

N° d'ordre :

Université Sorbonne Paris Nord – Léonard de Vinci

U.F.R. Sciences - Médecine - Biologie Humaine

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par :

Nesrine Mouhoubi

Le 28 Juin 2021

Approche glycobiologique du carcinome hépatocellulaire : études biocliniques et cellulaires

École doctorale : ED146 - Galilée

Unité de recherche : Inserm U1148 Laboratory for Vascular Translational Science

Groupe : Biothérapies et Glycoconjugués

Directrice de thèse : Dr Angela SUTTON

Co-encadrant de thèse : Dr Erwan GUYOT

JURY

Dr Charlotte COSTENTIN (MCU-PH)	Rapporteur
Pr Dulce PAPPY-GARCIA (Pr)	Rapporteur
Dr Carina PRIP-BUUS (DR)	Examineur
Pr Fabrice ALLAIN (Pr)	Examineur
Pr Dominique LEDOUX (Pr)	Examineur
Dr Erwan GUYOT (MCU-PH)	Co-encadrant de thèse
Dr Angela SUTTON (MCU-PH)	Directrice de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Mes sincères remerciements vont au Pr Dominique LEDOUX. C'est un grand honneur pour moi de vous avoir eu comme enseignant. Vous nous avez prodigué des cours d'un haut niveau. J'ai tant appris de vous. Merci d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Chère Angela, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir épaulée, de m'avoir soutenue du Master 1 jusqu'à la fin de ma thèse et d'avoir été là pour moi dans mes moments les plus difficiles. Tu as toujours cru en moi, tu n'as pas cessé de m'encourager à aller de l'avant durant tout mon parcours.

Erwan, je te remercie de m'avoir co-encadrée durant mon Master 2 et ma thèse, de m'avoir aidée du mieux que tu pouvais durant mon parcours.

Pr Nathalie CHARNAUX, je te remercie de m'avoir accueillie dans ton laboratoire en Master 1, de m'avoir appris à perfectionner mon travail et à persévérer.

Dr Hanna HLAWATY, je te remercie de ta présence, ton soutien moral. Ta bonne humeur quotidienne a toujours égayé notre laboratoire.

Dr Oualid HADDAD, je te remercie de ton soutien, ta disponibilité. Tes conseils scientifiques et techniques m'ont été précieux.

Mes remerciements vont également au Pr Olivier OUDAR qui a toujours été là tout au long de notre parcours universitaire.

Je remercie la technicienne de notre laboratoire Odile SAINTE-CATHERINE. Merci pour ton aide, ta disponibilité. Tu es débordante d'énergie. A aucun moment, tu as baissé les bras face à des problèmes techniques.

Merci à Jessica FUNCK et Diego GARCIA-WEBER pour votre implication dans la correction de ce manuscrit.

Je remercie également le Dr Christelle LAGUILLIER-MORIZOT, pour son accompagnement tout au long de ma thèse.

Je remercie mes amis Amena BUTT, Kévin BASSAND, Abdallah FERGANI, Eva DELBREL, Lyna Mebrek, Imane MIHOUB, Koceila-Massinissa AIT BELKACEM, Rim ZAABOUB, Rofia BOUDRIA. A chacun de mes appels, vous avez toujours répondu présent. Nous avons passé d'agréables moments ensemble, nous nous sommes tant amusés et vos rires éternels résonneront toujours dans ma tête.

Hivda-céline YEGEN, ma güzel ablacim, je te remercie infiniment de m'avoir soutenue et épaulée durant ces derniers mois. Tu es une amie formidable.

Meriem NAIM, je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi depuis ton arrivée au laboratoire, tu as toujours été disponible. Tu es une très bonne amie sur qui j'ai toujours pu compter. Tu m'as soutenue jusqu'au bout et je t'en remercie infiniment.

A mes amies Liasmine HAINE, Dyhia MELBOUCI, nous avons partagé d'agréables et inoubliables moments depuis notre L3 (je n'ai pas oublié les sandwiches aux rillettes de thon). Votre amitié est et demeurera indéfectible. Je vous remercie chaleureusement et du fond du cœur pour tout.

A ma chère cousine Lidia BOUZIDI qui m'a supportée durant ces derniers mois, merci pour les bons plats que tu as préparés, pour ta disponibilité et ton soutien moral.

Pour finir, mes plus grands remerciements vont à mes chers parents, vous qui m'avez élevée, vous m'avez tant donné sans rien demander en retour. A mes frères Tahar, Yacine et Rayane-Massinissa qui ont toujours cru en moi. Je vous aime infiniment.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	4
LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX	14
OBJECTIFS DE LA THESE.....	15
INTRODUCTION	19
I. Les Protéoglycannes.....	19
A. Les protéoglycannes matriciels	21
B. Les protéoglycannes circulants	23
C. Les protéoglycannes intracellulaires : la serglycine	24
D. Les protéoglycannes membranaires	24
1. Les glypicans.....	24
a) Structure.....	24
b) Clivage des glypicans	25
c) Expression des glypicans	25
d) Rôle du glypican-3 dans la signalisation cellulaire	26
2. Les syndécannes	27
a) Structure.....	27
b) Clivage de l'ectodomaine des syndécannes	29
c) Expression des syndécannes	31
d) Rôle des syndécannes dans la signalisation cellulaire.....	32
II. Les chaînes héparane sulfate	32
A. Structure des chaînes héparane sulfate.....	32
B. Biosynthèse des chaînes héparane sulfate	34
C. Expression des enzymes de biosynthèse des chaînes héparane sulfate.....	36
III. Interaction entre les chaînes héparane sulfate et les protéines de liaison à l'héparine (HBP)	38
A. Les facteurs de croissance : exemple du FGF	38
B. Les chimiokines : exemple de CXCL12 (SDF-1) et de CCL5 (RANTES)	39
IV. Modification post-synthèse des chaînes héparane sulfate.....	40
A. Les sulfatases-1 et -2	41

1.	Structure	41
2.	Rôle fonctionnel des sulfatases-1 et -2 : conséquences sur l'interaction HS-HBP.....	42
3.	Expression des sulfatases-1 et -2 au cours du développement	44
4.	Expression et implication des sulfatases-1 et -2 dans le cancer	44
B.	L'héparanase	45
1.	Structure de l'héparanase	45
2.	Rôle fonctionnel de l'héparanase : conséquences sur l'interaction HS-HBP	46
3.	Expression et implication de l'héparanase dans le cancer.....	47
4.	Inhibition de l'héparanase dans le cancer.....	47
C.	Les polymorphismes génétiques des enzymes impliquées dans la modification post-synthèse des chaînes héparane sulfate.....	49
1.	Les SNPs du gène codant la sulfatase-1	49
2.	Les SNPs du gène codant la sulfatase-2	50
3.	Les SNPs du gène codant l'héparanase	50
V.	Le carcinome hépatocellulaire	52
A.	Incidence	52
B.	Prévalence	52
C.	Etiologies	52
1.	Infection par le virus de l'hépatite B (VHB)	53
2.	Infection par le virus de l'hépatite C (VHC)	54
3.	Le syndrome métabolique et la stéatohépatite non alcoolique	54
a)	Définition.....	54
b)	Classification des maladies hépatiques liées au syndrome métabolique	55
4.	La consommation chronique d'alcool	56
a)	Métabolisme de l'alcool (éthanol).....	56
b)	Mécanismes moléculaires de la toxicité hépatique induite par l'alcool	57
D.	Mécanismes moléculaires et histoire naturelle des maladies hépatiques	58
1.	La stéatose.....	58
2.	L'inflammation hépatique	59
a)	Les polymorphismes liés au métabolisme lipidiques	61
3.	La fibrose hépatique.....	63
4.	La cirrhose	65
5.	Le carcinome hépatocellulaire	66
E.	Diagnostic et classification des maladies hépatiques chroniques	66

1.	Méthode invasive de diagnostic : la biopsie hépatique	66
2.	Méthodes non invasives de diagnostic	69
a)	Les approches biologiques de diagnostic : les marqueurs sériques.....	69
b)	Les approches physiques de diagnostic de la stéatose et de la fibrose	70
F.	Diagnostic et surveillance du carcinome hépatocellulaire.....	71
1.	Diagnostic et surveillance du CHC par imagerie.....	71
2.	Classification du carcinome hépatocellulaire.....	72
a)	CHC très précoce (stade 0 du BCLC)	72
b)	CHC précoce (stade A du BCLC)	73
c)	CHC intermédiaire (BCLC stade B)	73
d)	CHC avancé (BCLC stade C).....	73
e)	CHC en phase terminale (BCLC stade D).....	74
3.	Biomarqueurs pour le diagnostic et la surveillance du CHC	75
a)	L'alpha-foetoprotéine.....	76
b)	Le glypican-3	76
c)	Le syndécanne-1	77
d)	L'endocan ou endothelial cell-specific molecule-1	77
	RESULTATS.....	79
I.	Article 1 : Sulfatase 2 along with Syndecan 1 and Glypican 3 serum levels are associated with a prognostic value in patients with alcohol-related advanced Hepatocellular Carcinoma.	79
II.	Article 2: TNF- α alters heparan sulfate level and composition in human hepatocarcinoma cell line	102
III.	Article 3 : Genetic polymorphisms in sulfatases and heparanase genes do not influence severe hepatic liver diseases in patients with metabolic syndrome.	140
	DISCUSSION	143
	REFERENCES	155
	ANNEXES.....	174

LISTE DES ABREVIATIONS

ΔUA : Acide uronique (GlcA ou IdoA)

2OST : 2-O-sulfotransférase

3OST : 3-O-sulfotransférase

4-HNE : 4-Hydroxynonéal

6OST : 6-O-sulfotransférase

A : Adénine

AASLD : Association Américaine pour l'étude des maladies du foie, « American Association for the Study of Liver Diseases »

AchR : Récepteur de l'Acétyl-choline

ADH : Alcool Déshydrogénase

AFP : Alpha-Foetoprotéine

ALAT : Alanine Aminotransférase

ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase

APASL : Association Asie-Pacifique pour l'étude des maladies du foie, « The Asian Pacific Association for the Study of the Liver »

apoB : Apoprotéines B

apoE : Apoprotéines E

ASAT : Transaminases Aspartame Aminotransférase

ASH : Alcoholic Steatohepatitis

BCLC : Barcelona Clinic Liver Cancer

CAT : Catalytique

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CS : Chondroïtine Sulfate

CS : Chondroïtine Sulfate

CXCL1 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 1

DAG : Diacylglycérol

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

Domaines NAc : Domaines N-Acétylés

Domaines S : Domaines sulfatés

DS : Dermatane Sulfate

EASL : Association Européenne pour l'étude des maladies du foie, « European Association for the Study of the Liver »

