikoletopoulou et al., 2010)
EphA4	EphB3	(Furne et al., 2009)
Plexine-D1	Sémaphorine 3^{E}	(Luchino et al., 2013)
Intégrines α6β4 et α3β1	Composant MEC	(Stupack et al., 2001)
PTC1	SHH	(Thibert, 2003)
CDON	SHH	(Delloye-Bourgeois et al., 2013)
Néogénine	RGMa	(Matsunaga et al., 2004)
IR	Insuline	(Boucher et al., 2010)
IGFR1	IGF-1	(Boucher et al., 2010)

Tableau 2: Les récepteurs à dépendance et leurs ligands

Détails bibliographique relatifs à chacun des 21 récepteurs à dépendance identifiés jusqu'à aujourd'hui et de leurs ligands.

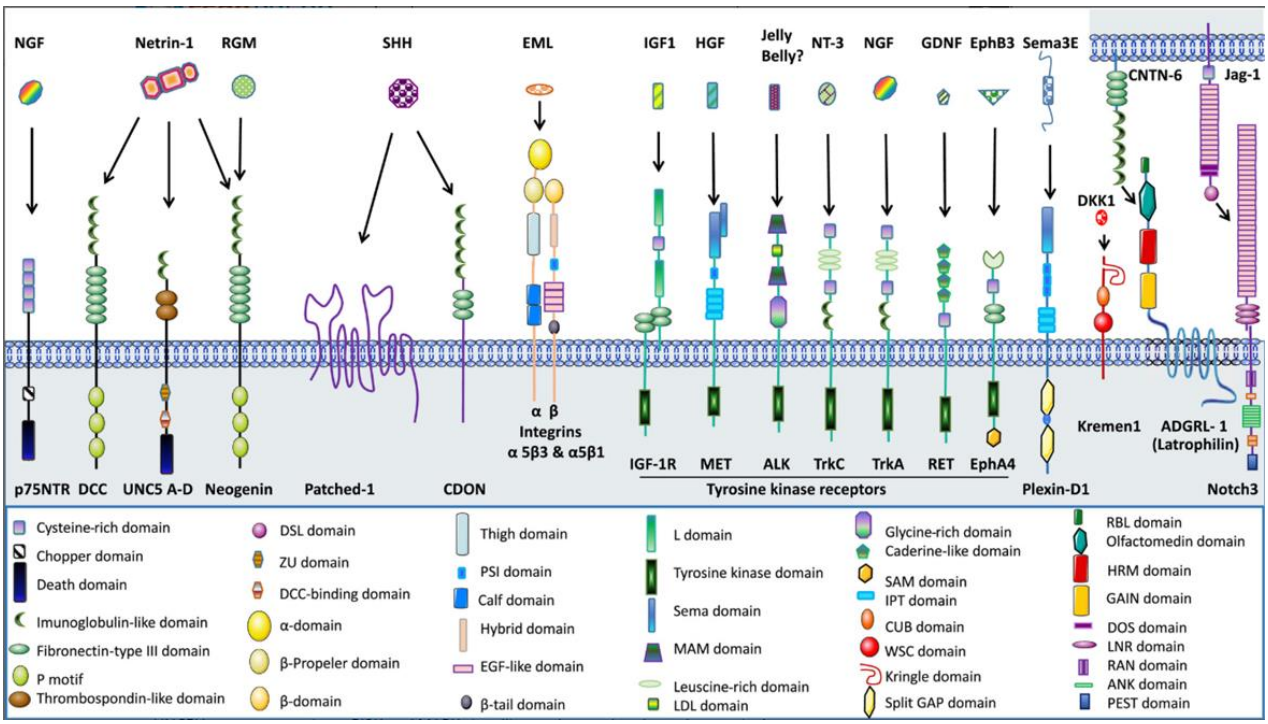


Figure 9 : La famille des récepteurs à dépendance

La famille des récepteurs a dépendance est actuellement composée de 21 membres ne partageant aucune homologie de séquence ou de structure (sauf pour les récepteurs UNC5A-B-C-D) mais ayant une fonction commune: la capacité d'induire l'apoptose en absence de ligand.

Adapté de (Corsi et al., 2009)

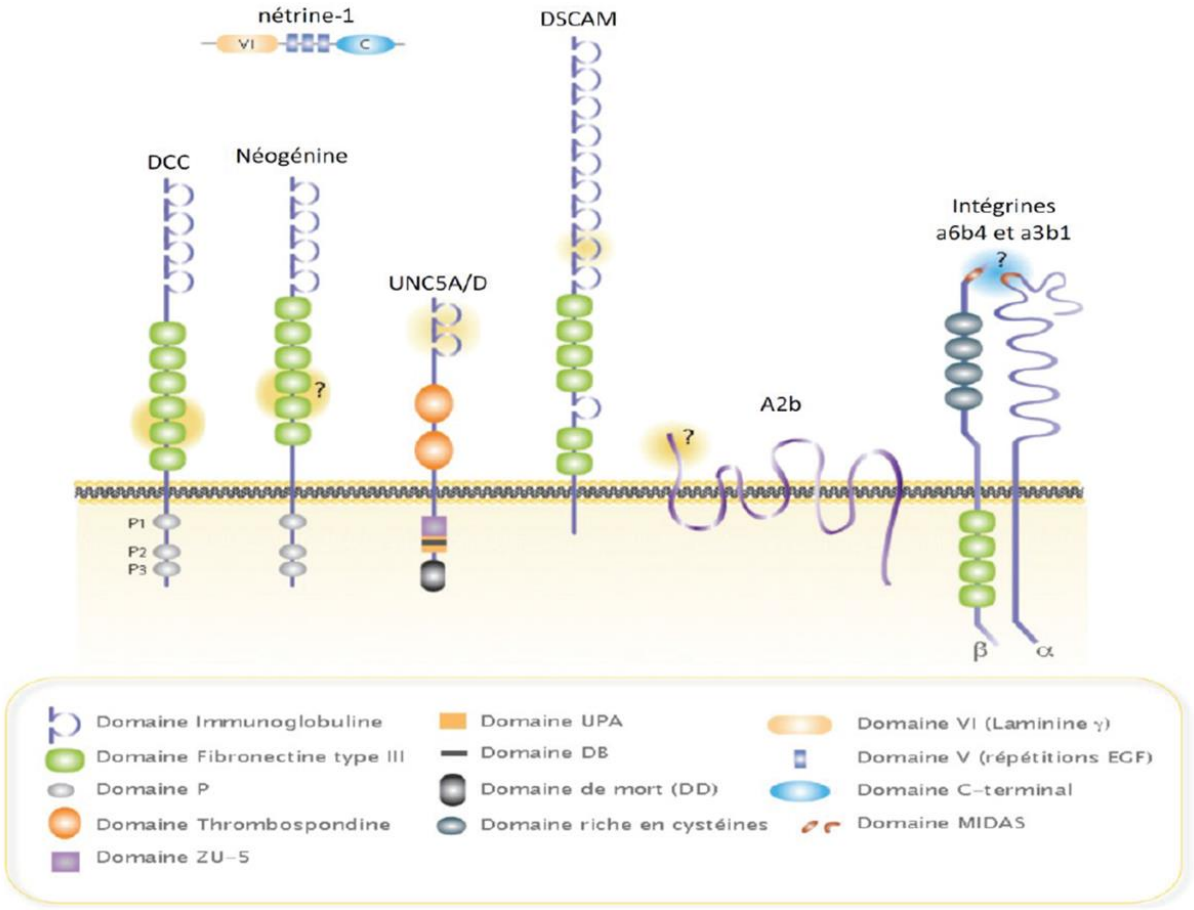


Figure 10: Les récepteurs de la nétrine-1

La nétrine-1 est capable de fixer sur les récepteurs à dépendance DCC et UNC5A-B-C et D, ainsi que peut-être sur les récepteurs néogénine, DSCAM, A2b ainsi que les intégrines a3b1 et a6b4 et APP (non présenté sur le schéma)

D'après la thèse de Laura Broutier (équipe du Dr. P. Mehlen, CRCL)

Ces récepteurs ont d'abord été identifiés chez *Caenorhabditis elegans*, ou des mutants apparaissaient comme associés à des défauts de de migration de neurones le long de l'axe dorso-ventral (Leung-Hagesteijn, 1992). Des gènes orthologues ont été identifiés chez la drosophile (*dunc5*), chez la souris (*unc5h1,-2,-3,-4*) et chez l'homme (*unc5a, b, c et d*). Le gène *unc5a* chez l'homme se trouve sur le chromosome 5q35.2 et est très conservé au cours de l'évolution à l'image des gènes de la nétrine.

Le récepteur UNC5A est un récepteur transmembranaire de type I de 93kDa, ayant une structure bien différente du récepteur DCC avec lequel il partage un ligand commun, la nétrine-1. La partie extracellulaire d'UNC5A est constituée de deux domaines de type immunoglobuline, et de deux domaines de type thrombospondine de type I. Sa partie cytoplasmique possède un domaine de mort (DD), un domaine ZU-5 (Zona occludens/Inc-5 homology domain) et un domaine de clivage par la caspase-3. Ces domaines sont indispensables à sa fonction pro-apoptotique (Delcros and Mehlen, 2013).

Ce récepteur est exprimé dans le système nerveux durant l'embryogénèse, et plus généralement de façon ubiquitaire chez l'adulte. **(Figure 11)**

2.7.1 Signalisation positive

En présence de nétrine-1, le récepteur UNC5A est connu pour activer dans les fibroblastes ou des cellules de neuroblastome, les voies de signalisation initiées par Cdc42 et Rac1. Ces protéines kinases sont toutes les deux impliquées dans la morphologie cellulaire, la migration cellulaire, la progression du cycle cellulaire, et l'adhésion. Ces voies de signalisation sont en effet nécessaires au guidage axonal (Li et al., 2004; Liu et al., 2004). UNC5A, et les autres récepteurs UNC5 sont décrits pour activer les voies de signalisation PI3K et MAPK, importants lors de la migration axonale(Forcet et al., 2002).

De façon plus générale, les récepteurs à dépendance sont reconnus pour transduire des signaux de différenciation, de migration, de prolifération ainsi que d'autres signaux affectant la survie cellulaire **(Figure 12)**.

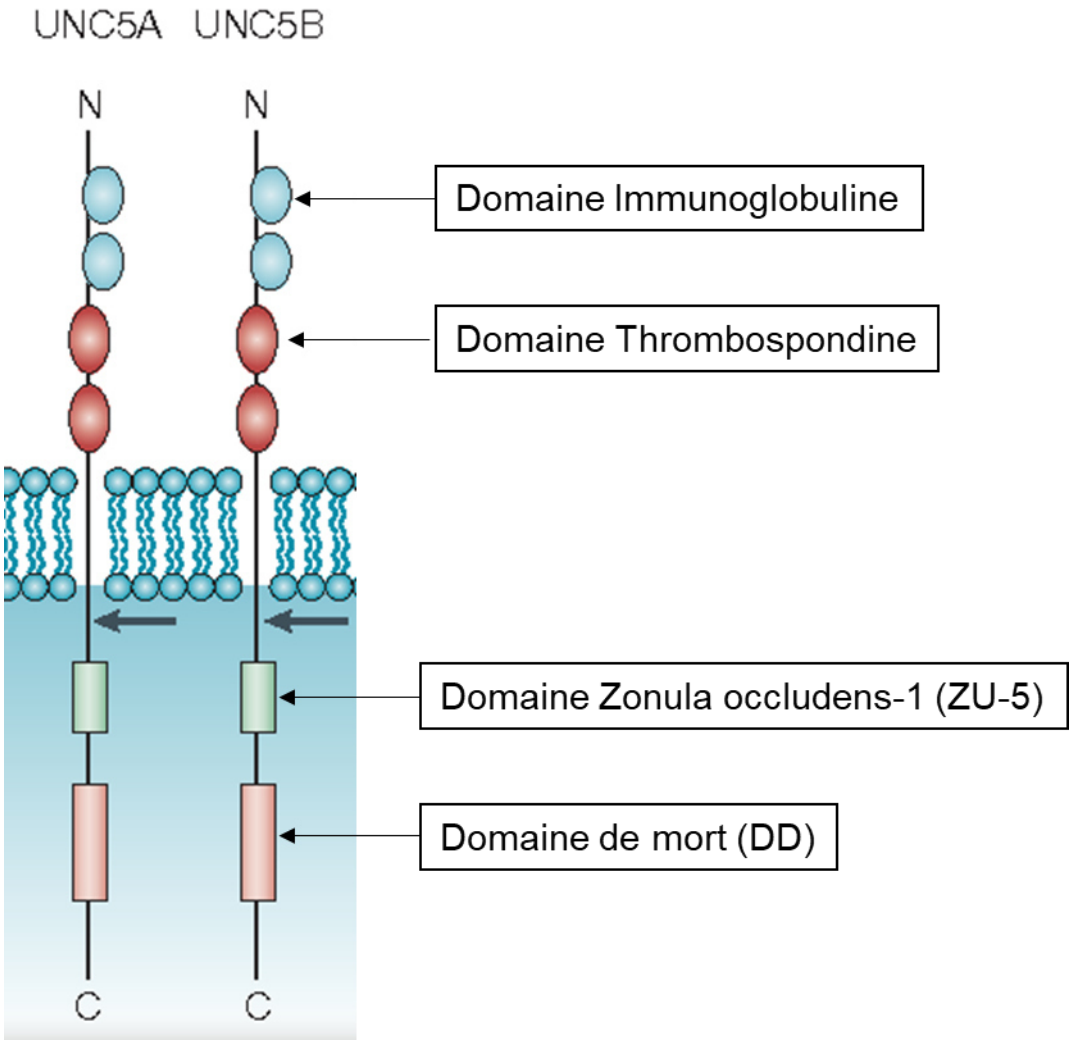


Figure 11: Les récepteurs UNC5A et UNC5B

Le récepteur UNC5A est composé de 4 domaines extracellulaire: 2 domaines immunoglobulines et 2 demaines thrombospondines. La partie intracellulaire porte le domaine Zonula occludens-1 (ZU-5) et le domaine de mort (DD).

Adapté de (Arakawa, 2004)

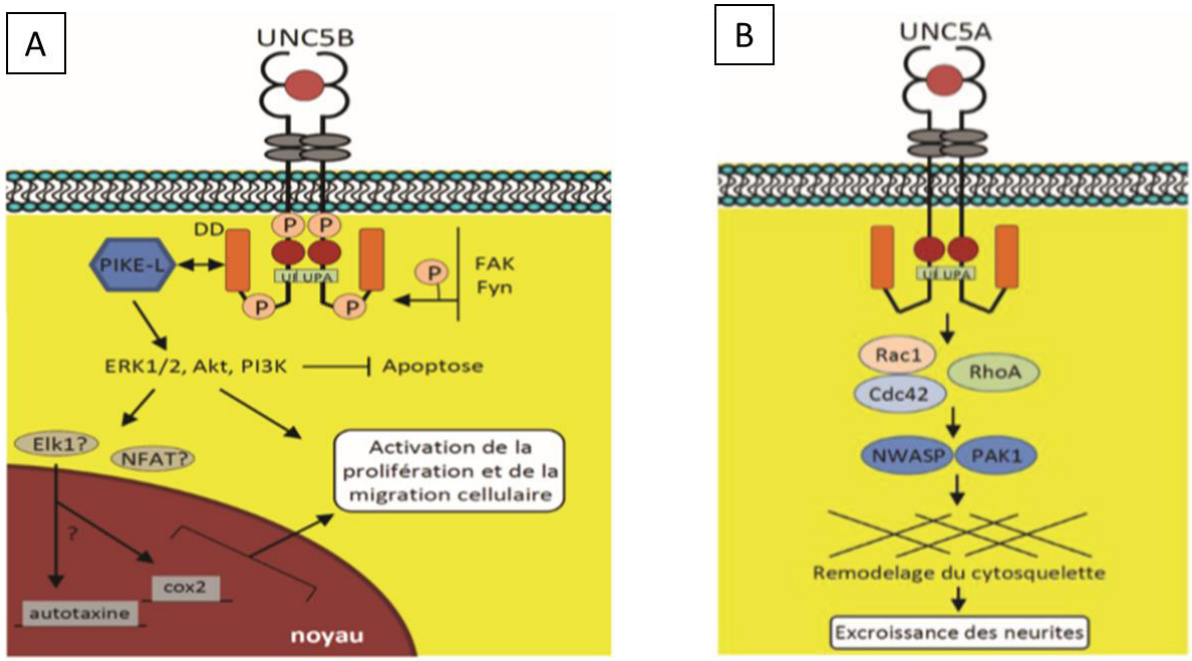


Figure 12: Les voies de signalisation positives induites par les récepteurs UNC5A et B

Le récepteur UNC5B se trouve sous forme dimérique lorsqu'il est lié à la nétrine-1. Dans ce contexte, il transmet des signaux de survie, de prolifération et de migration cellulaire par l'intermédiaire des kinases Fak et Fyn (Forcet et al., 2002; Lawrence et al., 2005; Ren et al., 2008; Tang et al., 2008)

Les récepteurs UNC5A, comme UNC5B, se trouvent dimérisés en présence de nétrine-1, et transmettent alors des signaux de croissance cellulaire, principalement mis en évidence dans les cellules neuronales. En entraînant l'activation des GTPases Rac1 et Cdc42, des protéines impliquées dans le remodellage du cytosquelette vont être activées. (Picard et al., 2009)

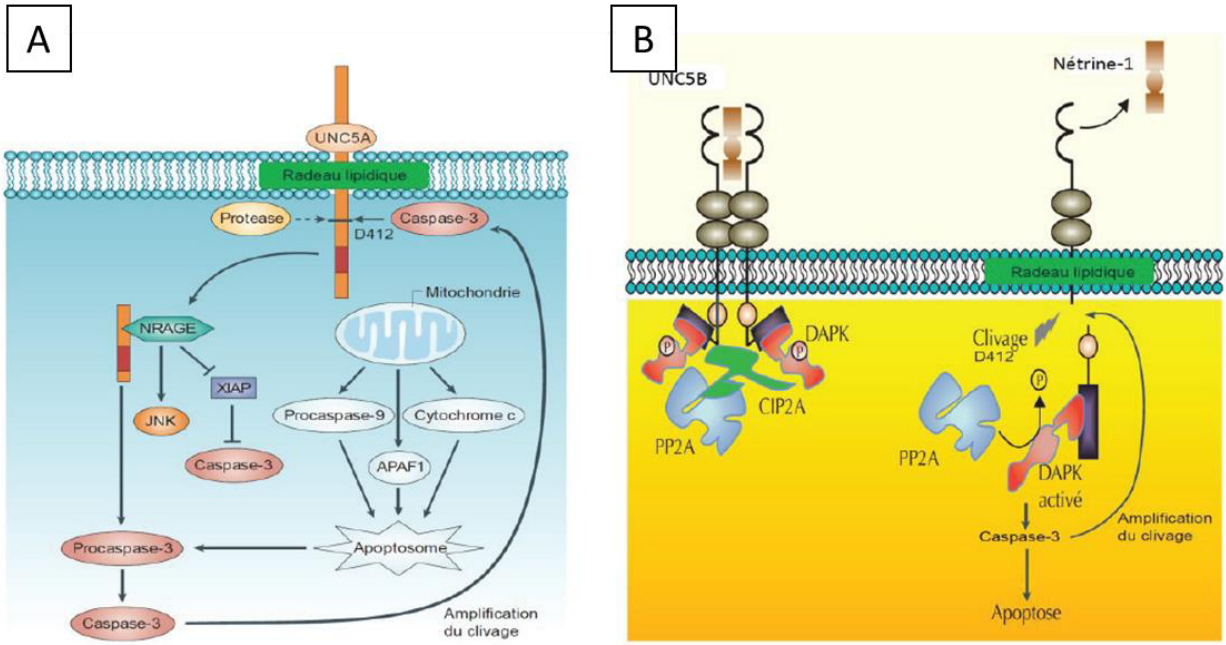


Figure 13: Les voies de signalisation négatives induites par les récepteurs UNC5A et B

En absence de nétrine-1, les récepteurs UNC5A et UNC5B sont transférés dans les radeaux lipidiques et peuvent être clivés.

(A) Pour UNC5A, le fragment du clivage est responsable du recrutement de la protéine adaptatrice NRAGE via son domaine ZU-5. NRAGE active la voie JNK et inhibe la voie XIAP, entrainant l'activation de la caspase-3 et de l'apoptose. Le récepteur UNC5A contient également un domaine DD, capable du recrutement de la protéine DAPK, ainsi que de la PP2A et de l'inhibiteur associé CIP2A (non représenté ici).

(B)La protéine DAPK qui intéragit avec le domaine DD du récepteur UNC5B est déphosphorylée par la PP2A en absence de CIP2A. En effet, CIP2A n'est pas présent dans le complexe lorsque le récepteur n'est pas lié à son ligand, et donc sous forme monomérique. La DAPK activée va induire la voie JNK et l'activation de la caspase-3, puis l'apoptose.

Adapté de (Arakawa, 2004; Delcros and Mehlen, 2013)

2.7.1 Signalisation négative

Les domaines ZU-5 et DD de la partie cytoplasmique du récepteur UNC5A sont impliqués, en absence de nétrine-1, dans le recrutement de la protéine NRAGE via le domaine ZU-5 et de la protéine DAPK1 via le domaine DD de mort (Williams et al., 2003).
L'apoptose induite par UNC5A a dans un premier temps été caractérisée via l'interaction avec NRAGE. Cette protéine est décrite pour activer la voie JNK et inhiber la protéine XIAP (Jordan et al., 2001) et le facteur de transcription Che-1, conduisant ainsi à l'activation de la caspase-

3. Des études montrent également que le domaine ZU-5 d'UNC5A, comme celui d'UNC5B semble être impliqué dans le recrutement de la DAPK1, et de son activation par la phosphatase PP2A (Guenebeaud et al., 2010; Llambi et al., 2005). Après activation, la DAPK1 va induire l'activation de la caspase-3, ce qui aboutit ensuite à l'apoptose. **(Figure 13)**

2.8 Apoptose

L'apoptose est un phénomène biologique (Guicciardi et al., 2013) impliqué dans différentes étapes du développement de l'organisme, durant l'embryogenèse et tout au long de la vie. L'apoptose est un processus de mort programmée au sein duquel les cellules vont déclencher leur autodestruction à la suite d'un signal intra ou extracellulaire. C'est une mort physiologique en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Ce type de mort permet le maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules dont l'intégrité génomique est menacée, et le maintien de la taille des organes dans l'organisme.
L'apoptose est une mort particulière des cellules, non associée à l'inflammation, même si les corps apoptotiques peuvent activer les cellules immunitaires tels que les macrophages impliqués dans leur phagocytose. Elle se déroule en trois phases : la phase d'induction ou d'initiation, la phase d'exécution et la phase de dégradation. Les signaux nécessaires à l'initiation de l'apoptose peuvent provenir du milieu extracellulaire, entrainant l'activation de la voie extrinsèque, ou bien de la cellule elle-même, entraînant alors l'activation de la voie intrinsèque (Cotter, 2009).

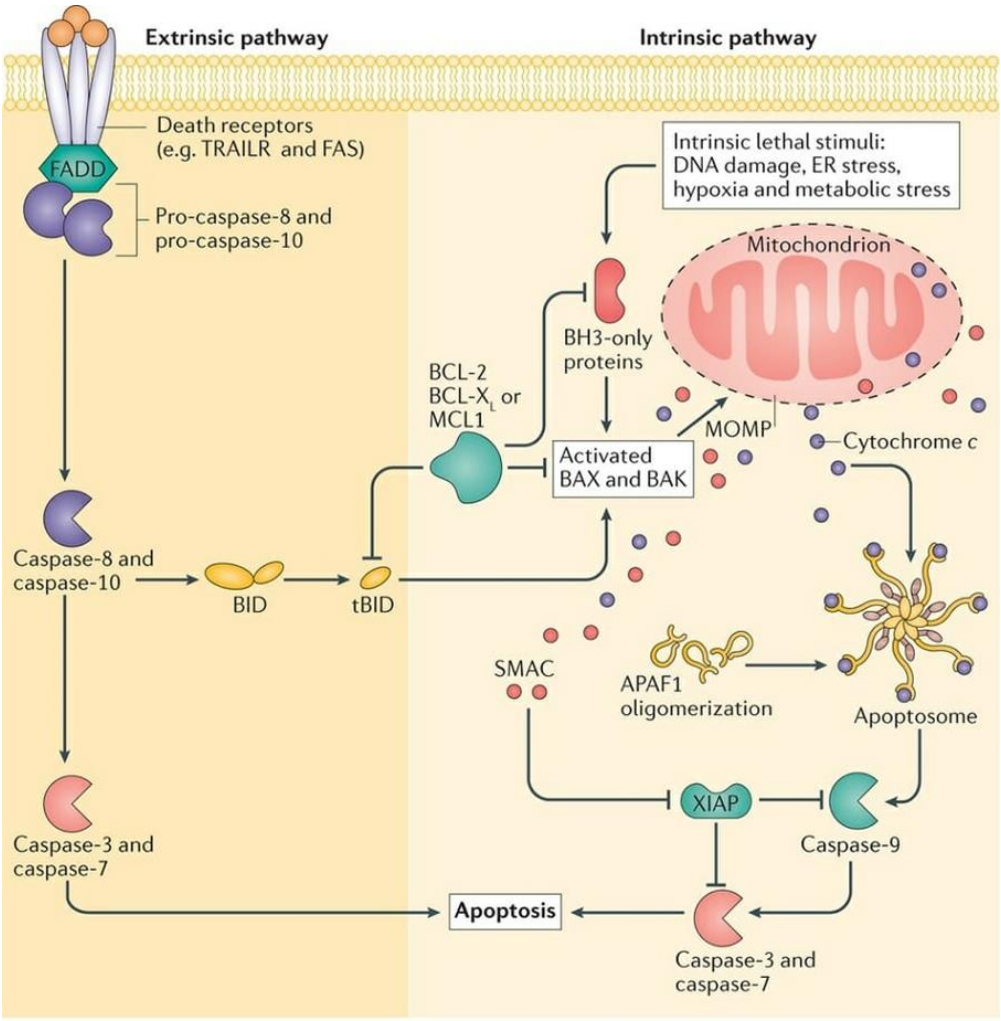


Figure 14: Les voies d'induction de l'apoptose

L'apoptose peut se dérouler via deux voies de signalisation différentes. Dans le premier cas, l'apoptose peut survenir à la suite de signaux extérieurs captés par les récepteurs de mort. Dans ce cas, les caspases 8 et 10 vont être activées, entrainant à la foie l'activation des caspases effectrices 3 et 7, et l'activation de protéines pro-apoptotiques impliquées dans la formation de l'apoptosome et l'amplification de la signalisation pro-apoptotique. Dans le deuxième cas, les signaux déclencheurs de l'apoptose sont intrinsèques et proviennent d'un stress du réticulum endoplasmique, d'hypoxie ou de dommage à l'ADN, entraînant alors un déséquilibre entre les protéines pro-et anti-apoptotiques. Les protéines Bax et Bak, pro-apoptotiques, vont entraîner la libération de cytochrome c dans la cellule, la formation de l'apoptosome, et le clivage de la caspase-9 responsable du clivage des caspases effectrices 3 et 7, entraînant la survenue de l'apoptose. Adapté de (Wilson, J. H., & Hunt, T. (2002). Molecular biology of the cell, 4th edition: a problems approach. New York: Garland Science).

2.8.1 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose intervient en réponse à des signaux extérieurs à la cellule, capté par les récepteurs de mort (Yin and Ding, 2003). C'est par cette voie notamment que les lymphocytes T cytotoxiques vont induire la mort de cellules ciblées. Cette voie est activée par des récepteurs membranaires, et induit le recrutement de protéines adaptatrices (FADD) et des pro-caspases initiatrices (caspase 8). La proximité des pro-caspases dans le complexe précité va induire leur auto-protéolyse et leur activation. Les caspases initiatrices activées vont être responsables de l'activation des caspases effectrices, mais aussi de l'activation de la voie de signalisation extrinsèque. Les caspases effectrices (1 et 3) sont impliquées dans le clivage de protéines cytosoliques et nucléaires formant le cytosquelette. La caspase-1 est impliquée dans l'externalisation des phosphatidyl-sérines, favorisant l'endocytose des corps apoptotiques par les cellules environnantes. **(Figure 14)**

2.8.2 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est déclenchée par des signaux intracellulaires, principalement lors de dommages à l'ADN, d'expositions à des rayonnements UV ou gamma, d'une raréfaction locale des facteurs de survie, ou via l'action de protéines oncogènes, de protéines suppresseurs de tumeurs, ou de protéines virales (Kroemer, 2003). Dans le cas particulier des dommages à l'ADN, p53 est activée et entraîne l'inactivation des protéines anti-apoptotiques contenue dans la membrane externe des mitochondries. Cela entraîne la libération de cytochrome C dans le cytoplasme, et entraine la formation de l'apoptosome, par des interactions avec des protéines adaptatrices. Ce complexe va conduire à l'activation de la procaspase-9. À l'image de la caspase-8, la caspase-9 est une caspase initiatrice responsable de l'activation de caspases effectrices comme la caspase-3, impliqué dans la perturbation du cytosquelette, ou de la caspase-1 responsable de l'externalisation des phosphatidyl-sérines**. (Figure 14)**

2.8.3 La dégradation de l'ADN

Les caspases-3 effectrices sont également responsables de l'activation de DNases. Les protéines CAD (caspase-activated DNase) coupent l'ADN entre les nucléosomes, générant ainsi des fragments de 180 paires de bases (Nagata, 2000). La phagocytose des corps apoptotique contenant ces fragment d'ADN par les phagocytes participe à l'entretien de l'inflammation.

2.8.4 Apoptose et pathologies associées

L'apoptose permet de réguler l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules dont l'intégrité génomique est menacée. Un défaut d'apoptose est impliqué dans le maintien en vie de cellules qui accumulent des anomalies génétiques, et qui se divisent souvent dans un environnement remanié et propice à la transformation tumorale.

Les défaut d'apoptose ont été mis en évidence dans le développement de maladies auto-immunes, où des lymphocytes auto-réactifs n'ont pas été éliminés au cours de la sélection clonale lymphocytaire (Papadimitriou and Petterson, 1976; Straus, 1999), ainsi que dans de nombreux cas de cancers (Thompson, 1995). A l'inverse, une augmentation des phénomènes apoptotiques provoque des pathologies telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. Le SIDA est aussi provoqué par une apoptose importante des lymphocytes T auxiliaires infectés par le VIH.

Dans le foie, l'apoptose est un processus qui intervient fréquemment dans différents cas :

- La mort des cellules en fin de vie, permettant leur renouvellement.
- La mort des cellules subissant des stress (du réticulum endoplasmique, du métabolisme, rédox…).
- L'absence de facteur de croissance, ou possiblement, de ligands de récepteur à dépendance.

Dans ces différents cas, l'apoptose intervient et engendre l'efférocytose des corps apoptotiques par les cellules de Kupffer, les macrophages résidents du foie. Ceci entraîne leur activation, augmentant l'expression de ligand de mort à leur surface. De plus, l'apoptose hépatique semble induire de l'inflammation, malgré des descriptions d'apoptose non inflammatoire dans d'autres tissus.

2.9 Pathologies associées aux récepteurs à dépendance

Les récepteurs à dépendance sont impliqués dans l'induction de signaux de survie cellulaire, ou de signaux de mort en absence de ligand. Le contournement de l'activité pro-apoptotique de ces récepteurs par la tumeur lui apporte un avantage sélectif. Ces récepteurs ont effectivement été décrits comme suppresseur de tumeurs, pouvant potentiellement limiter la

progression tumorale en provoquant l'élimination des cellules surnuméraires dans un environnement contenant une quantité de ligand limitante.

2.9.1 Equilibres ligand-récepteurs

Trois options s'offrent à la cellule tumorale afin de supprimer l'activité pro-apoptotique des récepteurs à dépendance :

- Supprimer les récepteurs qui activent des voies de signalisation apoptotiques
- Supprimer les acteurs protéiques des voies de signalisation en aval du récepteur
- Augmenter la production de ligand autocrine

Ces trois phénomènes ont été documentés et constituent un avantage sélectif pour le développement des tumeurs. **(Figure 15)**

L'expression des récepteurs UNC5A, B et C est inhibée dans les cancers de l'ovaire, du sein, de l'utérus, de l'estomac, du poumon, du rein et du côlon (Gibert and Mehlen, 2015). UNC5A, particulièrement lorsqu'il est exprimé dans des lignées cellulaire de cancer du côlon, réduit leur capacité à former des colonies et induit l'apoptose par activation de la caspase-3.

2.9.2 Essai thérapeutique

Un essai thérapeutique basé sur la déplétion fonctionnelle d'un ligand de récepteurs à dépendance est aujourd'hui en cours. La molécule testée est le NP137, un anticorps humanisé dirigé contre la nétrine-1, visant à inhiber l'interaction entre la nétrine-1 et ses récepteurs (Grandin et al., 2016). Ainsi, le traitement viserait à rétablir l'apoptose dans les cellules tumorales dépendante de la nétrine-1. Pour le moment, il s'agit d'une étude multicentrique de phase 1, visant à déterminer la dose, la sécurité, la tolérabilité, la pharmacocinétique, la pharmacodynamie et des données préliminaires sur l'activité anti-tumorale de l'anticorps NP137 (essai répertorié par les NIH sous la référence NCT02977195).

2.10 Les modèles d'études

2.10.1 In Vitro

Afin d'étudier in vitro les effets de la nétrine-1 dans la lignée HepaRG, l'induction génétique exogène en transfectant des plasmides codant pour la nétrine-1 ou pour le récepteur UNC5A est possible. Il est également possible d'inhiber l'expression de ces deux protéines en utilisant des ARN interférents qui entraînent la dégradation des ARNm cibles.

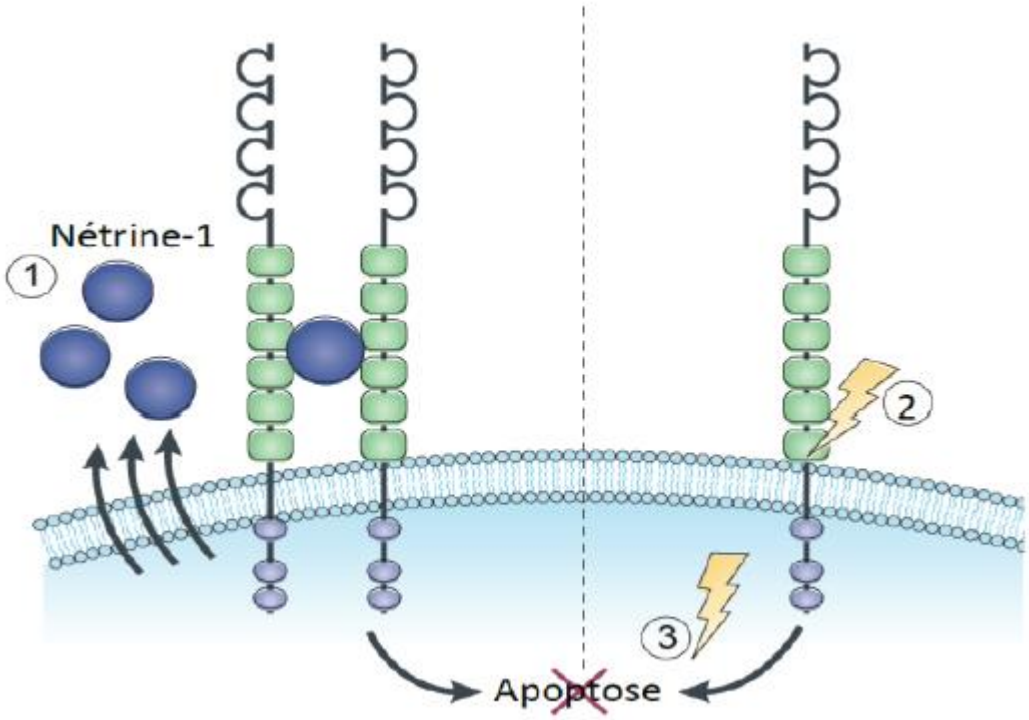


Figure 15: Perte de fonction pro-apoptotique des récepteurs à dépendance

Perte de fonction pro-apoptotique des récepteurs à dépendance

Au cours de la tumorigénèse, trois mécanismes peuvent entraîner la perte d'inductibilité de l'apoptose par les récepteurs à dépendance. 1) surexpression du ligand comme la nétrine-1, 2) perte d'expression du récepteur à dépendance, 3) perte de fonction d'un ou plusieurs protéines adaptatrices nécessaires à sa signalisation.

Adapté de(Mehlen et al., 2011)

Nous avons également à notre disposition de la nétrine-1 soluble, permettant de mimer une surexpression de nétrine-1 par les cellules, ainsi que l'anticorps NP137, bloquant l'interaction de la nétrine-1 avec ses récepteurs.

2.10.1 In Vivo

Des souris génétiquement modifiées ont été créées afin d'étudier la nétrine-1. Il existe des souris knock-in pour le gène de la nétrine-1. Ces souris expriment de façon constitutive la nétrine-1 dans l'ensemble des tissus et la surexpriment de manière conditionnelle après traitement au tamoxifène.

Il existe également des souris knock-out pour le gène de la nétrine-1. En absence de nétrine-1, les embryons de souris ne sont pas viables à cause de l'absence de migration d'axone dans le système nerveux des embryons. Cette délétion est donc conditionnée par l'injection de tamoxifène chez les souriceaux âgés de deux semaines. La délétion de la nétrine-1 est totale dans certains tissus après 4 semaines. La présence de nétrine-1 dans le foie de ces souris semble indiquer que le tissu hépatique est résistant à l'induction de la délétion du gène de la nétrine-1.

2.11 Pathologies hépatiques et nétrine-1

La nétrine-1 est surexprimée lors des pathologies virales et non virales du foie. On note une augmentation du transcrit *NTN1* (forme sécrétée) de 11 fois chez des patients infectés par le virus de l'hépatite B, et de 23 fois chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C comparés aux patients non infectés. La stratification de ces observations en fonction du stade de fibrose hépatique révèle également que plus la fibrose est avancée, plus les taux de transcrits de nétrine-1 sont également élevés, quel que soit le statut sérologique des patients. La nétrine-1 est donc induite lors d'infections hépatiques par les virus des hépatites B et C, mais également lors de la progression des pathologies hépatiques non virales vers des stades de fibrose avancée (Plissonnier et al., 2016).

Inversement, et en lien cohérent avec la notion de récepteur à dépendance, l'infection par le virus de l'hépatite C ainsi que la progression vers la cirrhose coopèrent pour une répression de l'expression du récepteur *UNC5A* de la netrine-1 humaine, tant là aussi dans une cohorte

de plusieurs centaines de patients que dans des études mécanistiques *in vitro* (Plissonnier et al., 2017).

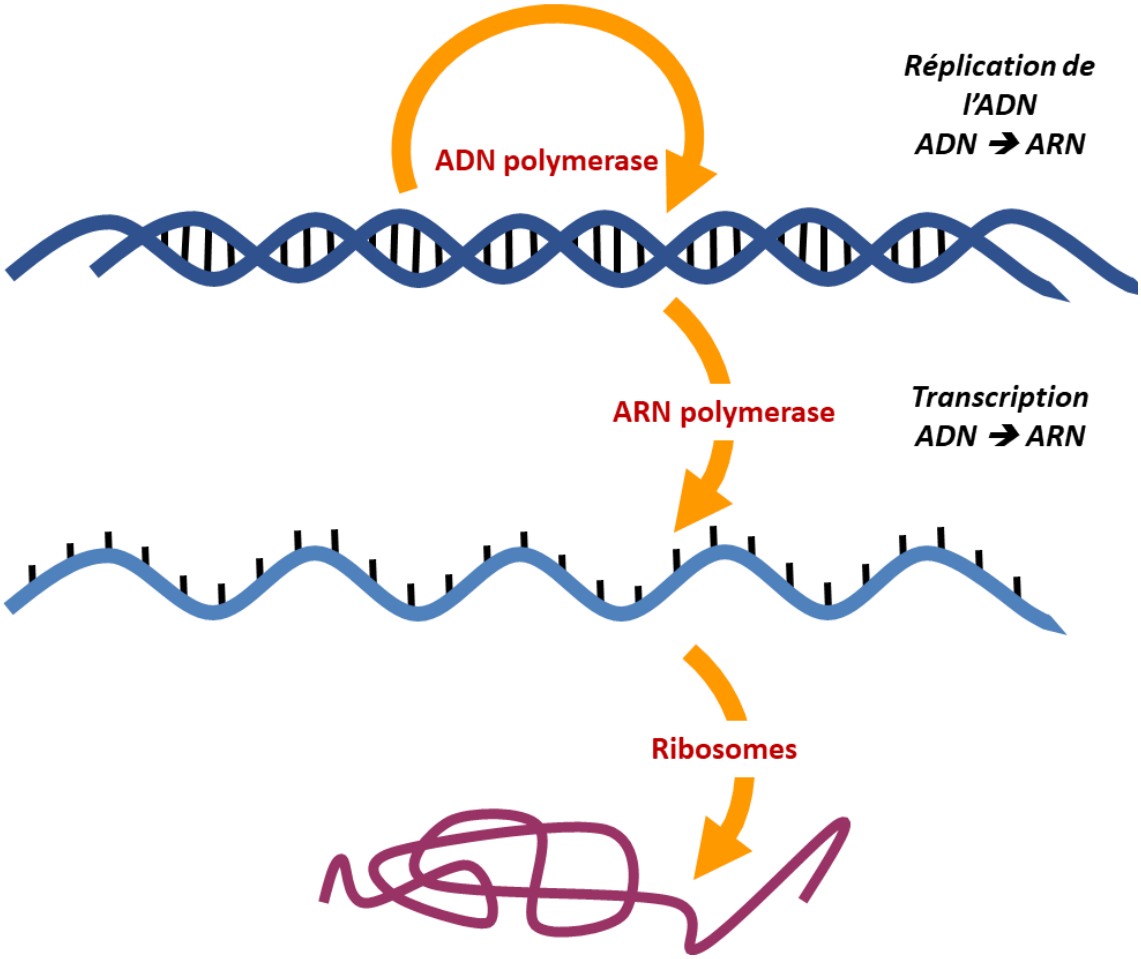


Figure 16: Etapes et régulations de la synthèse des protéines

La synthèse protéique est contrôlée par différentes étapes. Cette synthèse dépend d'abord de la quantité d'ARNm synthétisée et de tous les mécanismes co-transcriptionnels nécessaires pour l'orienter vers une traduction active. Les ribosomes sont les complexes ribo-protéiques qui prennent en charge la traduction des ARNm en protéines.

3 Synthèse des protéines et stress du réticulum endoplasmique

3.1 Généralités sur la synthèse protéique

3.1.1 La transcription

Les protéines sont les acteurs principaux de la fonctionnalité de la cellule et sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques. Ces outils cellulaires sont fabriqués à la demande, à partir de l'information génomique portée par l'ADN.

Des facteurs de transcription vont être co-responsables de la transcription des gènes. Chaque facteur de transcription reconnait des séquences d'ADN spécifiques auquel il peut se lier afin d'activer ou d'inhiber la transcription. Le contrôle des facteurs de transcription, et des co-facteurs présents dans les complexes de transcription est un moyen de contrôler l'expression des gènes. La transcription d'un gène permet la biosynthèse d'un ARN-pré-messager **(Figure 16).**

3.1.2 Modifications post-transcriptionnelles

Très peu de temps après l'initiation de la transcription, des enzymes intégrés au complexe de transcription vont déposer une 7-methyl-guanosine sur le premier nucléotide en 5' du transcrit (Cho et al., 1997). Cette coiffe a pour but de protéger les transcrits d'être ciblés et dégradés par les exonucléases.

Les transcrits doivent également être protégés en 3'. Après la fin de la transcription, la poly(A) polymérase va allonger l'extrémité 3' du transcrit. Cette polyadénylation est nécessaire pour l'export de l'ARN en dehors du noyau, ainsi que pour l'épissage du dernier intron.

Les ARN-pré-messagers sont composés de séquences introniques et exoniques. Les introns sont des séquences non codantes qui sont excisées lors de l'épissage. Cette étape fait appel à des complexes protéiques appelés spliceosomes, impliqués dans la reconnaissance des séquences qui flanquent les introns, et de couper en 5' de l'intron. Les deux extrémités libérées vont alors réagir au niveau de séquences spécifiques du même ARNm, formant un lariat (intron épissé partiellement circulaire) et l'ARN épissé. Cette étape peut également être régulée, et des phénomènes d'épissges alternatifs peuvent alors être observés. Les séquences reconnues par le spliceosome sont variables et n'ont pas toute la même lisibilité. Ainsi, dans

certain cas, certains introns ne seront pas retirés du transcrit, aboutissant à l'apparition du phénomène de 'rétention intronique'. Les signaux faibles sont appelés « signaux d'épissage alternatif », par opposition au signaux forts appelés « signaux constitutifs ». A partir d'un gène, on obtient alors, dans la plupart des cas, différents transcrits entraînant l'apparition de variants protéiques, aux activités parfois variables, parfois trop peu considérés lors de la mise en œuvre des projets.

3.1.3 Export des ARNm

Les ARNm sont transcrits et épissés dans le noyau. La machinerie nécessaire à la traduction se trouve dans le cytoplasme. Les ARN doivent alors être exportés du noyau vers le cytoplasme.

3.1.4 La traduction

La traduction est l'étape de synthèse des protéines à partir de l'information génétique contenue dans les ARNm. Ce sont les ribosomes qui prennent en charge cette synthèse. Ils sont composés de deux sous-unités, la petite sous unité (40S) permet la lecture des codons sur l'ARNm et la grande sous-unité, qui catalyse la synthèse des liaisons peptidiques. La traduction se déroule en 3 phases, l'initiation, l'élongation et la terminaison **(Figure 16)**.

3.1.4.1 Initiation de la traduction

Les ARNm, une fois dans le cytoplasme, interagissent avec différentes protéines. Par exemple, eiF4E interagit avec la coiffe, et PABP interagit avec le site polyadénylé. Ces deux protéines vont former un complexe avec eiF4G permettant de circulariser l'ARNm et de permettre le recrutement de la petite sous-unité du ribosome, et des cofacteurs de traduction.

Ce complexe protéique commence à parcourir ou « scanner » le transcrit, jusqu'à s'arrêter sur le site d'initiation de la traduction. Ce site est souvent un codon AUG, le premier lu par la petite sous unité, mais dans de nombreux autres cas, la traduction peut démarrer sur d'autre codons d'initiation. Une fois la petite sous-unité du ribosome stoppée sur le codon d'initiation, le recrutement de la grosse sous-unité 60S du ribosome intervient, et l'élongation peut débuter.

Il existe un moyen alternatif de démarrer la traduction pour certain transcrits. Certains transcrits portent des séquences de nucléotides permettant la formation de structures

spécifiques, capable d'induire le recrutement des ribosomes indépendamment de la présence d'une coiffe ou d'une queue polyadénylée, ou des cofacteurs formant les complexes nécessaires à l'initiation de la traduction dépendante de la présence de la coiffe. Ces séquences Internal Ribosomes Entry Site (IRES) permettent le recrutement de ribosomes. C'est notament le cas du transcrit de la nétrine-1, qui comporte une IRES dans sa partie 5'UTR, mise en évidence comme étant active dans un contexte d'UPR (Lahlali et al., 2016). Ainsi, même en cas d'inhibition de la traduction dépendante de la coiffe, la traduction de la nétrine-1 est maintenue.

3.1.4.2 L'élongation

Une fois l'initiation terminée, le ribosome progresse alors de codon en codon sur l'ARNm. Les acides aminés correspondants sont alors polymérisés un à un au peptide naissant. C'est la sous-unité 60S du ribosome qui catalyse cette réaction. Grâce à l'intervention de co-facteurs de traduction, le ribosome va pouvoir glisser sur le codon suivant, jusqu'au codon stop. La terminaison à lieu à ce moment précis.

On trouve la plupart du temps plusieurs ribosomes simultanément sur un même ARN. Dès que le site d'initiation est libéré, un autre évènement d'initiation peut avoir lieu sur le même ARN, et lancer l'élongation. Les ARN ne portant qu'un ribosome sont appelés des monosomes. Ceux portant plusieurs ribosomes sont appelés disomes, trisomes, quadrisomes, puis polysomes.

Cette étape peut être régulée par différents processus. Dans un premier temps, il faut savoir que les ARNm sont des molécules qui adoptent certaines conformations tridimensionnelles, directement liées à leur séquence primaire. Ces conformations peuvent être, dans certains cas, un frein à la progression du ribosome sur le transcrit. C'est également le cas si certaines protéines se lie au ARNm en cours de traduction, et participent dans ce cas à la régulation des processus de traduction en modulant l'activité des ribosomes. La traduction, comme toute réaction enzymatique, nécessite également pour son bon déroulement, une quantité de substrat suffisante. La quantité d'ARN de transfert (ARNt) dans le milieu est donc un régulateur important de l'élongation, et en absence de ces substrats, des pauses du ribosome sur le transcrit peuvent interrompre la traduction.

3.1.4.3 La terminaison

Il n'existe pas d'ARN de transfert complémentaire du codon stop. Des facteurs de terminaison tels que eRF1 and eRF3, vont intervenir afin d'induire le décrochage du ribosome (Petry et al., 2008). A ce moment, le ribosome se détache du transcrit, et libère simultanément la protéine néo-synthétisée.

3.1.4.4 Régulation de la biosynthèse des protéines

Chacune des étapes citées précédemment peut être régulée de différentes façons. Ces phénomènes de régulation permettent d'une part de gérer la quantité de protéine synthétisée, mais aussi de contrôler leur qualité.

L'initiation de la traduction présente deux phases de régulation possibles. La première consiste à la circularisation de l'ARNm. Seul les ARNm portant une coiffe et une queue polyadénylée peuvent être circularisés, et ainsi recruter tous les complexes nécessaires à l'‘initiation de la traduction. Le cadre de lecture est également très important lors de la traduction. Ainsi, l'initiation de la traduction doit débuter sur le bon codon. Le démarrage de cette traduction sur un autre codon que celui initialement prévu peut entraîner l'apparition de protéines tronquées (codon stop prématuré), rallongée (codon initiateur en amont de celui normalement reconnu), ou une protéine ayant une séquence complètement différente de celle attendue si le cadre de lecture n'est pas le bon.

L'élongation est régulée par deux évènements majeurs. L'abondance en ARN de transfert dans le milieu est importante, et conditionne le bon déroulement de l'élongation. Une carence en ARNt va stopper le ribosome et peut entraîner son décrochage prématuré. La structure tridimensionnelle secondaire de l'ARN, qu'il soit nu ou complexé à des protéines, peut également entraîner des difficultés de progression du ribosome sur le transcrit. Là encore, il peut y avoir induction de pause des ribosomes, ou un décrochage prématuré.

3.1.5 La sécrétion

On peut catégoriser les protéines selon leur localisation. Il y a les protéines solubles, cytoplasmiques ou nucléaires, qui sont traduites dans le cytoplasme de manière générale. Les protéines enchassées dans les membranes plasmiques, sécrétées ou lysosomales doivent être orientées vers le réticulum endoplasmique afin de pouvoir subir les modifications nécessaires à leur activité, et un adressage correct.

Afin d'exporter les peptides naissant vers le réticulum endoplasmique, une machinerie spécifique a été mise en place au cours de l'évolution. Les protéines sécrétées et membranaires vont exprimer en position aminoterminale de la chaine peptidique néo-synthétisée un peptide signal. Au cours de l'élongation, ce peptide signal va être reconnu par des protéines adaptatrices dès sa sortie du ribosome par un canal spécial. Ces co-facteurs protéiques sont capables de lier à la fois le peptide signal, les protéines des pores du réticulum endoplasmique, et de bloquer l'entrée de nouveau ARNs de transfert dans le site A du ribosome afin de bloquer momentanément la traduction. Une fois que le ribosome est fixé aux pores du réticulum endoplasmique, le site A de la sous-unité 60S est libéré et l'élongation peut reprendre. Le peptide synthétisé est alors transloqué directement dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les protéines peuvent alors être maturées à partir de ce moment. Le réticulum endoplasmique prend en charge principalement le repliement des protéines. Une fois ces protéines correctement repliées, elles vont être exportées vers l'appareil de Golgi après que des vésicules associées à la protéine COPII bourgeonne du réticulum endoplasmique. Ces vésicules sont orientés vers le réseau de vésicules du Golgi et peuvent fusionner dans un premier temps avec des vésicules pré-Golgi, permettant de débiter la maturation des protéines qu'elles contiennent. Ces vésicules fusionnent ensuite à la région cis-Golgi. Différentes modifications post-traductionnelles sont apportées aux protéines dans l'appareil de Golgi. Elles peuvent subir des glycosylations complémentaires à celles déjà intervenues dans le réticulum endoplasmique, mais aussi des sulfatations, des phosphorylations par certaines kinases, ou l'ajout de chaines d'acides gras. Toutes ces modifications sont essentielles pour l'adressage correct des protéines sur leur lieu final. Ces protéines sont alors chargées dans des vésicules allant, soit du trans-Golgi vers la membrane plasmique pour une sécrétion ou un relargage membranaire, soit du cis-Golgi vers le réticulum endoplasmique.

La nétrine-1 est une protéines sécrétée, sans doute lié à la membrane du fait de son appartenance à la famille des laminines. Sa sécrétion passe la voie de signalisation décrite ci-dessus.

3.1.6 La dégradation

Les protéines sont en constant renouvellement dans les cellules. On estime qu'un hépatocyte renouvelle 40% de ses protéines en 24 heures. Ceci est dû au fait que les hépatocytes sont riches en protéines enzymatiques, qui ont des demi-vie courtes de l'ordre de quelques heures. A l'inverse, les protéines structurales ont des demi-vie bien plus longues, de l'ordre du jour, voire du mois. Les protéines peuvent être dégradées de différentes façons, en fonction de l'environnement de la cellule et de la demi-vie de la protéine.

Des systèmes de régulation sont présents dans les cellules afin de détruire des protéines à des moments précis. C'est le cas des complexes d'ubiquitination, chargé de déposer des groupements ubiquitines sur les protéines abimées, ou cible de ces complexes. Les protéines ubiquitinylées sont alors orientées vers le protéasome, chargé de leur hydrolyse enzymatique. D'autre processus de dégradation peuvent intervenir, par autophagie et dégradation dans les lysosomes, ou par action des caspases lorsque l'apoptose est activée.

3.1.7 Les protéines dans la cellule : importance de la structure

Les protéines sont des molécules biologiques nécessaires à l'accomplissement de multiples fonctions dans les tissus vivants. Il existe différents types de protéines, impliquées dans différents processus biologiques : les protéines enzymatiques sont impliquées dans la catalyse de réactions chimiques, nécessaires principalement pour le métabolisme, mais aussi la détoxification. Les protéines structurales sont impliquées dans la morphologie des cellules ou des tissus, et garantissent leur bon fonctionnement. On trouve également des protéines motrices, impliquées dans les mouvements musculaires, des protéines qui conditionnent l'ADN (histones), d'autres impliquées dans l'expression des gènes (facteurs de transcription), et finalement celles impliquées dans la signalisation (récepteur, ligand, protéines adaptatrices).

Les protéines constituent la « boîte à outils » de la cellule, et leurs rôles clé dans les divers processus biologiques cités ci-dessus en font des molécules dont la chaine de biosynthèse est finement régulée, comme nous l'avons vu précédemment.

Le foie est impliqué dans la sécrétion de protéines plasmatiques impliquées dans la signalisation de l'inflammation, de la coagulation, du métabolisme lipidique, et la cicatrisation, notamment. Le foie est également en charge de la détoxification sanguine.

C'est la structure tridimensionnelle de la protéine qui lui confère son activité biologique. Cette structure tridimensionnelle est directement liée à la structure primaire de la protéine. La conformation des protéines, au-delà des phénomènes allostériques co-traductionnels, implique des protéines chaperonnes, et des enzymes nécessaires à la formation des ponts di-sulfure dans le réticulum endoplasmique.

3.2 Le réticulum endoplasmique

3.2.1 Structure du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un organite cellulaire formant un réseau étendu et complexe de membranes en continuité avec la membrane nucléaire. Cet organite n'existe que chez les eucaryotes. Il représente à lui seul plus de la moitié du système membranaire cellulaire et sa taille varie selon le type cellulaire. La lumière du réticulum endoplasmique correspond à l'espace situé entre le réseau membranaire et la membrane nucléaire et représente près de 10% du volume cellulaire total. Cet organite constitue un compartiment cellulaire isolé, dans lequel des conditions d'oxydation régulées et la richesse contrôlée en calcium sont nécessaires à ses fonctions. **(Figure 17)**

3.2.2 Fonction du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est spécialisé dans la biosynthèse des lipides, des protéines, et sert également de lieu de stockage pour le calcium, nécessaires aux voies de signalisation intracellulaires. Toutes ces fonctions sont essentielles à la cellule, mais leur importance relative varie considérablement en fonction du type cellulaire (Voeltz et al., 2002).

L'import des protéines dans le réticulum endoplasmique est un processus co-traductionnel comme précisé auparavant. La partie du réticulum endoplasmique où se fixe les ribosomes est appelée réticulum endoplasmique rugueux (de par son apparence en microscopie électronique).

Après translocation des protéines néo-synthétisées dans la lumière du réticulum endoplasmique, elles vont être prise en charge par des protéines chaperonnes résidentes du

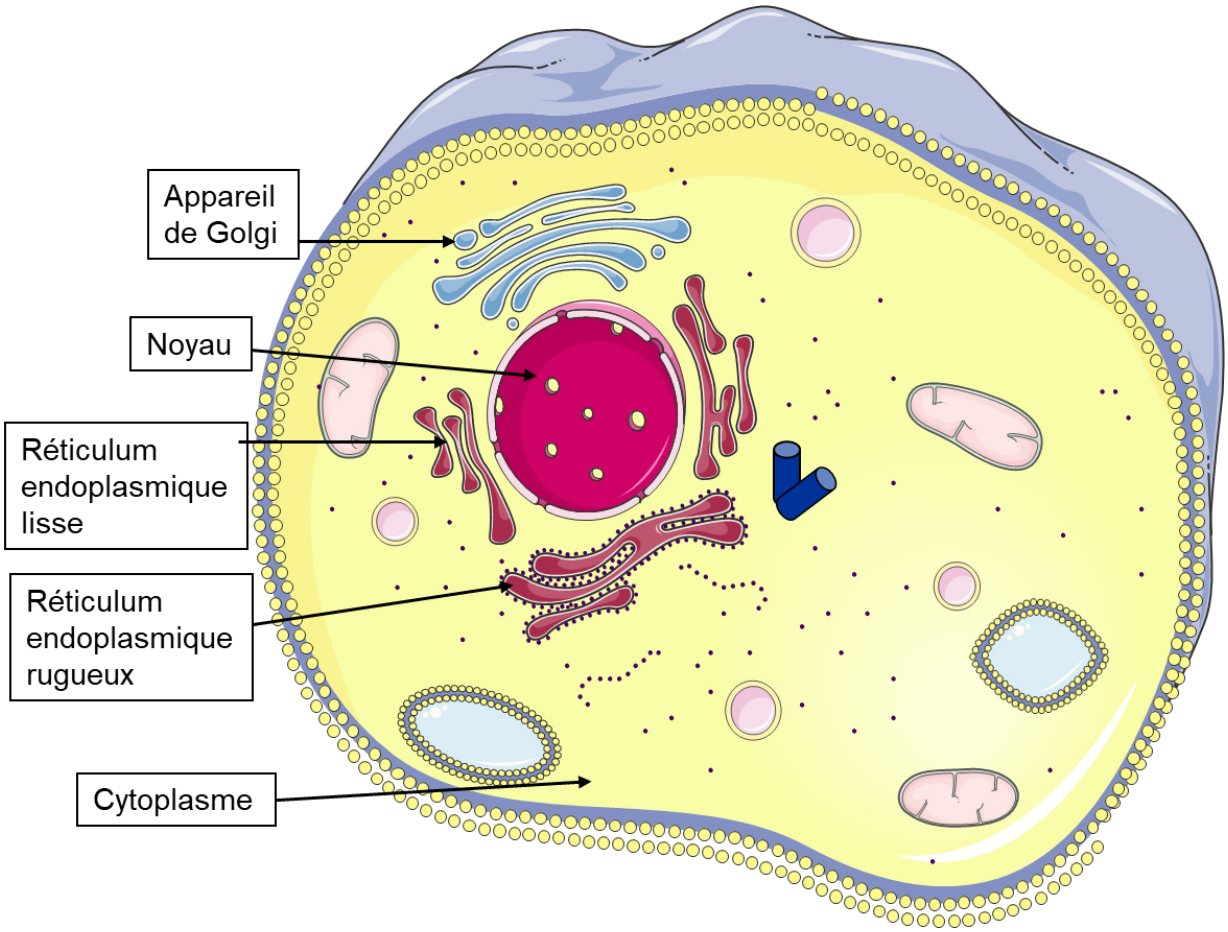


Figure 17: Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un organite cellulaire membranaire, dont la membrane est en continuité avec celle du noyau. C'est dans cette organite que le calcium est stocké, et que les protéines sont repliées, afin d'acquérir leur structure tridimensionnelle correcte. Le réticulum endoplasmique rugueux est celui qui prend en charge le repliement des protéines. Le réticulum endoplasmique lisse est chargé du métabolisme et de la synthèse des lipides, principalement.

réticulum endoplasmique, afin de subir les repliements nécessaires à l'acquisition de leur fonction, comme précité.

Le réticulum endoplasmique va permettre la formation des ponts disulfures et le contrôle qualité du repliement des protéines (Wang et al., 2012). La calnexine et la calréticuline sont deux protéines présentes dans le réticulum endoplasmique nécessaires pour la formation des ponts dissulfure et le contrôle qualité du repliement des protéines. Au cours de la translocation du peptide, une chaîne oligosacharidique est greffée sur le peptide, en faisant le substrat de ces deux chaperonnes. Cet oligosaccharide va être la cible de clivage par différentes protéines réticulaires, permettant alors la reconnaissance par les protéines nécessaires au bon repliement de la protéine. Après clivage de deux résidus de glucose, l'association avec l'enzyme ERp57 va catalyser la formation du pont dissulfure, permettant aux protéines glycosylées d'acquérir leur structure tridimensionnelle. **(Figure 18)**

Si les protéines sont conformées correctement, elles demeurent invisibles aux enzymes de la voie ERAD (ER-Associated-dégradation) et peuvent quitter le réticulum endoplasmique après clivage d'un mannose. Dans le cas où les protéines ne sont pas conformées correctement, la protéine UDP-glucose-glycoprotéine-glucosyltransférase réinitialise le processus de repliement par la calnexine et la calréticuline, jusqu'à leur repliement correct, ou leur élimination par la voie ERAD. Cette voie entraîne la rétrotranslocation de la protéine mal conformée vers le cytoplasme pour sa dégradation par le protéasome.

Parmi les protéines chargées du contrôle qualité, on trouve également des protéines chaperonnes de la famille des protéines de choc thermique (heat shock) HSP70 et HSP90, respectivement GRP78 aussi appelé Bip, et GRP94.

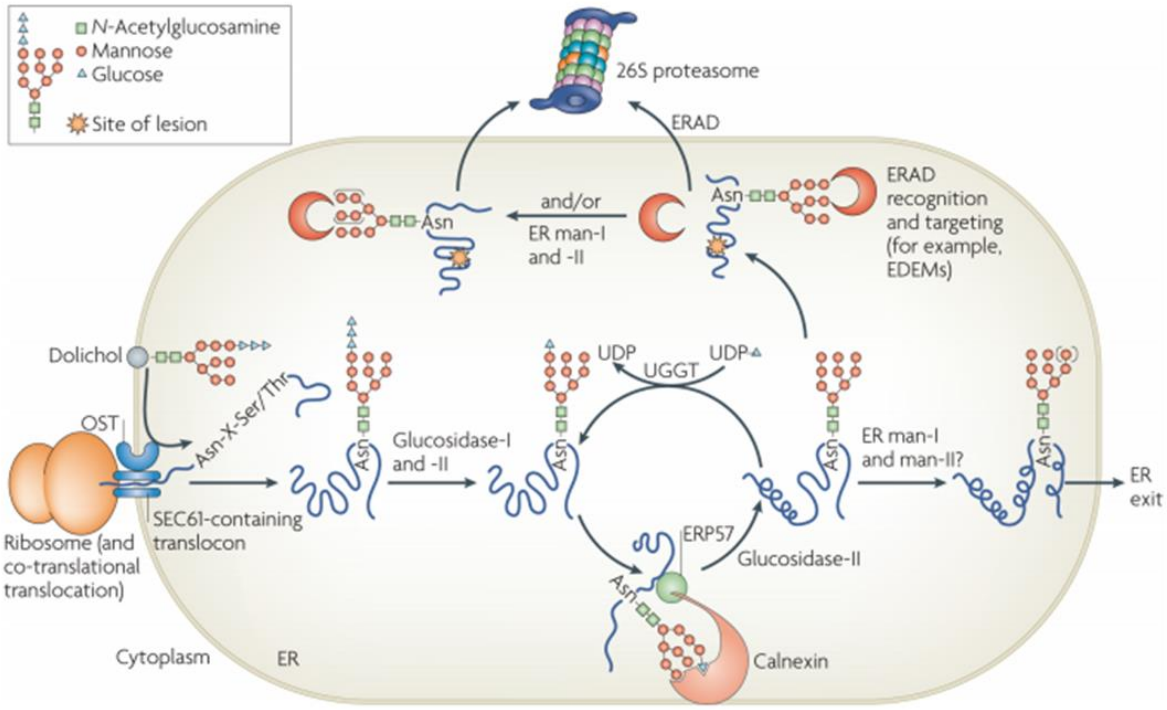


Figure 18: Le cycle de la calnexine/calréticuline

Lors de la traduction de protéines comportant un peptide signal, la traduction est réalisée à la surface du réticulum endoplasmique afin de faire entrer les peptides en cours de synthèse dans le réticulum endoplasmique. Un résidu Glycan ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) est alors déposé sur un résidu Asn de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr. Après clivage par des enzymes réticulaires, le peptide va être reconnu par les chaperonnes calnexines et calréticuline, qui vont faciliter son repliement. Ces deux chaperonnes s'associent avec ERp57 impliqué dans la formation des ponts disulfures. Si les protéines sont conformées correctement, elle peuvent quitter le réticulum endoplasmique et suivre les voies de sécrétion. A l'inverse, elle sont reglycosylées et repasse par le cycle de la calnexine/calreticuline. Celle ne pouvant être correctement repliée passe par la voie ERAD et sont dégradées par le protéasome.

Adapté de (Vembar and Brodsky, 2008)

3.2.3 Le stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est très sensible aux perturbations de l'homéostasie cellulaire en énergie, en calcium, et en potentiel d'oxydoréduction, de la quantité de glucose (nécessaire au N-glycosylation des protéines) et de la quantité de protéines sécrétées synthétisée. En effet, toute perturbation affecte le potentiel de repliement des protéines par le réticulum endoplasmique, provoquant une accumulation et une agrégation des protéines non ou mal conformées. Cette accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique est toxique pour la cellule, et entraine l'apparition d'une situation appelée 'stress du réticulum endoplasmique'. Les protéines Bip sont recrutées par les protéines mal conformées permettant alors l'initiation de voie de signalisation de l'UPR (Unfolded Protein Response).

Ces stress peuvent être induits par différentes situations, telles que des infections virales, entraînant une augmentation de la synthèse protéique. Les hépatocytes sont des cellules impliquées dans la sécrétion de nombreuses protéines plasmatiques, et sont donc très dépendantes de la physiologie du réticulum endoplasmique.

3.2.4 La réponse aux protéines mal repliées ou UPR

Le réticulum endoplasmique est un compartiment cellulaire essentiel responsable de la synthèse et du bon repliement des protéines qui suivent la voie de sécrétion dans la cellule. Le repliement des protéines est sensible aux altérations de l'homéostasie du réticulum endoplasmique, telle que le niveau de calcium intra-réticulaire, la disponibilité en nutriments et en énergie, ainsi qu'à la quantité de protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique. Des perturbations de ces processus cellulaires interfèrent avec le repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique, entraînant un stress protéotoxique qui va activer l'UPR. Initialement, l'UPR est une voie de signalisation adaptative permettant d'éviter les changements métaboliques cellulaires impactant la traduction, et visant à permettre de maintenir ou de retrouver l'homéostasie du réticulum endoplasmique afin de maintenir une traduction capable de répondre à la demande dans la cellule. Des voies de signalisation impliquées dans le repliement protéique et dans la dégradation protéique sont activées lors de l'UPR. Lorsque l'homéostasie du réticulum endoplasmique ne peut être restaurée par

l'UPR, l'apoptose de la cellule, induite par l'UPR elle-même, intervient et aboutit à la mort de la cellule.

L'UPR est induite de façon canonique par des senseurs présents dans la lumière du réticulum endoplasmique : IRE1α, PERK, et ATF6 α. **(Figure 19)**

3.3 Voies de signalisation de l'UPR

3.3.1 La voie de signalisation IREα

La voie de signalisation IRE1α est la plus conservée lors de l'activation de l'UPR. IRE1α est une protéine transmembranaire ubiquitaire possédant une double activité catalytique : serine/thréonine kinase et endoribonucléase (RNase) dans son domaine cytosolique. Dans un état physiologique, le domaine luminal de IRE1a est lié à la protéine chaperonne BiP (Binding immunoglobuline Protein) qui la maintient dans un état inactif. En réponse à une accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique, BiP va être recrutée dans la lumière du réticulum afin de contribuer à la reconfiguration des protéines mal repliées accumulées. IRE1α est alors libérée, et va s'activer par dimérisation et autophosphorylation gràca à son activité kinase. Cette autophosphorylation va induire des changements conformationnels permettant d'activer l'activité RNAse.

De façon alternative, les protéines mal repliées peuvent se fixer directement au domaine luminal d'IRE1α, induisant alors des changements allostériques au niveau de la protéine qui l'active.

L'activation d'IRE1a va induire le splicing non conventionnel d'un ARN messager dans le cytosol, *XBP1*, codant la 'X-Box binding protein 1'. Les 26 nucléotides excisés du transcrit induisent un changement du cadre de lecture lors de la traduction, et la production d'un

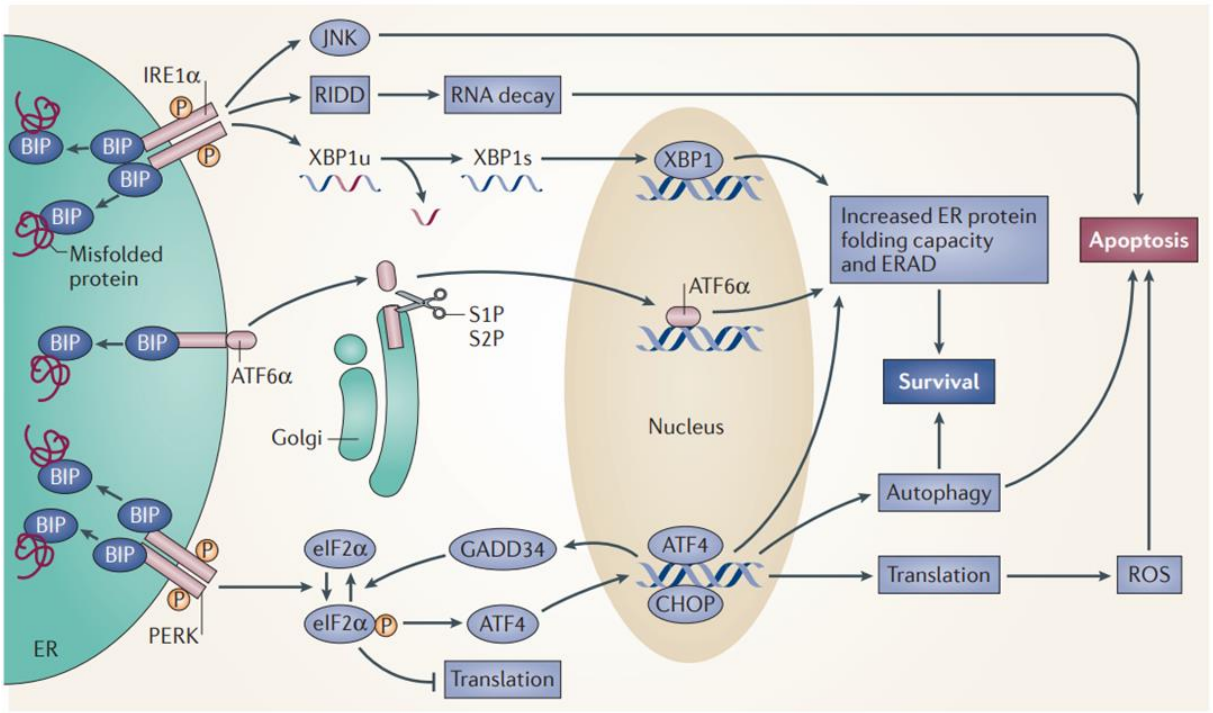


Figure 19 : Les voies de signalisation de la réponse UPR

La réponse UPR est composée de trois voies de signalisation en aval des senseurs du stress du réticulum endoplasmique: IRE1a, ATF6 et PERK. Ces trois senseurs sont maintenus à leur état inactif grâce à leur interaction avec Bip. Suite à un stress du réticulum endoplasmique, la protéine chaperonne Bip se fixe sur les protéines non ou mal conformées, entrainant l'activation de la réponse UPR. Elle induit l'augmentation de la capacité de repliement des protéines, ainsi que le transport et la dégradation des protéines mal repliées par la voie ERAD, et l'atténuation de la synthèse protéique médiée par la coiffe, permettant de ne pas surcharger le réticulum endoplasmique. Si ce stress n'est pas résolu, les cellules s'orientent vers l'apoptose.

Adapté de (Wang and Kaufman, 2014)

facteur de transcription qui va augmenter l'expression de plusieurs chaperonnes et ainsi augmenter les capacités de repliement des protéines. En cas de stress très important du réticulum endoplasmique, IRE1a est impliqué dans la dégradation de beaucoup d'autres ARN messagers liés au réticulum endoplasmique et de micro-ARNs via le processus de RIDD (regulated IRE1α-dependent decay).

3.3.2 La voie de signalisation PERK

PERK est une protéine transmembranaire, contenant un domaine N-terminal sensible au stress et un domaine cytosolique comportant une activité kinase. De façon similaire à IRE1a ; le domaine luminal de PERK est lié à Bip. L'activation de PERK repose sur sa dimérisation ou tétramérisation de son domaine luminal, induisant son autophosphorylation. Après activation, PERK phosphoryle la protéine 'eukaryotic translation initiation factor 2a' (eIF2a). Ce facteur est impliqué dans l'assemblage du ribosome 80S, et inhibe ainsi la traduction des ARN ayant une traduction dépendant de la coiffe. L'inhibition de ce type de traduction va induire la traduction de certain ARN messagers, comme ATF4v1, ayant une traduction conditionnée, elle, par une IRES (Chan et al., 2013). ATF4 permet l'activation de la transcription de gènes cibles spécifiques de l'UPR correspondant à la protéine 'CCAAT-enhancer binding protein homologous protein' (CHOP) et à la 'Growth arrest and DNA damage-inducible protein' (GADD34). CHOP est un facteur de transcription qui va induire la mort cellulaire par la transcription spécifique de gènes impliqués dans l'apoptose induite par l'UPR. À l'inverse, GADD34 est impliqué dans une boucle de rétrocontrôle par dephosphorylation de eIF2α, induisant une reprise de la traduction, elle-même inhibée par PERK durant l'UPR.

3.3.3 La voie de signalisation ATF6α

ATF6α est une protéine transmembranaire de type II, localisée dans le réticulum endoplasmique. Cette protéine comprend un domaine cytosolique bZip, co-facteur de transcription, spécialisée dans la régulation du contrôle qualité des protéines du réticulum endoplasmique. Lors d'un stress du réticulum endoplasmique déclenché par une accumulation de protéines mal repliées, ATF6α est conduit au Golgi par l'implication de

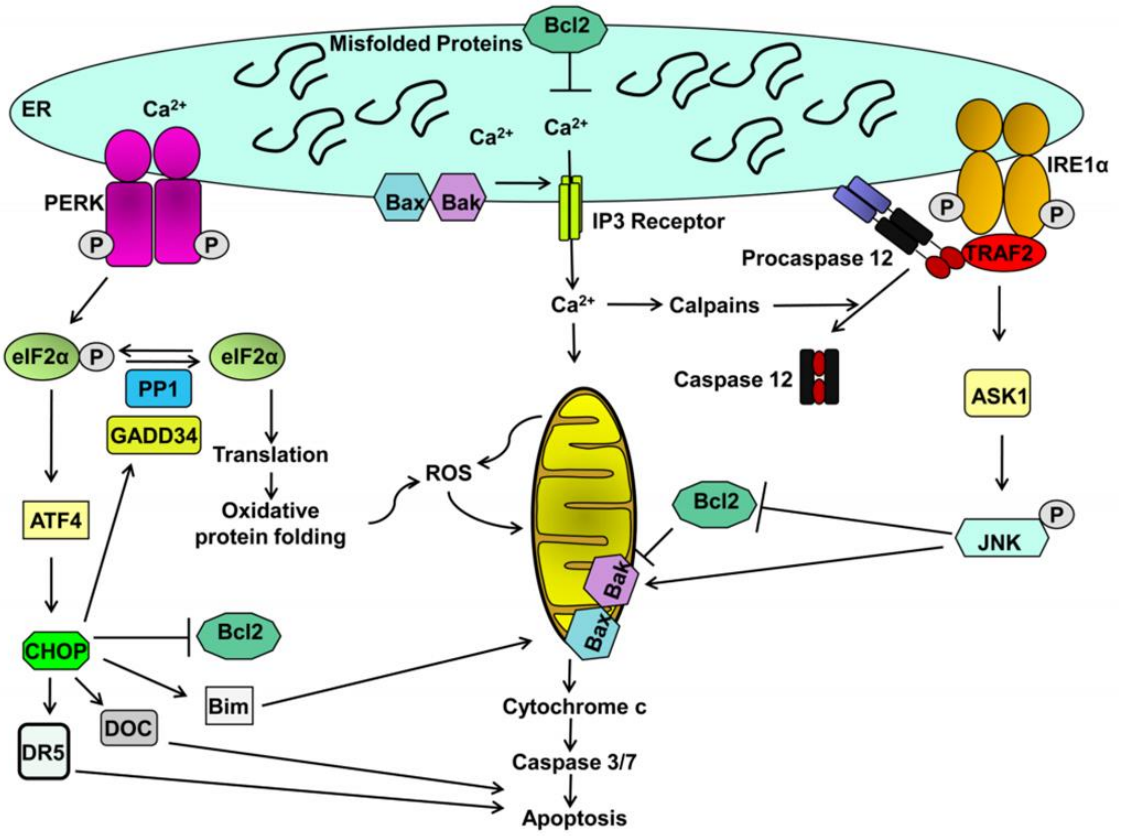


Figure 20: Les voies d'induction de l'apoptose par l'UPR

Les intermédiraires de signalisation de l'UPR dont également impliqués dans la régulation d'expression et d'activation des protéines pro et anto-apoptotiques comme Bax, Bak et Bcl2. Les modifications d'équilibre et de localisation de ces protéines entrainent des perturbations de l'homéostasie du calcium, précurseur de la signalisation apoptotique. Les calpaïnes sont activées par le calcium provenant du réticulum endoplasmique et vont cliver la caspase-12 afin de diriger la cellule vers l'apoptose.

Les protéines Bax et Bak sont aussi impliquées dans la libération du cytochrome C de la mitochondrie. Le cytochrome C va activer par clivage les caspases-3 et -7.

Adapté de (Malhi and Kaufman, 2011)

vésicules de sécrétion. Dans l'appareil de Golgi, ATF6α est clivé par la protéine 'site-1 protease' (S1P) et la protéine 'site-2 protease' (S2P), relargant un fragment cytosolique de 50kDa qui migre jusqu'au noyau. Le clivage d'ATF6α active des gènes cibles de l'UPR, comme des gènes impliqués dans les fonctions ERAD, et la synthèse de phospholipides. L'augmentation importante du clivage d'ATF6α serait aussi impliquée dans l'augmentation de la synthèse de cholestérol (Ye et al., 2000).

3.3.4 Induction de l'apoptose

Les trois senseurs du stress du réticulum endoplasmique sont capables d'induire l'apoptose lorsque le stress est trop important (induction de perturbation du métabolisme) ou trop long. Le senseur PERK va induire la protéine CHOP, impliquée dans la régulation positive des protéines pro apoptotiques Bax et Bak, toutes les deux impliquées dans la formation de pores sur les membranes du réticulum endoplasmique et des mitochondries. La libération de calcium et de cytochrome C dans le cytoplasme de la cellule va induire à la fois l'activation des caspases 3 et 7, ainsi que l'activation des calpaïnes, conduisant finalement à l'activation de la caspase 12. CHOP est également responsable de l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl2. En parallèle de PERK, IRE1α, via son interaction avec TRAF2 va être responsable de l'induction de la voie JNK, ayant les mêmes rôles que CHOP. La réponse UPR, impliquée dans l'homéostasie du réticulum endoplasmique lors d'un stress peut donc induire via différentes voies de signalisation l'apoptose des cellules. (Malhi and Kaufman, 2011). **(Figure 20)**

3.4 UPR et pathologies hépatiques

Les différentes pathologies hépatiques citées en premières partie, qu'elles soient virales ou métaboliques, ont en commun l'induction de phénomènes de stress du réticulum endoplasmique.

3.4.1 Pathologies virales

Dans le cas des pathologies virales, la machinerie cellulaire va être détournée afin de produire de nouveau virions infectieux. Il s'agit alors de produire de nouvelles copie du génome viral d'intérêt, en détournant la machinerie cellulaire de transcription ou de traduction, mais également de produire toutes les protéines nécessaires à l'encapsidation (si nécessaire) et à

l'enveloppement. La traduction des protéines virales fait appel à la machinerie cellulaire, et s'ajoute à la traduction de toutes les protéines en cours. De plus, les transcrits viraux peuvent comporter des IRES (HCV) (Fraser and Doudna, 2007)permettant le recrutement de ribosomes relativement indépendamment du statut de la traduction dans la cellule. Une accumulation de protéines atypiques, en quantités parfois très élevées (cas de l'antigène HBs) dans le réticulum endoplasmique survient, déclenchant la mise en place d'une réponse UPR.

3.4.2 Les pathologies non virales

Les pathologies hépatiques non virales impliquent également le stress du réticulum endoplasmique et la réponse UPR. En effet, dès que le métabolisme des hépatocytes est perturbé, un dérèglement de l'homéostasie cellulaire, et notamment du potentiel d'oxydoreduction peut survenir (Malhi and Kaufman, 2011).

La principale cause du stress du réticulum endoplasmique est le stress oxydatif, qui entraîne une accumulation voire une agrégation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique. Les transplantations hépatiques, le métabolisme des molécules telles que l'alcool, l'aflatoxine B1, de médicaments, ou de lipides, ainsi que certaines mutations affectant la structure de l'alpha1-anti-trypsine, un constituant majeur du plasma d'origine hépatique, sont suffisants pour induire ce type de stress dans les hépatocytes.

3.5 Nétrine-1 et UPR

Mon groupe d'accueil au sein du laboratoire s'intéresse à différents mécanismes moléculaires impliquant la nétrine en physiopathologie hépatique, et à la manière dont ces mécanismes pourraient être impliqués dans l'aggravation de la pathologie.

Après avoir montré que les stades de fibrose croissants sont fortement associés à la quantité de transcrit *NTN1* de la nétrine-1 (et inversement pour *UNC5A*) dans des biopsies de patients, le stress du réticulum endoplasmique a été étudié.

Dans le modèle cellulaire HepaRG (Parent et al., 2004), il a été montré que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique par le DTT (dithiothréitol) était capable d'induire une réponse UPR complète, et que la traduction de la nétrine-1 était maintenue durant l'inhibition globale de la traduction dépendante de la coiffe. Ce maintien de la traduction de la nétrine-1 est conditionné par la région IRES en 5' de la séquence *NTN1*, capable d'initier une traduction sans avoir besoin de recruter les différents complexes nécessaires à l'initiation dépendante de

la coiffe. La nétrine-1 étant un ligand de récepteur à dépendance impliquée dans la signalisation de l'apoptose, la survie cellulaire a alors été étudiée. La nétrine-1 est donc finalement impliquée dans le maintien en vie des cellules soumises à une réponse UPR, et semble inhiber l'apoptose induite par l'UPR (Lahlali et al., 2016).

Comme précisé auparavant, l'UPR est un phénomène fréquemment induit dans le foie du fait des nombreuses sollicitations circadiennes auxquelles cet organe se doit de répondre en terme métabolique, et du fait de la nature traductionnelle des réponses apportées par les cellules concernées. Ainsi, la nétrine-1 serait susceptible d'acquérir dans ce contexte un profil de molécule pro-carcinogène, qui inhiberait l'apoptose induite par la réponse aux protéines mal repliées et maintiendrait les cellules par ailleurs (épi-)génétiquement altérées en vie dans un micro-environnement favorable à la transformation tumorale des cellules. (Lahlali et al., 2016)

3.6 Les modèles d'étude

3.6.1 In vitro

3.6.1.1 Induction de l'UPR

L'UPR est une réponse inductible dans des hépatocytes primaires humains, ou dans la lignée cellulaire HepaRG par l'utilisation de différentes molécules chimiques qui induiront un stress du réticulum endoplasmique par différents aspects :

Le DTT est une molécule à fort potentiel réducteur empêchant la formation des ponts disulfures des protéines. Cela va entraîner une accumulation de protéines mal conformées, un stress du réticulum endoplasmique et le déclenchement de la réponse UPR (Friedlander et al., 2000).