EFYA : Acide Glutamique, Phénylalanine, Tyrosine et Alanine

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ESM-1 : Endothelial cell-Specific Molecule-1

Extl3 : Exostosine-like 3

FAK : Focal Adhesion Kinase

FGF : Fibroblast Growth Factors

FGly : N-Formylglycine

G : Guanine

G6S : Glucosamine-6-Sulfatase

GABA : Acide γ -Aminobutyrique

GAG : Glycosaminoglycannes

Gal : Galactose

GalNAc : N-acétylgalactosamine

GGT : Gamma Glutamyl-Transférase

GlcA : Acide Glucuronique

GlcNAc : N-Acétylglucosamine

GlcNS : GlcNAc N-sulfaté

GPC-3 : Glypican-3

GPCs : Glypicans

GPI : Glycosyl-phosphatidylinositol

GWAS : Genome-Wide Association Study

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

HA : Acide Hyaluronique

HBP : Heparin Binding Proteins

HD : Hydrophilic domain

HGF : Hepatocyte Growth Factor

Hh : Hedgehog

HO· : Radical Hydroxyle

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance, « High Performance Liquid Chromatography »

HPSE : Héparanase

HS : Héparane Sulfate

HSD17B13 : Hydroxysteroid 17 β -Dehydrogenase 13

HSPG : Protéoglycannes à chaînes Héparane Sulfate

Huh7 : Cellules d'Hépatome humain

IdoA : Acide Iduronique

KO : Knock-Out (-/-)

kPa : KiloPascal

KS : Kérotane Sulfate

LDM : Leucodystrophie Métachromatique

LEF : Lymphoid Enhancer binding Factor

LLA : Leucémie Lymphoïde Aiguë

LPI : Lysophosphatidylinositol

LPS : Lipopolysaccharides

LRT : Lipoprotéines plasmatiques Riches en Triglycérides

LT : Lymphocytes T

MAG : Monoacylglycérol

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBOAT7 : Membrane Bound O-Acyltransferase domain containing 7

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF : le Facteur Stimulant les Colonies de macrophages, « Macrophage colony-stimulating factor »

MDA : Malondialdéhyde

MEC : Matrice Extracellulaire

MEM : Maladie des Exostoses Multiples

MMPs : Métalloprotéases Matricielles

MPS : Mucopolysaccharidoses

NAc : N-Acétylés

NAD(P)H : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NAS : NAFLD Activity Score

NASH : Stéatohépatite non alcoolique, « Non Alcoholic Steatohepatitis »

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NFκB : Nuclear Factor-kappa B

NIH : National Institutes of Health

NS : N-sulfate

O₂⁻ : Anion superoxyde

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PGs : Protéoglycannes

PI : Phosphatidylinositol

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PIP2 : Phosphatidyl Inositol bisphosphate

PKB : Protein Kinase B

PKC- α : Protéine Kinase C- α

PNPLA3 : Patatin-Like Phospholipase domain-containing protein 3

RCPG : Récepteurs à 7 domaines transmembraires Couplés aux Protéines G

RFA : Ablation par Radiofréquence

RTK : Récepteurs à activité Tyrosine-Kinase

SDC-1 : Syndécanne-1

SDCs : Syndécannes

SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor-1

SGBS : Simpson-Golabi-Behmel

SLRP : Small Leucine-Rich Protein

SNP : Polymorphismes d'un Seul Nucléotide « single nucleotide polymorphisms »

SPR : Résonance plasmonique de surface

ssLMWH : Supersulfated Low-Molecular-Weight Heparin

SULF-1 : Sulfatase-1

SULF-2 : Sulfatase-2

TACE : Chimioembolisation Transartérielle

TAG : Triacylglycérol

TCF : T-Cell specific transcription Factor

TE : Elastographie Transitoire

TG : Triglycérides

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TIMP : Inhibiteurs Tissulaires des Métalloprotéases, « tissue inhibitors of matrix metalloproteinases »

TIMP-1 : Inhibiteur Tissulaire de la Métalloprotéinase-1

TLR 4 : Toll-Like Receptors 4

TM : Transmembranaire

TM6SF2 : Adiponutrine Transmembrane 6 Superfamily 2

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

UPR : Unfolded Protein Response

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VPN : Valeur Prédicative Négative

VPP : Valeur Prédicative Positive

Xyl : Xylose

α -SMA : alpha Actine Musculaire lisse, « alpha Smooth Muscle Actin »

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Modification structurale des chaînes héparane sulfate.	16
Figure 2. Histoire naturelle du développement du carcinome hépatocellulaire.	18
Figure 3. Représentation schématique des différents glycosaminoglycannes.	20
Figure 4. Structures des protéoglycannes.	21
Figure 5. Structure des glypicans.	25
Figure 6. Structure des syndécannes.	28
Figure 7. Localisation des sites de clivage sur l'ectodomaine des syndécanne-1 et -4.	30
Figure 8. Structure des chaînes héparane sulfate.	33
Figure 9. Biosynthèse des chaînes héparane sulfate.	35
Figure 10. Motifs de sulfatation des unités disaccharidiques des chaînes héparane sulfate.	36
Figure 11. Structure des Sulfatases-1 et -2.	42
Figure 12. Régulation de la signalisation des heparin binding proteins par les SULFs.	43
Figure 13. Structure de l'héparanase.	46
Figure 14. Voies du métabolisme hépatique de l'alcool impliquant l'alcool déshydrogénase cytosolique et le système microsomal d'oxydation de l'éthanol.	57
Figure 15. Mécanismes moléculaires de fibrogenèse hépatique.	65
Figure 16. Le système de notation METAVIR décrit dans l'hépatite C chronique, sur biopsie hépatique.	69
Figure 17. Le système de classification du CHC selon le Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) et stratégies de traitement proposées pour le CHC.	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Différents polymorphismes génétiques des enzymes impliquées dans la modification post-synthèse des chaînes héparane sulfate.....	51
Tableau 2. Différents polymorphismes liés au métabolisme lipidique.	63
Tableau 3. Classification histologique de la NAFLD selon le score « NAFLD Activity Score » (NAS).	68

OBJECTIFS DE LA THESE

La cancérogenèse hépatique est un processus multifactoriel et multi-étape dans lequel des caractéristiques environnementales et génétiques contribuent à la transformation maligne des cellules hépatiques. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse hépatique, tels que la prolifération et l'angiogenèse, sont médiés par des facteurs de croissance et des chimiokines, ayant la particularité de pouvoir se lier aux chaînes glycosaminoglycannes (GAG) de type héparane sulfate (HS) chargées négativement, grâce à des liaisons électrostatiques, d'où leur dénomination « heparin binding proteins » (HBP). Ces chaînes HS peuvent être présentes au niveau membranaire, liées de manière covalente à une protéine centrale pour former des protéoglycannes à chaînes héparane sulfate (HSPG) tels que les syndécannes (SDC) [Figure 1]. L'activité des HBP est dépendante de la présence de motifs structuraux bien définis au sein des chaînes HS [Figure 1]. La modification structurale des chaînes HS, médiée par les enzymes à activité 6-O-endosulfatase (sulfatase-1, sulfatase-2 (SULFs)) et endoglucuronidase (héparanase (HPSE)), peut modifier l'affinité des HBP pour les chaînes HS et réguler positivement leur activité en permettant leur libération et leur interaction avec leurs récepteurs respectifs, activant ainsi des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la cancérogenèse.

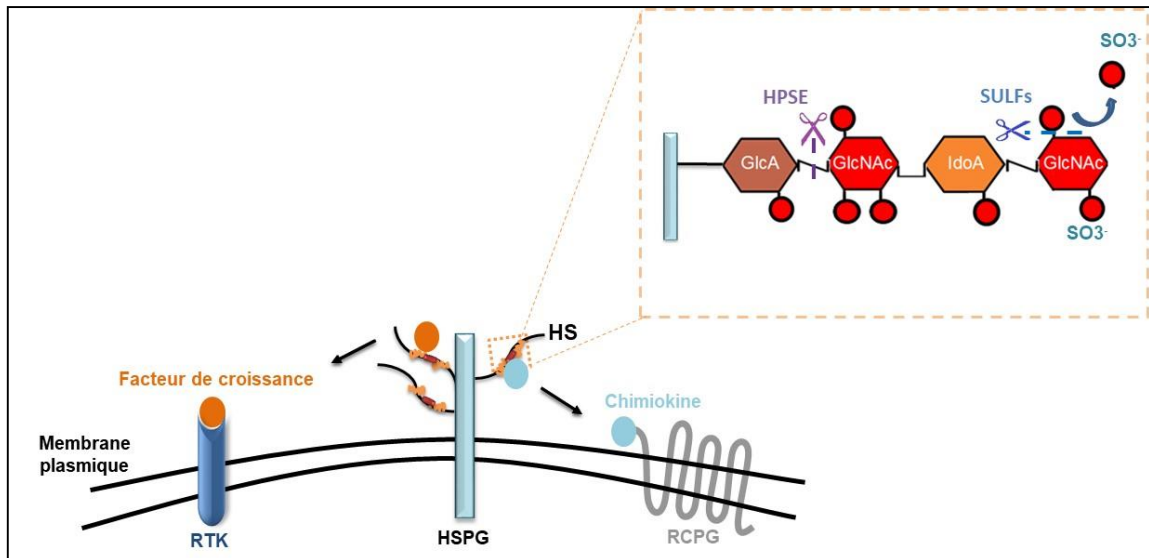


Figure 1. Modification structurale des chaînes héparane sulfate.

Les chaînes HS peuvent être membranaires, liées de manière covalente à une protéine centrale pour former les protéoglycannes à chaînes HS (HSPG). Les chaînes HS sont constituées de la répétition d'unités disaccharidiques de type acide glucuronique (GlcA) ou acide iduronique (IdoA) et N-acétylglucosamine (GlcNAc). Les chaînes HS subissent des modifications structurales par les enzymes sulfatase-1, sulfatase-2 (SULFs) qui clivent le groupement sulfate en position 6 du glucosamine et par l'héparanase (HPSE) qui clive les chaînes HS, liées aux HBP, en fragments fonctionnels, pouvant favoriser la fixation des chimiokines et facteurs de croissance à leurs récepteurs respectifs. D'après (El Masri et al. 2017).

Mes travaux de thèse s'articulent autour de 2 axes :

L'axe bioclinique

Les patients atteints de maladies hépatiques chroniques sévères sont particulièrement à risque de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC). Cependant, le risque de CHC n'est pas identique d'un patient à l'autre. Ainsi, l'identification des facteurs de susceptibilité génétique, en particulier sous forme de polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs), et leur intégration dans les scores cliniques peut contribuer à affiner la sélection des patients à risque qui pourraient bénéficier d'une prise en charge médicale personnalisée avec des mesures préventives individualisées, des stratégies de diagnostic adaptées ou des procédures thérapeutiques mieux ciblées.

Ainsi, **le premier objectif de l'axe bioclinique** a été d'évaluer l'impact de plusieurs variants génétiques sur la susceptibilité de développer des maladies hépatiques chroniques et leur évolution en CHC. Ces variants de gènes sélectionnés sont indépendants et portés par des gènes codant les enzymes SULF-1, SULF-2 et HPSE. La valeur pronostique de ces variants a été évaluée de manière rétrospective dans une cohorte de patients atteints d'une stéatohépatite non alcoolique (NASH), en tenant compte des événements cliniques qui surviennent au cours du suivi tels que la fibrose, la cirrhose, le CHC et le décès [Figure 2].

L'un des problèmes majeurs qui limite la prise en charge des patients atteints de CHC est le diagnostic de la maladie à un stade avancé, malgré une surveillance clinique régulière pendant les stades précédant le CHC, ce qui contribue à un mauvais pronostic. L'alpha-fœtoprotéine (AFP), une glycoprotéine fœtale analogue à l'albumine chez l'adulte, est couramment utilisée comme marqueur tumoral avec une sensibilité d'environ 40 % pour la détection du CHC précoce. Toutefois, l'AFP est parfois élevée chez les patients sans CHC qui souffrent d'une maladie hépatique chronique telle que l'hépatite virale B ou C (Chia, Wong, et Luk 2019; Miura et al. 2020). Ainsi, il reste important d'identifier des biomarqueurs sériques spécifiques permettant un diagnostic précoce avec une valeur pronostique afin d'optimiser la prise en charge de ces patients et éventuellement d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Du fait de la surexpression génique et tissulaire de plusieurs HSPG, tels que le syndécanne-1 (SDC-1) et le glypican-3 (GPC-3) dans le CHC (biopsies hépatiques), leur potentiel diagnostique a été évalué au niveau sérique (H. Liu et al. 2018; Regós et al. 2020). Ainsi, ces deux HSPG ont été proposés comme biomarqueurs sériques en raison de leur capacité à distinguer les patients atteints d'une cirrhose, de ceux atteints d'un petit CHC (Nault et al. 2013; Chia, Wong, et Luk 2019). Par conséquent, **le deuxième objectif de l'axe bioclinique** a été d'évaluer une association potentielle entre les niveaux circulants du SDC-1, du GPC-3, ainsi que les enzymes SULF-1, SULF-2 et HPSE avec l'apparition d'un CHC chez les patients atteints de cirrhose alcoolique [Figure 2].

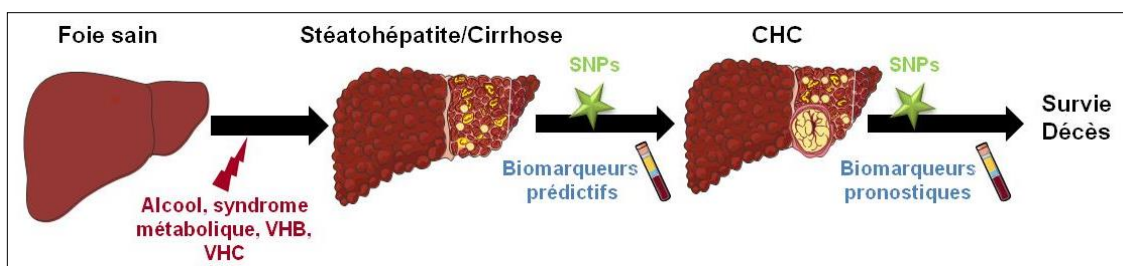


Figure 2. Histoire naturelle du développement du carcinome hépatocellulaire.

Dans les pays occidentaux, 90 % des cas de CHC se développent dans un contexte d'une hépatopathie chronique, avancée, au stade cirrhose. La consommation chronique d'alcool, les hépatites virales chroniques B et C et la stéatose hépatique représentent les principales causes de CHC. L'intégration de variants génétiques (SNPs) dans les stratégies de dépistage permettrait de définir les patients à risque et d'adapter des stratégies de diagnostic du CHC, non invasives, basées notamment sur l'utilisation de biomarqueurs sériques, visant ainsi à améliorer la prise en charge thérapeutique des patients. D'après (Ganne-Carrié et Nahon 2019; Singal, Lampertico, et Nahon 2020).

L'axe fondamental

Le CHC est une tumeur qui se développe dans un contexte inflammatoire chronique. En effet, l'influence des facteurs externes (l'alcool, le syndrome métabolique, le stress oxydant) induit l'activation des macrophages résidents du foie, les cellules de Küpffer, qui jouent un rôle central dans les lésions hépatiques précoces en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. Ces cytokines pro-inflammatoires favorisent le recrutement des neutrophiles et monocytes et la sécrétion de chimiokines telles que le CXCL12 (SDF-1) et CCL5 (RANTES), ce qui amplifie la réponse inflammatoire. Notre équipe a montré que la liaison des chimiokines aux chaînes HS serait impliquée dans la progression tumorale en induisant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules d'hépatome humain (Huh7) (Sutton, Friand, Brulé-Donneger, et al. 2007; Friand et al. 2009; Charni et al. 2009). Ainsi, l'objectif de ce projet fondamental a été de caractériser l'influence du contexte inflammatoire, induit par un traitement au TNF- α , sur l'expression des enzymes de biosynthèse et de modification des chaînes HS, la modification structurale des chaînes HS dans un modèle d'hépatome humain Huh7 et l'impact sur la prolifération des cellules cancéreuses.

INTRODUCTION

I. Les Protéoglycannes

Les protéoglycannes (PGs) sont des molécules complexes et très diverses, caractérisées par une protéine centrale, sur laquelle est associée, de manière covalente, une ou plusieurs chaînes polysaccharidiques de type glycosaminoglycane (GAG). Les propriétés fonctionnelles des PGs et leur classification dépendent :

- Du type de chaînes GAG qu'ils portent, pouvant être de type chondroïtine sulfate (CS), dermatane sulfate (DS), kératine sulfate (KS) ou héparane sulfate (HS).
- De la séquence polypeptidique de la protéine centrale.
- De leur localisation cellulaire.

Les chaînes CS sont constituées par la répétition d'unités disaccharidiques de type N-acétylgalactosamine (GalNAc) et acide glucuronique (GlcA) [Figure 3]. La 4-O-sulfatation ou la 6-O-sulfatation du GalNAc forme ce que l'on appelle des chaînes CS de type A et C, respectivement. Les chaînes DS partagent la même structure que les CS, à l'exception du GlcA qui peut subir une épimérisation en acide iduronique (IdoA) sur le long de la chaîne. Cette épimérisation permet la 2-O-sulfatation de l'IdoA (Malavaki et al. 2008). Les chaînes KS sont constituées de la répétition d'unités N-acétylglucosamine (GlcNAc) et Galactose, pouvant être O-sulfatées en C-6 du glucosamine (Bierbaum 2017). Les chaînes HS sont composées de la répétition de résidus de GlcNAc et de GlcA (ce dernier pouvant également subir une épimérisation en IdoA). Dans les chaînes HS, le GlcNAc est N-sulfaté (GlcNS) et O-sulfaté en position C-6 (rarement en C-3) et l'acide uronique O-sulfaté en position C-2 (Laguri, Arenzana-Seisdedos, et Lortat-Jacob 2008; El Masri et al. 2017). Enfin, l'héparine, connue pour son activité anticoagulante, partage la même structure que les chaînes HS mais avec un degré de sulfatation plus élevé (Nugent et al. 2005).

On retrouve également des GAG non associés à une protéine centrale, c'est notamment le cas de l'acide hyaluronique [Figure 3]. La chaîne polysaccharidique de l'acide hyaluronique est constituée de la répétition d'unités disaccharidiques de GlcA et GlcNAc non sulfatées (Slevin et al. 2007).

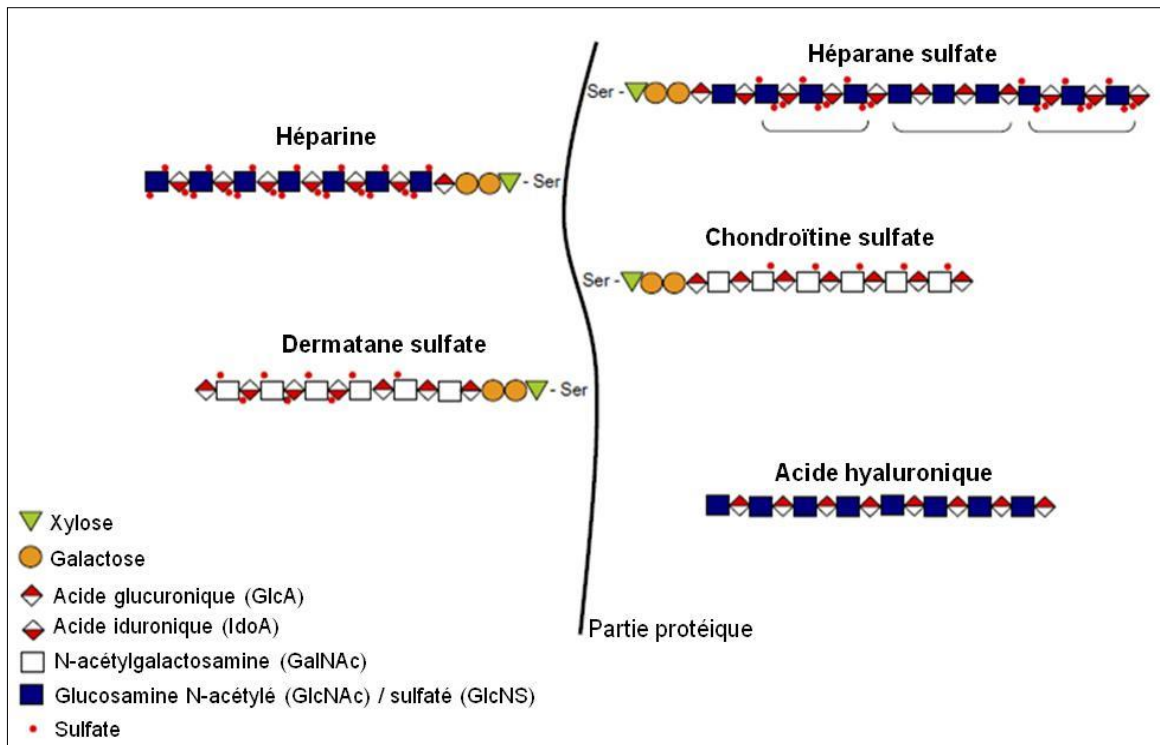


Figure 3. Représentation schématique des différents glycosaminoglycannes.