La tunicamycine est une molécule ayant pour effet d'inhiber les N-glycosylations dans le réticulum endoplasmique, ce qui aura des conséquences conformationnelles sur les glycoprotéines ciblées par ce composé, et des effets cellulaires comparables(Abhari et al., 2019).

3.6.1.2 Etude de la traduction

L'étude de la traduction se fait notamment en étudiant la répartition des transcrits engagés dans les polysomes. Pour cela, différentes molécules peuvent être utilisées afin d'induire différents phénotypes, et d'en déduire l'activité traductionnelle des transcrits étudiés.

Afin de réaliser du fractionnement de polysomes et de pouvoir étudier l'engagement des transcrits cibles dans les polysomes, il est nécessaire de traiter les cellules avec de la cycloheximide. En effet, cette molécule a la capacité de bloquer les ribosomes durant leur élongation. La cycloheximide se fixe aux ribosomes sur un site encore non identifié, et inhibe la translocation du ribosome rendue possible par le facteur eEF2. Le traitement des cellules avec cette molécule permet alors de figer tous les ribosomes, et d'étudier la répartition de notre transcrit d'intérêt parmi les polysomes.

La puromycine est un antibiotique inhibiteur de la traduction dans les cellules eukaryotes. Cette molécule est capable de se lier au peptide en cours de formation, via la formation d'une liaison peptidique par le ribosome. En revanche, il est impossible de créer de nouvelle liaison peptidique, comme sur l'un des 20 acides aminés. La traduction est alors stoppée, le peptide tronqué, le ribosome et le transcrit sont alors séparés. Le peptide formé comporte alors en C terminal une puromycine qui peut être utilisée pour être marquée à l'aide d'anticorps.

L'utilisation de la puromycine comme inhibiteur de la traduction et inducteur de la séparation des ribosomes et des transcrits peut aussi être utilisé dans le cadre des expériences de fractionnement de polysomes.

La harringtonine est une autre molécule interférant avec la traduction. Elle est décrite pour se fixer sur le site A libre du ribosome pendant l'initiation et stoppe l'élongation en maintenant le ribosome sur le site d'initiation de la traduction, empêchant alors toute réinitiation de la traduction. **(Figure 21)**

3.6.2 *In vivo*

Le stress du réticulum endoplasmique chez la souris peut être induit par injection intra-péritonéale de tunicamycine. (Lahlali et al., 2016) Il est ici montré que les souris traitées à la tunicamycine présentent un foie moins coloré que les souris non traitées, sans doute dû à des phénomènes de vasoconstriction.

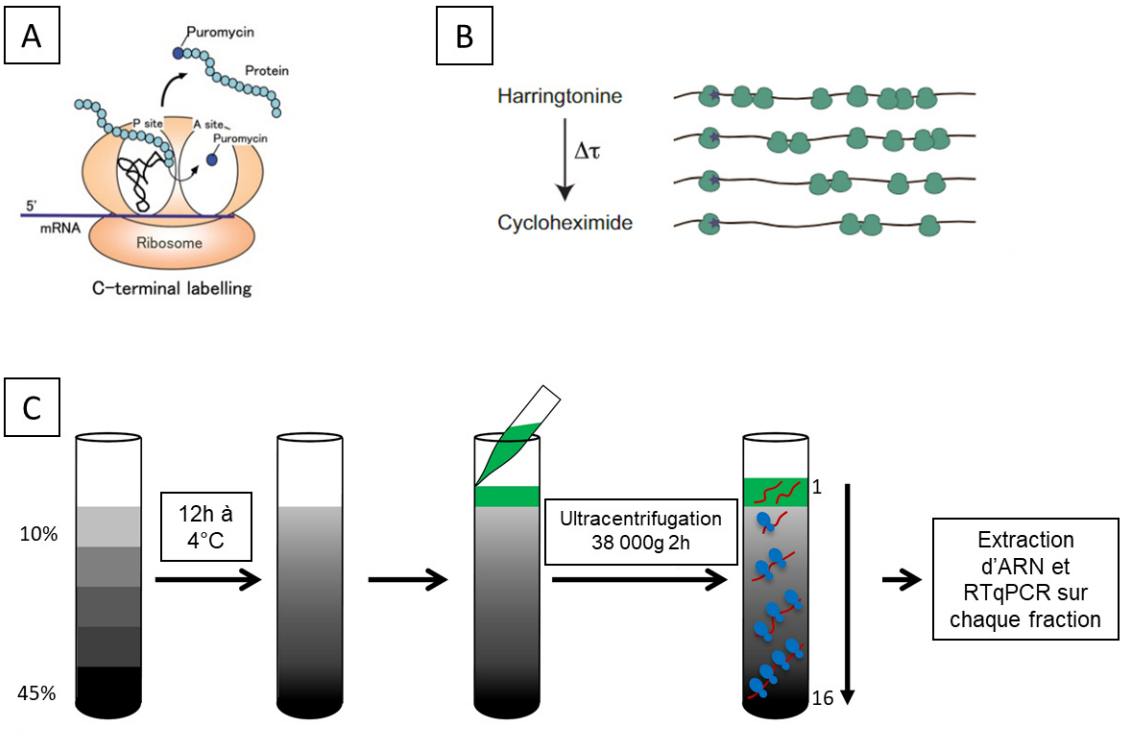


Figure 21: Etude de la traduction

(A) Différentes molécules sont connues pour bloquer la traduction de différente façon. La puromycine est capable de former une liaison peptidique avec le peptide en cours de traduction, remplaçant un acide aminé. Ce remplacement va cependant induire la fin de la traduction. On obtient alors un peptide dont de dernier composant est une puromycine.(Ohashi et al., 2013).

(B) Afin d'étudier la traduction, il est nécessaire de figer les polysomes afin de les purifier. On utilise alors de la cycloheximide, composé chimique qui va bloquer la traduction et maintenir le ribosome sur le transcrit en cours de traduction. La harringtonine est une molécule qui ne va bloquer que les ribosomes présents sur le site d'initiation. On peut alors l'utiliser pour bloquer l'initiation, et apprécier la cinétique de traduction des transcrit étudiés. (Ingolia et al., 2011)

(C) La purification de polysomes se fait par ultracentrifugation sur gradient de sucrose. Les polysomes sont séparés en fonction de leur densité, et sont ensuite récupéré dans des fractions séparées pour analyse. (Panda et al., 2017)

4 L'inflammation

Afin de protéger l'organisme contre des pathogènes externes (bactéries, parasites, virus…), ou des composants aberrants du soi (cellules cancéreuses ou apoptotiques…), une réponse immunitaire fonctionnelle est nécessaire afin de maintenir notre intégrité. Les réponses immunitaires peuvent être réparties en deux groupes : les réponses innées et adaptatives.

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre les pathogènes dans l'organisme. Cette réponse immunitaire innée, la plus ancienne phylogénétiquement, se traduit par la sécrétion de signaux inflammatoires par les cellules ayant subi des dommages. L'induction de cette réponse est peu contrôlée, à la différence de la phase de résolution, qui elle est très contrôlée afin de prévenir l'inflammation chronique ou les maladie auto-immunes. La réponse immunitaire innée est en effet une réponse immunitaire globale qui ne fait pas la différence entre le soi et le non-soi. Cette réponse est nécessaire pour la mise ne place de la réponse immunitaire adaptative, ainsi que pour la réparation du tissu lésé.

4.1 Généralités

L'inflammation est un processus rapide, réversible et dynamique permettant à un tissu lésé (chimiquement, physiquement, ou biologiquement) de retrouver son homéostasie. Lors d'infections bactériennes, virales, de blessures physiques (radiations), mécaniques (plaies), ou chimiques (solvants toxiques par exemple), les cellules immunitaires ou non, résidentes de chaque tissu vont être stimulées, et chargées de produire des cytokines nécessaires à la signalisation avec les autres cellules. Lors d'une infection virale, bactérienne, ou d'une lésion, des molécules repérées par des récepteurs de l'immunité innée exprimés par toute sorte de cellules dans l'organisme déclenchent cette réponse inflammatoire.

4.1.1 Les récepteurs de l'immunité innée

Différents signaux de dangers, précoces et non-spécifiques, appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) peuvent être captés par les cellules dans leur environnement via différents récepteurs appelés PRR (Pathogen Recognition Receptors). On trouve différents groupe de récepteurs parmi ces PRR :

- les TLR (Toll-Like Receptors),

- les RLR (Retinoic acid-inducible Gene I / RIG-like) Receptors,
- les NLR (Nucleotide-binding oligomerization domain containing protein-Like Receptors
- les CLR (C-type Lectin Receptors).

Tous ces récepteurs sont exprimés de façon ubiquitaire ou différentielle en fonction des types cellulaires. Leur localisation et leur activation intervient également de façon différente dans les cellules. **(Figure 22-23)**

4.1.2 Signalisation cellulaire

Tous ces récepteurs, une fois activés par leurs ligands, vont s'activater et leur interaction avec différentes protéines adaptatrices aura lieu, jusqu'à activation des opérateurs nécessaires à la mise en place de la réponse.

Les récepteurs activés intéragissent tout d'abord avec des protéines adaptatrices telles que MyD88 ou TRIF, qui vont à leur tour interagir avec les kinases TBK1 ou TAK1 impliquées dans l'activation directe ou indirecte des facteurs de transcription IRFs, NFkB, et c-fos/c-jun, nécessaires pour l'expression de gènes effecteurs impliqués dans la réponse immunitaire (Wree et al., 2019).

4.1.3 Réponse transcriptionnelle

Les facteurs de transcription cités précédemment sont responsables de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire, et plus largement dans la réponse immunitaire globale, impliquant d'autres processus comme la survie cellulaire, et la réponse au stress.

On voit notamment différentes familles de gènes surexprimées en cas d'inflammation, comme les cytokines, les chimiokines, ainsi que des protéines régulatrices des voies de signalisation impliquées, les récepteurs immunitaires, certaines protéines impliquées dans la présentation d'antigène, et les molécules d'adhésions impliquées dans l'extravasation des cellules immunitaires provenant du compartiment sanguin. Des gènes codant pour des protéines régulatrices de l'apoptose, ainsi que pour des facteurs de croissance ou leurs récepteurs sont aussi régulés (Smale and Natoli, 2014).

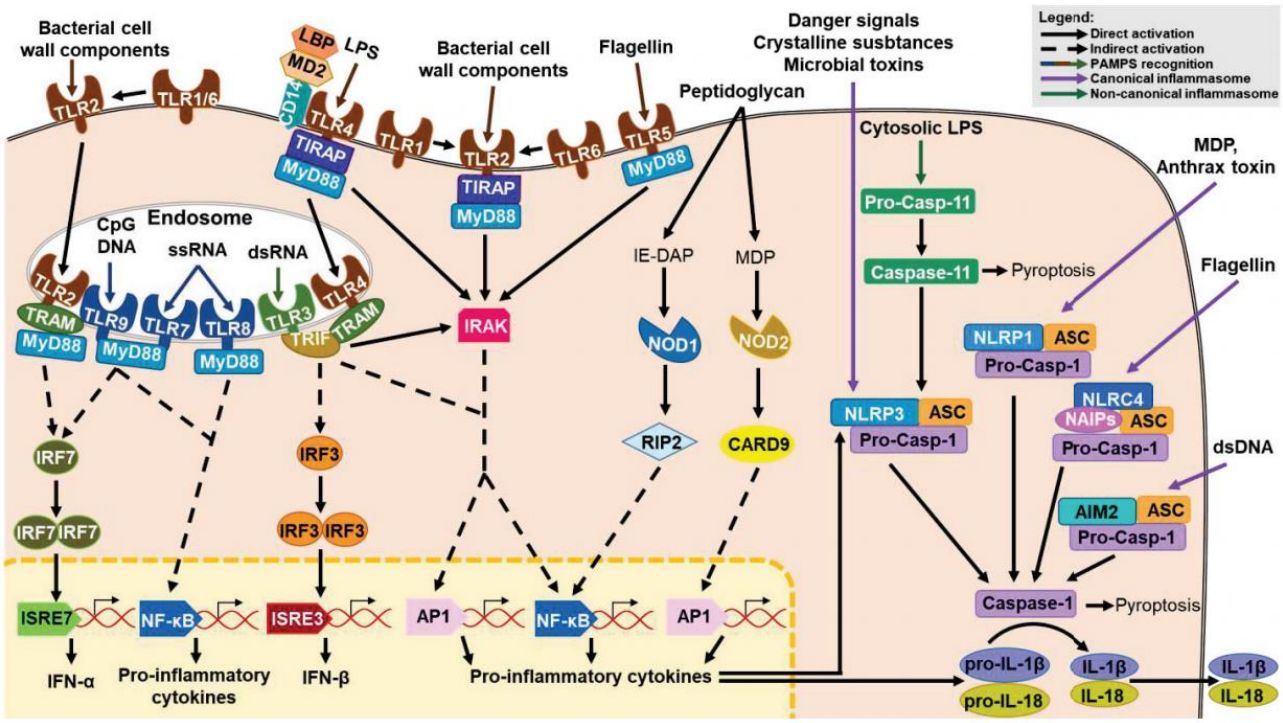


Figure 22 : Voies de signalisation des TLRs, NLRs et inflammasomes

Les cellules sont constituées de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance des molécules associés à des pathogènes, permettant d'initier des réponses immunitaires rapides. Les voies de signalisation des récepteurs de l'immunité innée, des molécules activatrices et des protéines adaptatrices sont représentées ici.

Adapté de (Kawai and Akira, 2007; Pandey et al., 2015)(Kawai and Akira, 2007; Pandey et al., 2015)

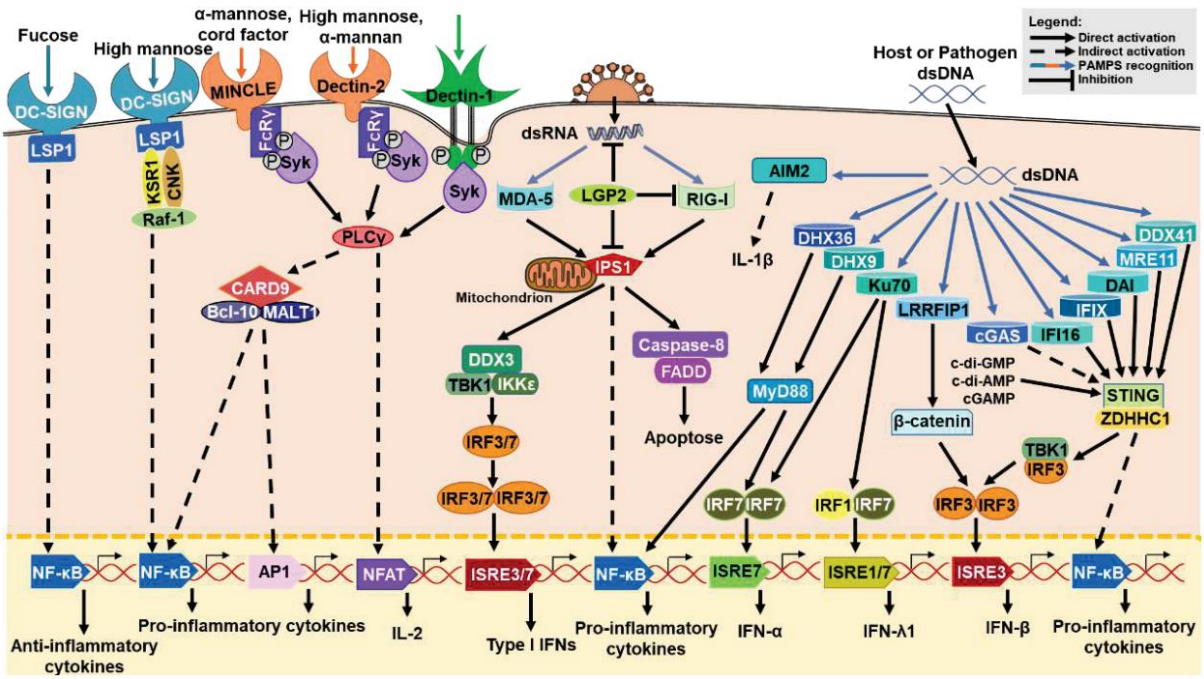


Figure 23 : Voies de signalisation des CLRs, des RLRs, et CDSs

Les cellules expriment des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance des molécules associées à des pathogènes, permettant d'initier des réponses immunitaires rapides. Les voies de signalisation des récepteurs de l'immunité innée, des molécules activatrices et des protéines adaptatrices sont représentés ici.

Adapté de (Pandey et al., 2015)(Pandey et al., 2015)

4.1.4 L'inflammasome

L'inflammasome est un complexe protéique qui se forme à la suite de différents stimuli (Chan and Schroder, 2019). Les hépatocytes ne possèdent pas tout l'arsenal protéique pour former de tels complexes. En revanche, les autres types cellulaires présents dans le foie, ainsi que ceux recrutés de la circulation lors d'une inflammation hépatique sont capable d'induire des inflammasomes. La formation des inflammasomes conduit au clivage d'interleukines comme l'IL1β et l'IL18. Les inflammasomes jouent également un rôle dans l'apoptose puisqu'ils sont impliqués dans la fragmentation de l'ADN et la formation de pores cellulaires (Licandro et al., 2013). **(Figure 22)**

4.2 Les cellules immunitaires hépatiques

Le foie est considéré comme un organe lymphoïde secondaire du fait de la quantité de sang qui le traverse, qui s'y infiltre, et de la quantité de cellule immunitaire résidentes (Crispe, 2009).En effet, toutes les cellules hépatiques décrites dans la première partie de ce document sont connues pour jouer un rôle au niveau de la réponse immunitaire. **(Figure 24)**

4.2.1 Les hépatocytes

Les hépatocytes expriment la majorité des PRR fonctionnels. Néanmoins, comme abordé ci-dessus, ils ne possèderaient pas d'inflammasome fonctionnel. Ces cellules peuvent néanmoins comme beaucoup d'autres types cellulaires, sécréter des cytokines et sont alors impliqués dans la réponse immunitaire précoce. Les hépatocytes sont également décrits pour être capables d'activer et d'induire la prolifération d'une sous-population de cellule T CD8+ naïves en absence de signaux cytokiniques exogènes. Ces lymphocytes T activées perdent leur activité cytolytique après 3 jours de culture, où elles meurent. Les hépatocytes sont donc impliqués dans la sécrétion de cytokines, l'initiation d'une réponse immunitaire innée, et peuvent activer des lymphocytes T (Bertolino et al., 1998)(Bertolino et al., 1998).

4.2.2 Les cellules étoilées

Les cellules étoilées sont les fibroblastes hépatiques, spécialisés dans le stockage et le métabolisme des lipides. Elles sont également la source de la matrice extracellulaire de

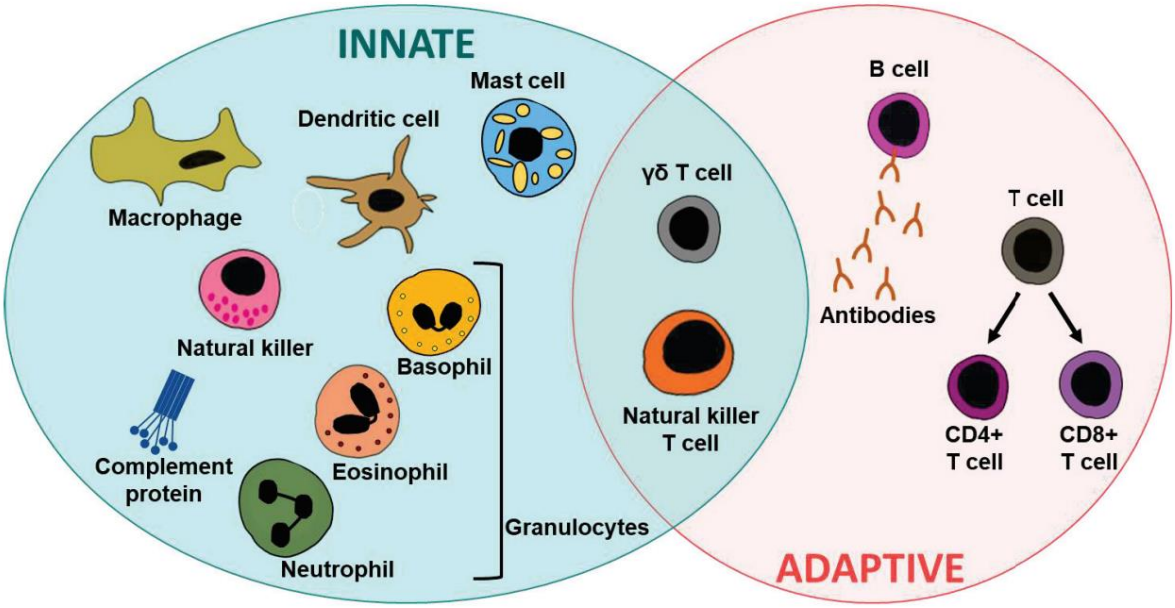


Figure 24 : Les cellules et les composants de l'immunité innée et adaptatrice

L'organisme humain comprend deux types d'immunité protégeant son intégrité immunologique. L'immunité adaptatrice est assurée par la plus grande quantité de cellules. Elle permet la mise en place d'une réponse peu spécifique chargé de l'élimination d'un large spectre de pathogènes. Parmi les cellules de l'immunité innée se trouve les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les cellules NK et les granulocytes, comprenant les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles. Le système immunitaire adaptatif va permettre la mise en place d'une réponse immunitaire très sensible et très efficace. Les cellules concernées sont les lymphocytes B, sécréteurs d'immunoglobulines, et les cellules T CD4+ ou CD8+. Les cellules NKT et γδT se trouvent à l'interface entre ces deux immunités.
D'après la thèse de Suzanne FAURE--DUPUY

l'espace de Disse, permettant la cohésion, la communication et la différenciation des différents types cellulaires présents dans le foie. Les cellules étoilées sont activées par l'inflammation et permettent alors la sécrétion de médiateurs nécessaires au retour à l'homéostasie hépatique. En revanche, l'inflammation chronique va entraîner la différenciation des cellules étoilées en myofibroblastes. Après leur activation par différentes cytokines pro-inflammatoires, elles prolifèrent et sécrètent un grand nombre de composants de la matrice extracellulaire créant alors un excès possible de tissu de cicatriciel. Cet excès de tissu cicatriciel produit durant les phases d'inflammation chronique participe à la définition des processus de fibroses hépatiques (Hsieh, 2015).

4.2.3 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont largement impliquées dans l'angiogenèse, la régénération hépatique, et par extention, dans la tumorigénèse hépatique et la néovascularisation tumorale. Elles ont également un rôle important dans la surveillance immunitaire hépatique du fait de leur capacité à réaliser une endocytose médiée par les récepteurs de type 'scavenger'. (DeLeve and Maretti-Mira, 2017)

4.2.4 Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie. Ce sont les premières cellules impliquées dans la défense contre les pathogènes, et son spécialisées dans leur reconnaissance. Les cellules de Kupffer représentent la plus grande population de macrophages du corps humain. Elles sont situées dans les sinusoïdes hépatiques, où elles peuvent alors phagocyter les débris cellulaires, les hépatocytes trop âgés ou les pathogènes. Ces processus de phagocytose des macrophages sont impliqués dans la présentation d'antigènes aux cellules T, permettant la création d'une réponse immunitaire spécifique.

Les macrophages montrent une durée de vie supérieure à un an, et ont la capacité de se renouveler d'eux-mêmes, avec néanmoins un faible taux de réplication.

Les cellules de Kupffer sont impliquées dans les processus de tolérance immunitaire hépatique. Effectivement, 80% du sang hépatique provient de la circulation entérique par la veine porte. Ce sang provient directement de l'intestin et est chargé en nutriments, mais aussi en pathogènes et débris qui doivent être éliminés. Cette exposition constante de l'organe

hépatique à ces pathogènes (cristaux, débris, virus, et surtout LPS, présent en quantités pondérale) devrait induire une inflammation constante dans le foie. C'est pourquoi on parle de tolérance immunitaire.

Les macrophages peuvent exprimer différents phénotypes allant du plus tolérant (M2) au plus actif (M1) contre les pathogènes. Il n'existe bien sûr pas uniquement ces deux phénotypes sous forme figée, mais plutôt un éventail de phénotypes inclus entre ces deux phénotypes descriptifs des populations les plus différenciées. Dans le foie, les cellules de Kupffer proches de la circulation entérique et donc constamment exposés aux pathogènes exprime plutôt un phénotype de macrophages M2, exprimant des molécules immunomodulatrices anti-inflammatoires. A l'inverse, les cellules de Kupffer plus proches de la circulation systémique vont exprimer un phénotype beaucoup plus inflammatoire en cas d'activation par un pathogène. En effet, la présence de pathogène dans cet environnement serait signe d'infection nécessitant une réponse immunitaire rapide.

Ces macrophages résidents du foie expriment pratiquement tous les PRR, menant, après activation à une sécrétion d'un large spectre de molécules pro- ou anti-inflammatoires impliquées dans la régulation de l'immunité du foie. Parmi les facteurs sécrétés, on pourra trouver les ROS, des cytokines (IL-6, IL-10, IL-12, TNFα…) et des chimiokines (CCL3, CCL5…).

Les cellules de Kupffer peuvent également exprimer des inflammasomes activables par des pathogènes, et fonctionnels, entraînant ainsi le clivage de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18 en IL-1β et en IL-18, ainsi que leur sécrétion. Toutes ces molécules de signalisation sont impliquées dans le recrutement, en partie, des monocytes du compartiment sanguin, permettant ainsi d'augmenter la population de macrophages et l'inflammation locale (Kubes and Mehal, 2012)

4.3 Orchestration de l'inflammation hépatique

L'inflammation dans le foie est déclenchée dans un premier temps par des cellules blessées, qu'elles soient infectées par des virus ou que leur mort soit induite par des composés chimiques tels que l'alcool ou les médicaments. Il s'agit bien souvent des hépatocytes, qui sont les cibles des virus hépatiques, ou les principaux acteurs de la détoxification sanguine prenant en charge le métabolisme des composés toxiques. Ces hépatocytes vont alors sécréter des alarmines et des cytokines, messagers de danger, impliqués dans l'activation des cellules immunitaires hépatiques : les cellules de Kupffer.

Les cellules de Kupffer vont alors produire des quantités beaucoup plus importantes de cytokines, permettant de recruter d'autres cellules immunitaires à partir du compartiment sanguin, et ainsi de créer un environnement très inflammatoire propice à l'inhibition de l'infection et à la réparation du tissu lésé. Les cellules de Kupffer vont aussi se déplacer au niveau du site lésé dans le parenchyme hépatique, afin de nettoyer les éventuels débris cellulaires par phagocytose. Ces cellules sont en effet impliquées dans la présentation d'antigène aux cellules T et dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. **(figure 25)**

4.3.1 Les cellules immunitaires sanguines

L'activation des cellules de Kupffer et la sécrétion massive de cytokines va entraîner le recrutement de cellules immunitaires sanguines impliquées dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Ce recrutement est permis notamment grâce à l'activation des cellules endothéliales par les cytokines. Les cellules endothéliales vont alors commencer à produire des récepteurs de type 'lectine', capables de recruter directement dans le compartiment sanguin, au moment de leur passage dans les sinusoïdes, les cellules immunitaires. Ces récepteurs sont nécessaires pour stopper les cellules, et induire leur extravasation par diapédèse jusqu'au site d'inflammation. **(figure 24)**

4.3.2 Les macrophages dérivés de la moelle osseuse

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont des macrophages dérivés des monocytes sanguins, d'origine donc myéloïde. Ces cellules voyagent dans le compartiment sanguin sous la forme de monocytes. Lors d'inflammation, ils sont recrutés sur le site lésé par chimiotactisme cytokinique et se différencient, une fois dans le tissu en macrophages. Ces cellules sont des phagocytes, spécialisés dans la phagocytose. Elles peuvent phagocyter les débris cellulaires tels que les corps apoptotiques, les corps nécrotiques, et les poussières dans le cas des poumons par exemple. Dans le foie, seules les bactéries provenant de la circulation entérale ou les débris de cellules apoptotiques ou nécrotiques seront principalement phagocytés. A l'image des cellules de Kupffer, les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont impliqués dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la phagocytose des débris, leur conférant également une activité de présentation d'antigène. Elles sont donc

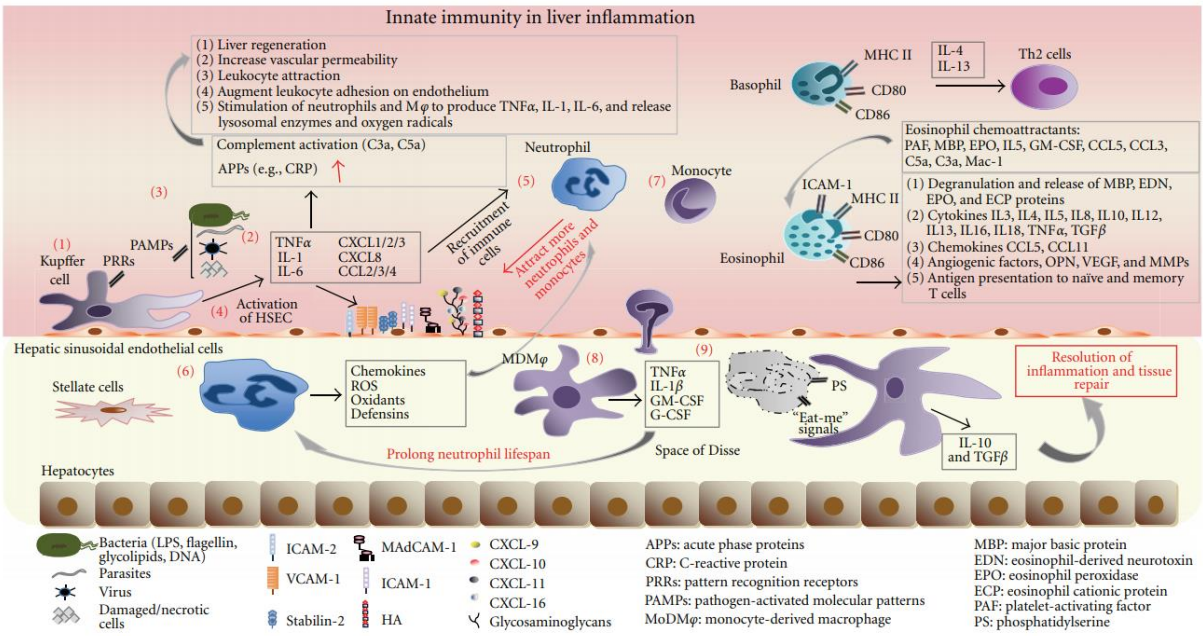


Figure 25: La réponse immunitaire hépatique

Durant une infection ou une lésion hépatique impliquant une cytolyse, les cellules de Kupffer (1) macrophages résidents, sont les premiers à être activés par les signaux de dangers ou molécules associées à des pathogènes (2). Elles vont produire des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFa, l'IL-1 et l'IL-6 et des chemokines comme CXCL1-3-8, CCL2-4 et 10 (3). Ces molécules initient l'inflammation et activent d'autres types cellulaires hépatiques comme les cellules sinusoïdales endothéliales, entrainant l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion nécessaires au recrutement des cellules immunitaires du compartiment sanguin comme les neutrophiles et les monocytes (5). Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées. Elles sont spécialisées dans la phagocytose et dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de molécules antimicrobiennes comme les ROS (6). Les monocytes se différencient dans le tissu en macrophages chargés de sécréter des cytokines qui maintiennent les neutrophiles en vie et et permettent l 'élimination correcte des pathogènes. Lorsque les neutrophiles entrent en apoptose, des signaux anti-inflammatoires nécessaires pour la résolution de l'inflammation sont induits (9).

Adapté de (Liaskou et al., 2012)(Liaskou et al., 2012)

également impliquées dans le développement d'une réponse adaptative via la stimulation des cellules T et la présentation d'antigène (Liaskou et al., 2013)(Liaskou et al., 2013).
Les macrophages dérivés de la moelle osseuse n'ont pas le même phénotype que les cellules de Kupffer. Ces dernières ont une tolérance élevée au LPS et sécrètent plutôt des interleukines anti-inflammatoires comme l'IL-10. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont moins tolérants et ont un phénotype pro-inflammatoire plus marqué que les cellules de Kupffer (Movita et al., 2015)(Movita et al., 2015).

4.3.3 Les polynucléaires neutrophiles

Les premières cellules qui vont être recrutées à la suite de l'activation des cellules de Kupffer vont être les lymphocytes polynucléaires neutrophiles. Ces cellules sont attirées par chimiotactisme grâce aux cytokines sécrétées par les cellules de Kupffer et autres cellules activées dans le foie. Leur passage dans le sang est bref : elles sont en effet rapidement recrutées dans les tissus où elles vont constituer les principales barrières anti-bactériennes. Ces cellules sont principalement impliquées dans des phénomènes de phagocytose de cellules infectées ou étrangères. Cette phagocytose est déclenchée par présentation d'un antigène (membrane bactérienne, antigène viral, ou tout autre corps reconnu comme étranger). Elles sont fréquemment retrouvées dans le foie dans les pathologies inflammatoire chroniques, mais leur processus de recrutement dans le foie, et leur activité dans cet organe n'est pas encore bien comprise (McDonald and Kubes, 2016).

4.3.4 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules expertes dans la présentation d'antigène. Elles capturent et régulent la présentation d'antigène, migrent dans les organes lymphoïdes et sécrètent des cytokines permettant l'initiation et la prolongation de l'inflammation, mais aussi l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Cependant, les cellules dendritiques hépatiques montre un phénotype tolérant (Weston et al., 2019), permettant l'induction de cellules T régulatrices et la délétion des cellules T activées, en vue de limiter la possibilité de réactions auto-immunes. Dans un modèle de souris, les cellules dendritiques sont également impliquées dans l'inhibition de la fibrose hépatique grâce à la sécrétion de l'enzyme MMP9

impliqué dans la digestion de la matrice surnuméraire produite par les cellules étoilées (Jiao et al., 2012).

4.3.5 Les cellules lymphocytaires T

A la différence d'autre organes, l'inflammation hépatique est souvent stérile (absence de pathogènes) sauf en cas en cas d'infection virale. Les principales cellules T retrouvées dans le foie lors d'épisodes inflammatoires sont les Th17, sécrétrices d'IL17, et les cellules NK (Hammerich et al., 2011)(Hammerich et al., 2011).

4.4 Les pathologies humaines

La plupart des maladies hépatiques citées dans la première partie de ce document sont associées à des processus inflammatoires, se déroulant à long terme du fait de la chronicité de la maladie.

Toutes ces pathologies, qu'elles soient virales ou non, induisent la perturbation du métabolisme des hépatocytes, leur apoptose et/ou leur nécrose, et l'activation des cellules de Kupffer, des cellules étoilées et des cellules endothéliales, puis le recrutement de cellules immunitaires du compartiment sanguin.

Les infections par les hépatites B, C ou les co-infections par les virus des hépatites B-D sont inductrices d'une réponse inflammatoire. Ces virus ne seraient pas cytolytiques ; ce n'est donc pas l'apoptose ou la nécrose des cellules qui semblerait impliquée dans l'initiation de l'inflammation. En revanche, les hépatocytes expriment les récepteurs de l'immunité innée capables de repérer certains motifs moléculaires des pathogènes qui les infectent, entraînant alors la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, une activité cytotoxique lymphocytaire et l'apparition d'antigènes intracellulaires dénaturés, oxydés, ou remaniés par d'autres évènements biochimiques, et donc potentiellement immunogènes.

4.5 L'inflammation hépatique chez la souris

La souris est un modèle animal fréquemment utilisé pour l'étude du système immunitaire. Néanmoins, il est bon de garder à l'esprit que l'homme et la souris ne présente pas le même profil immunitaire **(Figure 26)**(Rongvaux et al., 2013). Si les taux sanguins de cellules NK, de cellule dendritiques et de monocytes sont comparables, Les taux de granulocytes, de cellules

T et de cellules B sont complètement modifiés. Ces différences ne sont aujourd'hui encore pas expliquées. Le sang humain est enrichi en cellules myeloides (granulocytes et monocytes), alors que celui de la souris en plus riche en lymphocytes.

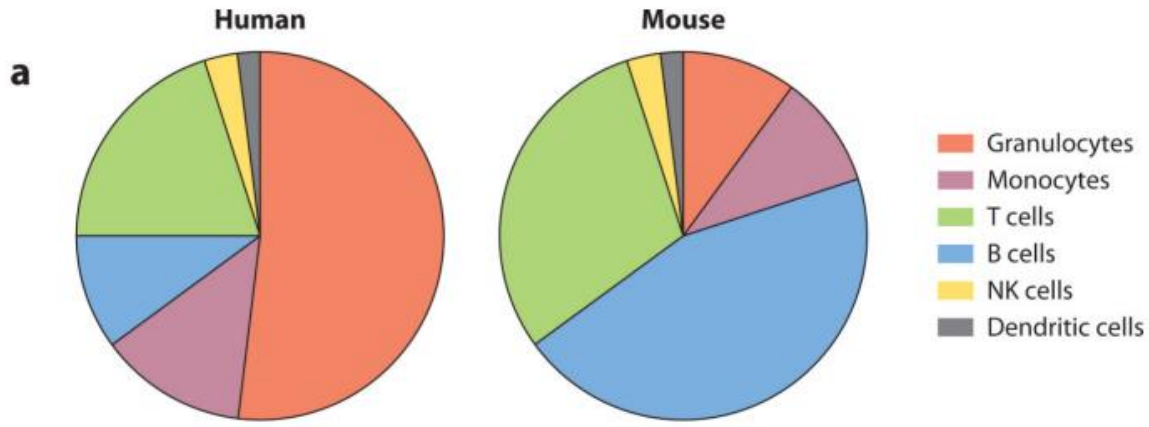


Figure 26: Différence immunitaire entre l'homme et la souris

Le sang humain est riche en cellules myeloïdes, telles que les granulocytes et les monocytes, alors que le sang de souris est enrichi en lymphocytes (B et T). Cette différences n'est aujourd'hui pas encore expliquée.

Adapté de (Rongvaux et al., 2013)(Rongvaux et al., 2013)

Ces profils indiquent tout de même que l'homme, du fait d'une présence de cellule myeloides inflammatoire plus importante que chez la souris, serait potentiellement soumis à des réponses inflammatoires plus rapide, ou plus vive que la souris. En effet chez l'homme, on recense de nombreuse pathologies provoquées par l'inflammation chronique. La souris, qui montre un enrichissement sanguin en lymphocytes par rapport à l'homme semble montrer une immunité orientée vers l'adaptatif, et des réponses inflammatoires moins riches que chez l'homme. C'est aussi le cas dans les pathologies hépatiques. Alors que l'inflammation chez l'homme est responsable de l'aggravation de la maladie jusqu'à l'hépatocarcinome en poussant le remodelage du tissu hépatique, il semble que chez la souris, l'inflammation n'ait pas le même rôle. L'IL6 est une cytokines inflammatoire exprimée chez la souris comme chez l'homme dans l'inflammation hépatique. La survenue d'hépatocarcinome chez la souris n'est provoquée que par la présence de cette cytokine. De plus, ces hépatocarcinomes ne se développent pas sur fond de fibrose ou de cirrhose. (Naugler et al., 2007)

On notera également que les facteurs impliqués dans la régulation de l'immunité chez l'homme et chez la souris sont sensiblement les même et présentent un degré d'homologie relativement élevé, nous permettant ainsi de pouvoir effectuer des hypothèse plus aisé en étudiant ce modèle.

Au niveau hépatique, des cellules de Kupffer ayant les mêmes propriétés que les cellules de Kupffer humaines sont présentes. Ces macrophages sont donc impliqués dans l'immunité locale et le recrutement des cellules immunitaire en cas de réactions inflammatoires hépatiques. Les cellules de Kupffer ont été décrite comme nécessaire pour l'activation des cellules T recrutées dans le foie, comme chez l'homme. (Schümann et al., 2000)

4.6 Les modèles d'étude

4.6.1 In vitro

Différents analogues des ligands de récepteurs de l'immunité innée sont disponibles afin d'induire de l'inflammation *in vitro* ou *in vivo*.

Le poly(I:C) est un analogue d'ARN double brin conçu pour induire l'inflammation. Il n'existe pas, dans les cellules eukaryotes, d'ARN double brin capables d'induire une réponse inflammatoire. En revanche, les intermédiaires de réplication du virus de l'hépatite C se

présentent sous la forme d'ARN double brin. Ces intermédiaires de réplication peuvent d'ailleurs se lier, en plus de RIG-I par exemple au niveau cytosolique, à certains récepteurs de l'immunité innée comme TLR3, spécialisé dans la reconnaissance des ARN doubles brins dans les compartiments endosomaux. (Li et al., 2012)

4.6.2 In vivo

Afin d'étudier la régulation de la nétrine causée par l'inflammation in vivo, des souris ont subi des injections intra-péritonéales de poly(I:C). Comme dans des modèles cellulaires humain, le poly(I:C) va induire chez la souris une réaction immunitaire inflammatoire. (McCartney et al., 2009)

5 Netrin-1, UPR et inflammation

Les infections virales hépatiques sont inductrices d'inflammation et de stress du réticulum endoplasmique. L'inflammation est, elle aussi, capable d'induire un stress du réticulum endoplasmique du fait d'une forte demande en traduction de protéine, et la réponse UPR engagée pour rétablir l'homéostasie du réticulum endoplasmique est impliquée elle aussi dans l 'induction d'une réponse inflammatoire.

Les infections virales hépatiques, lorsqu'elles sont chroniques, sont également impliquées dans la carcinogénèse du tissu. L'inflammation chronique engendrée par ces infections est également largement impliquée dans la carcinogénèse, notamment par la synthèse d'IL-6 (et d'autres), interleukines impliquées dans la transformation tumorale des cellules hépatiques (Naugler et al., 2007)(Naugler et al., 2007).

Dans ce contexte pathologique, deux études réalisées par le passé dans le groupe du Dr. Romain PARENT montrent que :

- Les patients infectés par les virus de l'hépatite B ou C expriment des taux de nétrine-1 plus élevés. Ces taux de nétrine-1 sont corrélés positivement au stade de fibrose hépatique (Plissonnier et al., 2017)(Plissonnier et al., 2017).
- Durant la réponse UPR, les taux de traduction de la nétrine-1 sont maintenus à un niveau élevé et protègent les cellules de l'apoptose physiologiquement induite par l'UPR (Lahlali et al., 2016)(Lahlali et al., 2016).