D'après (Imberty, Lortat-Jacob, et Pérez 2007).

Les PGs peuvent être sécrétés dans la matrice extracellulaire (MEC) (versican, agrécan, agrine et décorine). Ils peuvent être circulants, c'est le cas de l'endocan et la bikunine ou intracellulaires, c'est le cas de la serglycine. Ils peuvent également être membranaires, représentés par la famille des glypicans (GPCs), reliés à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), et des syndécannes (SDCs) possédant un domaine transmembranaire [Figure 4] (Poulain et Yost 2015).

Ces PGs peuvent interagir avec les composants structurels de la MEC, tels que la laminine, le collagène de type IV ou la fibronectine, contribuant ainsi à la formation du réseau matriciel et au maintien de son intégrité et à sa solidité. Ils peuvent également interagir avec d'autres composants associés à la surface cellulaire, tels que les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), les récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK) et les intégrines, contrôlant ainsi l'adhérence, la migration et la signalisation cellulaire (Delehedde et al. 2013). Les chaînes GAG peuvent se lier à de nombreuses protéines, en particulier des ligands solubles tels que les facteurs de croissance, les cytokines et les

chimiokines, dont la diffusion au sein des tissus, la stabilité et l'activité sont régulées par cette interaction.

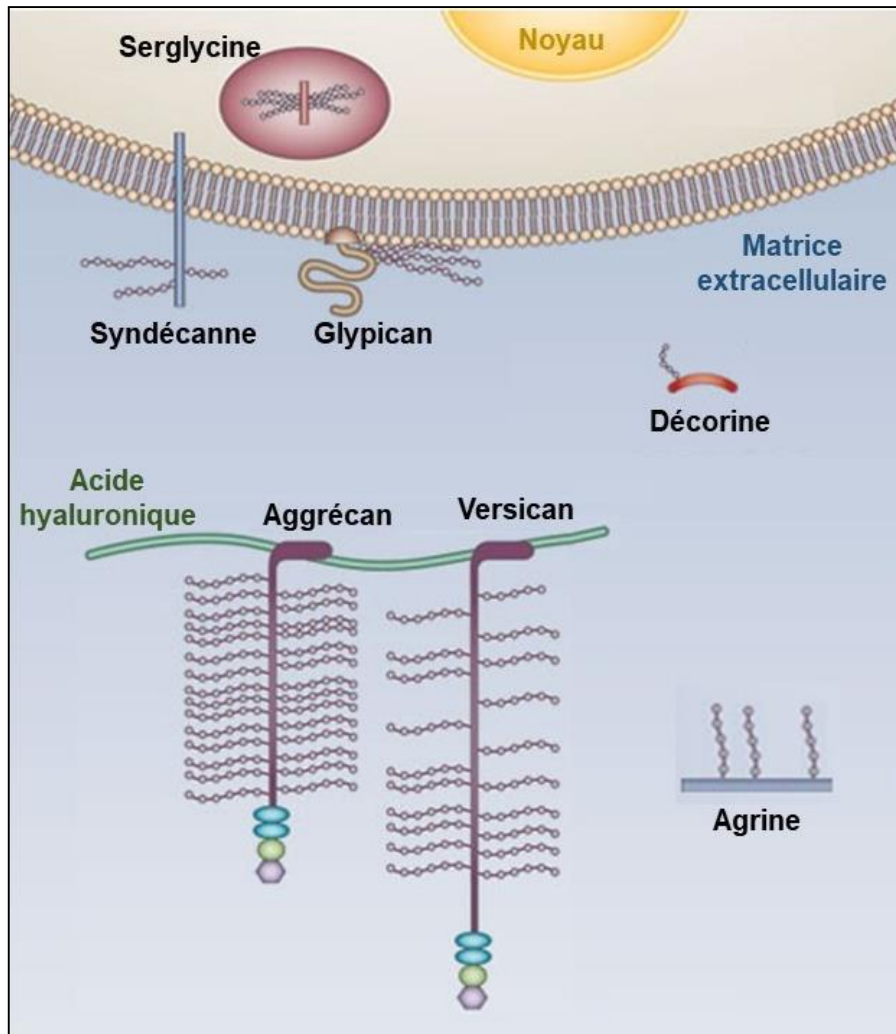


Figure 4. Structures des protéoglycannes.

La serglycine est un protéoglycane intracellulaire. L'Agrine, la décorine et les protéoglycannes liant l'acide hyaluronique tels que l'aggrécane et le versican sont situés dans la matrice extracellulaire, tandis que les glypicans et les syndécannes sont des protéoglycannes membranaires. D'après (Edwards 2012).

A. Les protéoglycannes matriciels

La décorine est un PG de la famille des Small Leucine-Rich Protein (SLRP). Ce PG est composée d'une protéine centrale de 42 kDa sur laquelle est attachée une seule chaîne CS ou DS. La décorine est active sous forme monomérique (W. Zhang et al. 2018). Elle se fixe aux fibres de collagène et contribue à leur stabilisation dans la MEC (Horváth et al. 2019). Elle

peut également se fixer aux RTK et induire leur internalisation, régulant ainsi de manière négative leur activité. La décorine joue un rôle important dans l'angiogenèse physiologique en favorisant l'adhérence des cellules endothéliales. En revanche, elle régule négativement l'angiogenèse tumorale en fixant les facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que l'hépatocyte growth factor (HGF) et le platelet-derived growth factor (PDGF) empêchant ainsi, leur interaction avec leurs récepteurs respectifs (W. Zhang et al. 2018). Depuis plusieurs années, des chercheurs s'intéressent aux propriétés anti-tumorales de la décorine. En effet, la surexpression de la décorine, *in vitro*, inhibe la prolifération de plusieurs lignées cellulaires du cancer de l'ovaire, du cancer du sein et du CHC en induisant notamment la surexpression de la protéine pro-apoptotique p21 (Horváth et al. 2019).

L'agrine est un PG à chaînes HS (HSPG) dont le poids moléculaire est de 225 kDa (Annaval et al. 2020). Le gène de l'agrine code deux isoformes de ce HSPG, issues d'un épissage alternatif, une forme extracellulaire et une forme transmembranaire (TM-Agrine) qui jouent un rôle important dans l'assemblage de l'appareil post-synaptique. La forme extracellulaire est retrouvée au niveau des jonctions neuromusculaires, elle induit l'agrégation du récepteur de l'acétyl-choline (AChR). La forme transmembranaire (TM-Agrine) est retrouvée dans le cerveau et induit l'agrégation du récepteur de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) du système nerveux central (Burgess, Skarnes, et Sanes 2000; Bezakova et Ruegg 2003; Annaval et al. 2020).

Le versican est un PG modulaire. Il existe sous 4 isoformes, désignées respectivement par des variants V0, V1, V2 et V3. Les différences structurelles entre les isoformes sont limitées à la partie centrale qui correspond à la région de fixation des GAG. V0, la plus grande isoforme, contient deux domaines d'attachement aux chaînes GAG désignés comme GAG- α (12-17 chaînes CS latérales) et GAG- β (5-8 chaînes CS latérales). En revanche, V1 ne comprend que le domaine GAG- β , tandis que V2 ne contient que GAG- α . Les domaines GAG- α et GAG- β sont tous deux absents dans l'isoforme V3, par conséquent, cette isoforme existe en tant que glycoprotéine et non en tant que PG. Le versican, en s'associant à l'acide hyaluronique (HA), est capable de se lier aux composants de la MEC tels que le collagène de type I et la fibronectine. Le versican se lie également aux molécules présentes à la surface cellulaire, notamment aux sélectines P et L, aux chimiokines, à l'intégrine β 1 et au récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGF). Il régule ainsi de nombreux processus cellulaires, notamment l'adhérence, la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire. Un taux élevé de

versican est retrouvé dans de nombreuses tumeurs, notamment, les ostéosarcomes et le cancer du sein (Wight 2002; Ricciardelli et al. 2002; 2009; Nikitovic et al. 2006).

L'aggrécan est un PG modulaire, il comporte environ 100 chaînes CS, qui possèdent un poids moléculaire de 20 kDa chacune. Il comporte également moins de 60 chaînes KS qui font entre 5 et 15 kDa chacune. L'aggrécan est exprimé dans le tendon, le cerveau et le muscle. Il est également présent à des concentrations très élevées dans le cartilage, sous forme d'agrégats, liés à l'acide hyaluronique, où ils contribuent à des propriétés structurales essentielles, telles que l'élasticité et la résistance aux forces de compression. Cela est dû en partie à la charge négative des chaînes GAG qui fixent des contre-ions tels que le Na⁺, créant ainsi un déséquilibre osmotique entre le cartilage et les tissus environnants. Pour contrer ce déséquilibre, l'eau est attirée dans le cartilage ce qui lui confère une forte hydratation (environ 70% du poids du tissu) (Kiani et al. 2002; Dudhia 2005).

B. Les protéoglycannes circulants

La bikunine est un PG plasmatique portant une seule chaîne CS. La partie protéique de la bikunine contient deux domaines inhibiteurs des sérine-protéases telles que la trypsine, la plasmine, la thrombine et les élastases. En inhibant leur activité, la bikunine exerce un rôle anti-tumoral et un effet anti-inflammatoire notamment dans les cas de pancréatite, de choc septique et de polyarthrite rhumatoïde (Fries et Blom 2000; Pugia, Valdes, et Jortani 2007; Haouari et al. 2020).

L'endocan est un PG portant une seule chaîne DS, exprimé et sécrété par les cellules endothéliales, il est également appelé Endothelial cell-Specific Molecule-1 (ESM-1). Son poids moléculaire est de 50 kDa. La biosynthèse et la sécrétion de l'endocan sont contrôlées par des cytokines proinflammatoires, notamment le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) mais également par des facteurs proangiogéniques tel que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Stéphane Sarrazin et al. 2010). L'endocan est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs malignes notamment, dans le cancer du poumon, le glioblastome et le CHC, avec des niveaux d'expression en corrélation positive avec la sévérité de la maladie. L'endocan peut fixer via sa chaîne DS des facteurs de croissance tel que le HGF et promouvant ainsi son activité mitogénique (Scherpereel et al. 2003).

C. Les protéoglycannes intracellulaires : la serglycine

La serglycine est un PG intracellulaire, présent majoritairement dans les cellules hématopoïétiques. Elle joue un rôle important dans les réactions inflammatoires. En effet, la serglycine est impliquée dans la rétention des médiateurs inflammatoires dans les granules de sécrétion, notamment dans les mastocytes où elle interagit avec l'histamine, dans les lymphocytes T (LT) cytotoxiques où elle interagit avec les granzymes ou dans les macrophages où elle interagit avec le TNF- α (Kolset et Tveit 2008). La nature des chaînes GAG attachées à la partie protéique de la serglycine diffère d'un type cellulaire à un autre. Ainsi, la serglycine synthétisée par les mastocytes du tissu conjonctif présente des chaînes d'héparine, la serglycine synthétisée par les macrophages présente des chaînes CS ou HS, tandis que, celle synthétisée par les mastocytes des muqueuses, les neutrophiles et les plaquettes contient principalement des chaînes CS (Pejler, Abrink, et Wernersson 2009).

D. Les protéoglycannes membranaires

La majorité des PGs présents à la surface des cellules sont des HSPG. Les glypicans et les syndécannes constituent les deux principales familles de HSPG membranaires, qui se distinguent par la nature de leur partie protéique et leur mode d'ancrage à la membrane.

1. Les glypicans

a) Structure

Les glypicans (GPCs) sont des PGs reliés à la membrane par une ancre GPI, plus précisément au niveau des « rafts » lipidiques. Chez les mammifères, ils sont au nombre de 6 (GPC-1 à GPC-6) et leur structure est très conservée entre les espèces. Tous les GPCs ont un poids moléculaire de 60 à 70 kDa (Guo et al. 2020a). Au niveau extracellulaire, ils contiennent un domaine N-terminal, suivi d'un domaine globulaire contenant de nombreux résidus cystéine, d'un domaine de liaison aux chaînes GAG et d'un domaine C-terminal lié à l'ancre GPI permettant son ancrage membranaire [Figure 5] (Fransson 2003). Les GPCs ne possèdent pas de domaines transmembranaire et cytoplasmique [Figure5]. Les GPCs (1 à 6) portent des chaînes HS (Stephane Sarrazin, Lamanna, et Esko 2011), tandis que le GPC-5 porte aussi des chaînes CS/DS (Saunders, Paine-Saunders, et Lander 1997).

b) Clivage des glypicans

Les PGs peuvent subir un clivage de leur domaine extracellulaire nommé « shedding » qui les transforme en effecteurs solubles, paracrines ou autocrines. De cette manière, ils peuvent entrer en compétition, avec d'autres HSPG, pour un ligand et entraîner sa fixation à son récepteur à la surface des cellules, induisant une signalisation intracellulaire. Ils peuvent au contraire se fixer à la MEC afin d'inhiber l'interaction récepteur-ligand et ainsi la signalisation cellulaire induite en amont (Manon-Jensen, Itoh, et Couchman 2010).

Ainsi, les GPCs peuvent subir un clivage protéolytique par des protéases de type furine, entre l'arginine en position 358 et la cystéine en position 359. Ce clivage génère ainsi deux fragments : un fragment N-terminal de 40 kDa, soluble, retrouvé dans la circulation sanguine et un fragment C-terminal de 30 kDa qui peut subir un deuxième clivage par des lipases qui clivent l'ancre GPI [Figure 5] (Filmus et Capurro 2014; Miura et al. 2020; Guo et al. 2020).

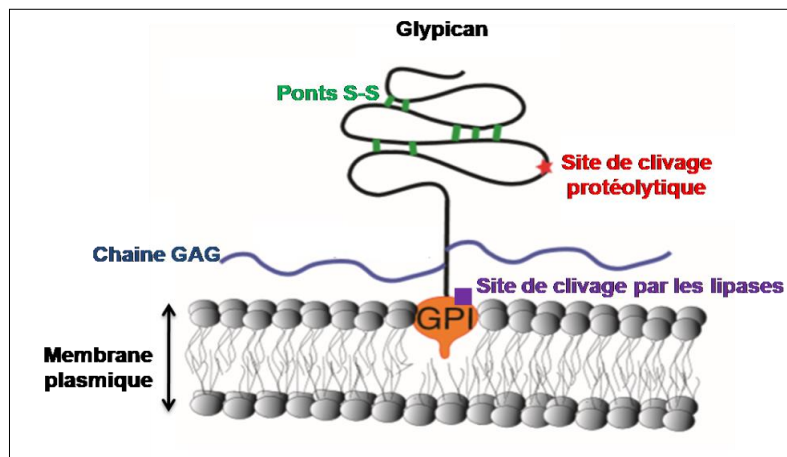


Figure 5. Structure des glypicans.

Les GPCs sont des PGs liés à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Ils sont caractérisés par une partie extracellulaire, composée d'un domaine globulaire riche en résidus cystéine qui forment des ponts disulfures (représentés en vert) et d'un domaine de liaison aux chaînes GAG qui peuvent être de type héparane sulfate (HS) et chondroïtine sulfate (CS)/dermatane sulfate (DS). Le site de clivage protéolytique, entre l'arginine en position 358 et la cystéine en position 359 est représenté par une étoile rouge. Au niveau de l'ancre GPI, le site de clivage par des lipases est représenté par un carré violet. D'après (Filmus, Capurro, et Rast 2008).

c) Expression des glypicans

Les GPCs sont principalement exprimés au cours du développement embryonnaire. Ils régulent la réponse cellulaire induite par plusieurs facteurs de croissance pendant la

morphogenèse. Leur expression réapparaît dans différents types de tumeurs, au niveau tissulaire et sérique et est associée à un mauvais pronostic vital. Une surexpression du GPC-1 a été retrouvée dans le cancer du sein (Matsuda et al. 2001) et le cancer du pancréas (Kleeff et al. 1998), le GPC-2 est surexprimé dans le neuroblastome (Bosse et al. 2017) et le GPC-3 est surexprimé dans 70% des cas de CHC (Guo et al. 2020). En revanche, il semble que le GPC-3 inhibe la prolifération cellulaire au cours du développement embryonnaire. En effet, une mutation entraînant une perte de fonction du GPC-3, générant un PG dépourvu de l'ancrage GPI, provoque le syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), un trouble lié au chromosome X caractérisé par un excès de croissance pré- et post-natale avec des anomalies craniofaciales, squelettiques et viscérales. Les souris déficientes en GPC-3 (GPC3^{-/-}) présentent également des caractéristiques phénotypiques similaires au SGBS (Filmus et Capurro 2014; Guo et al. 2020).

d) Rôle du glypican-3 dans la signalisation cellulaire

Il semble que la partie protéique du GPC-3 possède une capacité de liaison, indépendante des chaînes HS, à de nombreuses molécules impliquées dans la signalisation cellulaire telles que Hedgehog (Hh) et Wnt.

- **La voie de signalisation Hedgehog**

Hh joue un rôle important dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire au cours de la morphogenèse embryonnaire. La liaison de Hh à la protéine centrale du GPC-3, inhibe l'interaction de la protéine Hh avec son récepteur membranaire et induit l'internalisation du complexe GPC-3/Hh, par une voie d'endocytose clathrine-dépendante, et par conséquent sa dégradation. La surcroissance retrouvée chez les patients atteints de SGBS est due en partie à l'hyperactivation de la voie de signalisation Hh, due à la perte de fonction du GPC-3 (Filmus, Capurro, et Rast 2008; Guo et al. 2020; Kaur et Cummings 2019).

- **La voie de signalisation Wnt/ β -caténine**

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, en régulant directement le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et la tumorigenèse notamment dans certains cas de CHC où on peut retrouver, en plus de la surexpression du GPC-3, une accumulation de la β -caténine qui se produit dans environ 70% des cas de CHC, dont seulement 20% sont dus à des

mutations activatrices de la β -caténine (R. Pang et al. 2004). Il a été montré que le GPC-3 régule de manière positive cette voie de signalisation. En effet, ce PG interagit avec la protéine Wnt et la présente à son récepteur spécifique. Cette fixation aboutit à l'activation des médiateurs de signalisation impliqués dans la translocation de la β -caténine dans le noyau, où elle agit comme co-activateur transcriptionnel, associé aux protéines «T-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer binding factor » (TCF/LEF) liant l'ADN, activant la transcription de nombreux gènes cibles tel que la cycline D1 qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire au cours du développement et la cancérogenèse (Capurro et al. 2005; S. Kim et Jeong 2019; Guo et al. 2020).

2. Les syndécannes

a) Structure

Les syndécannes (SDCs) sont des PG transmembranaires (SDC-1 à 4), dont le poids moléculaire de la protéine centrale varie entre 20 et 40 kDa (Xian, Gopal, et Couchman 2009). Les SDCs sont caractérisés par des domaines extracellulaires différents et des domaines cytoplasmiques courts qui contiennent deux régions constantes, C1 proximale et C2 distale, par rapport au domaine transmembranaire. Ces régions constantes sont séparées par une région variable V qui est spécifique à chaque membre de la famille des SDCs [Figure 6].