Les infections virales et le stress du réticulum endoplasmique sont impliqués dans la régulation positive de la nétrine-1, mise ne évidence comme protectrice contre l'apoptose **(figure 27)**

La nétrine-1 est impliquée dans la résolution de l'inflammation et la régénération hépatique (Mirakaj and Rosenberger, 2017; Schlegel et al., 2016)(Mirakaj and Rosenberger, 2017; Schlegel et al., 2016).

En effet les réponses inflammatoires semblent plus courtes en présence de nétrine-1 dans le foie. Pour autant, la nétrine-1 semble avoir des rôles qui diffèrent en fonction des organes et des pathologies étudiées. Elle peut être pro- ou anti-inflammatoire.

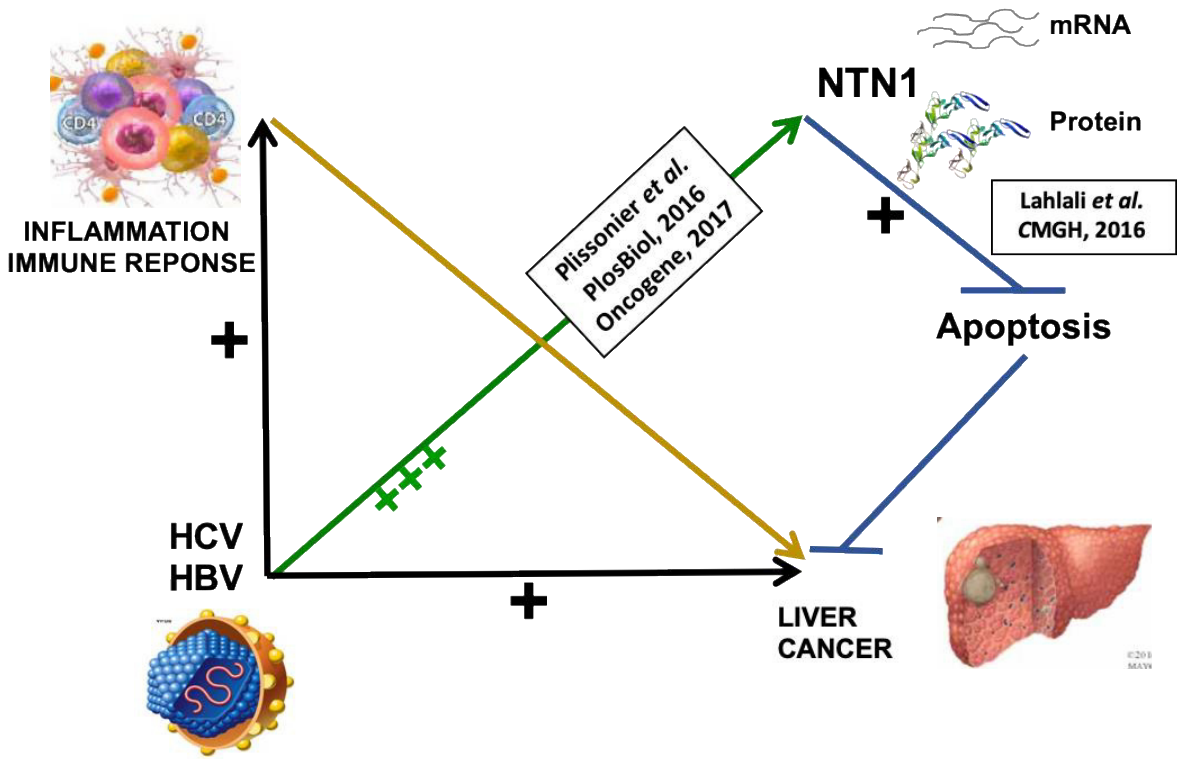


Figure 27: Inflammation, nétrine-1 et hépatocarcinogénèse

L'infection du foie par les virus des hépatites B ou C, des virus carcinogènes, entraîne une réponse immunitaire inflammatoire chronique impliquée dans la carcinogénèse hépatique (notamment par l'IL-6). Ces infections augmentent également les taux de nétrine-1, inhibitrice de l'apoptose induite par l'UPR dans les hépatocytes. Cette propriété fait de la nétrine-1 une molécule potentiellement carcinogène dans le foie, mais son rôle causal reste à démontrer.

6 Objectifs

Cette introduction détaille trois processus cellulaires, impliqués à la fois dans les pathologies hépatiques, mais aussi dans d'autres pathologies plus générales comme les cancers. Les hépatocarcinomes sont décrits pour être associés à ces trois phénomènes biologiques :

- Une inflammation exacerbée provoquée par la cytolyse hépatocytaire, ou par la détection de motifs issus de virus hépatotropes dans les cellules ;
- Un stress du réticulum endoplasmique moteur de l'induction d'une réponse UPR ;
- Une surexpression de nétrine-1, facteur impliqué dans la survie cellulaire et dont l'expression est maintenue dans un micro-environnement contenant plusieurs facteurs de stress tels que les virus, les signaux de dangers issus de la cytolyse, et les cytokines pro-inflammatoires.

Tous ces facteurs, présents dans un même tissu au même moment peuvent être impliqués dans le maintien de la tumeur initiée par ces mêmes mécanismes plus tôt dans la physiopathologie de l'organe.

Cette thèse a pour but d'étudier les relations fonctionnelles existant entre le couple nétrine-UNC5 et l'UPR ainsi que l'inflammation, en tant que deux processus communs à de nombreuses maladies chroniques du foie prédisposant aux hépatocarcinomes (et les accompagnant).

Il a été démontré plus tôt que la nétrine-1 est une protéine dont la traduction est maintenue lors du stress du réticulum endoplasmique et de la réponse UPR. Le maintien à un niveau élevé de ces taux de nétrine-1, durant la réponse UPR en tant que stress pouvant être cytotoxique, protège les hépatocytes de cette cytotoxicité. Ainsi, la nétrine-1 pourrait acquérir dans ce contexte un pouvoir carcinogène, en entraînant la survie de cellules potentiellement altérées et devant mourir par apoptose, elle-même initiée par la réponse UPR. Nous avons vu plus tôt que les cellules pouvaient, via différent mécanismes, profiter de la signalisation induite par ces récepteurs à dépendance pour se protéger de l'apoptose. Le premier mécanisme est la surexpression du ligand permettant ainsi d'inhiber la signalisation pro-apoptotique des

récepteurs (dans notre cas UNC5, DCC n'étant pas exprimé dans l'hépatocyte) potentiellement non liés au ligand. Les deux autres mécanismes mettent en jeux les récepteurs, directement ou indirectement. Ces récepteurs peuvent être directement inhibés, ou bien les protéines de signalisation en aval de ces récepteurs peuvent être modulées fonctionnellement afin d'altérer les voies de signalisation aboutissant à l'apoptose.

Le premier projet de cette thèse vise à démontrer par quel récepteur à dépendance passe la signalisation de l'inhibition de l'apoptose lors d'un stress du réticulum endoplasmique dans des hépatocytes. UNC5A est régulé négativement, évènement supposé protecteur de l'induction d'apoptose dans un contexte ou la nétrine-1 est fortement exprimée. Les différentes étapes de la régulation de l'expression du récepteur ont alors été étudiées dans un contexte de stress du réticulum endoplasmique.

Dans une deuxième partie, c'est l'inflammation et la nétrine-1 qui vont être étudiées. En effet, comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent, nétrine-1 et inflammation ont été décrits pour réguler l'un et l'autre, de façon positive ou négative en fonction de l'organe et du contexte pathologique dans lequel elles sont considérées. Afin de mieux comprendre quelles sont les voies de régulation mises en jeu entre ces deux phénomènes biologiques, tous les deux impliqués dans la carcinogénèse, nous avons étudié la régulation de la nétrine-1 dans un contexte inflammatoire. Autrement dit, nous avons souhaité formuler la question suivante : Comment l'inflammation hépatique est-elle responsable de l'augmentation et du maintien des taux de nétrine-1 élevés dans le foie ? **(Figure 28)**

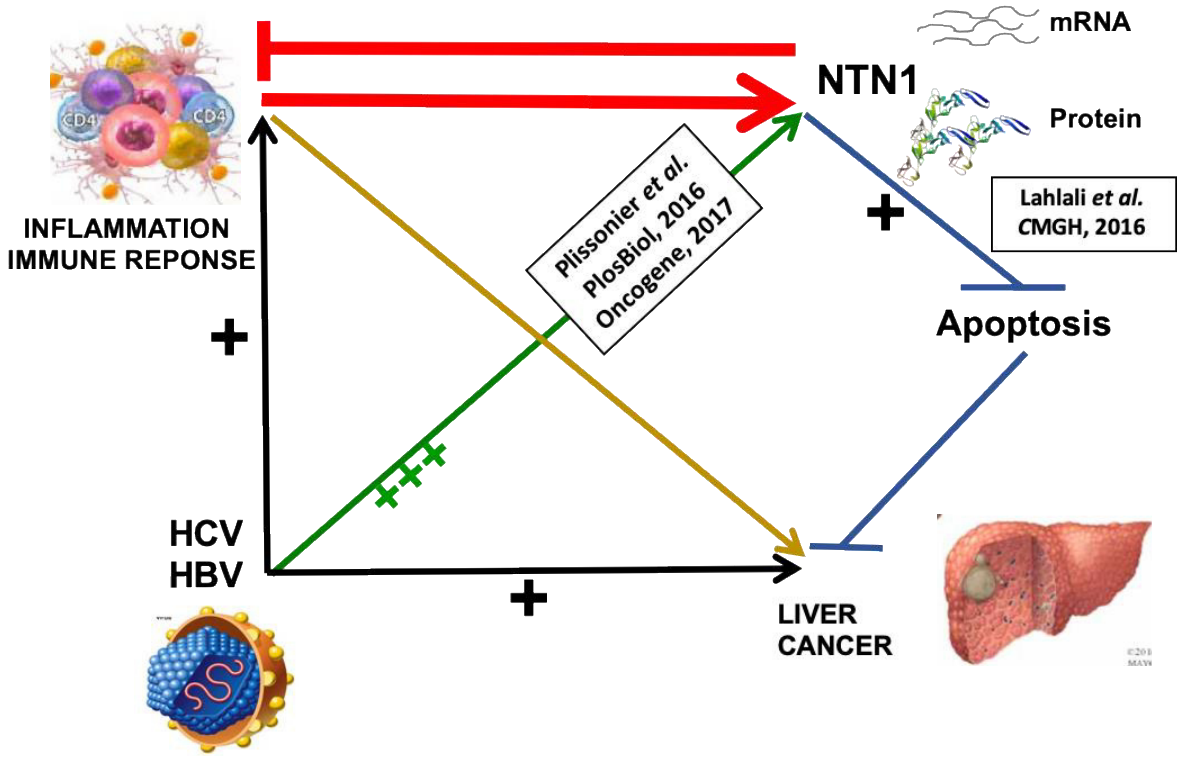


Figure 28: Inflammation, nétrine-1 et hépatocarcinogénèse

Les travaux de cette thèse vise à montrer dans un premier temps quel est le récepteur impliqué dans la signalisation anti-apoptotique de la nétrine-1 dans un contexte de stress du réticulum endoplasmique. Le deuxième projet vise à montrer comment l'inflammation, elle-même impliquée dans la carcinogénèse, peut également réguler la nétrine-1, également impliquée dans la carcinogénèse.

7 Projet 1 : UNC5A et UPR

Hepatocellular carcinoma-associated depletion of the netrin-1 receptor Uncoordinated Phenotype-5A (UNC5A) skews the hepatic unfolded protein response towards prosurvival outcomes.

Barnault R[1], Lahlali T[1], Plissonnier ML[1], Romero-López C[2], Laverdure N[1], Ducarouge B[6], Rivoire M[3], Mehlen P[1], Zoulim F[4], Parent R[1].

[1] - INSERM U1052 & CNRS UMR5286, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France; University of Lyon, Lyon, France; DevWeCan Laboratories of Excellence Network (Labex), Lyon, France. Electronic address: romain.barnault@inserm.fr.

[2] - Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra IPBLN-CSIC, CSIC, Granada, Spain. Electronic address: cristina_romero@ibp.csic.es.

[3] - INSERM U1052 & CNRS UMR5286, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France; University of Lyon, Lyon, France. Electronic address: michel.rivoire@lyon.unicancer.fr.

[4] - INSERM U1052 & CNRS UMR5286, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France; University of Lyon, Lyon, France; DevWeCan Laboratories of Excellence Network (Labex), Lyon, France; Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. Electronic address: fabien.zoulim@inserm.fr.

Publié en 2018 dans la revue scientifique BBRC

Biochemical and Biophysical Research Communications 495 (2018) 2425–2431

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Hepatocellular carcinoma-associated depletion of the netrin-1 receptor Uncoordinated Phenotype-5A (UNC5A) skews the hepatic unfolded protein response towards prosurvival outcomes

Romain Barnault [a, b, c], Thomas Lahlali [a, b, c], Marie-Laure Plissonnier [a, b, c], Cristina Romero-López [d], Noémie Laverdure [a, b, c], Benjamin Ducarouge [a, b, c], Michel Rivoire [a, b], Patrick Mehlen [a, b, c], Fabien Zoulim [a, b, c, e], Romain Parent [a, b, c, *]

[a] INSERM U1052 & CNRS UMR5286, Cancer Research Centre of Lyon, Lyon, France
[b] University of Lyon, Lyon, France
[c] DevWeCan Laboratories of Excellence Network (Labex), Lyon, France
[d] Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra IPBLN-CSIC, CSIC, Granada, Spain
[e] Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 December 2017
Accepted 22 December 2017
Available online 24 December 2017

Keywords:
UNC5A
Translation
Cell death
Liver
Hepatocellular carcinoma

ABSTRACT

In the liver, HBV and HCV infections, exposure to toxics, genetic and metabolic disorders may induce endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolding protein response (UPR). The UPR allows cells to reach ER homeostasis after lumen overload, but also fosters survival of damaged cells and therefore HCC onset. Dependence receptors such as UNC5A trigger apoptosis when unbound to their ligands. We have previously shown that the main dependence receptor ligand, netrin-1, could protect cells against UPR-induced apoptosis through sustained translation. In this study, we show that UNC5A is cumulatively downregulated by the UPR at the transcriptional level *in vitro* and at the translational level both *in vitro* and *in vivo*. We have found that the 5′-untranslated region of the *UNC5A* mRNA shares a certain homology degree with that of netrin-1, suggesting linked translational regulatory mechanisms, at least during the initial stages of the UPR. RNAi and forced expression studies identified UNC5A as a modulator of cell death in the context of the UPR. *UNC5A* decrease of association with polysomes and expression oriented cells towards UPR-associated hepatocytic survival. Such data indicate that cooperation between the UPR and UNC5A depletion as previously observed by ourselves in HCC patients samples may foster liver cancer development and growth.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

All cells face stresses that may disturb their homeostasis. In the liver, the common hallmark induced by viral infection, metabolism disorders, or exposure to toxins is endoplasmic reticulum (ER) stress [1]. Such pathogenic conditions may be associated with increased protein biosynthesis, which may in turn lead to the accumulation of misfolded material in the ER. This accumulation fosters protein misfolding, disturbing ER homeostasis and traffic towards the Golgi apparatus along the hepatocytic canonical secretion route [2]. However, cells may also experience a wide range of this so-called UPR state in terms of intensity and reversibility and may successfully restore their homeostasis should the process has not reached a point of no return, where cell death would remain the only outcome [3]. In the endoplasmic reticulum, three sensors (IRE1α, PERK and ATF6) are activated upon ER stress in order to return to homeostasis [4]. Such three sensors are distinctly involved in the UPR process. The first one leads to cap-dependent translation arrest, via the activation of the PERK kinase [5]. This phosphorylation enhances the translation of ATF4 and

* Corresponding author. Cancer Research Centre of Lyon, Inserm U1052 - CNRS UMR 5286, 151 Cours Albert Thomas, F-69424 Lyon, Cedex 03, France.
E-mail addresses: romain.barnault@inserm.fr (R. Barnault), thomas.lahlali@inserm.fr (T. Lahlali), marie-laure.plissonnier@inserm.fr (M.-L. Plissonnier), cristina_romero@ibp.csic.es (C. Romero-López), noemie.laverdure@chu-lyon.fr (N. Laverdure), benjamin.ducarouge@lyon.unicancer.fr (B. Ducarouge), michel.rivoire@lyon.unicancer.fr (M. Rivoire), patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr (P. Mehlen), fabien.zoulim@inserm.fr (F. Zoulim), romain.parent@inserm.fr (R. Parent).

https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.129
0006-291X/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Romain BARNAULT

Abbreviations

ATF4v1	Activated Transcription Factor 4 variant 1
ATF6	Activated Transcription Factor 6
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein Homologous Protein
CIP2A	Cancerous Inhibitor of PP2A
DAPK1	Death-Associated Protein Kinase 1
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DR	Dependence Receptor
DRB	5,6-Dichloro-1-β-D-Ribofuranosylbenzimidazole
DTT	Dithiothreitol
eIF2α	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2α
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
FLuc	Firefly Luciferase
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
HBV	Hepatitis B Virus
IRE1α	Inositol-Requiring Enzyme 1α
IRES	Internal Ribosome Entry Site
NRAGE	Neurotrophin Receptor-mediated melanoma Antigen
NTN1/*NTN1*	Netrin-1 gene/*transcript*
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PERK	Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PHH	Primary Human Hepatocytes
PI	Propidium Iodide
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PR65β	Serine/threonine-protein phosphatase 2A
Tu	Tunicamycin
UNC5A	Uncoordinated Phenotype-5A
UTR	Untranslated Region
SL	Stem-Loop
VR1	Vanilloid Receptor 1
XBP1	X-box Binding Protein 1

CHOP, both responsible for chaperone genes transcription and apoptosis regulation, as the second pathway. The third pathway involves *XBP1* splicing when the IRE1α sensor is activated. Spliced *XBP1* is an ATF6-like transcription factor, allowing the transcription of chaperones and other genes involved in the endoplasmic reticulum-associated degradation. While the UPR may help cells cope with transient alterations in a healthy context, recurrent genetic and epigenetic injuries of the hepatocytic compartment associated with chronic liver disease may become positively selected for remanence in a diseased liver. Such ambivalent outcomes of the UPR may ultimately account for liver cancer onset.

Netrin-1 is a laminin-related secreted protein of 67 kDa acting as a ligand for the so-called dependence receptors (DRs). DRs are family of receptors, including the UNC5 family and others, which, upon dissociation from their ligands, dimerize and signal via different adaptor proteins including PR65β and CIP2A, ultimately leading to caspase-3 dependent apoptosis [6]. In this context, we recently demonstrated that netrin-1 translation is UPR insensitive, and that such constant translation of netrin-1 protects hepatocytes against apoptosis [7]. Of note, netrin-1 overexpression corresponds to UNC5A receptor functional inactivation, a concept that illustrates this receptor's decreased expression according to the DRs theory [8]. Moreover, we have previously shown that UNC5A underwent collapse from cirrhosis to HCC in chronic liver disease patients prompting research aiming at deciphering the cause of such decrease [9]. For this, experimentally-induced UPR using *bona fide* untransformed hepatocyte-like HepaRG cells whose relevance has been recognized in cell biology studies [10], primary human hepatocytes (PHH), and wild-type C57BL6 mice was implemented.

In this study, we show that the UPR-induced translational repression of UNC5A protects hepatocytic cells against apoptosis, with potential consequences in liver carcinogenesis.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and in vitro treatments

HepaRG cells [10] were seeded at a density of 4×10^4 cells/cm^2. PHH were harvested from patients liver resection after collagenase digestion and seeded at a density of 2×10^5 cells/cm^2 [11]. Cells were plated in collagen-coated plates and were grown in William's E medium containing insulin 5 μg/mL (Sigma-Aldrich), penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 μg/mL (Life Technologies), and 5% (PHH) or 10% (HepaRG cells) fetal bovine serum (Hyclone) and hydrocortisone hemisuccinate (50 μM, Pharmacia Upjohn). 2% DMSO (Sigma-Aldrich) were added for PHH. ER stress was induced by DTT 1.25 mM (Sigma-Aldrich). Puromycin (10 μg/mL, Life Technologies)was used for 40 min to assess translation inhibition. Transcription arrest was induced by DRB (25 μg/mL) or actinomycin D (5 μg/mL, Sigma-Aldrich).

2.2. RT-PCR and RT-qPCR

Total RNA was extracted with Extract-all reagent (Eurobio). One μg of RNA was treated with DNase I (Promega), and then reverse transcribed with 5% DMSO, using MMLV (Life Technologies). qRT-PCR was performed on a LightCycler96 device (Roche) with Fast-Sybr mix (Applied Biosystems). Unspliced and spliced forms of *XBP1* were studied using the GoTaq DNA Polymerase (Promega). *XBP1* amplicons were loaded on 10% polyacrylamide gels for isoforms separation. PCR primers and conditions are listed in Supplementary Table 1 (human targets) and Supplementary Table 2 (mouse targets).

2.3. RNAi and plasmid transfection

HepaRG cells were transfected with 25 nmol/L final concentration of a non targeting control small interfering RNA (siRNA) or UNC5A siRNA (designed by Sigma-Aldrich). Sequences of siRNAs are listed in Supplementary Table 3. HepaRG cells were transfected with UNC5A promoter (−1158; −1), UNC5A, or neuronal vanilloid receptor 1 (VR1) plasmids as described [9] or UNC5A 5′Untranslated region (UTR) (180 base pair long)-Luc-bearing pGL3 constructs [9]. Lipofectamine 2000 (Life Technologies) was used.

2.4. Isolation of polysomal RNAs

Cycloheximide (100 μg/mL, Sigma-Aldrich) was added to medium for 5 min before harvest. Medium was then removed and cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 100 μg/mL cycloheximide (Sigma). The cells were scraped, centrifuged (800 × g, 5 min, 4 °C). Lysis of cell pellets in 1 mL of polysome buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5% Nonidet P-40, and a ribonuclease inhibitor,

Romain BARNAULT

RNasin (500 units/ml; Promega) was done. After removal of nuclei, cytosolic supernatants were supplemented with 100 μg/mL cycloheximide, 20 mM dithiothreitol, and 1× protease inhibitor cocktail (Roche). Mitochondria and membrane debris were removed by centrifugation (14,000 × g, 5 min, 4 °C). Postmitochondrial supernatants were overlaid onto 15–40% sucrose gradients and spun (38,000 rpm, 2 h, 4 °C) in a SW41Ti rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Polysomal fractions were identified using a gradient fractionator (Brandel). Fractions (750 μl for HepaRG and PHH, 1 mL for mice livers) were deproteinated (100 μg proteinase K, 1% SDS, 10 mM EDTA, 30min, 37 °C). Messenger RNAs distribution was determined by qRT-PCR using an equal volume of mRNA from each fraction.

2.5. Immunoblotting

Immunoblotting was performed using standard SDS-PAGE protocols with antibodies against the HA-tag, β-actin (Sigma-Aldrich), and puromycin (Merck Millipore) produced in mouse. Specifications are listed in Supplementary Table 4.

2.6. Caspase-3 activity assay

Caspase-3 activity assays were performed using the caspase 3/CPP32 Colorimetric Assay Kit, according to the manufacturer's instructions (Gentaur Biovision, Kampenhout, Belgium).

2.7. Propidium iodide incorporation assay

HepaRG cells were detached with Versene buffer (Life Technologies), washed twice in PBS, and centrifuged (1200 rpm, 5 min). Cells then were stained in a mix containing 1 mg/mL RNase-A (Invitrogen) and 100 mg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich) for 5 min at room temperature, washed in PBS, resuspended in PBS supplemented with 10 mmol/L EDTA, and analyzed using a FACscalibur device (BD, Franklin Lakes, NJ).

2.8. Mice studies

All trials were performed under IRB agreement #CECCAP_CLB_2014_015. Six weeks years old C57BL6 mice (Charles River Laboratory) were treated intraperitoneally with 1 mg/kg tunicamycin (Tu) (Sigma-Aldrich) or PBS for 24 h and killed prior to liver harvest. Samples used are identical to those used in a previous study dealing with the role of netrin-1 in UPR outcomes [7].

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using the Mann-Whitney or Wilcoxon tests with GraphPad Prism software 7.0. Significance was as follows: $^{*}P < .05$, $^{**}P < .01$, $^{***}P < .001$.

3. Results

The UPR is functional in HepaRG cells and PHH.

The assessment of the adequacy of a given cellular environment for UPR studies may be done through consideration of several markers [12,13]. Regulation of UPR markers upon experimental induction have been extensively studied by our group in the same hepatocytic system [7]. As a brief confirmation, such markers were studied after 12 and 24 h of DTT treatment. *GADD34*, *XBP1*, *P58IPK*, *CHOP* and *GRP94* transcripts were found increased at various levels, ranging from 1.8- to more than 50-fold in HepaRG cells or PHH. In average, HepaRG cells were found less sensitive to DTT than PHH (Fig. 1A and B). Consideration of *XBP1* splicing levels confirmed such data (Fig. 1 C,E). To estimate cap-dependent translation attenuation at such time points, cells were treated with puromycin for 40 min immediately after DTT. *De novo* translation detected by immunoblotting with an anti-puromycin antibody was on the contrary more impacted in HepaRG cells than in PHH (Fig. 1 D,F), a result probably linked to the quiescent state of PHH. Taken together, such data indicate that both cell environments are relevant for UPR studies.

3.1. The UPR down-regulates UNC5A at the transcriptional level

We first sought to evaluate the consequence of the hepatocytic UPR on *UNC5A* expression. While *netrin-1* mRNA remains stable upon the UPR [7], *UNC5A* mRNA levels decreased by almost 90% in HepaRG cells and 70% in PHH after 24 h of UPR induction (Fig. 2A and B). Messenger RNA amounts are regulated either at the transcript stability/splicing and/or the transcription regulation levels. To address this question, stability was first studied in HepaRG cells using actinomycin D or DRB treatment as transcription inhibitors in a time course experiment, which led to negative data (Supplementary Fig. 1). In order to ascertain that the UPR-induced decrease in *UNC5A* expression was transcriptionally regulated, a previously developed *UNC5A* promoter activity reporter plasmid [9] was used. In this setting a drop of 80% in *UNC5A* promoter-dependent luciferase activity was observed (Fig. 2C).

3.2. UNC5A translation is downregulated during the UPR

The UPR shuts-off global cap-dependent translation in the cell, namely via the phosphorylation of eIF2α [14]. Since netrin-1 and UNC5A are functionally associated as ligand and receptor, they may be encoded by transcripts sharing a certain degree of homology at both sequence and structural level (Supplementary Fig. 2A–C), as postulated by the RNA operon theory [15]. We hence analyzed the translational behaviour of the *UNC5A* transcript under UPR conditions through polyribosomal fractionation, enabling quantification of the association of *UNC5A* mRNA with polysomes after 24 h of DTT treatment of HepaRG cells and PHH (Fig. 3). Polyribosomal dissociation occurred in response to DTT in both cell environments (Fig. 3 A,B,F,G). The cap-translated *GUS* transcript, a housekeeping transcript in chronic liver disease [16], was used as a control. By RT-qPCR, *GUS* mRNA association levels to polysomes decreased from 63% of association to 51% (HepaRG, Fig. 3C) and from 45% to 7% of association (PHH, Fig. 3H) after DTT treatment. In contrast to *netrin-1* mRNA [7], *UNC5A* mRNA association to polysomes sharply decreased from 46% to 31% (HepaRG, Fig. 3D) and from 66% to 9% (PHH, Fig. 3I) after DTT treatment. Pooled data are shown in Fig. 3E (HepaRG) and 3J (PHH). We then sought to provide evidence for this phenotype at the protein level. We have failed to identify or even develop RNAi-validated specific antibodies to the human UNC5A protein, yet previously demonstrated that translational inhibition of UNC5A correlated with a decrease in protein signals upon HA-tagging of the UNC5A sequence after infection of liver cells with HCV, a UPR-inducing virus [9]. In order to find additional clues about translational regulation mediated by the 5′UTR of the *UNC5A* mRNA, its secondary structure was predicted by using the RNAStructure software [17]. The theoretical model yielded a highly compact folding mediated by numerous G-C pairs (Supplementary Fig. 2A), indicating low flexibility of the structure. The 5′UTR is organized around a four-way junction, which operates as anchoring site for the emergence of four well-defined stem-loops (SLs) or domains, named SL1 to SL4. This folding resembled to that adopted by the 5′UTR of *netrin-1* mRNA [7] (Supplementary Fig. 2B), as confirmed by local alignment performed with the LocaRNA software [18] (Supplementary Fig. 2C). This evidence suggests common

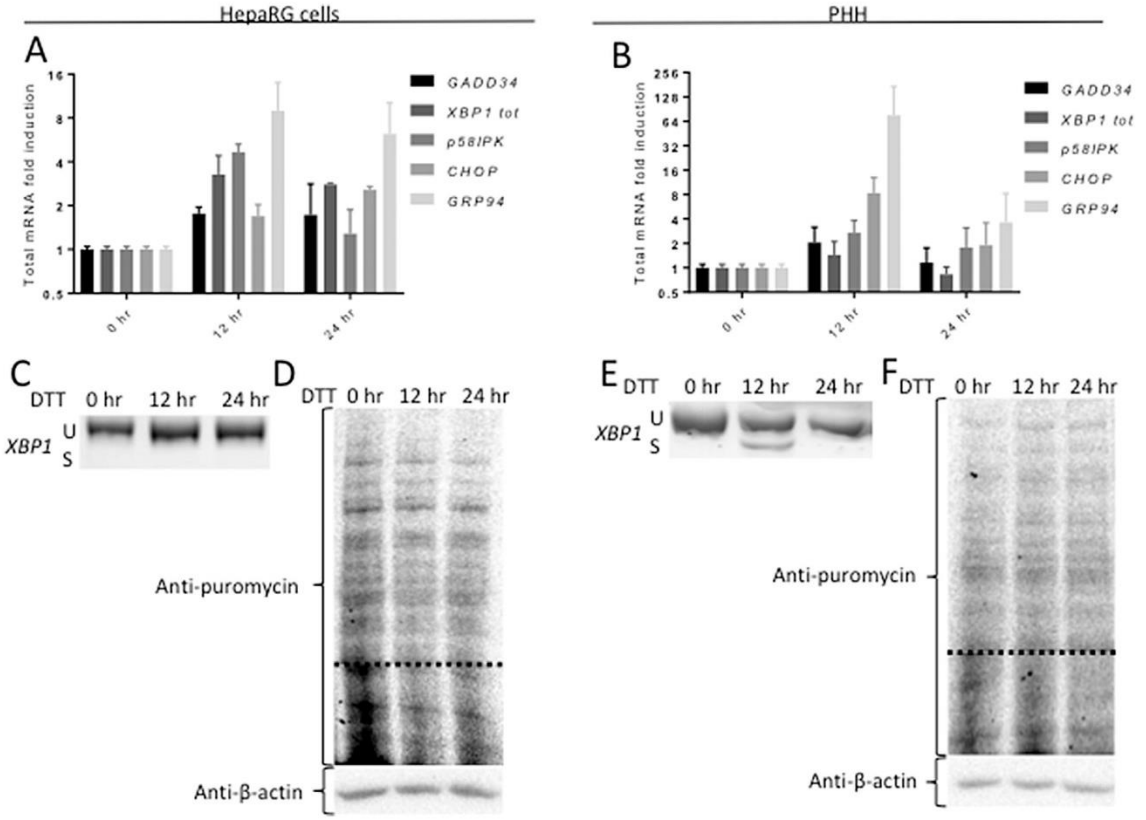


Fig. 1. The UPR is induced upon DTT treatment in HepaRG cells and PHH.
After DTT treatment for 12 and 24 h of HepaRG cells (**A,C,D**) or PHH (**B,E,F**), total RNAs were extracted and qRT-PCR or RT-PCR were performed. (**A,B**) Quantification of *GADD34*, *CHOP* and *GRP94* mRNAs (dependent on the PERK pathway), total *XBP1* mRNA (dependent on the ATF6 pathway), *p58IPK* mRNA (dependent of the IRE1α pathway) (mean + SD, n = 3). (**C-E**) RT-PCR for detection of *uXBP1* (unspliced isoform) or *sXBP1* (spliced isoform) on polyacrylamide gel (Representative result, n = 3). (**D,F**) Cells treated with DTT for 12 and 24 h were then treated with puromycin for 40min. Extracted proteins were separated by 10% SDS-PAGE before immunoblotting.

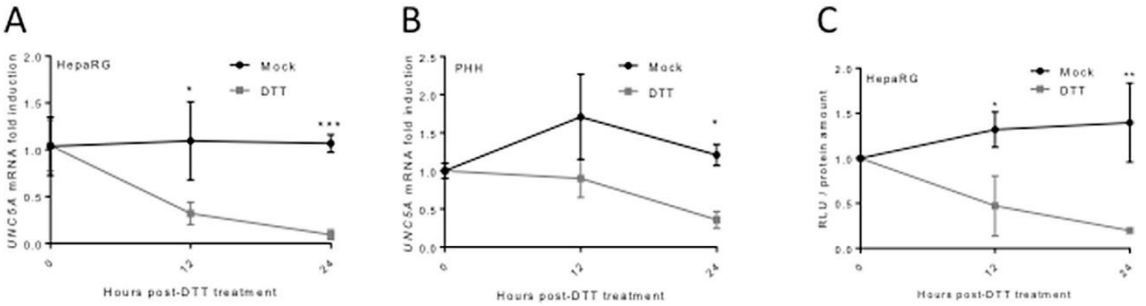


Fig. 2. *UNC5A* mRNA is transcriptionally downregulated upon the UPR in HepaRG cells and PHH.
HepaRG cells (**A**) and PHH (**B**) were treated with DTT for 12 and 24 h, *UNC5A* mRNA expression was then studied by RT-qPCR (mean + SD, n = 3). (**C**) HepaRG cells were transfected with an *UNC5A* promoter activity reporter plasmid. Two days after transfection, cells were treated with DTT for 12 and 24 h. FLuc activity was then measured and normalized with protein amounts (n = 3).

translational regulatory mechanisms for both transcripts, at least under non-UPR conditions. Transfection of plasmids enabling *UNC5A* 5′UTR translation-dependent luciferase activity quantification and bearing sequential deletions of SL1 to SL4 of this UTR showed that SL3 and 4 act as negative regulators of translation. This repression was however not dependent on the UPR intensity

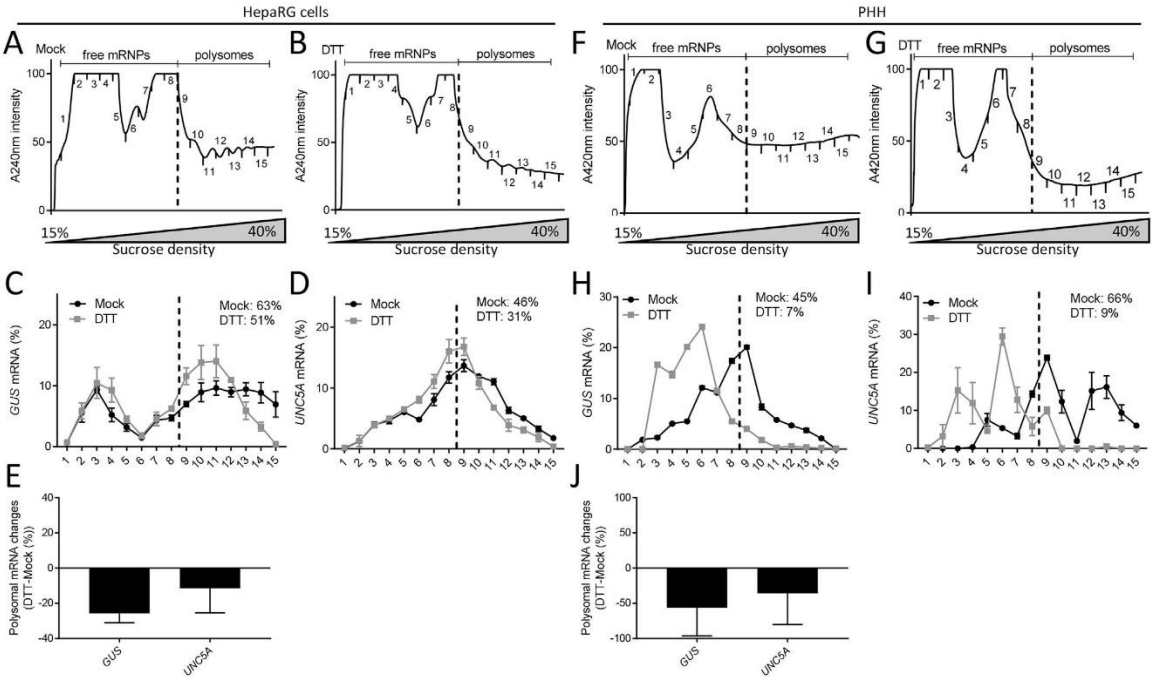


Fig. 3. *UNC5A* association with polyribosomes is downregulated during the UPR in HepaRG cells and PHH.
HepaRG cells (**A-E**) and PHH (**F-J**) were treated with DTT for 24 h. Cell lysates were subjected to polysomes fractionation followed by qRT-PCR for quantification of *GUS* and *UNC5A* mRNAs. Graph shows RNA absorbance after gradient fractionation (**A,B,F,G**). Bar graphs depict *GUS* (**C,H**) and *UNC5A* (**D,I**) mRNA quantification. (HepaRG: mean + SD, representative result, n = 5. PHH: mean + SD, representative result, n = 3). (**E,J**) The evolution of the association of the indicated mRNAs with polysomes upon DTT treatment was determined as a percentage difference of the polysomes-associated signals in DTT vs mock samples for each profile (HepaRG: mean + SD, n = 5. PHH: mean + SD, n = 3).

(Supplementary Fig. 2D). Taken together, these data suggest that despite shared similarities with *netrin-1*'s 5′UTR primary and secondary structures, the negative translation regulation of the *UNC5A* transcript during the UPR is probably conditioned by the implication of SL3 and 4.

3.3. UNC5A downregulation protect cells against UPR-induced apoptosis

We have previously shown that netrin-1 protects cells against UPR-induced cell death through an unaffected or even a positive regulation of its translation upon the UPR [7]. As found herein, and in accordance with the DR theory [8], its receptor undergoes an opposite regulation, suggesting that both netrin-1 and its receptor UNC5A cooperate in UPR-triggered escape from apoptosis.

To document the functional advantage of this repression for cells, the implication of UNC5A in UPR-induced cell death has been studied by RNAi and forced expression approaches prior to DTT treatment (Fig. 4). Caspase-3 activity assays (indicating the extent of apoptosis commitment) and PI staining (extent and frequency of disrupted membranes) were carried out. In conditions where UNC5A is overexpressed (Fig. 4A), caspase-3 activity increases after 12 and 24 h of DTT treatment (Fig. 4B), as did the amount of cells with disrupted membranes stained by PI (Fig. 4C and D). These data suggest a role for UNC5A in apoptosis outcomes during the hepatocytic UPR. As expected, upon RNAi depletion of *UNC5A* (Fig. 4E), both apoptosis markers reverted, although to distinct levels (Fig. 4 F-H). Altogether, such data suggest that (i) UNC5A is implicated in apoptosis in the UPR context, and that (ii) as a consequence, UNC5A's transcriptional and translational inhibitions cumulatively protect cells against this process.

3.4. UNC5A is translationally downregulated during the UPR in mouse livers

The liver is composed of several types of non hepatocytic cells known to play a key-role in liver pathogenesis [19]. To test if our *in vitro* results obtained on HepaRG and PHH could be verified *in vivo*, we treated C57BL6 wild-type mice with PBS or Tu for 24 h using a previous reported strategy [20]. Samples used in this study were identical to previously published ones by our group, with full documentation of UPR induction [7]. In a confirmatory experiment, CHOP upregulation validated UPR activation, while, interestingly from a translational control prospective, total levels of *UNC5A* were not significantly affected (Supplementary Fig. 3A and B). To further investigate whether UNC5A was regulated *in vivo*, polysomal fractionation was performed in mock and Tu-treated mice (gradient traces shown in Supplementary Fig. 3C and D). *UNC5A* partitioning to the polysomes decreased upon DTT treatment as was the case for the cap-dependent *GUS* transcript (representative polysomal profile shown in Supplementary Fig. 3E–F). Pooled data obtained from all treated mice confirmed inhibition of UNC5A translation by 11%, although two outlying results out of six mice were observed (Supplementary Fig. 3G). Such data suggest that UNC5A regulation during the UPR occurs mainly at the post-transcriptional level in the hepatic parenchyma, in accordance with the profound impact of the UPR on the translation machinery.

In summary, our results indicate that the UNC5A DR is likely to

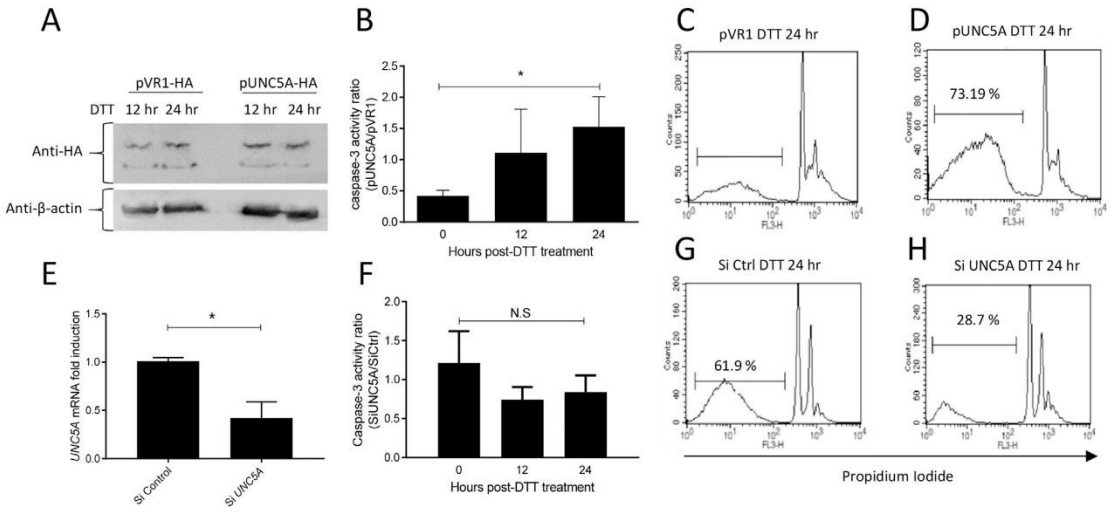


Fig. 4. UNC5A inhibition protects cells against UPR-induced cell death.
Cells were transfected with plasmids encoding VR1-HA, UNC5A-HA, or non-targeting or *UNC5A* siRNAs. Overexpression was assessed by western blot using anti-HA immunostaining for plasmid-transfected samples (**A**, representative of n = 3 independent experiments) or qRT-PCR for siRNA-transfected samples (**E**, mean + SD, n = 3). At 48 h post-transfection, cells were treated with DTT before assessing caspase-3 activity (**B,F**, mean + SD, n = 3) and apoptosis *per se* by PI staining (**C,D,G,H**, representative result of n = 3 independent experiments).

be mainly downregulated at the level of translation during the liver UPR. Importantly, this inhibition may endow cells with increased resistance against UPR-induced apoptosis in the diseased liver.

4. Discussion

Ovarian, breast, uterus, colorectal, stomach, lung or kidney tumors show a downregulation of UNC5A, UNC5B and UNC5C receptors [21]. We have shown that UNC5A was also strongly downregulated in HCC [9], indicating a potential implication in liver cancer onset or growth. HCC most often arises from cirrhosis, a strongly UPR-associated condition. In the context of cirrhosis induced by chronic conditions of the liver, all known to behave as strong UPR triggering agents [1], *netrin-1* is overexpressed [22] while *UNC5A* is downregulated [9]. Moreover, we have previously shown that netrin-1 translational up-regulation protects cells from UPR-induced cell death [7]. UNC5A downregulation documented herein during the UPR is equivalent to (and hence further functionally amplify) the latter data. The cumulative effects of these two mechanisms resulting in massive functional elevation of netrin-1 signals may change cell fate during chronic UPR. In the liver, under these conditions, cells kept alive still divide to maintain the minimal necessary pool of functional cells for ensuring vital hepatic functions. Such process impairs curbing of DNA and/or epigenetic damages during cell division, occurring at higher rates in cirrhosis, itself considered as the gateway for HCC development.

Based on previous experimental data [7] and bioinformatics in this work, we have shown that *UNC5A* and *netrin-1* 5′UTR were likely similarly folded. The *UNC5A* 5′UTR seems to be derived from its *netrin-1* counterpart since it appears as a deleted version of the former. The IRES activity of the *netrin-1* transcript [7] could rely on those specific additional elements, while their absence in the *UNC5A* transcript may in contrast lead to UNC5A's translational inhibition upon the UPR. SL3 and 4 could be implicated in the recruitment of IRES-transacting factors that downregulates *UNC5A* translation upon UPR, while *netrin-1*'s 5′UTR may recruit different translation activator via its IRES structure.

Last, p53, a UNC5 dependence receptor family inducer [23], is mutated in 50% of HCCs [24]. This may indicate that collapse in genome integrity and resistance to UPR-related cell death are functionally coupled prior to HCC onset and may involve the UNC5A DR. Such cells that escape DNA repair mechanisms and maintained alive through UNC5A downregulation and sustained expression of netrin-1 in end stage liver disease may be stronger HCC initiators, which is always UPR-dependent [1]. Overall, such data may argue for the development of combinatorial anti-HCC strategies, aiming at modulating the UPR [2] and reactivating UNC5-mediated cell death. The latter was recently made possible in other cancer settings by a high affinity, humanized, anti-netrin-1 therapeutic immunoglobulin [25].

Conflicts of interest

None.

Acknowledgements

We thank A. Paradisi (Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France) for the gift of the UNC5A promoter plasmid. Work was supported by the DevWeCan Labex consortium (Grant #ANR-LABX-061 to PM, FZ and RP) and by the ANRS (Grant #ECTZ37193 to PM and RP). RB is the recipient of a DevWeCan Labex predoctoral fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.129.

References

[1] H. Malhi, R.J. Kaufman, Endoplasmic reticulum stress in liver disease, J. Hepatol. 54 (2011) 795–809.
[2] F.L. Wu, W.Y. Liu, S. Van Poucke, M. Braddock, W.M. Jin, J. Xiao, X.K. Li, M.H. Zheng, Targeting endoplasmic reticulum stress in liver disease, Expet Rev. Gastroenterol. Hepatol. 10 (2016) 1041–1052.
[3] R. Iurlaro, C. Munoz-Pinedo, Cell death induced by endoplasmic reticulum stress, FEBS J. 283 (2016) 2640–2652.
[4] A.E. Frakes, A. Dillin, The UPR(ER): sensor and coordinator of organismal homeostasis, Mol. Cell 66 (2017) 761–771.
[5] N. Sonenberg, A.G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets, Cell 136 (2009) 731–745.
[6] C. Guenebeaud, D. Goldschneider, M. Castets, C. Guix, G. Chazot, C. Delloye-Bourgeois, A. Eisenberg-Lerner, G. Shohat, M. Zhang, V. Laudet, A. Kimchi, A. Bernet, P. Mehlen, The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase, Mol. Cell 40 (2010) 863–876.
[7] T. Lahlali, M.L. Plissonnier, C. Romero-Lopez, M. Michelet, B. Ducarouge, A. Berzal-Herranz, F. Zoulim, P. Mehlen, R. Parent, Netrin-1 protects hepatocytes against cell death through sustained translation during the unfolded protein response, Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol. 2 (2016) 281–301 e289.
[8] P. Mehlen, C. Delloye-Bourgeois, A. Chedotal, Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? Nat. Rev. Cancer 11 (2011) 188–197.
[9] M.L. Plissonnier, T. Lahlali, M. Raab, M. Michelet, C. Romero-Lopez, M. Rivoire, K. Strebhardt, D. Durantel, M. Levrero, P. Mehlen, F. Zoulim, R. Parent, Reciprocal antagonism between the netrin-1 receptor uncoordinated-phenotype-5A (UNC5A) and the hepatitis C virus, Oncogene 36 (2017) 6712–6724.
[10] R. Parent, M.J. Marion, L. Furio, C. Trepo, M.A. Petit, Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line, Gastroenterology 126 (2004) 1147–1156.
[11] P. Gripon, C. Diot, N. Theze, I. Fourel, O. Loreal, C. Brechot, C. Guguen-Guillouzo, Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide, J. Virol. 62 (1988) 4136–4143.
[12] E. Szegezdi, S.E. Logue, A.M. Gorman, A. Samali, Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, EMBO Rep. 7 (2006) 880–885.
[13] D. Ron, Translational control in the endoplasmic reticulum stress response, J. Clin. Invest. 110 (2002) 1383–1388.
[14] R.C. Wek, D.R. Cavener, Translational control and the unfolded protein response, Antioxidants Redox Signal. 9 (2007) 2357–2371.
[15] J.D. Keene, S.A. Tenenbaum, Eukaryotic mRNPs may represent post-transcriptional operons, Mol. Cell. 9 (2002) 1161–1167.
[16] T. Romanowski, K. Sikorska, K.P. Bielawski, GUS and PMM1 as suitable reference genes for gene expression analysis in the liver tissue of patients with chronic hepatitis, Med. Sci. Mon. 14 (2008) BR147–152.
[17] J.S. Reuter, D.H. Mathews, RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis, BMC Bioinf. 11 (2010) 129.
[18] S. Will, T. Joshi, I.L. Hofacker, P.F. Stadler, R. Backofen, LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs, RNA 18 (2012) 900–914.
[19] U.E. Lee, S.L. Friedman, Mechanisms of hepatic fibrogenesis, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 25 (2011) 195–206.
[20] K. Yamamoto, K. Takahara, S. Oyadomari, T. Okada, T. Sato, A. Harada, K. Mori, Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress, Mol. Biol. Cell 21 (2010) 2975–2986.
[21] K. Thiebault, L. Mazelin, L. Pays, F. Llambi, M.O. Joly, J.Y. Scoazec, J.C. Saurin, G. Romeo, P. Mehlen, The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment, Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 100 (2003) 4173–4178.
[22] M.L. Plissonnier, T. Lahlali, M. Michelet, F. Lebosse, J. Cottarel, M. Beer, G. Neveu, D. Durantel, B. Bartosch, R. Accardi, S. Clement, A. Paradisi, M. Devouassoux-Shisheboran, S. Einav, P. Mehlen, F. Zoulim, R. Parent, Epidermal growth factor receptor-dependent mutual amplification between Netrin-1 and the hepatitis C virus, PLoS Biol. 14 (2016) e1002421.
[23] Y. Miyamoto, M. Futamura, N. Kitamura, Y. Nakamura, H. Baba, H. Arakawa, Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis, Int. J. Oncol. 36 (2010) 1253–1260.
[24] The Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma, Cell 169 (2017) 1327–1341 e1323.
[25] M. Grandin, M. Meier, J.G. Delcros, D. Nikodemus, R. Reuten, T.R. Patel, D. Goldschneider, G. Orriss, N. Krahn, A. Boussouar, R. Abes, Y. Dean, D. Neves, A. Bernet, S. Depil, F. Schneiders, K. Poole, R. Dante, M. Koch, P. Mehlen, J. Stetefeld, Structural decoding of the netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers, Cancer Cell 29 (2016) 173–185.

8 Projet 2 : Inflammation hépatique et nétrine-1

Hepatic inflammation upregulates netrin-1 through alteration of transcript topology and translational activation

Romain Barnault1, Maud Michelet1, Anna Rita Redavid2, Federica Grazia Centonze3, Hesso Farhan3, Benjamin Gibert2, Patrick Mehlen2, Fabien Zoulim1,4, Romain Parent1*

1 Pathogenesis of Chronic Hepatitis B and C - LabEx DEVweCAN, INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69003 Lyon, France, Université de Lyon, F-69003 Lyon, Université Lyon 1, ISPB, Lyon, F-69622, France, CNRS UMR5286, F-69083 Lyon, France, Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France

2 Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - LabEx DEVweCAN, INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69003 Lyon, France, Université de Lyon, F-69003 Lyon, Université Lyon 1, ISPB, Lyon, F-69622, France, CNRS UMR5286, F-69083 Lyon, France, Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France

3 Institute of Basic Medical Science, University of Oslo, N-0372, Olso, Norway

4 Hospices Civils de Lyon, Service d'Hépatogastroentérologie, F-69001 Lyon, France

* Corresponding author

Abstract

Links between hepatic inflammation and HCC are likely incompletely defined. Netrin-1 is a developmental neurogenic factor reactivated upon general carcinogenesis and bearing pro-tumorigenic properties. Converging data indirectly suggest its detrimental implication in end stage liver pathology, including HCC. In the present study, using patient samples, mouse samples as well as in vitro cell biology and mechanistic approaches, we show that netrin-1 mRNA (*NTN1*) levels positively correlated with activity scores of human livers biopsies (up to +6-fold in A2 vs A0 samples, p=0.02, n=162). Netrin-1 was found in vitro-inducible by a panel of TLR2 to 6 agonists, a dataset strengthening the pathophysiological relevance of this in vitro phenotype. Using poly(I:C) as a TLR3 agonist, experimentally-induced inflammation in mice upregulated netrin-1, through the implication of parenchymal cells. Surprisingly, neither total mRNA levels (RT-qPCR), nor transcriptional levels (plasmid reporter assays, pre-mRNA RT-qPCR) nor splicing (mRNA over pre-mRNA ratios calculations), nor mRNA stability were found implicated. In contrast, robust transfer of *NTN1* to the ER (+7-fold, $p<0.05$, as observed by sequential fractionation) and its translational activation could be evidenced (+40%, $p<0.05$, by polysomal fractionation as well as polysomal run-off on HepaRG cells and PHH, respectively). This dataset suggested phenotypical convergence for netrin-1 induction through distinct regulatory scenarios depending on the cellular context (HepaRG or PHH). Secretory levels of the hepatocyte-like cells were left unchanged (AAT-GFP RUSH assay). Such data identify the less frequently addressed polysomal activation and mRNA topological regulation processes as sufficient events allowing netrin-1 induction. They also further document the pathogenic consequences of inflammation in the liver, in the present case through the implication of netrin-1.

Introduction

Chronic liver disease (CLD) are the main etiological conditions for liver injury, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) onset [1]. CLD exhibit a high degree of heterogeneity in terms of causes, ranging from infectious, to metabolic, to toxic and also, yet more rarely, genetic. CLD are however all characterized by the general implication of inflammation, determining hepatocytic turnover, extracellular matrix accumulation, histological worsening and the long-term induction of carcinogenic mediators acting in combination with precited factors for the eventual onset of HCC [2]. The fact that inflammation displays apparently contradictory functions in terms of benefits (viral clearance, histological wound healing) versus risks (e.g. fibrogenesis, including cirrhosis and oncogenesis) ratios for the hepatic tissue represents an important obstacle for a more complete understanding of its outcomes, eventually leading to potential clinical improvements. In such a context, identifying as inflammation-related some factors that are known to play a role in other conditions, either inside or outside the liver is of interest for an improved understanding of the impact of inflammation on the disease, including its HCC endpoint.

Netrin-1 is a developmentally regulated and secreted factor of neural origin [3, 4] whose expression has been shown to be reactivated in several illnesses in adulthood, including several types of carcinomas [5-8], where it opposes apoptosis through its so-called ‘dependence receptor’ status [6, 7, 9-14], and protects tumors against chemotherapy-induced cell death [14]. Netrin-1 has been much less often considered in the liver. We have recently in-depth documented its pathogenic implication as a hepatitis B and C virus (HBV, HCV)-induced protein [15, 16]. We have demonstrated that it also endowed hepatocytes with anti-apoptotic resistance during experimental unfolding protein response (UPR) [17], as a hallmark of CLD and cirrhosis, being its associated and near-mandatory gateway to HCC.
A body of conflicting data argue either for the exacerbating [18] or dampening [19-21] implication of netrin-1 in several distinct chronic inflammation settings, some of them being cancer predisposing. Moreover, netrin-1 has been shown to participate in the resolution of acute hepatic inflammatory episodes in mice, where it also fosters

regeneration [22]. These studies hence suggest that a potentially direct regulation of netrin-1 by hepatic inflammation per se can be hypothesized.

In this context, this study was aimed at testing the inflammation-related inducibility of netrin-1 in vitro and in vivo in the hepatic field, as well as, correlatively, in patients livers, in order to explore its associated mechanistics.

Material and methods

Clinical biopsies samples

Clinical liver biopsies samples were used under the French IRB 'CPP South-East IV' approval #A16/207 (2016) related to the Inserm unit 1052 Hepatology biobank, France (#DC2008-235). Written informed consent was obtained from each patient and conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Biopsies characteristics are shown in **Supplementary Table 1.** All activity scores were determined by an experienced pathologist from the Lyon University Hospital.

Animal housing, treatment and sample harvest

All trials were performed under IRB agreement #CECCAP_CLB_2014_015. Eight weeks old C57BL6 mice (Charles River Laboratory) were injected intraperitoneally with 1 mg/kg of poly(I:C) (Invivogen, Toulouse, France) or PBS for 16hrs and sacrificed prior to liver harvest. Due to liver zonation considerations [23], all analyses were performed after selection on ice of the same hepatic lobe across all animals. Hepatic lobes samples were immediately snap frozen in liquid nitrogen and subsequently thawed on ice prior to homogenization using a Dounce apparatus previously refrigerated, followed by addition of RIPA (see composition below) or polysome buffer (protein or polysome-related studies, see below) or Trizol (total RNA-related studies, Invitrogen).

ALT activity dosage

Mouse plasma samples (0.5ml) obtained upon sacrifice were obtained after centrifugation (2,000g, 10 min) and further processed using the ALT activity assay with colorimetric read-out (Sigma), following instructions.

Immunohistochemistry

For histological examination, tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Thick tissue sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue were prepared according to conventional procedures. Immunohistochemistry was performed on an automated immunostainer (Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France) using the Discovery-HRP kit according to the manufacturer's

instructions. Sections were incubated with an anti-netrin-1 antibody (1/500; see **Suppl. Table 2**). Staining was visualized with with 3,3′-diaminobenzidine as a chromogenic substrate. Finally, the sections were counterstained with Gill's hematoxylin.

Cell culture, siRNA and plasmid transfection

Cells were grown in a 5% CO_2 humidified atmosphere at 37°C. All reagents pertaining to HepaRG cells culture were purchased from ThermoFischer Scientific (Les Ulis, France) unless otherwise indicated. HepaRG cells were seeded at a density of $4.10^4/cm^2$ in William's E medium containing insulin 5mg/mL, penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 mg/mL, and 10% fetal bovine serum (Hyclone, Illkirch, France). The medium was supplemented with hydrocortisone hemisuccinate at a concentration of 5.10^{-5}mol/L (Pharmacia Upjohn, Guyancourt, France). Medium was renewed twice a week. Plasmids were transfected using the Mirus LT1 reagent (Mirus-Bio, Euromedex, Souffelweyersheim, France), following the manufacturer's procedures at a concentration of 10nM and 1μg/ml, respectively. All transfections were performed in suspension before distribution in wells and poly(I:C) treatment in order to prevent transfection yield variability.

Primary human hepatocytes (PHHs) were isolated from surgical liver resections, after informed consent of patients (IRB agreements #DC-2008-99 and DC-2008-101) as previously described [24] and cultured in complete William's medium supplemented with 1.8% DMSO (Sigma, St Quentin, France). All PHH-related data were obtained from at least three distinct patients. Cells were treated with Pam3-CSk4, LPS, FLA, FSL, riboxol, and LMW or HMW poly(I:C) (Invivogen, Toulouse, France) three to four days after seeding (i.e after having reached confluency) for the indicated time points and/or concentrations.

Cell viability assays

The Neutral Red (NR) assay was conducted as described by Repetto [25]. Briefly, the NR stock solution (40 mg NR dye in 10 mL PBS) was diluted in culture medium to a final concentration of 4 mg/mL and then centrifuged at 600 g for 10 min to remove any precipitated dye crystals. Cells were then incubated with 100 µL of NR medium for 1 hr. NR medium was removed and the cells washed with PBS. Plates were incubated for 10 min under shaking with 150 µL/well of NR destain solution (50% ethanol 96%,

49% deionized water, 1% glacial acetic acid). The MTS assay was conducted following the manufacturer's guidelines, carrying out a 2hr incorporation of the dye. OD was measured at 540 (NR) or 570 (MTS) nm in a microplate spectrophotometer.

Western blotting

Immunoblotting was performed using 40 to 80µg of RIPA (50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1x Protease inhibitor cocktail (Roche), 50mM Orthovanadate, 10mM NaF)-processed cell lysates, then resolved on 8% or 10% SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), blocked using 10% low fat dried milk in PBS for 1 hr at RT and probed overnight at 4°C with corresponding antibodies listed in **Suppl. Table 2**. After three washes in PBS-Tween 0.1%, membranes were incubated for 1hr at room temperature with secondary antibodies coupled to HRP (1/5,000, Sigma-Aldrich, St-Quentin, France) prior to chemiluminescence-based revelation using the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, Versailles, France). The western blot specificity of the netrin-1 antibody has been extensively in-house verified prior to all experiments shown (**Suppl. Figure 1**).

Total RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). One µg of RNA was DNAse I-digested (Promega, Charbonnières, France) and then reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (ThermoFischer) according to the manufacturer's instructions. Pre-mRNA-targeting qPCR data were tested for absence of DNA-based qPCR signal upon heat inactivation of MMLV. Quantitative real-time PCR was performed on 1/10th diluted samples on a LightCycler 96 device (Roche, Meylan, France) using the low Rox qPCR mix (Bioline, Paris, France). PCR primers sequences (5′-3′) and qPCR conditions are listed in the ad hoc section. Specificity of all primers was assessed by melting curve analyses and agarose gel electrophoresis.

Sequential extraction

This protocol has been implemented following guidelines by Stephens et al. [26, 27]. Briefly, aspiration of media and washing of cells (100mm Petri dishes) with 5–10 mL ice-cold PBS to remove any excess culture media was first done. Then gentle coating

of the flask with 1 mL permeabilization buffer and slow rocking in a 4°C cold room or on ice for 5 min was performed. At this point, loss of plasma membrane and soluble cytosolic contents could be visualized by using phase contrast microscopy (**Suppl. Figure 2**). Third, the flask was put upright and the buffer allowed to drain for 1 min. Transfer of the soluble material (cytosol) to a 1.5-mL microcentrifuge tube on ice was then done, prior to gentle wash of the flask with 5 mL of wash buffer prior to discarding the buffer. Coating of the flask with 1 mL of lysis buffer and rocking on ice for 5 min was then performed. At this point, only nuclei and insoluble cytoskeletal components remain attached to the culture flask, which could be again visualized using routine phase contrast microscopy (**Suppl. Figure 2**). Again, the flask was put upright and the buffer allowed to drain for 1 min. The resulting soluble (membrane-bound) material was transferred to a 1.5-mL microcentrifuge tube. Finally, soluble lysates were clarified at 7,500*g* for 10 min at 4°C and the supernatants transferred to new tubes.

Polysomes isolation / run off and profiling

For polysome fractionation, cycloheximide (Sigma, 100µg/ml) and/or harringtonine (2µg/mL; Interchim, Montluçon, France) was added to the medium for 5 and/or 15 minutes, respectively, prior to harvest. The medium was then removed and the cells washed with ice-cold PBS containing 100µg/ml cycloheximide. The cells were then scraped, centrifuged at 800g for 5 minutes at 4°C and cytoplasmic RNA was obtained by lysis (20 strokes of a p200 pipet) of the cell pellet in 1 ml of polysome buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 0.5% Nonidet P-40, and 40mM vanadyl ribonucleosides complexes (VRC, Sigma) 100 µg/ml cycloheximide, 20 mM dithiothreitol, and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. Mitochondria and membrane debris were removed by centrifugation. The post-mitochondrial supernatants were overlaid onto a 15-40% sucrose gradient and spun at 38,000rpm for 2hrs at 4°C in a SW41Ti rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Fractions were collected from the top of each gradient using a 240 nm UV reader-coupled fraction collector (Brandel, Glasgow, UK). Free mRNPs, monosomes and polysomes were located through the interpretation of UV gradient traces.

RUSH assay

HepaRG cells transfected with a GFP-tagged alpha1-antitrypsin (AAT) RUSH reporter were treated or not with poly(I:C). After 72 hrs, cells were treated with 40µM biotin and then fixed with 3% paraformaldehyde at different time points. After immunofluorescence staining, images were acquired on a LeicaSP5 confocal laser scanning microscope using the 63× oil objective at two-fold magnification.

Results

In order to provide a clinical basis for subsequent in vitro and in vivo investigations with respect to the interplay between netrin-1 and inflammation in the liver, we first considered a potential association between the netrin-1 transcript (*NTN1*) and clinical activity scores in a previously published cohort [16] of 162 human liver biopsies. Due to limited access to this material, all etiologies were first merged to reach statistical relevance after stratification.

A 4-fold increase in *NTN1* levels could be observed in A1 activity score biopsies as compared to A0 biopsies, although not conclusive statistically. A further and, this time significant, increase (6-fold versus A0 samples) was observed in A2 biopsies ($p<0.05$; **Figure 1).** Although dealing with activity scores, such data suggest that *NTN1* levels may correlate with inflammation in patients livers, and represent an incentive to causally investigate the interplay between both factors using in vitro and in vivo approaches.

We then sought to assay inflammation-related netrin-1 induction in the liver in vivo. To this aim, C57BL6 mice were challenged with poly(I:C), their liver harvested, and total RNA extraction processed for RT-qPCR on inflammation-related transcripts. Corresponding canonical markers of inflammation activation (*CXCL10*, *IL1B*, *IL6*, *KC* (ortholog of h*IL8*), and *MIP2* (ortholog of h*IL8*)) were monitored, both in male and female mice, all showing proper induction (**Suppl. Figure 3**). We then analyzed netrin-1 induction in this context. As was the case in hepatocytic cells in vitro, *NTN1* induction was found marginal if any (+1.25-fold across all individuals) when evaluated within total RNA populations. At the protein level, a dot blot approach (performed after antibody validation yielding a single-banded, RNAi-sensitive, netrin-1-specific signal by western blot, see **Suppl. Figure 1**) evidenced netrin-1 induction at the protein levels, albeit to different extents with respect to animal gender (+1.5-fold in males; +2.2-fold in females; **Figure 2a,b**). Interestingly, the overall inducibility of canonical inflammation markers was also higher in females. Also, such data suggest a substantial degree of correlation between inflammation intensity and netrin-1 induction, at least in the acute inflammatory context.

In order to identify the cells implicated in netrin-1 induction, we performed intrahepatic IHC on netrin-1 on these mouse samples. In these conditions, netrin-1 staining yielded

a homogenous and likely ubiquitous expression pattern, similar to previous data obtained in human livers upon HCV infection [16]. While unequivocal identification of the cell type(s) that produce netrin-1 remains to be obtained by IHC, a substantial level of certainty for netrin-1 staining in the hepatocytic compartment, which makes up 80% of the liver mass and areas, could be evidenced (**Figure 2c**).

We therefore considered, that while concomitant netrin-1 induction in nonparenchymal cells may not be ruled out, it was pertinent to embark into in vitro studies related to the dissection of the process leading to netrin-1 induction in human parenchymal cells such as HepaRG cells and PHH. We first investigated the potential impact of experimentally induced inflammation, using a panel of TLR ligands (Pam3-CSK4 as a TLR1/2 agonist, lipopolysaccharide (LPS) as a TLR4 agonist, FLA as a TLR5 agonist, FSL as a TLR2/6 agonist, and finally riboxol and poly(I:C) of low (LMW) and high molecular weights (HMW), as TLR3 (riboxol) and TL3/RIG-I/MDA5 (LMW and HMW poly(I:C)) agonists. Experiment was carried out on HepaRG cells as a source of unlimited supply of essentially growth-arrested and untransformed cells [28]. RIG-I was also probed as an inflammation induction control for LPS, FLA, FSL, riboxol and poly(I:C) treatment. LPS, FLA, FSL, riboxol and HMW were shown to be netrin-1 inducers, suggesting that netrin-1 is inducible by a spectrum of inflammation triggers in the hepatic environment (**Figure 3**).

CLD are substantially determined by chronic viral infections of the liver, where HBV and HCV represent their quasi-exclusive etiological agents. Such viruses have been shown to be direct inducers of dsRNA-based responses [29, 30], which in turn unleash subsequent inflammation inception of hepatocytes. In this context, we devised to use the dsRNA analog poly(I:C) of HMW for subsequent experiments on, first, HepaRG cells. Primary human hepatocytes (PHH) would then be used as well for validation of these data in a quiescent, untransformed and polarized environment. HepaRG cells were previously found broadly responsive to poly(I:C) in our hands [31]. In the present study, cells were submitted to escalating doses of poly(I:C) in a time and dose-dependent western blot assay. The RIG-I inducible marker was monitored for verifying poly(I:C) activity on the cells. In both cellular contexts, poly(I:C) occasioned netrin-1 protein induction in a dose and time dependent manner (**Figure 4a,b,** HepaRG cells and PHH, respectively). Altogether, such data indicate that netrin-1 is likely to be inflammation-inducible in patients livers and in isolated hepatocytic cells in vitro. In

some instances, netrin-1 may be induced as a protective response to cellular stress [14, 17, 32-34]. We therefore devised to monitor in real-time the functionality level of general cell functions upon poly(I:C) treatment, using neutral red tests. Toxicity of poly(I:C) was ruled out by this approach, both in HepaRG cells and PHH **(Suppl. Figure 4),** suggesting that netrin-1 induction may not be related to direct, acute, cell injury.

Then, in order to functionally investigate this induction, we embarked into the analysis of the whole biogenetic process of the netrin-1 protein, starting with RNA. Interestingly, no robust increase of *NTN1* mRNA levels could be evidenced, neither in HepaRG cells nor in PHH (**Figure 5a,b**), upon the analysis of total RNA pools. Total RNA levels for a given mature transcript are function of various factors that are active in real time, such as notably, transcription, stability, and splicing. We then investigated pre-mRNA levels in order to potentially document such implications. Again, no significant induction of pre-mRNA levels could be observed whatever the condition considered in HepaRG or in PHH (**Figure 5c,d**). In order to rule out transcriptional induction in such contexts, we transfected HepaRG cells with a *ntn1* promoter (-1740; -86)-bearing, firefly luciferase (FLuc)-expressing, reporter plasmid. Again, no increase in luciferase signals could be obtained following treatment of HepaRG cells with poly(I:C) in a time- or dose-dependent manner, suggesting the absence of transcriptional induction of *NTN1* (**Suppl. Figure 5**).

In order then to evaluate the implication of *NTN1* mRNA splicing in the process, we calculated the evolution of *NTN1* pre-mRNA over mRNA ratios of induction upon poly(I:C) treatment. Again, no significant alteration of such ratios could be evidenced (**Suppl. Figure 6**), suggesting that regulation of splicing did not participate in netrin-1 protein increase. Since neither transcription, nor splicing, nor total RNA levels were found altered by experimental induction of inflammation, alteration of *NTN1* mRNA stability as a potential factor for increased netrin-1 could be probably safely ruled out, which would otherwise have led to an alteration of total *NTN1* mRNA amounts.

Following the biogenetic process of netrin-1, we then considered post-transcriptional regulation and namely topological and/or translational regulations as potential contributors to netrin-1 protein induction. As a consequence, we therefore investigated the implication of translational modulation in the final phenotype, again both in HepaRG and in PHH. We first submitted both cell types to total polysomal fractionation using

sucrose gradient-based isopycnic ultracentrifugation followed by gradient trace monitoring, RNA extraction and RT-qPCR on the *NTN1* transcript. Proper fractionation could be evidenced using gradient UV traces, both at the control level or at the poly(I:C)-treated level. Indeed, the presence of the peak of free messenger ribonucleoparticles (mRNPs), followed by the 40S, 60S and 80S ribosomal subunits, themselves finally followed by the typical oscillating profile of successive polyribosomes was clearly delineated (**Figure 6a,** black and red traces, respectively). Of note, as expected, translation appears more active in confluent yet still slowly dividing HepaRG cells (as previously depicted [35]) than in PHH. The comparison of HepaRG and PHH-derived data from this experiment ended up in two distinct sets of conclusions. As for HepaRG cells, the percentage of polysome-bound *NTN1* mRNA signals versus total *NTN1* signals remained unchanged upon poly(I:C) treatment (87.9% versus 86.0% in treated cells). In contrast, in PHH, a major shift of the *NTN1* signal could be observed towards the polysomal compartment of the gradient (46.8% versus 89.3%, $p<0.05$) upon poly(I:C) incubation (**Figure 6b**). In order to confirm this, an EDTA release control experiment was carried out. EDTA induces polysomal collapse, triggering Mg^{2+} and Ca^{2+} chelation. EDTA, which was added to lysates prior to gradient loading, was used as a control for evaluating the extent of genuine polysomal origin of the signals obtained. Intriguingly, in HepaRG cells, the implication of non polysomal (perhaps associated to vesicular material of similar density) *NTN1* signals in the process was found major since EDTA treatment did not affect the levels of *NTN1* signals in the expected polysomal compartment of the gradient (89.9% left, **Figure 6b**). In contrast, EDTA readily ascertained the polysomal origin of *NTN1* levels derived from PHH data. Indeed, EDTA induced a reversal of the obtained polysomal signal to 17.4% of the initial signal (i.e. >70% decrease).

Altogether, such data argue for distinct modes of regulation of netrin-1 induction in HepaRG hepatocyte-like cells and in PHH. While PHH appear to canonically activate total polysome-based translation of the *NTN1* transcript for final induction of the protein, netrin-1 biogenesis mechanisms remain uncharted at this stage of the study in HepaRG cells.

Although approximately half of mRNAs that encode cytosolic proteins are bound to the ER, almost the entirety of the transcriptome encoding secretory and membrane proteins is ER-bound [36]. Netrin-1 is a secreted protein and its translation naturally

takes place in association with the endoplasmic reticulum (ER) membranes so that cotranslational translocation of the nascent peptide across the ER membrane may occur through the transient association of the signal sequence with the translocon [37]. Therefore, translation of netrin-1 should be conditioned by two distinct events: association with polyribosomes as well as accumulation of the transcript on the ER for subsequent transfer of the native peptide to the secretory pathway. We then hence took into consideration this process in order to gain insight into the induction of netrin-1, especially in the case of HepaRG cells, given the abovementioned discrepancy with PHH. To this aim, we isolated several cellular fractions using the so-called 'sequential extraction' method [26, 27], which allows the investigation of mRNAs partitioning between cytosolic and ER membrane-associated fractions, in the presence or not of poly(I:C). The extent of enrichment was first evaluated using three protein markers (RIG-1 and caspase-3 as cytosolic proteins and the ER-associated PDI protein, **Figure 7a,b**). No significant alterations of cytosolic or membrane-bound *NTN1* transcripts could be evidenced upon poly(I:C) treatment in PHH. In contrast, the level of enrichment of the *NTN1* transcript in membrane-bound versus cytosolic fractions increased by 7.4-fold in HepaRG cells ($p<0.05$) while it remained unchanged in PHH (**Figure 7c,d).** Such data suggest that translational induction of netrin-1 occurs via important transfer of the *NTN1* transcript towards the ER prior to undergoing active translation in HepaRG cells.

Translational activity of a given transcript may be altered at the specific ER-bound level. This notion is of specific relevance for secreted proteins since the ER is a mandatory site for co-translational translocation into the ER lumen. Hence, the previous data call for evaluating the active translation status of ER-bound *NTN1* mRNA, as the final location of the *NTN1* pool destined to netrin-1 production into the ER lumen. We first performed a sequential extraction as previously depicted. Enrichment of all fractions was first checked using the same RIG-I, PDI and caspase-3 markers as above (**Figure 8a**). As before, all samples were submitted to isopycnic ultracentrifugation, followed by fractionation, RNA extraction and RT-qPCR. Analysis of netrin-1 signals across fractions showed no significant shift between translationally inactive and active fractions in the case of HepaRG cells with poly(I:C) treatment (97.6% versus 95.4%). In contrast, PHH exhibited an increase in polysomal signals (87.4 versus 75.2% corresponding to a 12% increase). As for PHH, such results

suggest that global translational up-regulation of *NTN1* upon poly(I:C) treatment (+40%, see **Figure 6**) is composed of two arms: an ER-bound arm (+12% as mentioned above), complementing a cytosolic activation arm prior to ER association of the transcript (hence likely amounting to 28%, hence totaling 40%).

We then performed a polysomal run-off assay, using harringtonine. Harringtonine is an alkaloid that disrupts translation upon initiation and as a consequence, within 15 minutes of incubation, allows to differentiate between active translation and ribosomal stalling (as featured by inactive ribosomes / transcript complexes) [38, 39]. Since actively translated transcripts will undergo dissociation from ribosomes within 15 minutes, the extent of run-off is linked to the intensity of translation initiation for a given mRNA. In HepaRG cells poly(I:C) treatment correlated with a more limited harringtonine-induced polysomal run-off than in untreated cells. This suggests, intriguingly, that ribosomal stalling increased by two-fold upon poly(I:C) treatment in such cellular context. In contrast, in PHH, poly(I:C) treatment correlated with a more intense harringtonine-based polysomal run-off than in HepaRG cells, yet poly(I:C) treatment did not alter this run-off intensity levels. Interestingly, in resting cells, both HepaRG and PHH exhibited similar levels of harringtonine-induced polysomal *NTN1* run-off (10 vs 13%, respectively). However, upon poly(I:C) and harringtonine co-treatment, PHH exhibited 3- to 4-fold more *NTN1* mRNA run-off in comparison with HepaRG (-16% versus -3.5%, respectively), a result indicative of a higher degree of de novo *NTN1* translational initiation in such cells than in HepaRG cells (**Figure 8b,c**). These data suggest that ribosomal stalling somewhat dampens the previously observed massive mRNA transfer in HepaRG cells, while it does not participate in the final poly(I:C)-induced phenotype in PHH.

Netrin-1, as a secreted protein which, as a consequence, traffics through the ER lumen, ER exit sites, as well as cis and trans Golgi compartments before being loaded as a secreted cargo into secretion vesicles of the canonical secretory pathway of the hepatocyte. The hepatocyte is one of the major secretory cells of the human body. In this context, since inflammation is also potentially regulated at the secretion level because of its cytokinic component, we sought to consider a potential impact of poly(I:C) treatment on cell secretion, downstream of its translocation in the ER lumen. To this aim, the so-called RUSH (retention using selective hooks) assay [40] was used. We treated or not HepaRG cells with poly(I:C) and, using immunofluorescence, we

examined the ability of a fluorescent fusion form of AAT (AAT-GFP) to reach the Golgi apparatus (located using giantin staining) within the assay timeframe. However, as shown in **Suppl. Figure 7**, no noticeable differences were observed between colocalized signals derived from GFP or giantin in treated or untreated cells. AAT being one of the most abundant and specific cargoes of the hepatocyte, such data suggest that the global secretory activity levels of HepaRG cells are not altered by poly(I:C). While a netrin-1-specific RUSH assay remains to be done, these results suggest that poly(I:C) indeed modulates netrin-1 level through other processes than secretion, a process which could, if downregulated by poly(I:C), have occasioned intracellular netrin-1 accumulation.

Netrin-1 is a laminin-related protein [41] that is, in addition to its possible secretion, susceptible to undergo accumulation at the extracellular side of the plasma membrane. We thus tested netrin-1 signals by Facs on nonpermeabilized cells using the previously depicted anti-netrin-1 antibody (see **Suppl. Figure 1**). However, under such conditions, a non null residual signal remained detectable in netrin-1 crispr KO cells (not shown), impeding further analysis of netrin-1 induction at this level because of a lack of antibody specificity (in addition of three other tested (not shown)) in this approach.

As a consequence, we expect to eventually observe inflammation-induced upregulation of netrin-1 in cell culture supernatants. However, again, such analyses have so far remained unsuccessful (especially by ELISA, not shown) probably in part because of artefactual binding of netrin-1 on polypropylene or polyethylene surfaces (unpublished data). Such two last sections of the work are still under methodological development.

Altogether, this last section of data suggests that translational regulation, itself also perhaps conditioned by transcript transfer to the ER upon poly(I:C) treatment in some defined cellular contexts (here represented by HepaRG cells), is one of the main molecular events associated with netrin-1 upregulation.

Discussion

The association of netrin-1's expression with inflammatory disease that may be themselves promoting cancer onset has been documented [7, 42]. Given the causal link existing between inflammation and cancer in the liver [43], probing the direct impact of inflammation on netrin-1 expression in the liver, less often considered than other organs with respect to netrin-1, was therefore of interest.

Although transcriptional regulation has been considered a hallmark regulation step in general cell biology and differentiation processes, increasing evidence has been suggesting within the last 10 years that processes that need swift temporal regulation such as inflammation and, more generally, oncogenic processes, implicate translational modulation.

Our experience in the liver field has been recurrently confronted with this type of regulation. Indeed, differentiation of HepaRG cells is strongly associated with important translational downregulation of a majority of transcripts, together with a concomitant upregulation in polysomal fractions of a subset of hepatocytic differentiation-related mRNAs [44]. Experimental activation of the mTOR/S6 kinase pathway, which is present in 45% of HCC cases [45], impairs hepatocytic differentiation, and impedes the translation of transcripts moderating lipid homeostasis and cell growth [46]. Upon the UPR, netrin-1 translation is selectively favored during global translational shut down, together with IRES-bearing transcripts implicated in cell survival and transformation. Finally, the netrin-1 receptor UNC5A is also translationally down-regulated upon HCV infection, including in patients livers [15]. The reason for such repeatedly observed translational regulation of netrin-1 may be related to its IRES-bearing status [17]. Yet, the liver is one, if not the most, active secretory cell type in human physiology, in addition of being exposed to real-time needs for metabolic and hence secretory regulation (acute phase, post prandial phases). It is thus conceivable that the biogenesis of secreted factors such as netrin-1 are more often constrained by general events aiming at adaptating the liver secretome to circadian fluctuations than in other cell types. The present data, to be interpreted as a confirmation of the particular susceptibility of netrin-1 to post-transcriptional regulation, strengthens the need for more frequent analysis of pathogenic processes of the liver using methods distinct than total transcriptomics. Indeed, the translational regulation of the netrin-1 transcript, as

an oncogenic sequence, may have fallen under the control of well [47] or less well characterized (such as LARP1[48] which also binds *NTN1*[49]) RNA-binding proteins or translation initiation elongation factors, a mechanism which warrants further investigations.

While it was initially thought that cytosolic and nuclear proteins transcripts were not concerned by topologic regulation which involves shuttling to the ER membrane, prior to translation, secreted and membrane-embedded proteins encoding mRNAs need to associate with ER membrane-integrated translocons for subsequent protein production. As a secreted protein, netrin-1 derives from a transcript bearing a putative topogenic signal in its 5'UTR, which endows it with such topological regulation step prior to translation modulation itself. In the present study, we have shown, depending on the cell system of interest, i.e. HepaRG or PHH, that netrin-1 biogenesis under inflammation was specifically regulated at the topological level in the former, while being regulated at the translational initiation level in the latter. Such apparent discrepancy is of interest, since it appears that two distinct modes of post-splicing regulation actually converge towards a single phenotypic outcome, i.e., netrin-1 increase. We have not been able to evaluate the level of importance this type of phenomenon may have in cell biology or pathology at large. HepaRG cells are weakly cycling cells in the experimental design of this study and are less differentiated and polarized than PHH. It would be of interest to assay the existence of this type of phenotypical convergence using the same methodology on homologous couples of cell types derived from non-liver tissues.

From a more pathology- and cure-oriented point of view, we would like to emphasize that this study draws a link between inflammation and liver carcinogenesis through netrin-1. To date, in the liver, direct cross-talks between inflammation and HCC have been historically mainly defined through the IL-6/gp130/STAT3 axis [50]. We have previously documented that progression towards HCC associates with a sharp drop in *UNC5A* (netrin-1 receptors) expression levels [15], thereby functionally augmenting netrin-1 activity following the dependence receptor theory [51]. Also, although the causal implication of netrin-1 in carcinogenesis remains to be established (pending studies in animal models), a Cox model implemented on a 101 cirrhotic patients cohort suggests that above median *NTN1* levels associates with shorter (-4-fold) HCC-free survival (unpublished data).

As a concluding remark, chronic inflammation of a given tissue is always almost essentially counterbalanced by a wound healing process leading to scar, acellular, tissue build up, made of ECM proteins. As mentioned before, netrin-1 is a laminin-related protein that shares several structural features with ECM-constituting proteins. As a consequence, one may hypothesize that netrin-1 could participate in ECM build-up while conferring to cells increased resistance to death in the harsh and perhaps hypoxic conditions defining high grade fibrosis or even cirrhosis. While beneficial on a short term basis as a potential cell protective agent, netrin-1 could pertinently participate in the Janus-like profile of inflammation as a necessary phenomenon for tissue remodeling and viral clearance, but also as a detrimental phenomenon with respect to oncogenesis. The present study is therefore in strong agreement with a potential implication of netrin-1 in HCC under the status, as IL-6, of a hepatic inflammation-induced factor, and may further document the pathogenic consequences of long-lasting inflammation defining CLD.