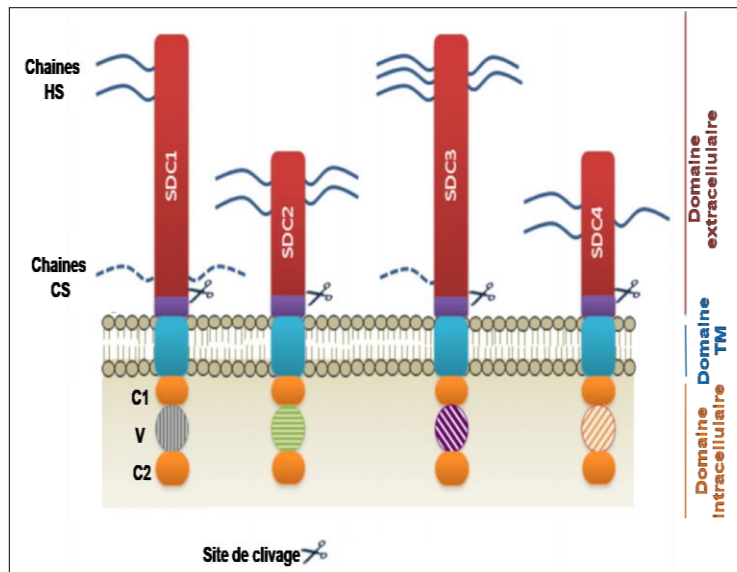


Figure 6. Structure des syndécannes.

Le domaine extracellulaire est représenté en rouge. Les chaînes héparane sulfate (HS) sont indiquées par les lignes bleues et les chaînes chondroïtine sulfate (CS) sont indiquées par des pointillés bleus. Le site de clivage est indiqué par des blocs violets, suivi d'un court domaine transmembranaire (TM) en bleu. Chaque syndécane a un court domaine cytoplasmique dans lequel une région variable est flanquée de deux régions hautement conservées appelées C1 et C2 (représentées en orange). D'après (Binch, Shapiro, et Risbud 2016).

- **Le domaine extracellulaire ou ectodomaine**

Le domaine extracellulaire des SDCs représente un domaine de liaison aux chaînes GAG. Les SDC-1 et -3 sont des PGs à chaînes HS et CS/DS, tandis que, les SDC-2 et -4 ne portent que des chaînes HS [Figure 6].

- **Le domaine transmembranaire**

Le domaine transmembranaire, contient un motif GXXXG, commun à tous les SDCs. Il régule leur homodimérisation et hétérodimérisation. Cette oligomérisation est importante pour l'activité du SDC (H. a. B. Multhaupt et al. 2009; Chung et al. 2016).

- **Le domaine cytoplasmique**

Le domaine C1 des SDCs représente un domaine d'interaction avec les adhérences focales, connues comme des sites de contact entre les cellules et la matrice extracellulaire sous-jacente. Ce sont des assemblages macromoléculaires complexes contenant des intégrines, des protéines structurelles cytoplasmiques telles que la taline, la vinculine, l' α -

actinine, la paxilline et des protéines de signalisation telles que la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) (H. a. B. Multhaupt et al. 2009).

Le domaine **C2** de tous les membres de la famille des SDCs contient quatre acides aminés terminaux, EFYA (Acide Glutamique, Phénylalanine, Tyrosine et Alanine), qui constituent un site de liaison pour les protéines, à domaine PDZ (PSD-95/Discs Large/ZO-1), telles que la synbindine, la syntenine et la synectine (Wilcox-Adelman, Denhez, et Goetinck 2002). Ces protéines sont localisées au niveau des adhérences focales et jouent un rôle dans la migration cellulaire (H. a. B. Multhaupt et al. 2009).

Contrairement aux autres membres de la famille des SDCs, le SDC-4 se lie au domaine catalytique de la protéine kinase C- α (PKC- α) par l'intermédiaire du phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP2) lié à la région variable **V** activant ainsi la PKC- α qui active par phosphorylation d'autres protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (Wilcox-Adelman, Denhez, et Goetinck 2002). Il a notamment été montré par notre équipe que les effets pro-angiogéniques de la chimiokine RANTES passent par le biais d'une signalisation intracellulaire du SDC-4 dépendante de l'activation de la PKC- α (L. Maillard et al. 2014).

b) Clivage de l'ectodomaine des syndécannes

Les SDCs peuvent subir un clivage « shedding » au niveau de sites conservés dans l'ectodomaine [Figure 7]. Ce shedding est médié par des métalloprotéases matricielles (MMPs) telles que MMP2, MMP3, MMP9, MMP7 et MT1-MMP (MMP14) mais également par des sérines protéases de type thrombine et plasmine (Bellin et al. 2002; Okina et al. 2009; Manon-Jensen, Itoh, et Couchman 2010).

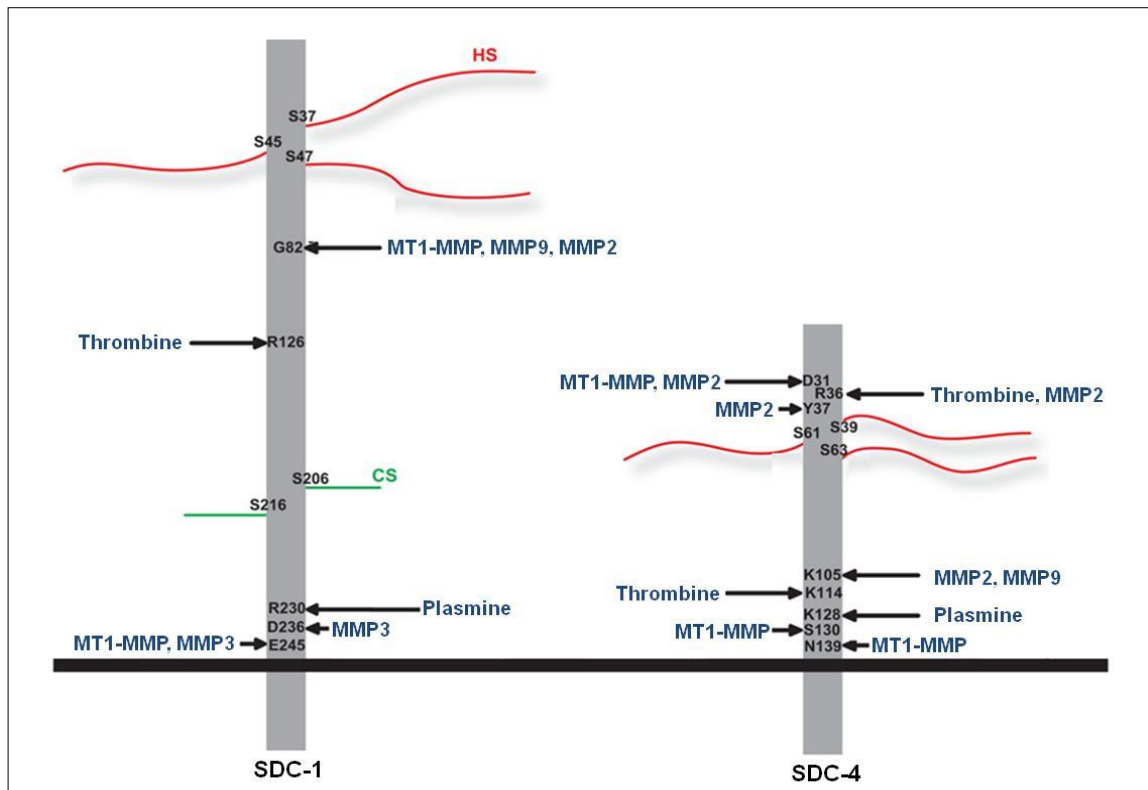


Figure 7. Localisation des sites de clivage sur l'ectodomaine des syndécanne-1 et -4.

Les sites de clivage protéolytique situés au niveau l'ectodomaine du SDC-1 et SDC-4 sont indiqués par des flèches. Les chiffres indiqués représentent la position du site de clivage dans la séquence protéique de l'ectodomaine. D'après (Manon-Jensen, Multhaupt, et Couchman 2013).

Ce mécanisme de shedding est bien décrit pour le SDC-1 et SDC-4. Par exemple, le shedding de l'ectodomaine de ces deux PGs est associé à la cicatrisation tissulaire. En effet, les ectodomains clivés de ces SDCs sont retrouvés dans l'exsudat de cicatrisation, liés à des facteurs tels que la plasmine, la thrombine et les facteurs de croissance épidermiques (Manon-Jensen, Itoh, et Couchman 2010). Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'ectodomaine du SDC-1 joue un rôle dans la formation d'un gradient de chimiokines (CXCL1), favorisant l'infiltration des polynucléaires neutrophiles à travers l'épithélium alvéolaire. Dans ce modèle de fibrose pulmonaire, on retrouve également un taux élevé de SDC-1 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (Teng, Aquino, et Park 2012).

L'activité catalytique des MMP peut être inhibée par la famille des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) qui sont au nombre de quatre (TIMP1-4). Les SDCs peuvent interagir, par l'intermédiaire des chaînes HS, avec TIMP-3 à la surface cellulaire. Cela peut

conduire à l'inhibition ou à l'internalisation des MMPs. Seule la protéine TIMP-3 s'est avérée efficace pour inhiber le clivage des SDC-1 et SDC-4 dans les cellules épithéliales mammaires de souris (Fitzgerald et al. 2000).

c) Expression des syndécannes

Bien que les SDCs soient présents à la surface de la plupart des cellules de mammifères, leur expression est fortement variable d'un tissu à un autre. Ainsi, le SDC-1 est principalement exprimé par les cellules épithéliales, tandis que le SDC-2 est présent sur les cellules endothéliales, les fibroblastes, et est particulièrement abondant dans le foie. Le SDC-3 est uniquement présent dans les tissus neuronaux, alors que le SDC-4 est ubiquitaire (Xian, Gopal, et Couchman 2009; Manon-Jensen, Itoh, et Couchman 2010b).

Afin de définir le rôle des SDCs dans le développement, des modèles de souris KO pour le SDC-1, -3, -4 ont été mis au point. Ces souris sont viables et fertiles.

Il semble que les souris KO pour le SDC-1 présentent un défaut de cicatrisation associé à une diminution de la migration des kératinocytes et une réduction de l'hyperplasie mammaire médiée par la voie Wnt/ β -caténine, suggérant un rôle important du SDC-1 dans la signalisation Wnt (Alexander et al. 2000; Stepp et al. 2002). Les souris KO pour le SDC-3 présentent quant à elles, une malformation du système nerveux au cours du développement et un trouble du comportement alimentaire associé à une résistance partielle à l'obésité définie par une diminution de l'accumulation de la masse adipeuse (Kaksonen et al. 2002; Strader et al. 2004). Les souris KO pour le SDC-4 présentent des défauts vasculaires au niveau des reins et une faible néo-angiogenèse dans la cicatrisation postnatale des plaies (Echtermeyer et al. 2001).

Une surexpression du SDC-1 a été retrouvée sur des biopsies hépatiques de patients atteints d'un CHC (Regős et al. 2020). De plus, un taux élevé de SDC-1 a été retrouvé dans le sérum des patients atteints de cancer, notamment le CHC, cancer du poumon et cancer du sein (Nault et al. 2013; Tsanou et al. 2004; Joensuu et al. 2002). Le taux sérique élevé de SDC-4 a également été retrouvé élevé chez les patients souffrant d'une insuffisance cardiaque chronique (Takahashi et al. 2011).

d) Rôle des syndécannes dans la signalisation cellulaire

Les SDCs jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire induite par de nombreux facteurs de croissance et chimiokines, participant ainsi à différents processus biologiques impliqués notamment dans la cancérogenèse tels que la prolifération et la migration.

Par exemple, dans le myélome multiple, la fixation du HGF aux chaînes HS du SDC-1, permet sa présentation à son récepteur à activité tyrosine kinase (c-Met) et l'activation des voies de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) et Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) impliquées respectivement dans la survie et la prolifération cellulaire (Derksen et al. 2003). Dans cette même maladie, les chaînes HS du SDC-1 régulent de manière positive la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, en présentant Wnt à son récepteur spécifique, déclenchant ainsi l'activation des médiateurs de signalisation impliqués dans la translocation de la β -caténine dans le noyau et la transcription de la cycline D1 qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire (Ren et al. 2018).

Le SDC-4 joue un rôle de co-récepteur du FGF-2. En effet, la fixation du FGF-2 aux chaînes HS du SDC-4 permet la formation d'un complexe ternaire SDC-4/FGF/FGFR nécessaire notamment à l'activation de la voie de signalisation MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire. Le complexe SDC-4/FGF/FGFR peut également être internalisé par macropinocytose (voie majoritaire) et par endocytose clathrine-dépendante (voie minoritaire) et induire l'activation de la voie de signalisation MAPK dépendante du FGFR depuis l'endosome (Elfenbein et al. 2012; Elfenbein et Simons 2013).

II. Les chaînes héparane sulfate

Les propriétés biologiques des chaînes HS sont dépendantes de leurs caractéristiques structurales qui sont déterminées par une voie de biosynthèse complexe et hautement régulée.

A. Structure des chaînes héparane sulfate

Les chaînes HS sont des polymères de disaccharides répétés, linéaires, composés de résidus de GlcNAc et GlcA [Figure 8]. Au niveau de certains domaines nommés NS, ces chaînes peuvent subir des modifications enzymatiques. En effet le GlcNAc est N-sulfaté

(GlcNS), le GlcA subit une épimérisation (en position C-5) en IdoA, le glucosamine O-sulfaté en position C-6 (rarement en C-3) et l'acide uronique en position C-2. Ces modifications de structure confèrent aux HS une organisation moléculaire hétérogène dans laquelle des domaines N-acétylés (NAc), faiblement ou non sulfatés, alternent avec des domaines hautement sulfatés (S) (El Masri et al. 2017; Laguri, Arenzana-Seisdedos, et Lortat-Jacob 2008). Ce domaine S est impliqué dans la reconnaissance et la liaison de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire telles que les chimiokines et les facteurs de croissance (El Masri et al. 2020).

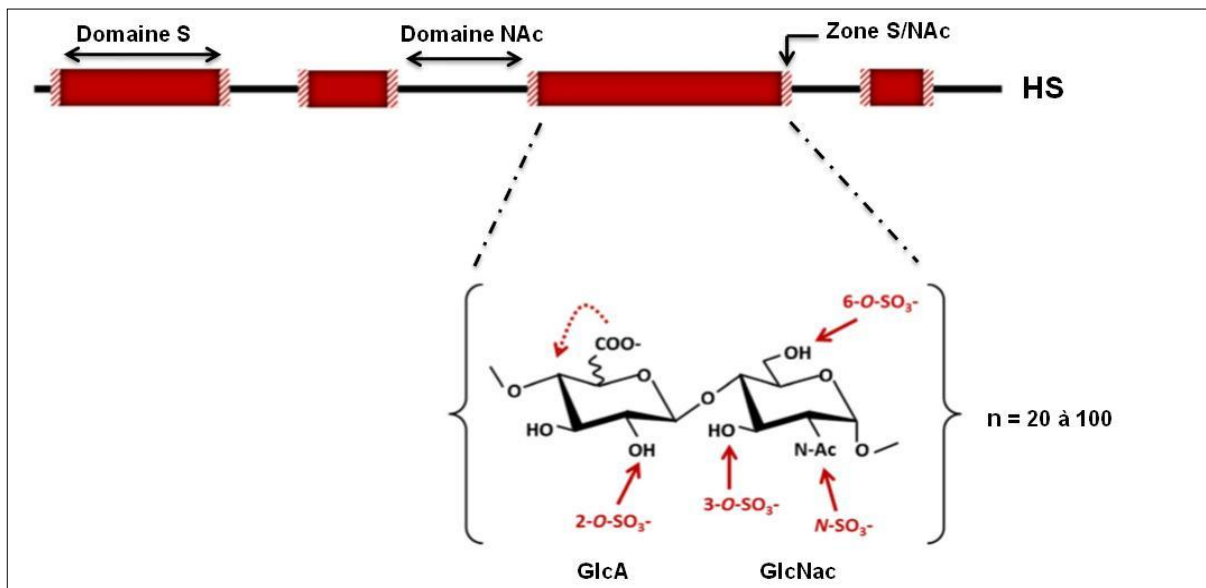


Figure 8. Structure des chaînes héparane sulfate.

Les chaînes HS sont constituées de la répétition d'unités disaccharidiques constituées d'acide glucuronique (GlcA)-N-acetylglucosamine (GlcNac). Au sein de ces chaînes, des domaines sulfatés (S), représentés en rouge, créés par des modifications enzymatiques telles que l'épimérisation et la sulfatation, sont séparés par des domaines N-acétylés (NAc), représentés par des traits noirs. Entre chaque domaine il existe une zone de transition appelée zone S/NAc (cases en pointillés orange), composée de disaccharides N-acétylés et sulfatés. Adapté de (El Masri et al. 2017; Laguri, Arenzana-Seisdedos, et Lortat-Jacob 2008)

B. Biosynthèse des chaînes héparane sulfate

La biosynthèse des HS est un processus multi-étape impliquant :

- **La formation d'un tétrasaccharide de liaison**

Le tétrasaccharide de liaison « linker » sert de site de fixation pour les chaînes HS. Ce tétrasaccharide est commun à l'héparine, aux chaînes CS et DS (Imberty, Lortat-Jacob, et Pérez 2007; H. A. B. Multhaupt et Couchman 2012). Il est composé d'un acide glucuronique-galactose-galactose-xylose (GlcA-Gal-Gal-Xyl) où le Xyl est attaché à un résidu sérine, présent au niveau de la protéine centrale des PGs [Figure 9].

- **L'élongation de la chaîne héparane sulfate**

Une fois que le premier résidu GlcNAc est ajouté par une enzyme exostosine-like 3 (Extl3), qui présente une activité glucosaminyl-transférase, l'élongation de la chaîne HS se poursuit par l'ajout d'unités GlcA et GlcNAc en séquence alternée aux extrémités non-réductrices du polymère en élongation. Cette élongation est assurée par des enzymes exostosines, Ext1 et Ext2, qui forment un complexe hétérodimérique nécessaire à leur activité glucosaminyl-/ glucuronyl-transférase dans le Golgi (McCormick et al. 2000; Pinhal et al. 2001). D'autres enzymes telles que Extl1 et Extl2 qui semblent avoir une activité glucosaminyl-transférase ont été identifiées (Busse et al. 2007). En revanche, leur implication dans l'élongation des chaînes HS est très peu connue.

- **La maturation de la chaîne héparane sulfate**

Parallèlement à l'allongement de cette chaîne, il se produit une maturation par une série de modifications structurelles.

La première de ces réactions est la N-désacétylation/N-sulfatation du glucosamine, catalysée par des enzymes bifonctionnelles de la famille des N-désacétylase/N-sulfotransférase (NDST), présentant 4 isoformes. Elle est suivie par l'épimérisation de GlcA en résidus d'IdoA (par la C5-épimérase) et la 2-O-sulfatation de l'IdoA par la 2-O-sulfotransférase (2OST). Enfin, les groupements sulfate en C6 et C3 du glucosamine sont ajoutés par les enzymes 6-O-sulfotransférase (6OST qui présentent 3 isoformes) et 3-O-sulfotransférase (3OST, qui présentent 7 isoformes), respectivement (Poulain et Yost 2015).

La 3-O-sulfatation est relativement rare et représente généralement moins de 1 % du total des unités disaccharidiques (Mochizuki et al. 2020).