Acknowledgements

We thank M Devouassoux-Shisheboran and B Bancel (pathologists, Lyon University Hospital) for determination of activity scores. RB is a recipient of a DevWeCan Labex (laboratories of excellence network, ANR-LABX-061) predoctoral fellowship. Funding has been obtained through the same Labex consortium (ANR-LABX-061 to PM, FZ and RP)

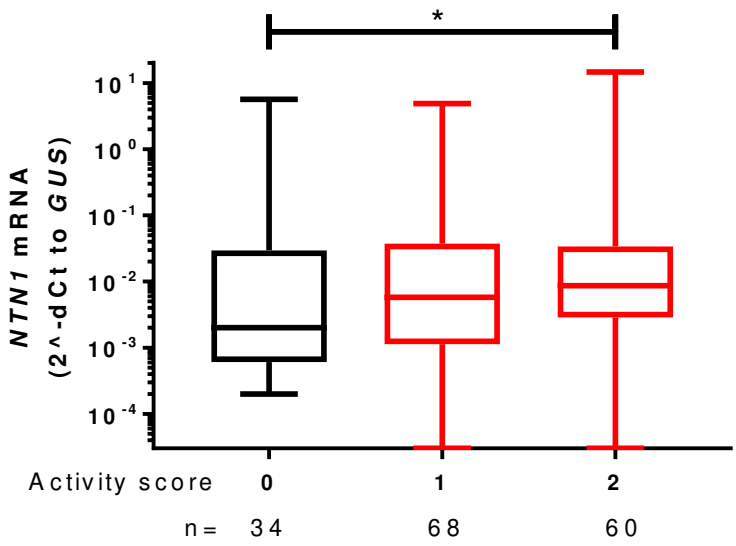


Figure 1

***NTN1* levels correlate with activity scores in clinical liver biopsies.**

The levels of *NTN1* mRNA were quantified by RT-qPCR using *GUS1* [52] as internal reference. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. (*p<0.05).

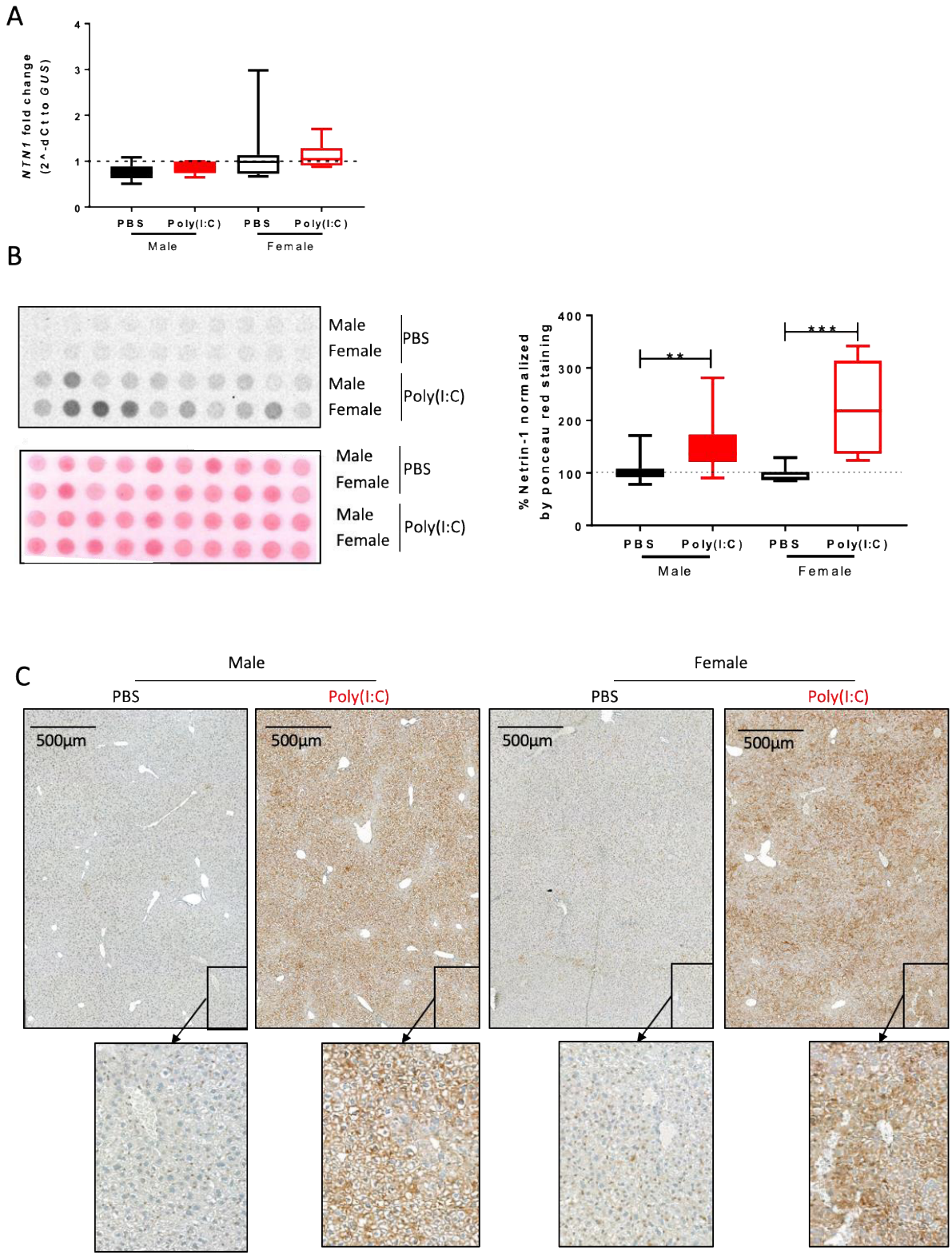


Figure 2

Netrin-1 levels are upregulated by poly(I:C) in mice livers.

a. The levels of *NTN1* mRNA were quantified by RT-qPCR using *GUS1* [52] as internal reference. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test.

b. Dot blot quantification of netrin-1 using an in-house validated (see Suppl. Figure 1) anti-netrin-1 antibody. Ponceau staining was used as a loading and standardizing reference. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. (*p<0.05, **p<0.01, ***, p<0.001).

c. Mouse sections derived from the same hepatic lobe in all instances were probed with the same anti-netrin-1 antibody prior to secondary antibody incubation and HRP-based revelation. Data are representative of a total of 40 mice (10 females, 10 males, +/- poly(I:C)).

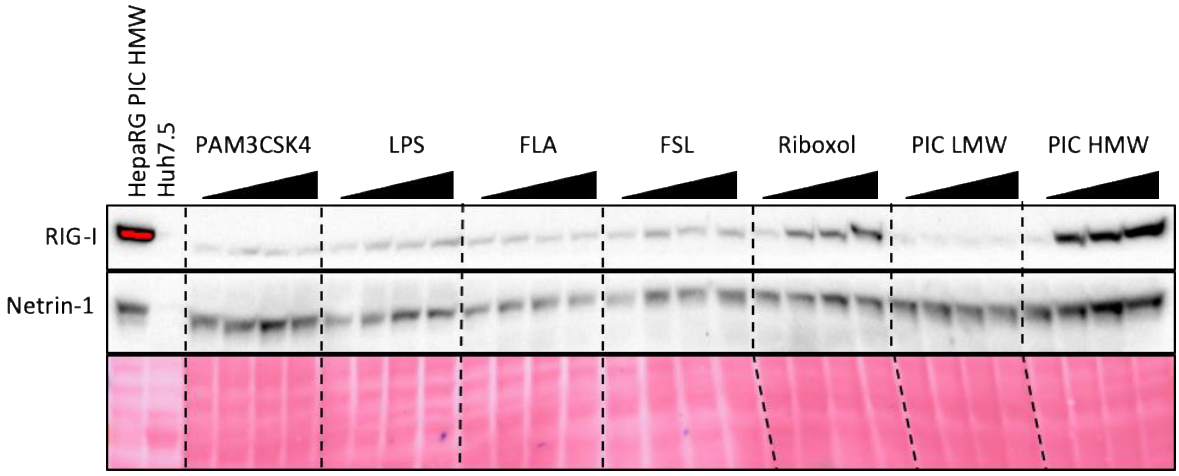


Figure 3.

Netrin-1 levels are upregulated by TLR2 to 6 ligands in a dose-dependent manner in HepaRG cells.

Netrin-1 expression levels were evaluated by immunoblotting using an anti-netrin-1 antibody. Ponceau red was used as loading and blotting control (n=2 independent experiments).

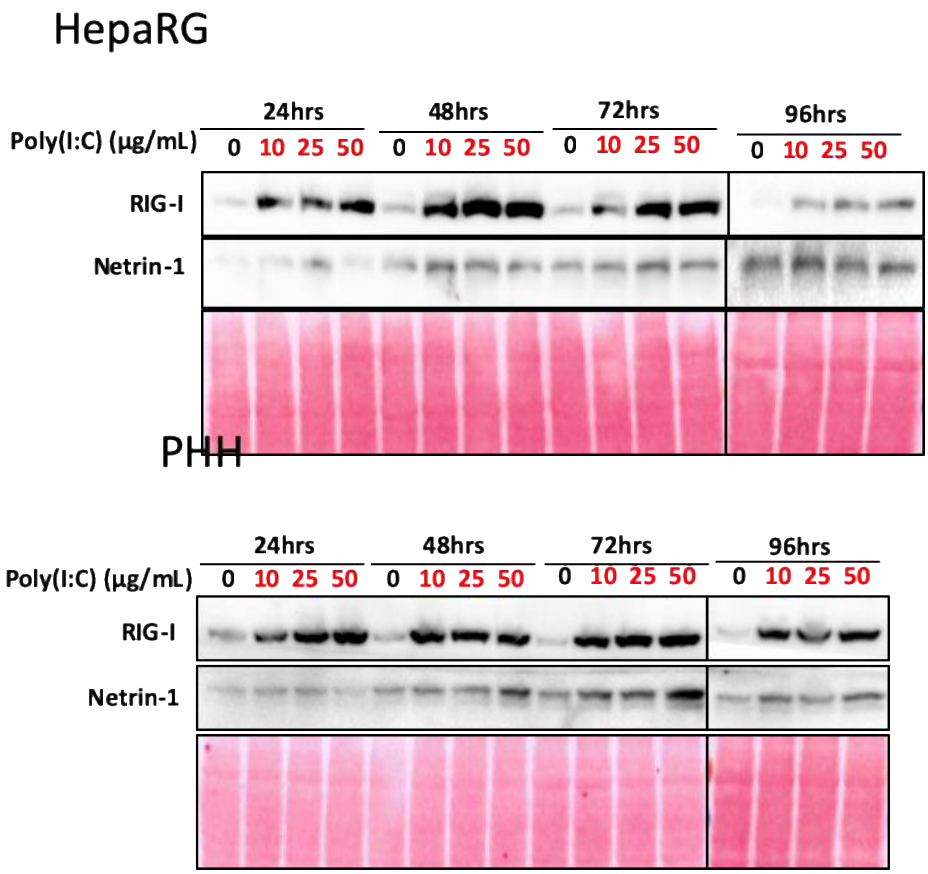


Figure 4.

Netrin-1 levels are upregulated by poly(I:C) in a time- and dose-dependent manner in HepaRG cells and in PHH.

Netrin-1 expression levels were evaluated by immunoblotting using an anti-netrin-1 antibody. Activity of poly(I:C) has been verified based on RIG-I detection. Ponceau Red staining was used a loading control (n= 3 (HepaRG) and n=3 distinct PHH batches).

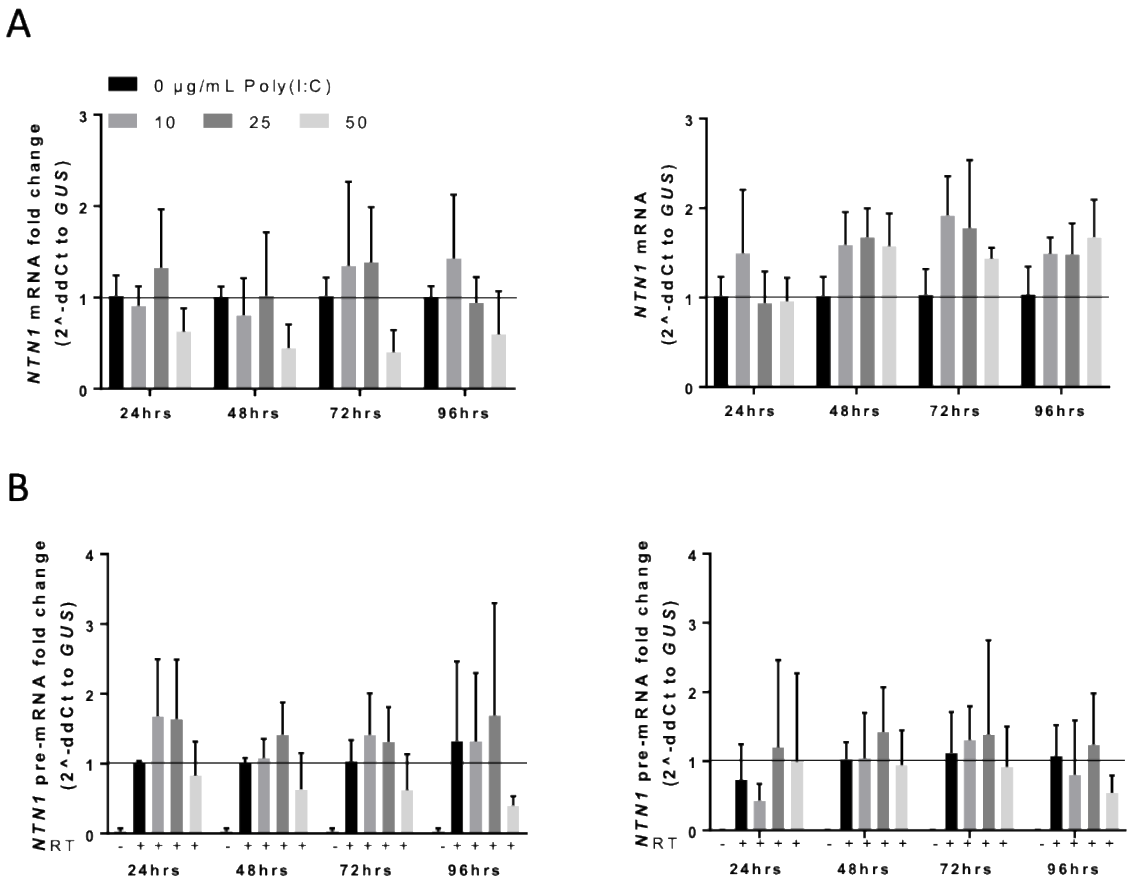


Figure 5.

***NTN1* total RNA, and pmRNA levels are unaffected by poly(I:C) either in a time- or dose-dependent manner in HepaRG cells and in PHH.**

a. The levels of *NTN1* mRNA were quantified by RT-qPCR using *GUS1* as an internal reference. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. (n.s.)

b. The levels of *NTN1* premRNAs (intron 1) were quantified by RT-qPCR using *GUS1* as internal reference. No amplification occured when using heat-inactivated RT. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. (n.s.).

n=3 independent experiments (HepaRG, and n=3 distinct PHH batches) run in technical triplicates.

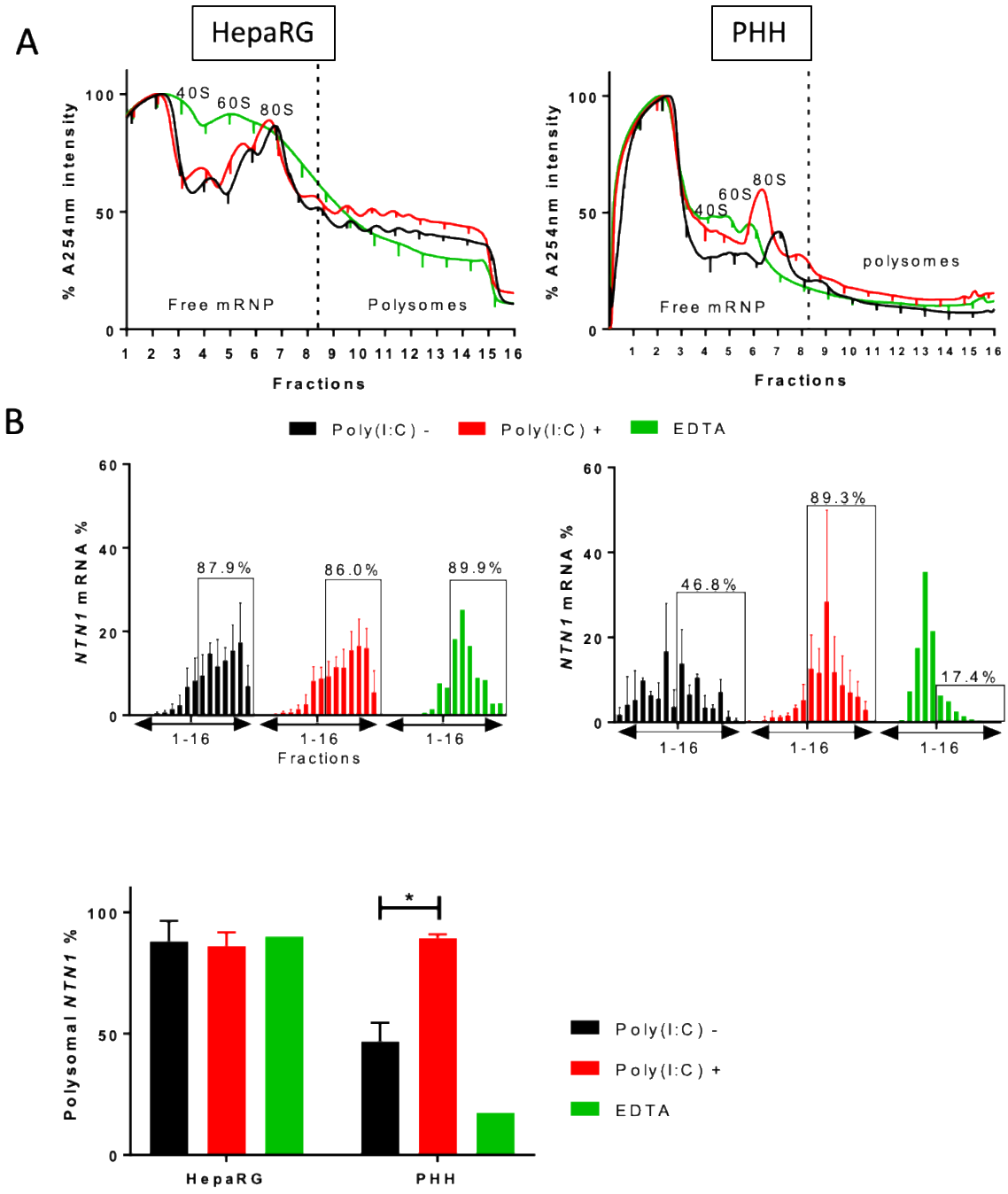


Figure 6

Translational association of *NTN1* to polysomes is specifically activated in PHH upon poly(I:C) treatment.

HepaRG cells and PHH were treated with cycloheximide, scraped, lysed and loaded atop of a linear sucrose gradient prior to isopycnic ultracentrifugation.

a. Representative profile of UV gradient traces.

b. *NTN1* distribution profile across the gradient. Total polyribosomes were fractionated, extracted and processed for *NTN1* by RT-qPCR (n= 3 (HepaRG), and n=3 distinct

PHH batches). Mann–Whitney test, *p<0.05. An EDTA release control was performed by adding EDTA to lysates immediately before ultracentrifugation.

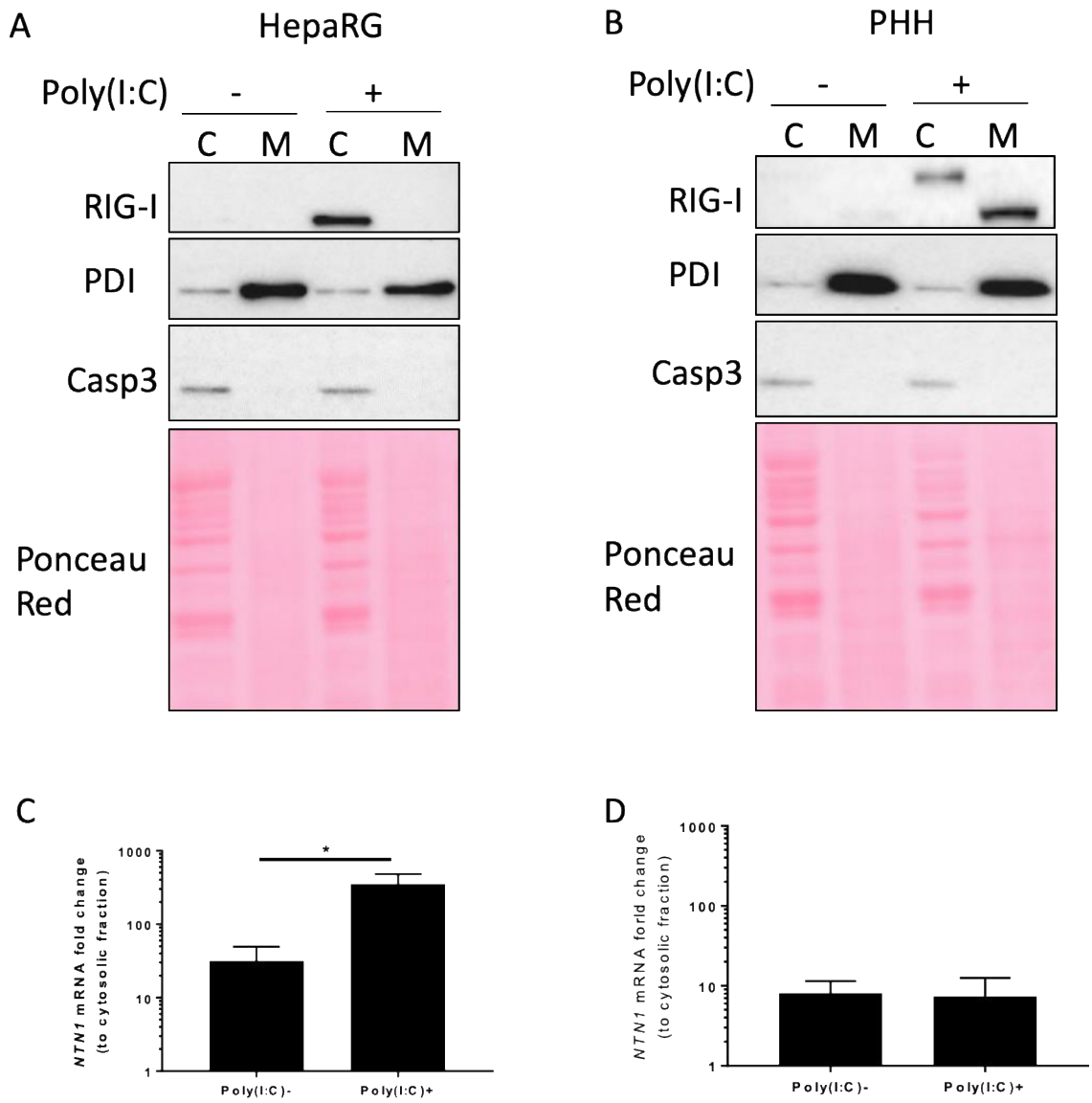


Figure 7

Topological regulation of the *NTN1* transcript is specifically activated in HepaRG cells upon poly(I:C) treatment.

The sequential extraction method as mentioned in the materials and methods section was used.

a. Adequate partitioning was adressed by western blotting on PDI (internal membrane contents) and caspase-3 (cytosolic contents). RIG-I (cytosolic location) was also probed as a poly(I:C) activity control.

b. *NTN1* transcripts were monitored for their partitioning by RT-qPCR. *GUS1* was used as an internal reference for, on the one hand, cytosolic material, and, on the other hand membrane-bound material. Mann-Whitney test, p*<0.05 (n= 3 (HepaRG), and n=3 distinct PHH batches).

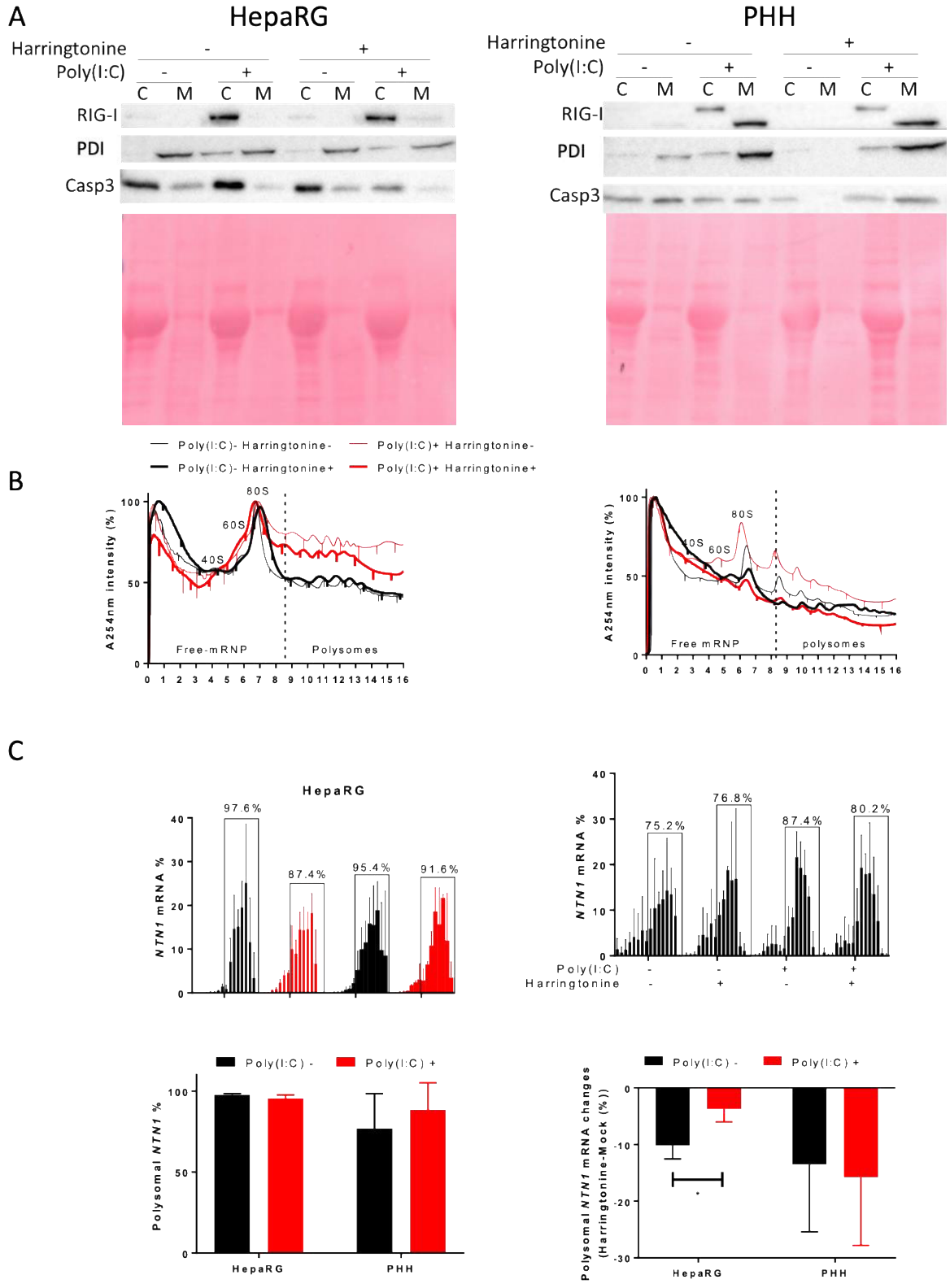


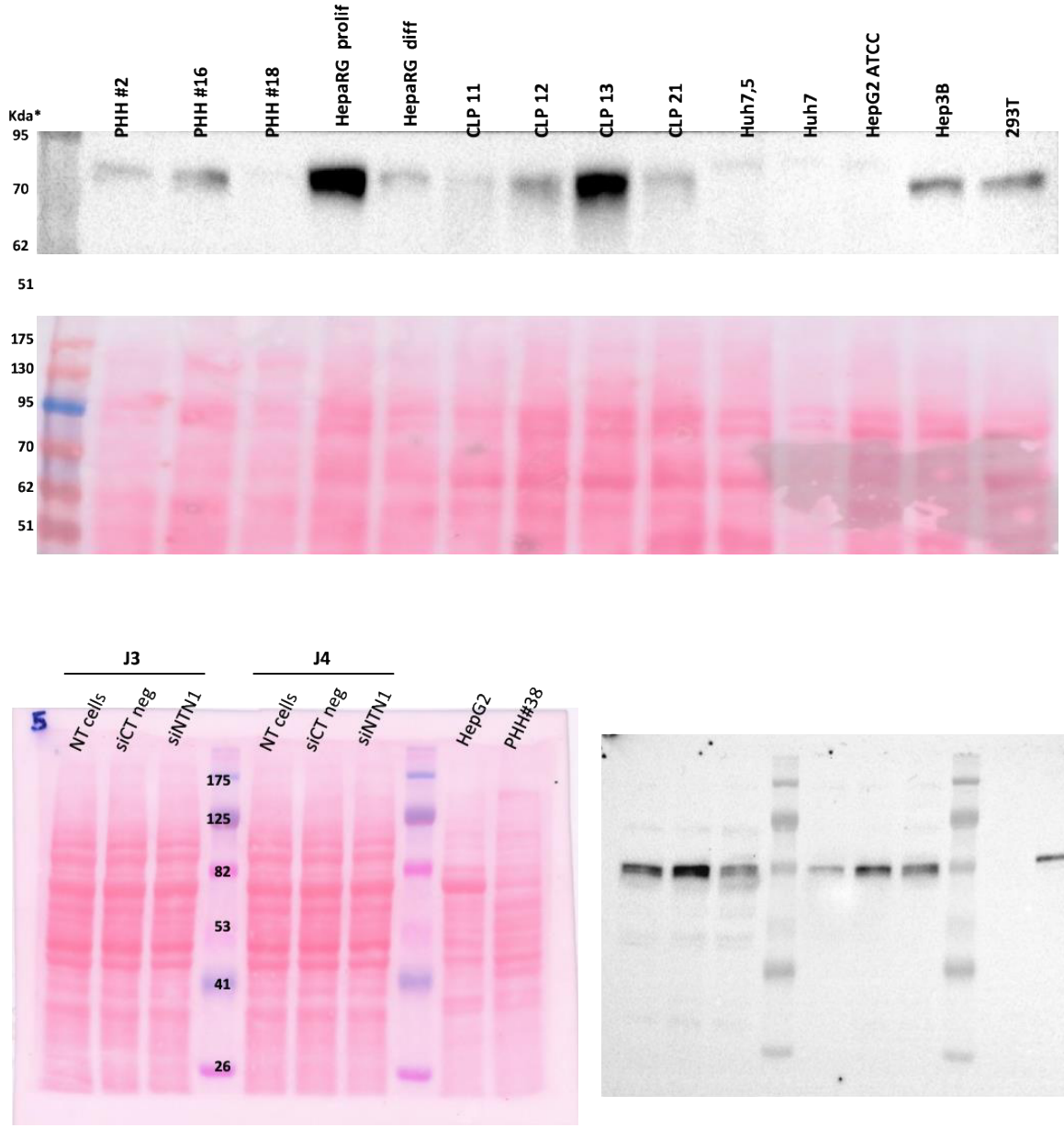
Figure 8

Endoplasmic reticulum-located translational initiation of netrin-1 is activated selectively in PHH upon poly(I:C) treatment.

HepaRG cells and PHH were treated with or not with harringtonine first, then cycloheximide, scraped, lysed and loaded atop of a linear sucrose gradient prior to isopycnic ultracentrifugation.

a. Representative profile of UV gradient traces.

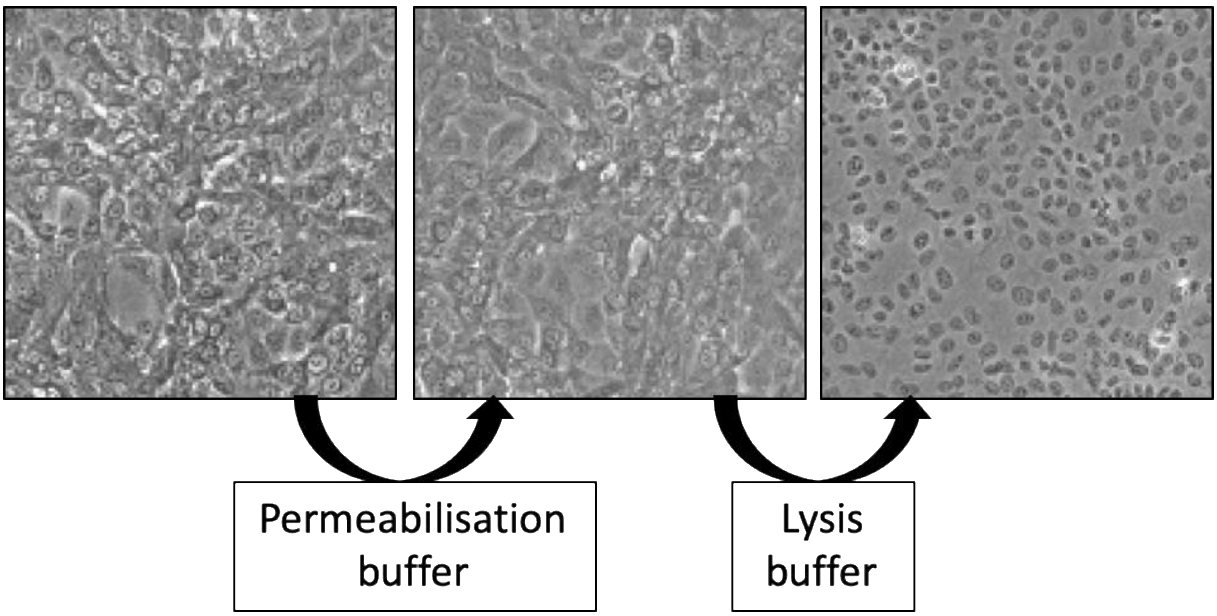
b. *NTN1* segregation across the gradient. Total polyribosomes were fractionated, extracted and processed for *NTN1* by RT-qPCR (n= 3 (HepaRG), and n=3 distinct PHH batches). Mann–Whitney test, *p<0.05. An EDTA release control was performed by adding EDTA to lysates immediately before ultracentrifugation.



Supplementary Figure 1.

In house assessment of anti-netrin-1 antibody staining reliability.

A panel of cell lysates derived from *NTN1* mRNA negative or positive cells as probed by RT-qPCR as well as siRNA-treated cells was submitted to anti-netrin-1 immunoblotting using the Abcam antibody (Ab126729), prior to HRP-based revelation.

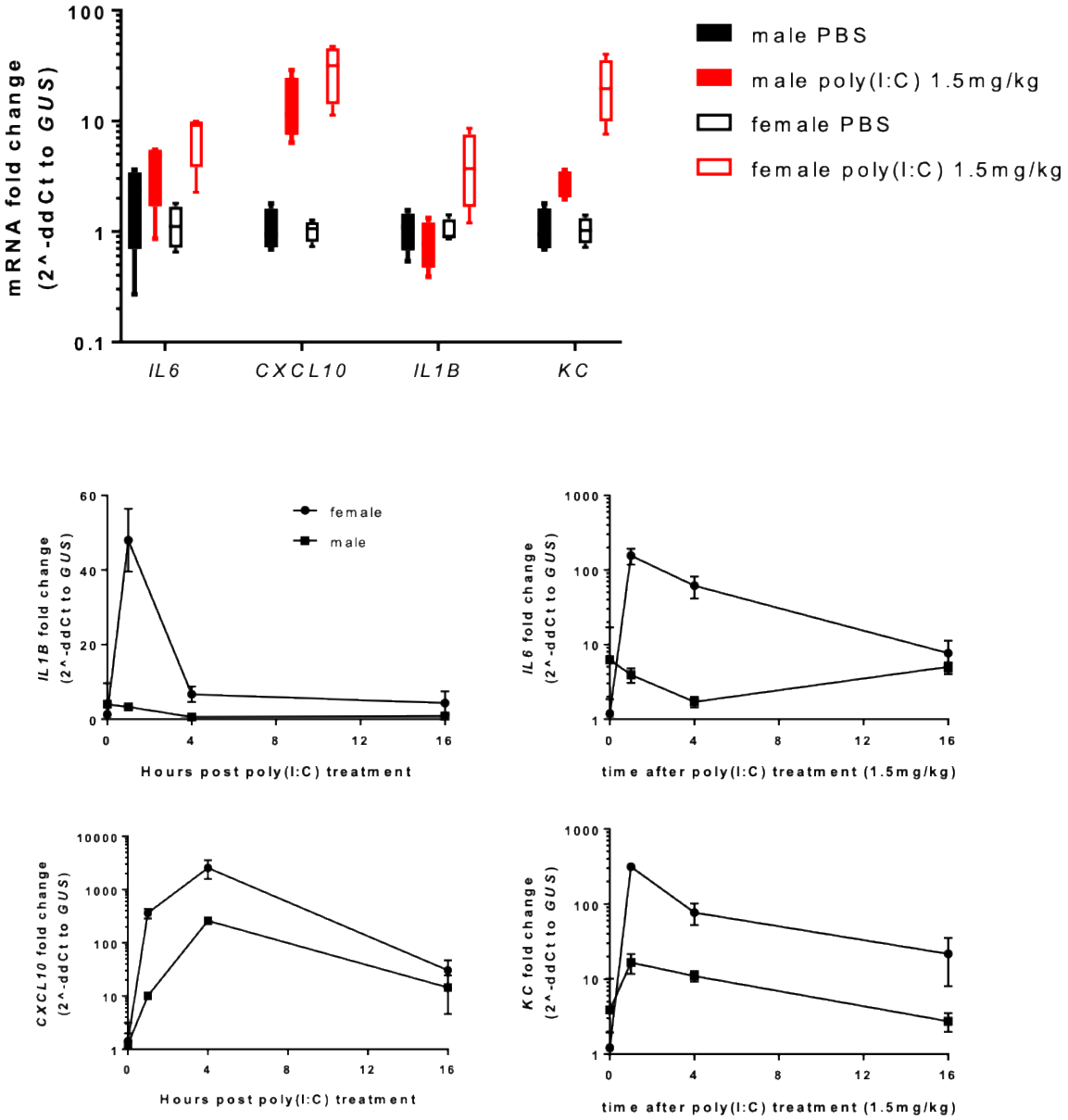


Supplementary Figure 2.

Sequential extraction method.

The sequential extraction method as mentioned in the materials and methods section was used.

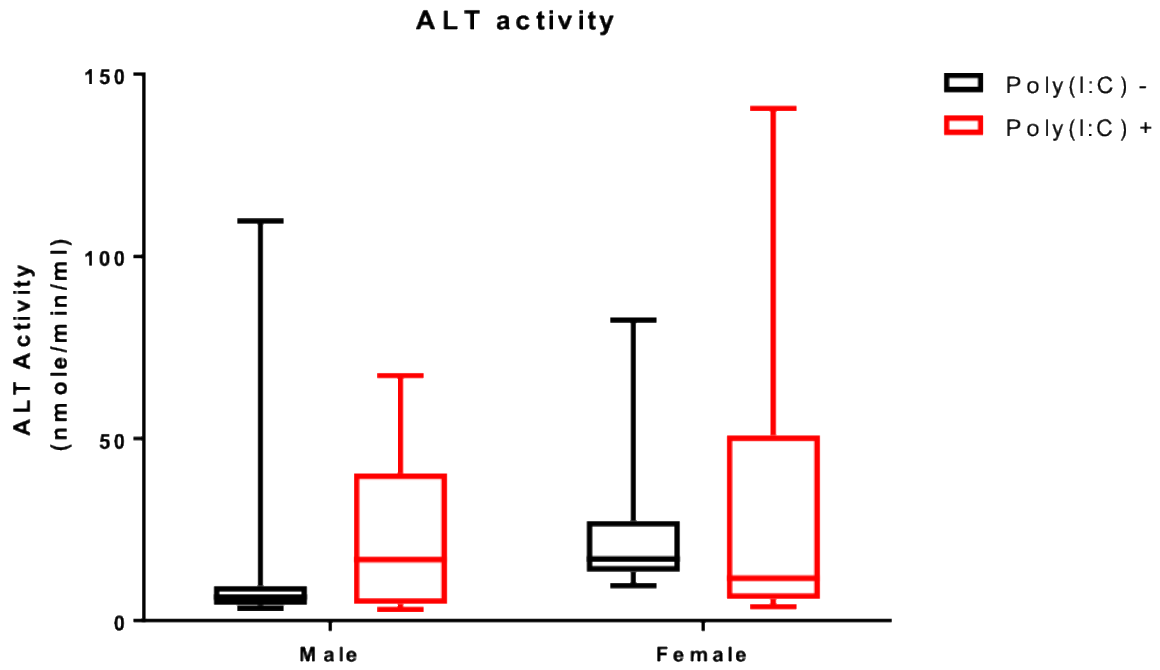
a. Phase contrast microscopy of sequential extraction steps. After stripping the intact cells of their cytoplasm (left panel) and then of their internal membrane contents (center), only nuclei remain visible as attached to the plastic dish (right panel).



Supplementary Figure 3.

Poly(I:C) activity assessment in mice.

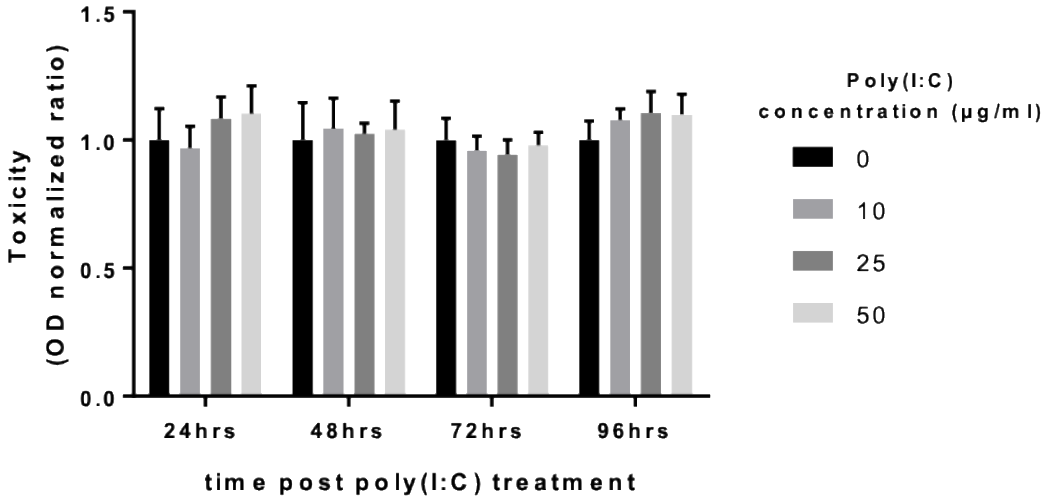
C57BL6 mice were challenged with poly(I:C), their liver harvested, and total RNA extraction processed for RT-qPCR on inflammation-related transcripts. Corresponding canonical markers of inflammation activation (*CXCL10*, *IL1B*, *IL6*, *KC* (ortholog of h*IL8*), were monitored (4 females, 4 males, +/- poly(I:C)).

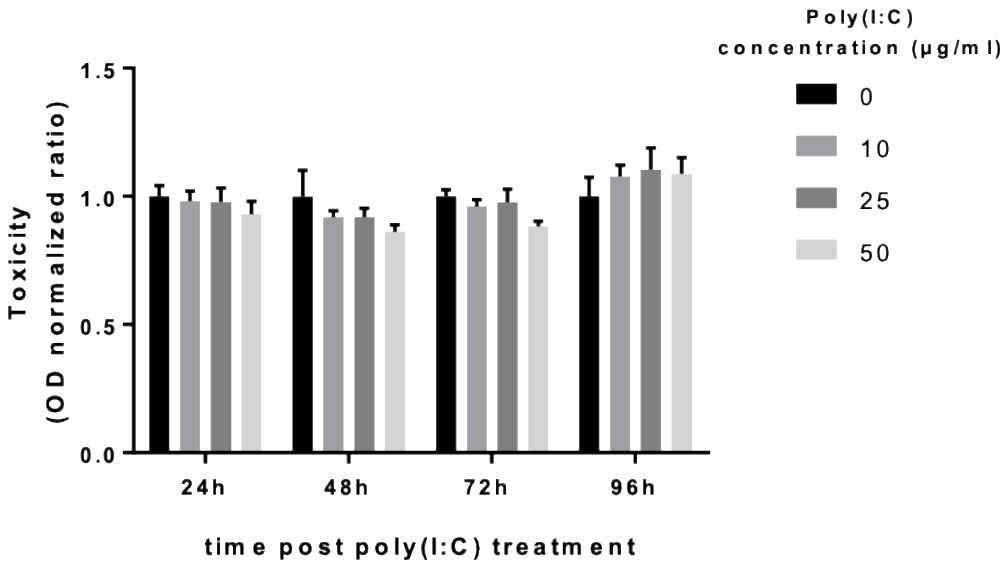


Supplementary Figure 4.

Poly(I:C) does not alter mice liver

Mouse plasma samples were abtained upon sacrifice. A total of 40 animals (10 for each sex +/- poly(I:C) was analyzed. Mann-Whitney test (n.s.)

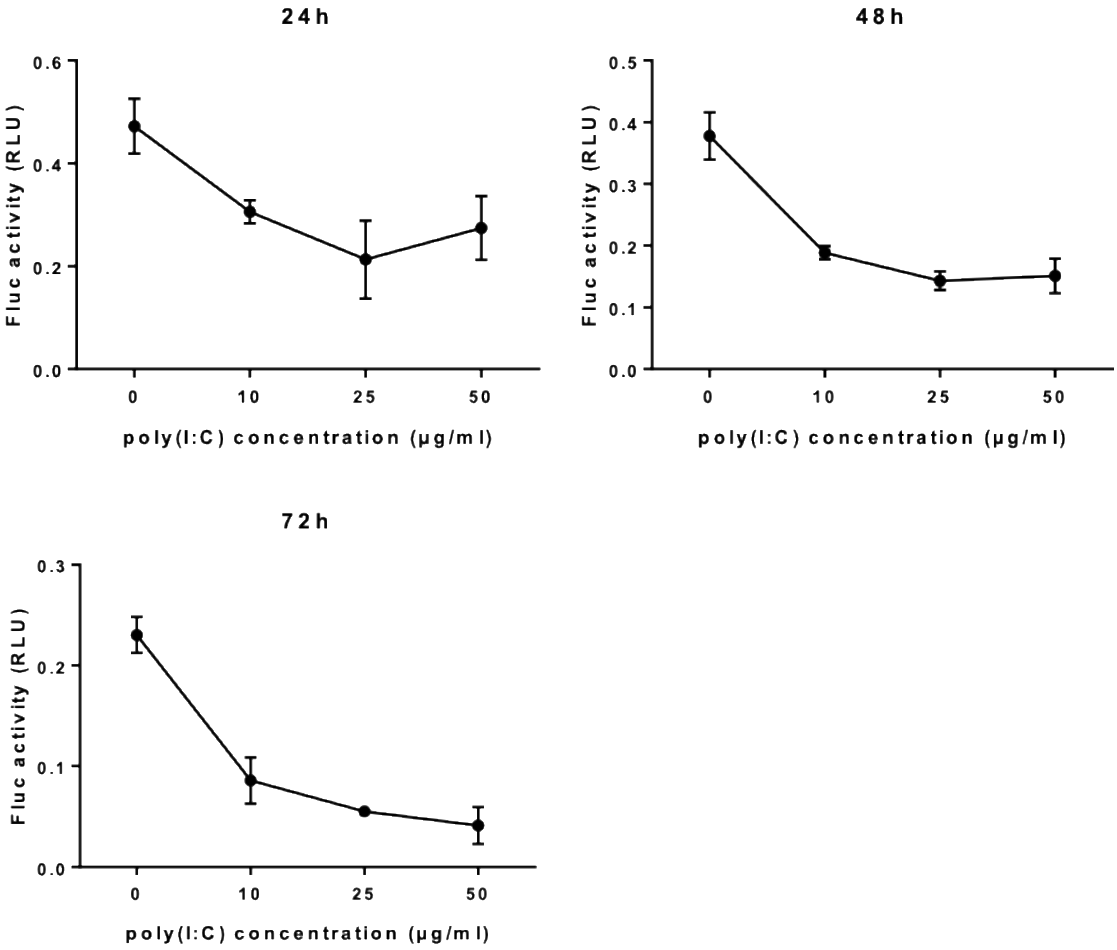




Supplementary Figure 5.

Poly(I:C) does not alter cell viability in HepaRG and PHH.

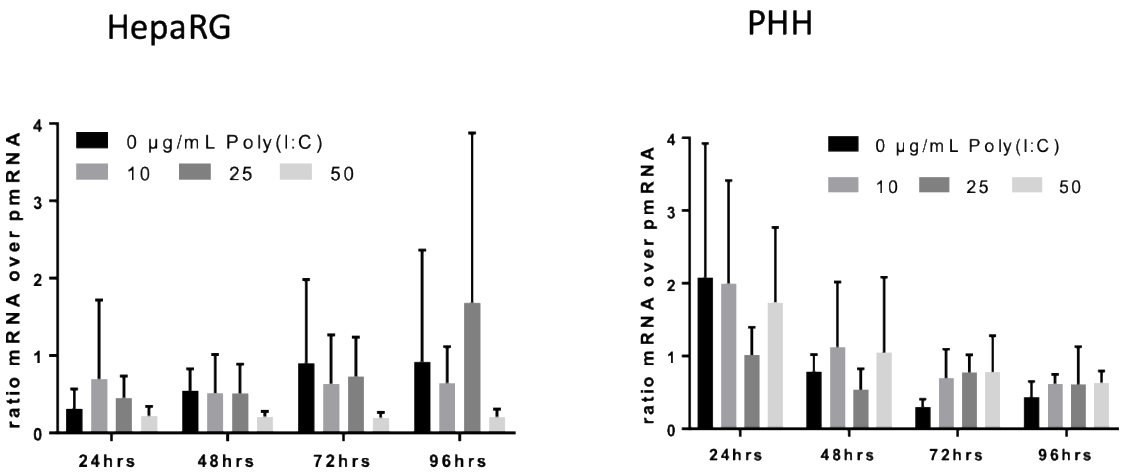
The functionality level of general cell functions upon poly(I:C) treatment, using Neutral Red test, has been determined (n=2 (HepaRG), and n=2 distinct PHH batches). Mann–Whitney test (n.s.).



Supplementary Figure 6.

***Ntn1* promoter-driven Luc expression is not upregulated by poly(I:C) in HepaRG cells.**

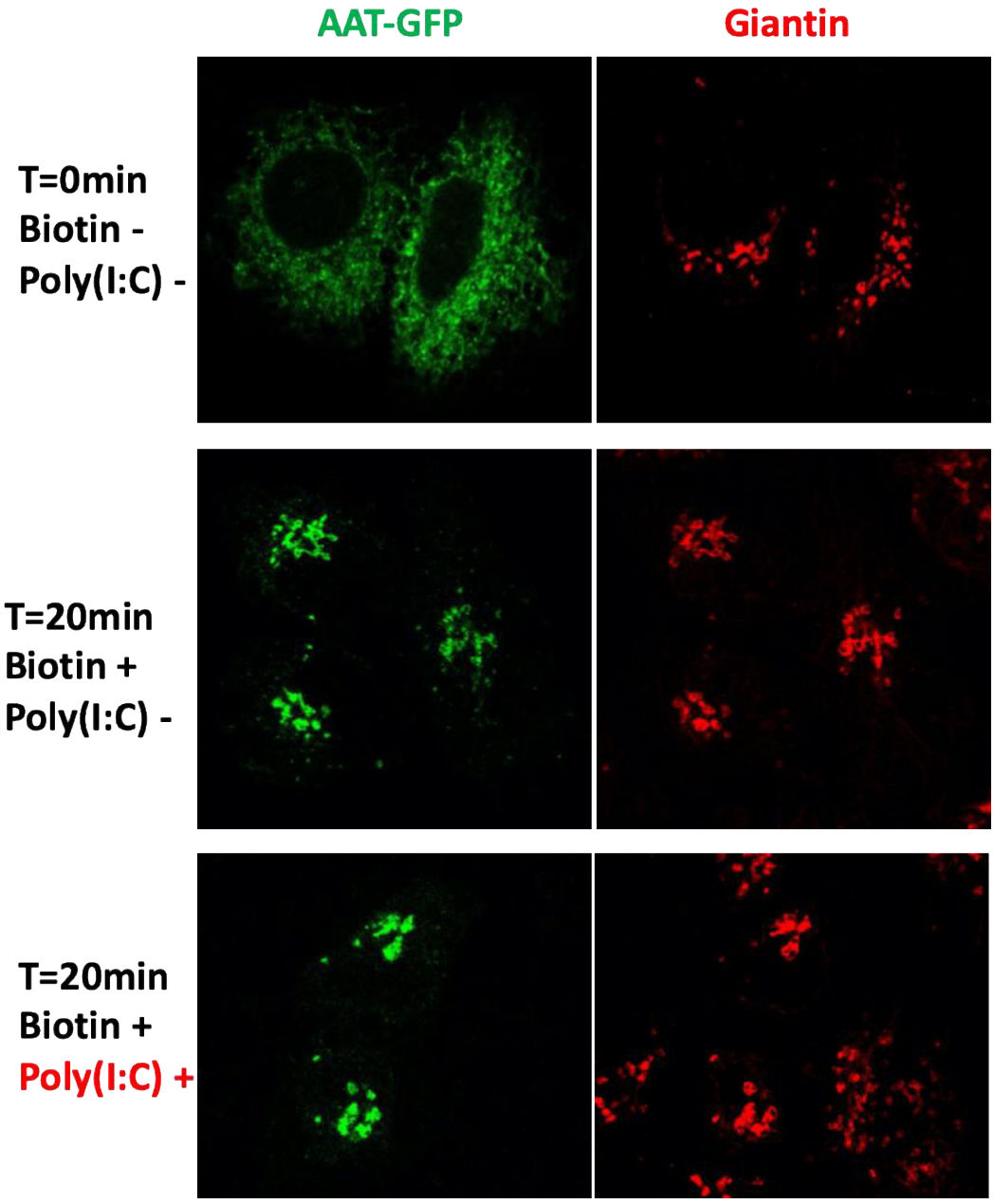
a. The levels of *Ntn1* promoter-dependent Luciferase expression under poly(I:C) treatment were evaluated using *Ntn1*-Luc expressing plasmid. Construct: long; -promoter sequence (-1740; -86). Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. (*p<0.05).

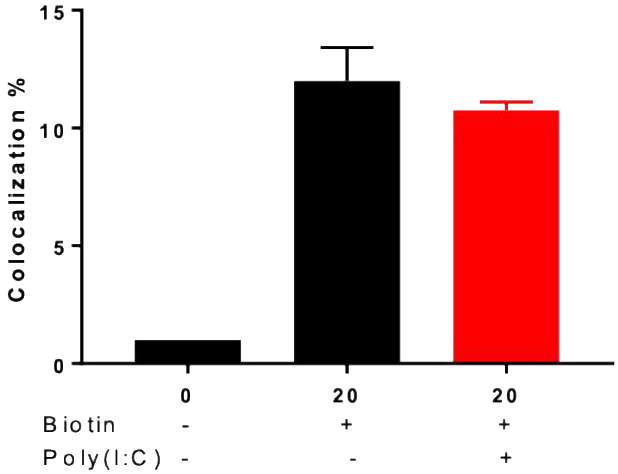


Supplementary Figure 7.

***NTN1* mRNA splicing remains unaffected by poly(I:C).**

a. NTN1 mRNA (M) over pmRNA (pM) ratios were calculated. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. (n.s.). n=3 independent experiments (HepaRG, and n=3 distinct PHH batches) run in technical triplicates.


AAT-GFP
Giantin
T=0min
Biotin -
Poly(I:C) -
T=20min
Biotin +
Poly(I:C) -
T=20min
Biotin +
Poly(I:C) +


Colocalization %
15
10
5
0
0
20
20
Biotin - + +
Poly(I:C) - - +

Supplementary Figure 8

Poly(I:C) does not alter the functionality of the hepatocytic secretory pathway using AAT as a hepatocyte-specific major cargo.

HepaRG cells were transfected with AAT-GFP bearing plasmids in biotin-free medium and treated or not with poly(I:C). GFP and giantin colocalization were then estimated in a time course assay after biotin addition to the medium (means of n=2 independent experiments are shown).

Suppl. Table 1. Biopsies data

	HBV- / HCV-	HBV+	HCV+
No. of patients	29	15	87
Men/Women	16/13	14/1	69/27
Median age, years (range)	61 (31-98)	57 (28-79)	60 (29-94)
HCV genotype/serotype 1 2 3 4 5	N/A	N/A	 54 6 19 7 1
Etiology	Alcohol (5) Autoimmune (13) Metabolic (4) No lesion (7) Others (0)	HBV	HCV
METAVIR score Activity (A0-A3), mean±sd (range) Fibrosis (F0-F4), mean±sd (range)	 0.66±0.8 (0-2) 1.6±1.2 (1-2)	 1.0±0.9 (0-3) 1.7±0.9 (0-3)	 1.4±0.7 (0-3) 2.4±1.0 (0-4)
Transaminases, N, mean±sd (range)	1.4 N±0.4 (1-2N)	2.6±2.2 (1-7N)	2.1 N±1.3 (1-8N)
ALT, IU/L, mean±sd (range)	N/A	N/A	N/A
AST, IU/L, mean±sd (range)	N/A	N/A	N/A

Suppl. Table 2. Antibodies used.

Antigen	Ig Species	Cat. Number & supplier	Antibody registry (RRID) #
Beta-actin	Mouse monoclonal	sc-8432, Santa Cruz	AB_626630
Netrin-1	Rabbit monoclonal	Ab126729, Abcam	AB_11131145
Netrin-1	Mouse monoclonal (humanized)	NP137, Netris Pharma	AB_2811180
RIG-I	Mouse monoclonal	sc-376845, Santa Cruz	AB_2732794
PDI	Mouse monoclonal	sc-74551, Santa Cruz	AB_2156462
Caspase-3	Rabbit polyclonal	9662, Cell Signaling	AB_331439
Human isotype control	Mouse monoclonal (humanized)	NP001, Netris Pharma	N/A
Anti-mouse-HRP	Goat polyclonal	A4416, Sigma	AB_258167
Anti-Rabbit-HRP	Goat polyclonal	A6154, Sigma	AB_258284
Anti-goat-HRP	Rabbit polyclonal	A8919, Sigma	AB_258425

Suppl. Table 3. Human and mouse qPCR primers

Gene symbol	Genbank acc. #	Primer sequences (5' to 3')	PCR conditions	Amplicon length, bp
NTN1 (human)	NM_004822.3	CTTCTGCGGCAGGCGGACAGAT ACGCGTTGCAGAGGTGGCACGA	Denaturation, 95°C; annealing, 65°C, 3-step, 10% DMSO	385
NTN1 (human)	NM_004822.3 (pre mRNA)	GGTAAAGTCCCGAACGCGG AAGTTTCGGGCGCAGGAGAG	Denaturation, 95°C; annealing, 55°C	133
GUS1 (human)	NM_001293105	CGTGGTTGGAGAGCTCATTTGGAA TTCCCCAGCACTCTCGTCGGT	Denaturation, 95°C; annealing, 55°C	72
NTN1 (mouse)	NM_008744.2	CCTGTCACCTCTGCAACTCT TGTGCGGGTTATTGAGGTCG	Denaturation, 95°C; annealing, 55°C	78
GUS1 (mouse)	NM_010368.1	GTGGTATGAACGGGAAGCAAT AACTGCATAATAATGGGCACTGT	Denaturation, 95°C; annealing, 55°C	97

References

1. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2012;142(6):1264-73 e1. Epub 2012/04/28. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.061. PubMed PMID: 22537432; PubMed Central PMCID: PMC3338949.
2. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2011;25(2):195-206. Epub 2011/04/19. doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.005. PubMed PMID: 21497738; PubMed Central PMCID: PMC3079877.
3. Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. Cell. 1994;78(3):425-35. Epub 1994/08/12. PubMed PMID: 8062385.

4. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. Cell. 1994;78(3):409-24. Epub 1994/08/12. PubMed PMID: 8062384.
5. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature. 2004;431(7004):80-4. Epub 2004/09/03. doi: 10.1038/nature02788. PubMed PMID: 15343335.
6. Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(12):4850-5. Epub 2008/03/21. doi: 10.1073/pnas.0709810105. PubMed PMID: 18353983; PubMed Central PMCID: PMC2290782.
7. Paradisi A, Maisse C, Bernet A, Coissieux MM, Maccarrone M, Scoazec JY, et al. NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. Gastroenterology. 2008;135(4):1248-57. Epub 2008/08/12. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.080. PubMed PMID: 18692059.
8. Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, Bousquet C, et al. Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. Gastroenterology. 2010;138(4):1595-606, 606 e1-8. Epub 2010/01/19. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.061. PubMed PMID: 20080097.
9. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. The EMBO journal. 2001;20(11):2715-22. Epub 2001/06/02. doi: 10.1093/emboj/20.11.2715. PubMed PMID: 11387206; PubMed Central PMCID: PMC125255.
10. Thiebault K, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly MO, Scoazec JY, et al. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(7):4173-8. Epub 2003/03/26. doi: 10.1073/pnas.0738063100. PubMed PMID: 12655055; PubMed Central PMCID: PMC153067.
11. Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, et al. The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. The EMBO journal. 2005;24(6):1192-201. Epub 2005/02/25. doi: 10.1038/sj.emboj.7600584. PubMed PMID: 15729359; PubMed Central PMCID: PMC556396.
12. Mille F, Llambi F, Guix C, Delloye-Bourgeois C, Guenebeaud C, Castro-Obregon S, et al. Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. Cell death and differentiation. 2009;16(10):1344-51. Epub 2009/06/23. doi: 10.1038/cdd.2009.75. PubMed PMID: 19543238; PubMed Central PMCID: PMC2841642.
13. Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, et al. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. Molecular cell. 2010;40(6):863-76. Epub 2010/12/22. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.021. PubMed PMID: 21172653.
14. Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, et al. Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. EMBO Mol Med. 2013;5(12):1821-34. Epub 2013/12/03. doi: 10.1002/emmm.201302654. PubMed PMID: 24293316.
15. Plissonnier ML, Lahlali T, Raab M, Michelet M, Romero-Lopez C, Rivoire M, et al. Reciprocal antagonism between the netrin-1 receptor uncoordinated-phenotype-5A

(UNC5A) and the hepatitis C virus. Oncogene. 2017;36(48):6712-24. Epub 2017/08/08. doi: 10.1038/onc.2017.271. PubMed PMID: 28783179.
16. Plissonnier ML, Lahlali T, Michelet M, Lebosse F, Cottarel J, Beer M, et al. Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Mutual Amplification between Netrin-1 and the Hepatitis C Virus. PLoS Biol. 2016;14(3):e1002421. Epub 2016/04/01. doi: 10.1371/journal.pbio.1002421. PubMed PMID: 27031829.
17. Lahlali T, Plissonnier ML, Romero-Lopez C, Michelet M, Ducarouge B, Berzal-Herranz A, et al. Netrin-1 Protects Hepatocytes Against Cell Death Through Sustained Translation During the Unfolded Protein Response. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2016;2(3):281-301 e9. Epub 2017/02/09. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.12.011. PubMed PMID: 28174720; PubMed Central PMCID: PMCPMC5042567.
18. van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhelawon B, Ray TD, Rayner KJ, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. Nat Immunol. 2012;13(2):136-43. Epub 2012/01/11. doi: 10.1038/ni.2205. PubMed PMID: 22231519; PubMed Central PMCID: PMC3262880.
19. Rosenberger P, Schwab JM, Mirakaj V, Masekowsky E, Mager A, Morote-Garcia JC, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. Nat Immunol. 2009;10(2):195-202. Epub 2009/01/06. doi: 10.1038/ni.1683. PubMed PMID: 19122655.
20. Mirakaj V, Thix CA, Laucher S, Mielke C, Morote-Garcia JC, Schmit MA, et al. Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181(8):815-24. Epub 2010/01/16. doi: 10.1164/rccm.200905-0717OC. PubMed PMID: 20075388.
21. Aherne CM, Collins CB, Masterson JC, Tizzano M, Boyle TA, Westrich JA, et al. Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis. Gut. 2012;61(5):695-705. Epub 2011/08/05. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300012. PubMed PMID: 21813473; PubMed Central PMCID: PMC3322588.
22. Schlegel M, Kohler D, Korner A, Granja T, Straub A, Giera M, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 controls resolution programs and promotes liver regeneration. Hepatology. 2015. Epub 2015/11/18. doi: 10.1002/hep.28347. PubMed PMID: 26573873.
23. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu Rev Nutr. 1996;16:179-203. Epub 1996/01/01. doi: 10.1146/annurev.nu.16.070196.001143. PubMed PMID: 8839925.
24. Lecluyse EL, Alexandre E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. Methods Mol Biol. 2010;640:57-82. Epub 2010/07/21. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_3. PubMed PMID: 20645046.
25. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat Protoc. 2008;3(7):1125-31. Epub 2008/07/05. doi: 10.1038/nprot.2008.75. PubMed PMID: 18600217.
26. Stephens SB, Nicchitta CV. In vitro and tissue culture methods for analysis of translation initiation on the endoplasmic reticulum. Methods Enzymol. 2007;431:47-60. Epub 2007/10/10. doi: 10.1016/S0076-6879(07)31004-5. PubMed PMID: 17923230.
27. Stephens SB, Dodd RD, Lerner RS, Pyhtila BM, Nicchitta CV. Analysis of mRNA partitioning between the cytosol and endoplasmic reticulum compartments of mammalian cells. Methods Mol Biol. 2008;419:197-214. Epub 2008/03/29. doi: 10.1007/978-1-59745-033-1_14. PubMed PMID: 18369985.

28. Parent R, Marion MJ, Furio L, Trepo C, Petit MA. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. Gastroenterology. 2004;126(4):1147-56. Epub 2004/04/02. PubMed PMID: 15057753.
29. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. Nature. 2008;454(7203):523-7. Epub 2008/06/13. doi: 10.1038/nature07106. PubMed PMID: 18548002; PubMed Central PMCID: PMCPMC2856441.
30. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. Immunity. 2015;42(1):123-32. Epub 2015/01/06. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.016. PubMed PMID: 25557055.
31. Maire M, Parent R, Morand AL, Alotte C, Trepo C, Durantel D, et al. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. Biochemical and biophysical research communications. 2008;368(3):556-62. Epub 2008/02/09. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.123. PubMed PMID: 18258184.
32. Siu KL, Lotz C, Ping P, Cai H. Netrin-1 abrogates ischemia/reperfusion-induced cardiac mitochondrial dysfunction via nitric oxide-dependent attenuation of NOX4 activation and recoupling of NOS. J Mol Cell Cardiol. 2015;78:174-85. Epub 2014/07/30. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.07.005. PubMed PMID: 25066694; PubMed Central PMCID: PMCPMC4268247.
33. Binet F, Mawambo G, Sitaras N, Tetreault N, Lapalme E, Favret S, et al. Neuronal ER stress impedes myeloid-cell-induced vascular regeneration through IRE1alpha degradation of netrin-1. Cell Metab. 2013;17(3):353-71. Epub 2013/03/12. doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.003. PubMed PMID: 23473031.
34. Rajasundari A, Pays L, Mehlen P, Ramesh G. Netrin-1 overexpression in kidney proximal tubular epithelium ameliorates cisplatin nephrotoxicity. Lab Invest. 2011;91(12):1717-26. Epub 2011/08/31. doi: 10.1038/labinvest.2011.126. PubMed PMID: 21876536; PubMed Central PMCID: PMCPMC3411324.
35. Barnault R, Lahlali T, Plissonnier ML, Romero-Lopez C, Laverdure N, Ducarouge B, et al. Hepatocellular carcinoma-associated depletion of the netrin-1 receptor Uncoordinated Phenotype-5A (UNC5A) skews the hepatic unfolded protein response towards prosurvival outcomes. Biochem Biophys Res Commun. 2018;495(4):2425-31. Epub 2017/12/27. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.129. PubMed PMID: 29277614.
36. Reid DW, Nicchitta CV. Primary role for endoplasmic reticulum-bound ribosomes in cellular translation identified by ribosome profiling. J Biol Chem. 2012;287(8):5518-27. Epub 2011/12/27. doi: 10.1074/jbc.M111.312280. PubMed PMID: 22199352; PubMed Central PMCID: PMCPMC3285328.
37. Chen Q, Jagannathan S, Reid DW, Zheng T, Nicchitta CV. Hierarchical regulation of mRNA partitioning between the cytoplasm and the endoplasmic reticulum of mammalian cells. Mol Biol Cell. 2011;22(14):2646-58. Epub 2011/05/27. doi: 10.1091/mbc.E11-03-0239. PubMed PMID: 21613539; PubMed Central PMCID: PMCPMC3135488.
38. Hoffman AM, Chen Q, Zheng T, Nicchitta CV. Heterogeneous translational landscape of the endoplasmic reticulum revealed by ribosome proximity labeling and transcriptome analysis. J Biol Chem. 2019;294(22):8942-58. Epub 2019/04/21. doi: 10.1074/jbc.RA119.007996. PubMed PMID: 31004035; PubMed Central PMCID: PMCPMC6552412.
39. Huang MT. Harringtonine, an inhibitor of initiation of protein biosynthesis. Mol Pharmacol. 1975;11(5):511-9. Epub 1975/09/01. PubMed PMID: 1237080.

40. Boncompain G, Perez F. Fluorescence-based analysis of trafficking in mammalian cells. Methods Cell Biol. 2013;118:179-94. Epub 2013/12/04. doi: 10.1016/B978-0-12-417164-0.00011-2. PubMed PMID: 24295307.
41. Leclere L, Rentzsch F. Repeated evolution of identical domain architecture in metazoan netrin domain-containing proteins. Genome Biol Evol. 2012;4(9):883-99. Epub 2012/07/21. doi: 10.1093/gbe/evs061. PubMed PMID: 22813778; PubMed Central PMCID: PMCPMC3516229.
42. Paradisi A, Maisse C, Coissieux MM, Gadot N, Lepinasse F, Delloye-Bourgeois C, et al. Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;106(40):17146-51. Epub 2009/09/02. doi: 10.1073/pnas.0901767106. PubMed PMID: 19721007; PubMed Central PMCID: PMC2761333.
43. El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2008;134(6):1752-63. Epub 2008/05/13. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.090
S0016-5085(08)00426-5 [pii]. PubMed PMID: 18471552.
44. Parent R, Beretta L. Translational control plays a prominent role in the hepatocytic differentiation of HepaRG liver progenitor cells. Genome Biol. 2008;9(1):R19. Epub 2008/01/29. doi: 10.1186/gb-2008-9-1-r19. PubMed PMID: 18221535; PubMed Central PMCID: PMC2395229.
45. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. Clin Cancer Res. 2004;10(24):8421-5. Epub 2004/12/30. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0941. PubMed PMID: 15623621.
46. Parent R, Kolippakkam D, Booth G, Beretta L. Mammalian target of rapamycin activation impairs hepatocytic differentiation and targets genes moderating lipid homeostasis and hepatocellular growth. Cancer Research. 2007;67(9):4337-45. Epub 2007/05/08. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-3640. PubMed PMID: 17483347.
47. Pelletier J, Sonenberg N. The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. Annu Rev Biochem. 2019;88:307-35. Epub 2019/06/22. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111042. PubMed PMID: 31220979.
48. Hong S, Freeberg MA, Han T, Kamath A, Yao Y, Fukuda T, et al. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. Elife. 2017;6. Epub 2017/06/27. doi: 10.7554/eLife.25237. PubMed PMID: 28650797; PubMed Central PMCID: PMCPMC5484620.
49. Mura M, Hopkins TG, Michael T, Abd-Latip N, Weir J, Aboagye E, et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. Oncogene. 2015;34(39):5025-36. Epub 2014/12/23. doi: 10.1038/onc.2014.428. PubMed PMID: 25531318; PubMed Central PMCID: PMC4430325.
50. He G, Karin M. NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. Cell Res. 2011;21(1):159-68. Epub 2010/12/29. doi: 10.1038/cr.2010.183. PubMed PMID: 21187858; PubMed Central PMCID: PMCPMC3193410.
51. Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chedotal A. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? Nat Rev Cancer. 2011;11(3):188-97. Epub 2011/02/18. doi: 10.1038/nrc3005. PubMed PMID: 21326323.
52. Romanowski T, Sikorska K, Bielawski KP. GUS and PMM1 as suitable reference genes for gene expression analysis in the liver tissue of patients with chronic hepatitis. Med Sci Monit. 2008;14(7):BR147-52. Epub 2008/07/02. PubMed PMID: 18591914.

9 Discussion

Au sein de notre groupe d'accueil au laboratoire, les phénomènes biologiques développés tout au long de cette thèse, et étudiés au cours des dernières années, semblent démontrer pour la nétrine-1 un rôle pro-carcinogène au travers de différents aspects.

Il a été montré plus tôt que la nétrine-1 est surexprimée lors de la cirrhose en général (Plissonnier et al., 2016)(Plissonnier et al., 2016), que sa traduction est sélectivement favorisée lors de la réponse UPR, et qu'elle a un rôle protecteur contre l'apoptose induite par cette même réponse UPR (Lahlali et al., 2016)(Lahlali et al., 2016).

En parallème de ce maintien de taux de nétrine-1 élevés, nous avons mis en évidence une chute de la quantité du récepteur UNC5A, impliqué dans la signalisation apoptotique (Barnault et al., 2018)(Barnault et al., 2018). Ces deux voies de régulation favorisent toutes les deux une orientation des cellules vers la survie, plutôt que l'apoptose, ceci dans un microenvironnement pouvant favoriser l'évolution des cellules en cellules tumorales

En effet, on se trouve ici dans un environnement dans lequel on trouve :

- Des facteurs de croissance (impliqués dans la régénération tissulaire)
- Des cytokines pro-inflammatoires
- Des signaux de dangers
- Une matrice extracellulaire atypique et moins propice à la différenciation
- De la nétrine-1

Tous ces éléments entretiennent une boucle très favorable à la transformation des cellules en cellules cancéreuses. D'un côté, la mort de cellules et l'activation de l'inflammation va encourager la prolifération cellulaire afin de réparer le tissu hépatique lésé, quel qu'en soit la cause. D'un autre côté, cet environnement contenant des facteur pro-carcinogènes tel que l'IL-6, et à un stade avancé, le TGFβ, ainsi que des molécules réactives capables d'endommager l'ADN du fait de perturbations métaboliques, en plus de la nétrine-1 anti-apoptotique, semble rassembler plusieurs éléments propices à la transformation de cellules saines en cellules tumorales.

Les récepteurs à dépendance tel qu'UNC5A sont capables d'activer la mort par apoptose en absence de leurs ligands, ici la nétrin-1. La diminution de l'expression du récepteur UNC5A (Barnault et al., 2018) et la surexpression de la nétrine-1 dans les hépatocytes en contexte de

stress du réticulum endoplasmique (Lahlali et al., 2016)(Lahlali et al., 2016)semble montrer ici que le couple UNC5A/nétrine-1 est impliqué dans la régulation des processus de mort cellulaire chez l'adulte. En effet, ces deux régulations inversées participent, dans un contexte pathologique, mais néanmoins physiologique, à protéger les cellules d'une mort par apoptose prématurée. Dans un contexte pathologique chronique de maladie hépatique, la surexpression de la nétrine-1 protéine sécrétée, peut avoir des effets autocrines et paracrines importants, à la différence de l'inhibition du récepteur qui n'aura un impact que sur la cellule en question en inhibant la signalisation pro-apoptotique.

Bien que les effets biologiques de la nétrine-1 soient étudiés dans des contextes pathologiques variés, sa régulation reste cependant très peu étudiée. Malgré l'absence de cartographie du promoteur, différents facteurs de transcription ont été décrits comme activateur de la transcription de la nétrin-1. Parmi ces facteurs de transcription, on retrouve NF-κB, plateforme importante des réactions inflammatoires. Ce facteur est en effet capable de diriger la transcription de nombreux gène impliqués dans l'inflammation et la survie cellulaire. (Paradisi et al., 2008). La nétrine-1 a également été décrite pour réguler des réactions inflammatoires hépatiques, notamment durant la phase de résolution de l'inflammation (Mirakaj et al., 2014)(Mirakaj et al., 2014). La nétrine-1 ferait alors partie de l'arsenal de résolvines impliquées dans l'inhibition de la réponse inflammatoire et la réparation tissulaire, permettant de retrouver l'homéostasie du tissu lésé. A court terme, ce scénario semble tout à fait possible, et la nétrine-1 peut effectivement jouer un rôle d'inhibition de l'inflammation dans un contexte aigu. En revanche, les pathologies hépatiques deviennent souvent chroniques, du fait de la cicatrisation tissulaire entrainant de la fibrose. L'inflammation devient alors elle aussi chronique, qu'il y ait une infection virale ou non. La nétrine-1, dans ce contexte, semble surexprimée, et acquiert alors des propriétés pro-carcinogène du fait de sa signalisation anti-apoptotique.

De plus, la nétrine-1 est également sélectivement favorisée d'un point de vue traductionnel dans un contexte de stress du réticulum endoplasmique. Ce phénomène est démontré comme inducteur d'inflammation. L'inflammation, réponse qui nécessite la biosynthèse de grandes quantité de cytokines et d'autre protéines adaptatrices cytosoliques, peut également induire un stress du réticulum endoplasmique. Ces deux phénomènes, largement décrits et présents

dans les pathologies hépatiques chroniques concourent tous les deux à la surexpression de la nétrine-1.

De façon surprenante, l'inflammation et l'UPR semble réguler la nétrine-1 durant sa phase traductionnelle. Sa transcription ne semble pas touchée par une quelconque régulation, comme son transcrit, sauf chez les patients, suggérant des mécanismes d'induction variables d'un type de cellules hépatiques à l'autre, et/ou pour des raisons de zonation du foie. La principale voie de régulation de l'expression de la nétrine-1 semble la traduction. Elle peut être régulée de différentes façons. Dans un contexte d'UPR, qui entraîne une inhibition globale de la traduction, l'IRES du transcrit de la nétrin-1 est responsable du maintien de sa traduction. En contexte inflammatoire en revanche, il semble que la localisation du transcrit dans la cellule, modifiant sa prise en charge par les ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique, soit régulé.

Dans un contexte infectieux, les taux de nétrine-1 sont également surexprimés. De la même façon que décrite précédemment, la surexpression de la protéine est régulée au niveau de sa traduction. De plus, il a été montré que ces taux élevés de ligands assurent un certain avantage au virus puisqu'ils participent à augmenter l'infectivité du virus de l'hépatite C.(Plissonnier et al., 2016). En plus de participer à l'inhibition de l'apoptose des cellules hépatiques en contexte de stress, la nétrine-1 a un rôle pro-viral lors d'infection par le virus de l'hépatite C.

La nétrine-1 est surexprimée dans de nombreux cancers, et son rôle anti-apoptotique a été démontré a de nombreuses reprises. C'est alors devenu une cible intéressante, permettant la restauration d'une apoptose physiologique si elle est inhibée, ou qu'elle est incapable de signaler via les récepteurs à dépendance. Un essai clinique, visant à montrer l'efficacité d'un anticorps anti-nétrine-1 (NP137) (Grandin et al., 2016) s'est terminé récemment. On pourrait penser d'après tous les éléments précédents, que l'inhibition de la nétrin-1 au cours des pathologies chroniques pourrait restaurer une apoptose physiologique dans l'organe, et ainsi éviter l'apparition d'hépatocarcinome.

La croissance de l'hépatocarcinome dépend de la néo angiogenèse, de l'inflammation, et d'une inhibition pathologique de l'apoptose cellulaire. Dans ce contexte, la nétrine-1 semble également une cible de choix.

L'inflammation est une réaction qui permet, lorsqu'elle ne devient pas pathologique de restaurer l'homéostasie du tissu. Différents facteurs sont impliqués dans l'élimination des déchets tissulaires, et la régénération de tissu sain. Les phénomènes apoptotiques sont importants dans ce type de réponse, et nous avons montré qu'une protéine anti-apoptotique était surexprimée dans un tel contexte. La nétrine-1 a également été décrite dans d'autre pathologie pour réguler l'inflammation. Tantôt pro-inflammatoire(van Gils et al., 2012; Ramkhelawon et al., 2014), parfois anti-inflammatoire (Aherne et al., 2012; Mirakaj et al., 2014; Podjaski et al., 2015; Ranganathan, 2013), son rôle n'est pas encore bien identifié.

Dans le foie, la nétrine-1 a été décrite précédemment comme anti-inflammatoire dans un contexte d'inflammation aigue. En contexte chronique, ou l'inflammation est entretenue par le microenvironnement pro-inflammatoire, la nétrine-1 semble être surexprimée pendant de longue périodes, et pourrait avoir un rôle pro-carcinogène.

Dans ce contexte, il devient nécessaire d'appréhender le rôle exact que la nétrine-1 exerce sur l'inflammation. En effet, cibler la nétrine-1 dans les maladies chroniques du foie peut d'un côté rétablir une apoptose physiologique, mais pourrait alors aussi inhiber la résolution de l'inflammation et entretenir un terrain pro-carcinogène de par la présence de facteurs de croissance et de cytokines.

Les résultats de l'étude clinique en cours avec l'anticorps NP137 apporteront des informations vis-à-vis de l'effet de la nétrine-1 sur l'inflammation. Dans un contexte hépatique, il sera possible de mesurer un possible effet pro ou anti-inflammatoire du traitement dans un contexte de pathologies inflammatoire chronique. De même, les données relatives à son efficacité antitumorale nous permettra d'appréhender avec plus d'exactitude le rôle de la nétrine-1, à propos de son activité anti-apoptotique principalement.

Ce travail de thèse apporte finalement des éléments intéressants sur le rôle physiologique de la nétrine-1 chez l'adulte. Le fait qu'elle soit modulée dans différentes pathologies et dans différents organes fait d'elle un régulateur de l'apoptose cellulaire à juste titre. Son implication dans les pathologies inflammatoires, notamment hépatique ou elle semble avoir un rôle anti-apoptotique d'une part, et régulateur de l'inflammation d'une autre part en fait une cible intéressante pour la prévention, voire le traitement des hépatocarcinomes.

10 Perspectives

L'inflammation semble réguler la nétrine-1 au niveau de sa traduction. Différentes expériences visant à montrer à court terme que l'inflammation est effectivement et si possible spécifiquement impliquée dans l'augmentation de la traduction de la nétrine-1 reste encore à réaliser.

La localisation du transcrit de la nétrine-1 dans la cellule semble impliqué dans sa surexpression. Quels sont les facteurs impliqués dans cette modification de localisation du transcrit ? Ces facteurs sont-ils induits lors de l'inflammation, ou activés par certaines voies de signalisation telle que la voie NF-κB ? Un criblage par ARN interférents de différentes cibles impliquées dans la régulation de la localisation des transcrits est actuellement en cours afin d'apporter des explications mécanistiques à l'observation de ce phénotype.

Afin de comprendre dans quelle mesure l'inflammation régule l'expression de nétrine-1, nous souhaitons mettre en place des méthodes indépendantes permettant de quantifier directement l'augmentation de la transcription. La méthode SILAC (Schwanhäusser et al., 2009)(Schwanhäusser et al., 2009) permet de quantifier précisément l'activité traductionnelle mise en jeu lors de la surexpression de la nétrine-1. L'incorporation d'acides aminés composés d'isotopes stables du carbone et de l'azote nous permet, après immun précipitation de nétrine-1 et spectrométrie de masse, de quantifier la nétrine-1 traduite durant le pulse d'acides aminés alourdi, dans un contexte inflammatoire ou non. Un technique visant à observer un résultat similaire est actuellement en cours de mise au point dans le laboratoire. Un pulse de puromycine entraine l'incorporation de puromycine dans les transcrit en cours de traduction. Une immuno-précipitaion de la nétrine-1, et la révélation du western-blot avec un anticorps anti-puromycine nous permettrait d'appréhender directement le degré d'implication de la traduction.

Finalement, la quantité de nétrine-1 observée dépend de l'intensité de production, de sécrétion, et de dégradation. La demi-vie de la protéine est actuellement en cours d'étude afin de vérifier qu'elle n'est pas altérée durant l'inflammation.

11 Bibliographie

Abhari, B.A., McCarthy, N., Le Berre, M., Kilcoyne, M., Joshi, L., Agostinis, P., and Fulda, S. (2019). Smac mimetic suppresses tunicamycin-induced apoptosis via resolution of ER stress. Cell Death Dis. *10*.
Aherne, C.M., Collins, C.B., Masterson, J.C., Tizzano, M., Boyle, T.A., Westrich, J.A., Parnes, J.A., Furuta, G.T., Rivera-Nieves, J., and Eltzschig, H.K. (2012). Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis. Gut *61*, 695–705.
Ankcorn, M.J., and Tedder, R.S. (2017). Hepatitis E: the current state of play. Transfus. Med. *27*, 84–95.
Arakawa, H. (2004). Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer *4*, 978–987.
Barnault, R., Lahlali, T., Plissonnier, M.-L., Romero-López, C., Laverdure, N., Ducarouge, B., Rivoire, M., Mehlen, P., Zoulim, F., and Parent, R. (2018). Hepatocellular carcinoma-associated depletion of the netrin-1 receptor Uncoordinated Phenotype-5A (UNC5A) skews the hepatic unfolded protein response towards prosurvival outcomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *495*, 2425–2431.
Bedossa, P. (1996). An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *24*, 5.
Bordeaux, M.-C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D.E., Edery, P., and Mehlen, P. (2000). The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. EMBO J. *19*, 4056–4063.
Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M.A., Kriauciunas, K., and Kahn, C.R. (2010). A Kinase-Independent Role for Unoccupied Insulin and IGF-1 Receptors in the Control of Apoptosis. Sci. Signal. *3*, ra87.
Boyer, N.P., and Gupton, S.L. (2018). Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons). Front. Cell. Neurosci. *12*.
Chan, A.H., and Schroder, K. (2019). Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. J. Exp. Med.
Chan, C.-P., Kok, K.-H., Tang, H.-M.V., Wong, C.-M., and Jin, D.-Y. (2013). Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1833*, 2165–2175.
Cho, E.-J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. Genes Dev. *11*, 3319–3326.
Corsi, J.-M., Houbron, C., Billuart, P., Brunet, I., Bouvrée, K., Eichmann, A., Girault, J.-A., and Enslen, H. (2009). Autophosphorylation-independent and -dependent Functions of Focal Adhesion Kinase during Development. J. Biol. Chem. *284*, 34769–34776.
Cotter, T.G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. Nat. Rev. Cancer *9*, 501–507.
Crispe, I.N. (2009). The Liver as a Lymphoid Organ. Annu. Rev. Immunol. *27*, 147–163.
Crispe, I.N. (2011). Liver Antigen-Presenting Cells. J. Hepatol. *54*, 357–365.
Delcros, J.-G., and Mehlen, P. (2013). Dependence receptors: life or death choices. Bull. Cancer (Paris) *100*, 1261–1274.
DeLeve, L.D., and Maretti-Mira, A.C. (2017). Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. Semin. Liver Dis. *37*, 377–387.
Delloye-Bourgeois, C., Goldschneider, D., Paradisi, A., Therizols, G., Belin, S., Hacot, S., Rosa-Calatrava, M., Scoazec, J.-Y., Diaz, J.-J., Bernet, A., et al. (2012). Nucleolar Localization of a Netrin-1 Isoform Enhances Tumor Cell Proliferation. Sci. Signal. *5*, ra57–ra57.

Delloye-Bourgeois, C., Gibert, B., Rama, N., Delcros, J.-G., Gadot, N., Scoazec, J.-Y., Krauss, R., Bernet, A., and Mehlen, P. (2013). Sonic Hedgehog Promotes Tumor Cell Survival by Inhibiting CDON Pro-Apoptotic Activity. PLoS Biol. *11*.
El-Agroudy, N.N., Kurzbach, A., Rodionov, R.N., O'Sullivan, J., Roden, M., Birkenfeld, A.L., and Pesta, D.H. (2019). Are Lifestyle Therapies Effective for NAFLD Treatment? Trends Endocrinol. Metab. *30*, 701–709.
Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M., and Mehlen, P. (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. Nature *417*, 443–447.
Fraser, C.S., and Doudna, J.A. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 29–38.
Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., and Sommer, T. (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. Nat. Cell Biol. *2*, 379–384.
Furne, C., Ricard, J., Cabrera, J.R., Pays, L., Bethea, J.R., Mehlen, P., and Liebl, D.J. (2009). EphrinB3 is an Anti-apoptotic Ligand that Inhibits the Dependence Receptor Functions of EphA4 Receptors during adult neurogenesis. Biochim. Biophys. Acta *1793*, 231–238.
Gäbele, E., Mühlbauer, M., Dorn, C., Weiss, T.S., Froh, M., Schnabl, B., Wiest, R., Schölmerich, J., Obermeier, F., and Hellerbrand, C. (2008). Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *376*, 271–276.
Gibert, B., and Mehlen, P. (2015). Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. Cancer Res. *75*, 5171–5175.
van Gils, J.M., Derby, M.C., Fernandes, L.R., Ramkhelawon, B., Ray, T.D., Rayner, K.J., Parathath, S., Distel, E., Feig, J.L., Alvarez-Leite, J.I., et al. (2012). The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. Nat. Immunol. *13*, 136–143.
Grandin, M., Meier, M., Delcros, J.G., Nikodemus, D., Reuten, R., Patel, T.R., Goldschneider, D., Orriss, G., Krahn, N., Boussouar, A., et al. (2016). Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. Cancer Cell *29*, 173–185.
Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V., et al. (2010). The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase. Mol. Cell *40*, 863–876.
Guicciardi, M.E., Malhi, H., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2013). Apoptosis and Necrosis in the Liver. Compr. Physiol. *3*.
Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S., and Ushio, Y. (2001). A Role of Netrin-1 in the Formation of the Subcortical Structure Striatum: Repulsive Action on the Migration of Late-Born Striatal Neurons. J. Neurosci. *21*, 4272–4280.
Hedgecock, E. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 Genes Guide Circumferential Migrations of Pioneer Axons and Mesodermal Cells on the Epidermis in C. elegans. Neuron.
Higashi, T., Friedman, S.L., and Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Adv. Drug Deliv. Rev. *121*, 27–42.
Hsieh, C.-C. (2015). Hepatic immune tolerance induced by hepatic stellate cells. World J. Gastroenterol. *21*, 11887.
Ingolia, N.T., Lareau, L.F., and Weissman, J.S. (2011). Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity of Mammalian Proteomes. Cell *147*, 789–802.
Jiang, Y., Liu, M., and Gershon, M.D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. Dev. Biol. *258*, 364–384.
Jiao, J., Sastre, D., Isabel Fiel, M., Lee, U.E., Ghiassi-Nejad, Z., Ginhoux, F., Vivier, E.,

Friedman, S.L., Merad, M., and Aloman, C. (2012). Dendritic Cell Regulation of Carbon Tetrachloride-induced Murine Liver Fibrosis Regression. Hepatol. Baltim. Md *55*, 244–255.
Jordan, B.W.M., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Götz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S., and Rapp, U.R. (2001). Neurotrophin Receptor-interacting Mage Homologue Is an Inducible Inhibitor of Apoptosis Protein-interacting Protein That Augments Cell Death. J. Biol. Chem. *276*, 39985–39989.
Kalani, A. (2019). A high methionine, low folate and vitamin B6/B12 containing diet can be associated with memory loss by epigenetic silencing of netrin-1. Neural Regen Res.
Knell, J. (1980). Liver Function and Failure. *14*, 4.
Korf, H., Boesch, M., Meelberghs, L., and van der Merwe, S. (2019). Macrophages as Key Players during Adipose Tissue–Liver Crosstalk in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Semin. Liver Dis. *39*, 291–300.
Krenkel, O., and Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. Nat. Rev. Immunol. *17*, 306–321.
Kroemer, G. (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. Biochem. Biophys. Res. Commun. *304*, 433–435.
Kubes, P., and Mehal, W.Z. (2012). Sterile Inflammation in the Liver. Gastroenterology *143*, 1158–1172.
Kulik, L., and El-Serag, H.B. (2019). Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology *156*, 477-491.e1.
Lade, A., Noon, L.A., and Friedman, S.L. (2014). Contributions of metabolic dysregulation and inflammation to nonalcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, and cancer. Curr. Opin. Oncol. *26*, 100–107.
Lahlali, T., Plissonnier, M.-L., Romero-López, C., Michelet, M., Ducarouge, B., Berzal-Herranz, A., Zoulim, F., Mehlen, P., and Parent, R. (2016). Netrin-1 Protects Hepatocytes Against Cell Death Through Sustained Translation During the Unfolded Protein Response. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. *2*, 281-301.e9.
Lawrence, M.C., McGlynn, K., Park, B.-H., and Cobb, M.H. (2005). ERK1/2-dependent Activation of Transcription Factors Required for Acute and Chronic Effects of Glucose on the Insulin Gene Promoter. J. Biol. Chem. *280*, 26751–26759.
LeCluyse, E.L., and Alexandre, E. (2010). Isolation and Culture of Primary Hepatocytes from Resected Human Liver Tissue. In Hepatocytes, P. Maurel, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 57–82.
Leung-Hagesteijn, C. (1992). UNC-5, a Transmembrane Protein with Immunoglobulin and Thrombospondin Type 1 Domains, Guides Cell and Pioneer Axon Migrations in C. elegans. Cell.
Levrero, M., Subic, M., Villeret, F., and Zoulim, F. (2018). Perspectives and limitations for nucleo(t)side analogs in future HBV therapies. Curr. Opin. Virol. *30*, 80–89.
Li, K., Li, N.L., Wei, D., Pfeffer, S.R., Fan, M., and Pfeffer, L.M. (2012). Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. Hepatology *55*, 666–675.
Li, W., Lee, J., Vikis, H.G., Lee, S.-H., Liu, G., Aurandt, J., Shen, T.-L., Fearon, E.R., Guan, J.-L., Han, M., et al. (2004). Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. Nat. Neurosci. *7*, 1213–1221.
Licandro, G., Khor, H.L., Beretta, O., Lai, J., Derks, H., Laudisi, F., Conforti-Andreoni, C., Qian, H.L., Teng, G.G., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2013). The NLRP3 inflammasome affects DNA damage responses after oxidative and genotoxic stress in dendritic cells. Eur. J. Immunol. *43*, 2126–2137.
Liu, G., Beggs, H., Jürgensen, C., Park, H.-T., Tang, H., Gorski, J., Jones, K.R., Reichardt,

L.F., Wu, J., and Rao, Y. (2004). Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. Nat. Neurosci. *7*, 1222–1232.
Livesey, F.J., and Hunt, S.P. (1997). Netrin and Netrin Receptor Expression in the Embryonic Mammalian Nervous System Suggests Roles in Retinal, Striatal, Nigral, and Cerebellar Development. Mol. Cell. Neurosci. *8*, 417–429.
Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. EMBO J. *20*, 2715–2722.
Llambi, F., Lourenço, F.C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. EMBO J. *24*, 1192–1201.
Luchino, J., Hocine, M., Amoureux, M.-C., Gibert, B., Bernet, A., Royet, A., Treilleux, I., Lécine, P., Borg, J.-P., Mehlen, P., et al. (2013). Semaphorin 3E Suppresses Tumor Cell Death Triggered by the Plexin D1 Dependence Receptor in Metastatic Breast Cancers. Cancer Cell *24*, 673–685.
Malhi, H., and Kaufman, R.J. (2011). Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease. J. Hepatol. *54*, 795–809.
Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P.P., Mueller, B.K., Strittmatter, S.M., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. Nat. Cell Biol. *6*, 749–755.
McCartney, S., Vermi, W., Gilfillan, S., Cella, M., Murphy, T.L., Schreiber, R.D., Murphy, K.M., and Colonna, M. (2009). Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. J. Exp. Med. *206*, 2967–2976.
McDonald, B., and Kubes, P. (2016). Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. Gastroenterology *151*, 1087–1095.
Mehlen, P. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature.
Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? Nat. Rev. Cancer *11*, 188–197.
Meyerhardt, J.A., Caca, K., Eckstrand, B.C., Hu, G., Lengauer, C., Banavali, S., Look, A.T., and Fearon, E.R. (1999). Netrin-1: Interaction with Deleted in Colorectal Cancer (DCC) and Alterations in Brain Tumors and Neuroblastomas. Cell Growth Differ. *10*, 35.
Mirakaj, V., Dalli, J., Granja, T., Rosenberger, P., and Serhan, C.N. (2014). Vagus nerve controls resolution and pro-resolving mediators of inflammation. J. Exp. Med. *211*, 1037–1048.
Mourali, J., Bénard, A., Lourenço, F.C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P., et al. (2006). Anaplastic Lymphoma Kinase Is a Dependence Receptor Whose Proapoptotic Functions Are Activated by Caspase Cleavage. Mol. Cell. Biol. *26*, 6209–6222.
Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation. Exp. Cell Res. *256*, 12–18.
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.
Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., and Barde, Y.-A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. Nature *467*, 59–63.
Ohashi, H., Ishizaka, M., Hirai, N., and Miyamoto-Sato, E. (2013). Efficiency of puromycin-based technologies mediated by release factors and a ribosome recycling factor. Protein Eng. Des. Sel. *26*, 533–537.
Osiowy, C. (2018). From infancy and beyond… ensuring a lifetime of hepatitis B virus (HBV) vaccine-induced immunity. Hum. Vaccines Immunother. *14*, 2093–2097.

Panda, A.C., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2017). Polysome Fractionation to Analyze mRNA Distribution Profiles. Bio-Protoc. *7*.
Papadimitriou, J.M., and Petterson, D.S. (1976). The pathogenesis of lupinosis in the rat. J. Pathol. *118*, 35–47.
Paradisi, A., Maisse, C., Bernet, A., Coissieux, M., Maccarrone, M., Scoazec, J., and Mehlen, P. (2008). NF-κB Regulates Netrin-1 Expression and Affects the Conditional Tumor Suppressive Activity of the Netrin-1 Receptors. Gastroenterology *135*, 1248–1257.
Parent, R., Marion, M.-J., Furio, L., Trépo, C., and Petit, M.-A. (2004). Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line☆. Gastroenterology *126*, 1147–1156.
Petry, S., Weixlbaumer, A., and Ramakrishnan, V. (2008). The termination of translation. Curr. Opin. Struct. Biol. *18*, 70–77.
Picard, M., Petrie, R.J., Antoine-Bertrand, J., Saint-Cyr-Proulx, E., Villemure, J.-F., and Lamarche-Vane, N. (2009). Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth. Cell. Signal. *21*, 1961–1973.
Plissonnier, M.-L., Lahlali, T., Michelet, M., Lebossé, F., Cottarel, J., Beer, M., Neveu, G., Durantel, D., Bartosch, B., Accardi, R., et al. (2016). Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Mutual Amplification between Netrin-1 and the Hepatitis C Virus. PLoS Biol. *14*.
Plissonnier, M.-L., Lahlali, T., Raab, M., Michelet, M., Romero-López, C., Rivoire, M., Strebhardt, K., Durantel, D., Levrero, M., Mehlen, P., et al. (2017). Reciprocal antagonism between the netrin-1 receptor uncoordinated-phenotype-5A (UNC5A) and the hepatitis C virus. Oncogene *36*, 6712–6724.
Podjaski, C., Alvarez, J.I., Bourbonniere, L., Larouche, S., Terouz, S., Bin, J.M., Lécuyer, M.-A., Saint-Laurent, O., Larochelle, C., Darlington, P.J., et al. (2015). Netrin 1 regulates blood–brain barrier function and neuroinflammation. Brain *138*, 1598–1612.
Poisson, J., Lemoinne, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., and Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. J. Hepatol. *66*, 212–227.
Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L., Yang, J., Bitler, C., Butcher, L., and Bredesen, D. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. Science *261*, 345–348.
Rajasekharan, S., and Kennedy, T.E. (2009). The netrin protein family. Genome Biol. *10*, 239.
Ramkhelawon, B., Hennessy, E.J., Ménager, M., Ray, T.D., Sheedy, F.J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., et al. (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. Nat. Med. *20*, 377–384.
Ranganathan, P. (2013). Netrin-1 regulates colon-kidney cross talk through suppression of IL-6 function in a mouse model of DSS-colitis. am J Physiol Renal Physiol.
Ren, X.-R., Hong, Y., Feng, Z., Yang, H.-M., Mei, L., and Xiong, W.-C. (2008). Tyrosine Phosphorylation of Netrin Receptors in Netrin-1 Signaling. Neurosignals *16*.
Ringehan, M., McKeating, J.A., and Protzer, U. (2017). Viral hepatitis and liver cancer. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *372*.
Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E.E., Flavell, R.A., and Manz, M.G. (2013). Human Hemato-Lymphoid System Mice: Current Use and Future Potential for Medicine. Annu. Rev. Immunol. *31*, 635–674.
Rushing, B.R., and Selim, M.I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. Food Chem. Toxicol. *124*, 81–100.
Saxena, R., Theise, N.D., and Crawford, J.M. (1999). Microanatomy of the human liver?exploring the hidden interfaces. Hepatology *30*, 1339–1346.
Schümann, J., Wolf, D., Pahl, A., Brune, K., Papadopoulos, T., van Rooijen, N., and Tiegs, G.

(2000). Importance of Kupffer Cells for T-Cell-Dependent Liver Injury in Mice. Am. J. Pathol. *157*, 1671–1683.
Singal, A.G., and El-Serag, H.B. (2015). Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. Clin. Gastroenterol. Hepatol. *13*, 2140–2151.
Smale, S.T., and Natoli, G. (2014). Transcriptional Control of Inflammatory Responses. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *6*.
Straus, S.E. (1999). An Inherited Disorder of Lymphocyte Apoptosis: The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. Ann. Intern. Med. *130*, 591.
Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M., and Cheresh, D.A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. J. Cell Biol. *155*, 459–470.
Tang, X., Jang, S.-W., Okada, M., Chan, C.-B., Feng, Y., Liu, Y., Luo, S.-W., Hong, Y., Rama, N., Xiong, W., et al. (2008). Netrin-1 Mediates Neuronal Survival Through PIKE-L Interaction With the Dependence Receptor UNC5B. Nat. Cell Biol. *10*, 698–706.
Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.-Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.-C., Arumäe, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 13361–13366.
Thibert, C. (2003). Inhibition of Neuroepithelial Patched-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. Science *301*, 843–846.
Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science *267*, 1456–1462.
Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F.C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P., et al. (2004). Proapoptotic Function of the MET Tyrosine Kinase Receptor through Caspase Cleavage. Mol. Cell. Biol. *24*, 10328–10339.
Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 944–957.
Voeltz, G.K., Rolls, M.M., and Rapoport, T.A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. EMBO Rep. *3*, 944–950.
Walker, C.M. (2019). Adaptive Immune Responses in Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Infections. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *9*.
Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. Nat. Rev. Cancer *14*, 581–597.
Wang, H., Ozaki, T., Shamim Hossain, M., Nakamura, Y., Kamijo, T., Xue, X., and Nakagawara, A. (2008). A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. Biochem. Biophys. Res. Commun. *370*, 594–598.
Wang, W.-A., Groenendyk, J., and Michalak, M. (2012). Calreticulin signaling in health and disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 842–846.
Weston, C.J., Zimmermann, H.W., and Adams, D.H. (2019). The Role of Myeloid-Derived Cells in the Progression of Liver Disease. Front. Immunol. *10*.
Williams, M.E., Strickland, P., Watanabe, K., and Hinck, L. (2003). UNC5H1 Induces Apoptosis via Its Juxtamembrane Region through an Interaction with NRAGE. J. Biol. Chem. *278*, 17483–17490.
Wree, A., Holtmann, T.M., Inzaugarat, M.E., and Feldstein, A.E. (2019). Novel Drivers of the Inflammatory Response in Liver Injury and Fibrosis. Semin. Liver Dis. *39*, 275–282.
Xu, K., Wu, Z., Renier, N., Antipenko, A., Tzvetkova-Robev, D., Xu, Y., Minchenko, M., Nardi-Dei, V., Rajashankar, K.R., Himanen, J., et al. (2014). Structures of Netrin-1 Bound to two Receptors Provide Insight into its Axon Guidance Mechanism. Science *344*, 1275–1279.

Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. Mol. Cell *6*, 1355–1364.
Yin, X.-M., and Ding, W.-X. (2003). Death Receptor Activation-Induced Hepatocyte Apoptosis and Liver Injury. Curr. Mol. Med. *3*, 491–508.
Yin, C., Evason, K.J., Asahina, K., and Stainier, D.Y.R. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. J. Clin. Invest. *123*, 1902–1910.
Zoulim, F., Liang, T.J., Gerbes, A.L., Aghemo, A., Deuffic-Burban, S., Dusheiko, G., Fried, M.W., Pol, S., Rockstroh, J.K., Terrault, N.A., et al. (2015). Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. Gut *64*, 1824–1833.
Abhari, B.A., McCarthy, N., Le Berre, M., Kilcoyne, M., Joshi, L., Agostinis, P., and Fulda, S. (2019). Smac mimetic suppresses tunicamycin-induced apoptosis via resolution of ER stress. Cell Death Dis. *10*.
Aherne, C.M., Collins, C.B., Masterson, J.C., Tizzano, M., Boyle, T.A., Westrich, J.A., Parnes, J.A., Furuta, G.T., Rivera-Nieves, J., and Eltzschig, H.K. (2012). Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis. Gut *61*, 695–705.
Ankcorn, M.J., and Tedder, R.S. (2017). Hepatitis E: the current state of play. Transfus. Med. *27*, 84–95.
Arakawa, H. (2004). Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer *4*, 978–987.
Barnault, R., Lahlali, T., Plissonnier, M.-L., Romero-López, C., Laverdure, N., Ducarouge, B., Rivoire, M., Mehlen, P., Zoulim, F., and Parent, R. (2018). Hepatocellular carcinoma-associated depletion of the netrin-1 receptor Uncoordinated Phenotype-5A (UNC5A) skews the hepatic unfolded protein response towards prosurvival outcomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *495*, 2425–2431.
Bedossa, P. (1996). An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *24*, 5.
Bertolino, P., Trescol-Biémont, M.-C., and Rabourdin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. Eur. J. Immunol. *28*, 221–236.
Bordeaux, M.-C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D.E., Edery, P., and Mehlen, P. (2000). The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. EMBO J. *19*, 4056–4063.
Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M.A., Kriauciunas, K., and Kahn, C.R. (2010). A Kinase-Independent Role for Unoccupied Insulin and IGF-1 Receptors in the Control of Apoptosis. Sci. Signal. *3*, ra87.
Boyer, N.P., and Gupton, S.L. (2018). Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons). Front. Cell. Neurosci. *12*.
Chan, A.H., and Schroder, K. (2019). Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. J. Exp. Med.
Chan, C.-P., Kok, K.-H., Tang, H.-M.V., Wong, C.-M., and Jin, D.-Y. (2013). Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. *1833*, 2165–2175.
Cho, E.-J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. Genes Dev. *11*, 3319–3326.
Corsi, J.-M., Houbron, C., Billuart, P., Brunet, I., Bouvrée, K., Eichmann, A., Girault, J.-A., and Enslen, H. (2009). Autophosphorylation-independent and -dependent Functions of Focal Adhesion Kinase during Development. J. Biol. Chem. *284*, 34769–34776.
Cotter, T.G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. Nat. Rev. Cancer *9*,

501–507.
Crispe, I.N. (2009). The Liver as a Lymphoid Organ. Annu. Rev. Immunol. *27*, 147–163.
Crispe, I.N. (2011). Liver Antigen-Presenting Cells. J. Hepatol. *54*, 357–365.
Delcros, J.-G., and Mehlen, P. (2013). Dependence receptors: life or death choices. Bull. Cancer (Paris) *100*, 1261–1274.
DeLeve, L.D., and Maretti-Mira, A.C. (2017). Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. Semin. Liver Dis. *37*, 377–387.
Delloye-Bourgeois, C., Goldschneider, D., Paradisi, A., Therizols, G., Belin, S., Hacot, S., Rosa-Calatrava, M., Scoazec, J.-Y., Diaz, J.-J., Bernet, A., et al. (2012). Nucleolar Localization of a Netrin-1 Isoform Enhances Tumor Cell Proliferation. Sci. Signal. *5*, ra57–ra57.
Delloye-Bourgeois, C., Gibert, B., Rama, N., Delcros, J.-G., Gadot, N., Scoazec, J.-Y., Krauss, R., Bernet, A., and Mehlen, P. (2013). Sonic Hedgehog Promotes Tumor Cell Survival by Inhibiting CDON Pro-Apoptotic Activity. PLoS Biol. *11*.
El-Agroudy, N.N., Kurzbach, A., Rodionov, R.N., O'Sullivan, J., Roden, M., Birkenfeld, A.L., and Pesta, D.H. (2019). Are Lifestyle Therapies Effective for NAFLD Treatment? Trends Endocrinol. Metab. *30*, 701–709.
Fattovich, G., Giustina, G., Christensen, E., Pantalena, M., Zagni, I., Realdi, G., and Schalm, S. (2000). Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. Gut *46*, 420–426.
Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M., and Mehlen, P. (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. Nature *417*, 443–447.
Fraser, C.S., and Doudna, J.A. (2007). Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 29–38.
Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., and Sommer, T. (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. Nat. Cell Biol. *2*, 379–384.
Furne, C., Ricard, J., Cabrera, J.R., Pays, L., Bethea, J.R., Mehlen, P., and Liebl, D.J. (2009). EphrinB3 is an Anti-apoptotic Ligand that Inhibits the Dependence Receptor Functions of EphA4 Receptors during adult neurogenesis. Biochim. Biophys. Acta *1793*, 231–238.
Gäbele, E., Mühlbauer, M., Dorn, C., Weiss, T.S., Froh, M., Schnabl, B., Wiest, R., Schölmerich, J., Obermeier, F., and Hellerbrand, C. (2008). Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *376*, 271–276.
Gibert, B., and Mehlen, P. (2015). Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. Cancer Res. *75*, 5171–5175.
van Gils, J.M., Derby, M.C., Fernandes, L.R., Ramkhelawon, B., Ray, T.D., Rayner, K.J., Parathath, S., Distel, E., Feig, J.L., Alvarez-Leite, J.I., et al. (2012). The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. Nat. Immunol. *13*, 136–143.
Grandin, M., Meier, M., Delcros, J.G., Nikodemus, D., Reuten, R., Patel, T.R., Goldschneider, D., Orriss, G., Krahn, N., Boussouar, A., et al. (2016). Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. Cancer Cell *29*, 173–185.
Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V., et al. (2010). The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase. Mol. Cell *40*, 863–876.
Guicciardi, M.E., Malhi, H., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2013). Apoptosis and Necrosis in the Liver. Compr. Physiol. *3*.

Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S., and Ushio, Y. (2001). A Role of Netrin-1 in the Formation of the Subcortical Structure Striatum: Repulsive Action on the Migration of Late-Born Striatal Neurons. J. Neurosci. *21*, 4272–4280.
Hammerich, L., Heymann, F., and Tacke, F. (2011). Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases. Clin. Dev. Immunol. *2011*.
Hedgecock, E. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 Genes Guide Circumferential Migrations of Pioneer Axons and Mesodermal Cells on the Epidermis in C. elegans. Neuron.
Higashi, T., Friedman, S.L., and Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Adv. Drug Deliv. Rev. *121*, 27–42.
Hsieh, C.-C. (2015). Hepatic immune tolerance induced by hepatic stellate cells. World J. Gastroenterol. *21*, 11887.
Ingolia, N.T., Lareau, L.F., and Weissman, J.S. (2011). Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity of Mammalian Proteomes. Cell *147*, 789–802.
Jiang, Y., Liu, M., and Gershon, M.D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. Dev. Biol. *258*, 364–384.
Jiao, J., Sastre, D., Isabel Fiel, M., Lee, U.E., Ghiassi-Nejad, Z., Ginhoux, F., Vivier, E., Friedman, S.L., Merad, M., and Aloman, C. (2012). Dendritic Cell Regulation of Carbon Tetrachloride-induced Murine Liver Fibrosis Regression. Hepatol. Baltim. Md *55*, 244–255.
Jordan, B.W.M., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Götz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S., and Rapp, U.R. (2001). Neurotrophin Receptor-interacting Mage Homologue Is an Inducible Inhibitor of Apoptosis Protein-interacting Protein That Augments Cell Death. J. Biol. Chem. *276*, 39985–39989.
Kalani, A. (2019). A high methionine, low folate and vitamin B6/B12 containing diet can be associated with memory loss by epigenetic silencing of netrin-1. Neural Regen Res.
Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. Semin. Immunol. *19*, 24–32.
Knell, J. (1980). Liver Function and Failure. *14*, 4.
Korf, H., Boesch, M., Meelberghs, L., and van der Merwe, S. (2019). Macrophages as Key Players during Adipose Tissue–Liver Crosstalk in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Semin. Liver Dis. *39*, 291–300.
Krenkel, O., and Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. Nat. Rev. Immunol. *17*, 306–321.
Kroemer, G. (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. Biochem. Biophys. Res. Commun. *304*, 433–435.
Kubes, P., and Mehal, W.Z. (2012). Sterile Inflammation in the Liver. Gastroenterology *143*, 1158–1172.
Kulik, L., and El-Serag, H.B. (2019). Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology *156*, 477-491.e1.
Lade, A., Noon, L.A., and Friedman, S.L. (2014). Contributions of metabolic dysregulation and inflammation to nonalcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, and cancer. Curr. Opin. Oncol. *26*, 100–107.
Lahlali, T., Plissonnier, M.-L., Romero-López, C., Michelet, M., Ducarouge, B., Berzal-Herranz, A., Zoulim, F., Mehlen, P., and Parent, R. (2016). Netrin-1 Protects Hepatocytes Against Cell Death Through Sustained Translation During the Unfolded Protein Response. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. *2*, 281-301.e9.
Lawrence, M.C., McGlynn, K., Park, B.-H., and Cobb, M.H. (2005). ERK1/2-dependent Activation of Transcription Factors Required for Acute and Chronic Effects of Glucose on the Insulin Gene Promoter. J. Biol. Chem. *280*, 26751–26759.
LeCluyse, E.L., and Alexandre, E. (2010). Isolation and Culture of Primary Hepatocytes from Resected Human Liver Tissue. In Hepatocytes, P. Maurel, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 57–82.

Leung-Hagesteijn, C. (1992). UNC-5, a Transmembrane Protein with Immunoglobulin and Thrombospondin Type 1 Domains, Guides Cell and Pioneer Axon Migrations in C. elegans. Cell.
Levrero, M., Subic, M., Villeret, F., and Zoulim, F. (2018). Perspectives and limitations for nucleo(t)side analogs in future HBV therapies. Curr. Opin. Virol. *30*, 80–89.
Li, K., Li, N.L., Wei, D., Pfeffer, S.R., Fan, M., and Pfeffer, L.M. (2012). Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. Hepatology *55*, 666–675.
Li, W., Lee, J., Vikis, H.G., Lee, S.-H., Liu, G., Aurandt, J., Shen, T.-L., Fearon, E.R., Guan, J.-L., Han, M., et al. (2004). Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. Nat. Neurosci. *7*, 1213–1221.
Liaskou, E., Wilson, D.V., and Oo, Y.H. (2012). Innate Immune Cells in Liver Inflammation. Mediators Inflamm. *2012*.
Liaskou, E., Zimmermann, H.W., Li, K.-K., Oo, Y.H., Suresh, S., Stamataki, Z., Qureshi, O., Lalor, P.F., Shaw, J., Syn, W., et al. (2013). Monocyte Subsets in Human Liver Disease Show Distinct Phenotypic and Functional Characteristics. Hepatol. Baltim. Md *57*, 385–398.
Licandro, G., Khor, H.L., Beretta, O., Lai, J., Derks, H., Laudisi, F., Conforti-Andreoni, C., Qian, H.L., Teng, G.G., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2013). The NLRP3 inflammasome affects DNA damage responses after oxidative and genotoxic stress in dendritic cells. Eur. J. Immunol. *43*, 2126–2137.
Liu, G., Beggs, H., Jürgensen, C., Park, H.-T., Tang, H., Gorski, J., Jones, K.R., Reichardt, L.F., Wu, J., and Rao, Y. (2004). Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. Nat. Neurosci. *7*, 1222–1232.
Livesey, F.J., and Hunt, S.P. (1997). Netrin and Netrin Receptor Expression in the Embryonic Mammalian Nervous System Suggests Roles in Retinal, Striatal, Nigral, and Cerebellar Development. Mol. Cell. Neurosci. *8*, 417–429.
Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. EMBO J. *20*, 2715–2722.
Llambi, F., Lourenço, F.C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. EMBO J. *24*, 1192–1201.
Luchino, J., Hocine, M., Amoureux, M.-C., Gibert, B., Bernet, A., Royet, A., Treilleux, I., Lécine, P., Borg, J.-P., Mehlen, P., et al. (2013). Semaphorin 3E Suppresses Tumor Cell Death Triggered by the Plexin D1 Dependence Receptor in Metastatic Breast Cancers. Cancer Cell *24*, 673–685.
Malhi, H., and Kaufman, R.J. (2011). Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease. J. Hepatol. *54*, 795–809.
Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P.P., Mueller, B.K., Strittmatter, S.M., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. Nat. Cell Biol. *6*, 749–755.
McCartney, S., Vermi, W., Gilfillan, S., Cella, M., Murphy, T.L., Schreiber, R.D., Murphy, K.M., and Colonna, M. (2009). Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. J. Exp. Med. *206*, 2967–2976.
McDonald, B., and Kubes, P. (2016). Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. Gastroenterology *151*, 1087–1095.
Mehlen, P. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature.
Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? Nat. Rev. Cancer *11*, 188–197.

Meyerhardt, J.A., Caca, K., Eckstrand, B.C., Hu, G., Lengauer, C., Banavali, S., Look, A.T., and Fearon, E.R. (1999). Netrin-1: Interaction with Deleted in Colorectal Cancer (DCC) and Alterations in Brain Tumors and Neuroblastomas. Cell Growth Differ. *10*, 35.
Mirakaj, V., and Rosenberger, P. (2017). Immunomodulatory Functions of Neuronal Guidance Proteins. Trends Immunol. *38*, 444–456.
Mirakaj, V., Dalli, J., Granja, T., Rosenberger, P., and Serhan, C.N. (2014). Vagus nerve controls resolution and pro-resolving mediators of inflammation. J. Exp. Med. *211*, 1037–1048.
Mourali, J., Bénard, A., Lourenço, F.C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P., et al. (2006). Anaplastic Lymphoma Kinase Is a Dependence Receptor Whose Proapoptotic Functions Are Activated by Caspase Cleavage. Mol. Cell. Biol. *26*, 6209–6222.
Movita, D., van de Garde, M.D.B., Biesta, P., Kreefft, K., Haagmans, B., Zuniga, E., Herschke, F., De Jonghe, S., Janssen, H.L.A., Gama, L., et al. (2015). Inflammatory Monocytes Recruited to the Liver within 24 Hours after Virus-Induced Inflammation Resemble Kupffer Cells but Are Functionally Distinct. J. Virol. *89*, 4809–4817.
Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation. Exp. Cell Res. *256*, 12–18.
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.
Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., and Barde, Y.-A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. Nature *467*, 59–63.
Ohashi, H., Ishizaka, M., Hirai, N., and Miyamoto-Sato, E. (2013). Efficiency of puromycin-based technologies mediated by release factors and a ribosome recycling factor. Protein Eng. Des. Sel. *26*, 533–537.
Osiowy, C. (2018). From infancy and beyond… ensuring a lifetime of hepatitis B virus (HBV) vaccine-induced immunity. Hum. Vaccines Immunother. *14*, 2093–2097.
Panda, A.C., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2017). Polysome Fractionation to Analyze mRNA Distribution Profiles. Bio-Protoc. *7*.
Pandey, S., Kawai, T., and Akira, S. (2015). Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *7*.
Papadimitriou, J.M., and Petterson, D.S. (1976). The pathogenesis of lupinosis in the rat. J. Pathol. *118*, 35–47.
Paradisi, A., Maisse, C., Bernet, A., Coissieux, M., Maccarrone, M., Scoazec, J., and Mehlen, P. (2008). NF-κB Regulates Netrin-1 Expression and Affects the Conditional Tumor Suppressive Activity of the Netrin-1 Receptors. Gastroenterology *135*, 1248–1257.
Parent, R., Marion, M.-J., Furio, L., Trépo, C., and Petit, M.-A. (2004). Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line☆. Gastroenterology *126*, 1147–1156.
Petry, S., Weixlbaumer, A., and Ramakrishnan, V. (2008). The termination of translation. Curr. Opin. Struct. Biol. *18*, 70–77.
Picard, M., Petrie, R.J., Antoine-Bertrand, J., Saint-Cyr-Proulx, E., Villemure, J.-F., and Lamarche-Vane, N. (2009). Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth. Cell. Signal. *21*, 1961–1973.
Plissonnier, M.-L., Lahlali, T., Michelet, M., Lebossé, F., Cottarel, J., Beer, M., Neveu, G., Durantel, D., Bartosch, B., Accardi, R., et al. (2016). Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Mutual Amplification between Netrin-1 and the Hepatitis C Virus. PLoS Biol. *14*.
Plissonnier, M.-L., Lahlali, T., Raab, M., Michelet, M., Romero-López, C., Rivoire, M., Strebhardt, K., Durantel, D., Levrero, M., Mehlen, P., et al. (2017). Reciprocal antagonism

between the netrin-1 receptor uncoordinated-phenotype-5A (UNC5A) and the hepatitis C virus. Oncogene *36*, 6712–6724.
Podjaski, C., Alvarez, J.I., Bourbonniere, L., Larouche, S., Terouz, S., Bin, J.M., Lécuyer, M.-A., Saint-Laurent, O., Larochelle, C., Darlington, P.J., et al. (2015). Netrin 1 regulates blood–brain barrier function and neuroinflammation. Brain *138*, 1598–1612.
Poisson, J., Lemoinne, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., and Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. J. Hepatol. *66*, 212–227.
Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L., Yang, J., Bitler, C., Butcher, L., and Bredesen, D. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. Science *261*, 345–348.
Rajasekharan, S., and Kennedy, T.E. (2009). The netrin protein family. Genome Biol. *10*, 239.
Ramkhelawon, B., Hennessy, E.J., Ménager, M., Ray, T.D., Sheedy, F.J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., et al. (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. Nat. Med. *20*, 377–384.
Ranganathan, P. (2013). Netrin-1 regulates colon-kidney cross talk through suppression of IL-6 function in a mouse model of DSS-colitis. am J Physiol Renal Physiol.
Ren, X.-R., Hong, Y., Feng, Z., Yang, H.-M., Mei, L., and Xiong, W.-C. (2008). Tyrosine Phosphorylation of Netrin Receptors in Netrin-1 Signaling. Neurosignals *16*.
Ringehan, M., McKeating, J.A., and Protzer, U. (2017). Viral hepatitis and liver cancer. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *372*.
Rocco, A., Compare, D., Angrisani, D., Sanduzzi Zamparelli, M., and Nardone, G. (2014). Alcoholic disease: Liver and beyond. World J. Gastroenterol. WJG *20*, 14652–14659.
Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E.E., Flavell, R.A., and Manz, M.G. (2013). Human Hemato-Lymphoid System Mice: Current Use and Future Potential for Medicine. Annu. Rev. Immunol. *31*, 635–674.
Rushing, B.R., and Selim, M.I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. Food Chem. Toxicol. *124*, 81–100.
Saxena, R., Theise, N.D., and Crawford, J.M. (1999). Microanatomy of the human liver?exploring the hidden interfaces. Hepatology *30*, 1339–1346.
Schlegel, M., Köhler, D., Körner, A., Granja, T., Straub, A., Giera, M., and Mirakaj, V. (2016). The neuroimmune guidance cue netrin-1 controls resolution programs and promotes liver regeneration: Schlegel, Köhler, et al. Hepatology *63*, 1689–1705.
Schümann, J., Wolf, D., Pahl, A., Brune, K., Papadopoulos, T., van Rooijen, N., and Tiegs, G. (2000). Importance of Kupffer Cells for T-Cell-Dependent Liver Injury in Mice. Am. J. Pathol. *157*, 1671–1683.
Schwanhäusser, B., Gossen, M., Dittmar, G., and Selbach, M. (2009). Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC. PROTEOMICS *9*, 205–209.
Singal, A.G., and El-Serag, H.B. (2015). Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. Clin. Gastroenterol. Hepatol. *13*, 2140–2151.
Smale, S.T., and Natoli, G. (2014). Transcriptional Control of Inflammatory Responses. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *6*.
Straus, S.E. (1999). An Inherited Disorder of Lymphocyte Apoptosis: The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. Ann. Intern. Med. *130*, 591.
Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M., and Cheresh, D.A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. J. Cell Biol. *155*, 459–470.
Tang, X., Jang, S.-W., Okada, M., Chan, C.-B., Feng, Y., Liu, Y., Luo, S.-W., Hong, Y.,

Rama, N., Xiong, W., et al. (2008). Netrin-1 Mediates Neuronal Survival Through PIKE-L Interaction With the Dependence Receptor UNC5B. Nat. Cell Biol. *10*, 698–706.
Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.-Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.-C., Arumäe, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 13361–13366.
Thibert, C. (2003). Inhibition of Neuroepithelial Patched-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. Science *301*, 843–846.
Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science *267*, 1456–1462.
Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F.C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P., et al. (2004). Proapoptotic Function of the MET Tyrosine Kinase Receptor through Caspase Cleavage. Mol. Cell. Biol. *24*, 10328–10339.
Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 944–957.
Voeltz, G.K., Rolls, M.M., and Rapoport, T.A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. EMBO Rep. *3*, 944–950.
Walker, C.M. (2019). Adaptive Immune Responses in Hepatitis A Virus and Hepatitis E Virus Infections. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *9*.
Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. Nat. Rev. Cancer *14*, 581–597.
Wang, H., Ozaki, T., Shamim Hossain, M., Nakamura, Y., Kamijo, T., Xue, X., and Nakagawara, A. (2008). A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. Biochem. Biophys. Res. Commun. *370*, 594–598.
Wang, W.-A., Groenendyk, J., and Michalak, M. (2012). Calreticulin signaling in health and disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 842–846.
Weston, C.J., Zimmermann, H.W., and Adams, D.H. (2019). The Role of Myeloid-Derived Cells in the Progression of Liver Disease. Front. Immunol. *10*.
Williams, M.E., Strickland, P., Watanabe, K., and Hinck, L. (2003). UNC5H1 Induces Apoptosis via Its Juxtamembrane Region through an Interaction with NRAGE. J. Biol. Chem. *278*, 17483–17490.
Wree, A., Holtmann, T.M., Inzaugarat, M.E., and Feldstein, A.E. (2019). Novel Drivers of the Inflammatory Response in Liver Injury and Fibrosis. Semin. Liver Dis. *39*, 275–282.
Xu, K., Wu, Z., Renier, N., Antipenko, A., Tzvetkova-Robev, D., Xu, Y., Minchenko, M., Nardi-Dei, V., Rajashankar, K.R., Himanen, J., et al. (2014). Structures of Netrin-1 Bound to two Receptors Provide Insight into its Axon Guidance Mechanism. Science *344*, 1275–1279.
Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. Mol. Cell *6*, 1355–1364.
Yin, X.-M., and Ding, W.-X. (2003). Death Receptor Activation-Induced Hepatocyte Apoptosis and Liver Injury. Curr. Mol. Med. *3*, 491–508.
Yin, C., Evason, K.J., Asahina, K., and Stainier, D.Y.R. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. J. Clin. Invest. *123*, 1902–1910.
Zoulim, F., Liang, T.J., Gerbes, A.L., Aghemo, A., Deuffic-Burban, S., Dusheiko, G., Fried, M.W., Pol, S., Rockstroh, J.K., Terrault, N.A., et al. (2015). Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. Gut *64*, 1824–1833.