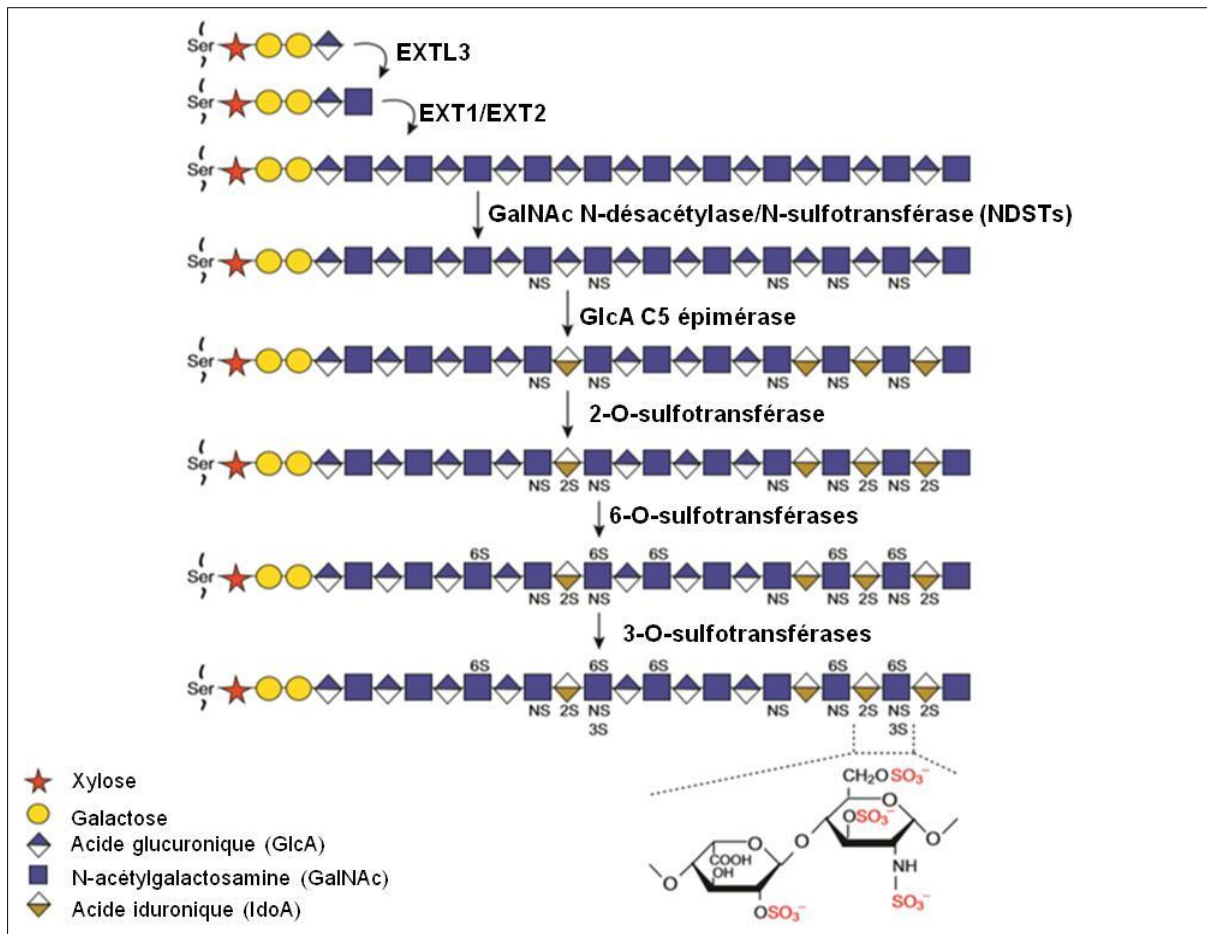


Figure 9. Biosynthèse des chaînes héparane sulfate.

Les chaînes HS sont reliées par un xylose à un résidu sérine sur la protéine centrale du protéoglycane. L'ajout du premier résidu GlcNAc est ensuite catalysé par l'enzyme EXT3. L'allongement des chaînes est obtenu par l'ajout alternatif de résidus de GlcA et de GlcNAc par les glycosyl-transférases EXT1 et EXT2. Au cours de la polymérisation, les chaînes subissent plusieurs modifications enzymatiques, notamment l'épimérisation du GlcA en IdoA et la sulfatation de la chaîne HS à différentes positions. ser, sérine ; NS, groupe N-sulfate sur les résidus de glucosamine ; 2S, groupe 2-O-sulfate sur les résidus GlcA ou IdoA ; 3S, 6S, Groupe 3-O-sulfate et 6-O-sulfate sur les résidus de GlcNAc, respectivement (Poulain et Yost 2015).

Ces processus de modification qui ont lieu au cours de la maturation des chaînes HS ne sont généralement pas uniformes. Il existe 12 modèles de sulfatation des unités disaccharidiques [Figure 10] et les combinaisons de ces unités permettent la formation de séquences variables et spécifiques de chaque ligand (HBP) (Mochizuki et al. 2020).

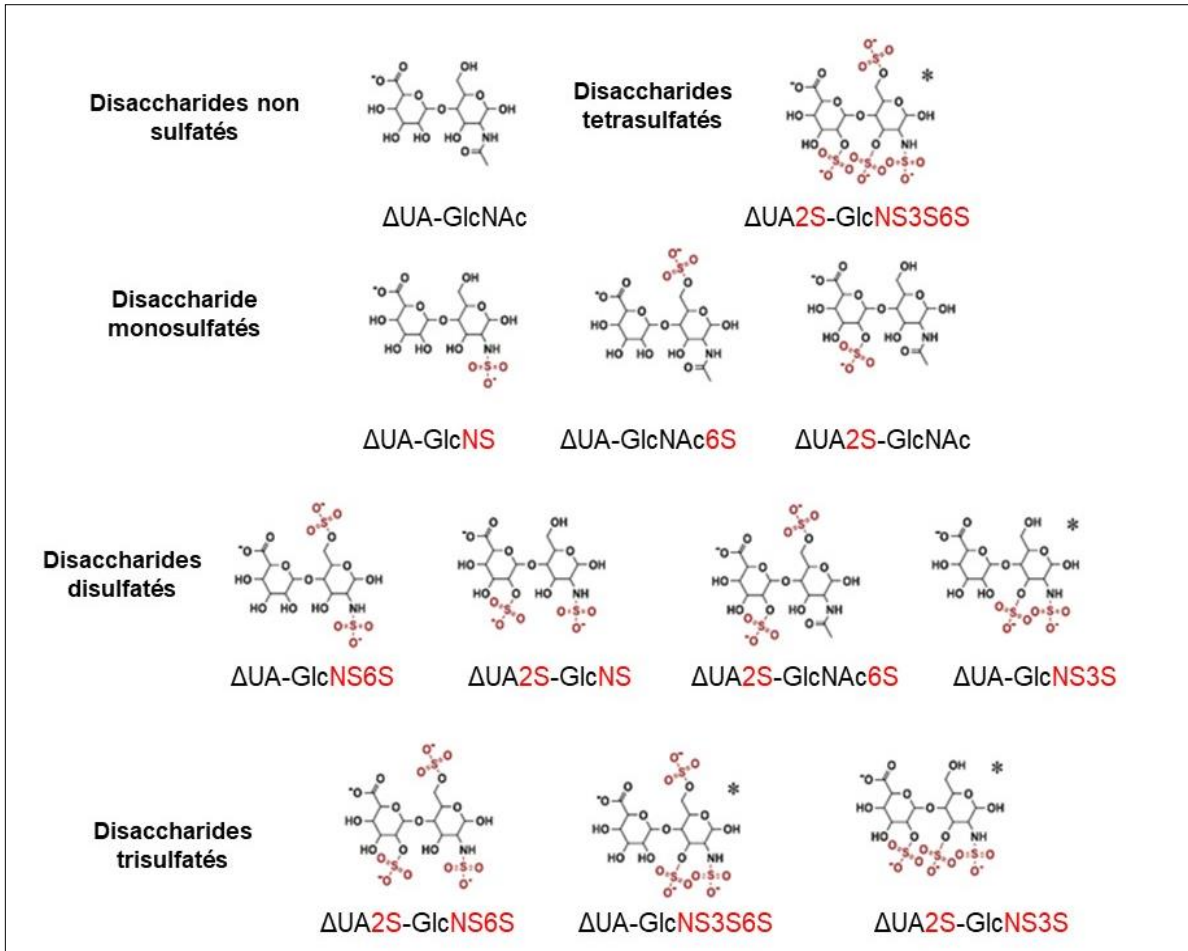


Figure 10. Motifs de sulfatation des unités disaccharidiques des chaînes héparane sulfate.

Douze unités disaccharidiques constituant les chaînes héparane sulfate (ayant différents motifs sulfatés) sont illustrées. Dans les chaînes HS, le GlcNAc est N-sulfaté (NS) et O-sulfaté en position C-6 (6S) (rarement en C-3, 3S). ΔUA indique l'acide uronique (GlcA ou IdoA) O-sulfaté en position C-2 (2S). Les astérisques () indiquent les unités 3-O-sulfatées. D'après (Mochizuki et al. 2020).*

C. Expression des enzymes de biosynthèse des chaînes héparane sulfate

Les caractéristiques structurales des chaînes HS sont donc finement régulées par l'action de ces enzymes et l'expression différentielle de leurs multiples isoformes. En effet, l'inhibition de l'expression de Ext1 et Ext2 par une stratégie d'ARN interférent dans un modèle de cellules rénales d'embryons humains (HEK) a montré une diminution de la longueur des chaînes HS. De manière similaire, il a été montré que les fibroblastes embryonnaires, isolés de souris porteuses d'une mutation hypomorphe dans le gène codant la

protéine Ext1, synthétisent des chaînes HS plus courtes que les fibroblastes issus de souris *wild-type*, non porteuses de la mutation (Yamada et al. 2004). Chez l'Homme, des mutations touchant les gènes codant Ext1 et Ext2 sur les chromosomes 8q24.1 et 11p11, respectivement ont été décrites, ayant pour conséquence un arrêt de la traduction de la protéine et une perte de son activité glycosyltransférase. Ces mutations sont à l'origine d'une maladie héréditaire autosomique dominante appelée la maladie des exostoses multiples (MEM), affectant 1 personne sur 100.000, dont les signes cliniques se manifestent par une excroissance osseuse cartilagineuse au niveau de l'épiphyse des os longs due à une absence ou diminution de la synthèse des chaînes HS qui conduit à une prolifération anormale des chondrocytes et à long terme à un ostéosarcome (Ruan et al. 2018).

La réaction de N-désacétylation/N-sulfatation, assurée par les enzymes NDST, est considérée comme une étape clé de la maturation des HS, car toutes les modifications enzymatiques ultérieures, l'épimérisation de GlcA en IdoA et les diverses réactions de sulfatation, ne se produisent qu'à proximité des groupements N-sulfate.

Les enzymes NDST-1 et NDST-2 sont exprimées dans tous les tissus embryonnaires et adultes, mais leurs niveaux d'expression diffèrent selon les organes. Les NDST-3 et NDST-4 sont principalement exprimées au cours du développement embryonnaire, mais on trouve également la NDST-3 dans le cœur et le cerveau chez l'adulte. En revanche, la NDST-4 est exprimée dans le cerveau adulte à de faibles niveaux (Grobe et al. 2002).

Des souris knock-out (KO) NDST-1 (-/-) présentent des malformations crâniennes et oculaires et une détresse respiratoire, entraînant la mort néonatale, suggérant qu'une compensation transcriptionnelle par les autres isoformes de la NDST n'a pas lieu. A l'inverse, les souris KO NDST-2 (-/-) sont viables mais présentent des mastocytes dépourvus de chaînes d'héparine sulfatées (Grobe et al. 2002). Chez l'Homme, des mutations autosomiques récessives du gène codant NDST-1 ont été identifiées et liées à une déficience intellectuelle qui se manifeste par des troubles cognitifs et d'apprentissage (Reuter et al. 2014)

III. Interaction entre les chaînes héparane sulfate et les protéines de liaison à l'héparine (HBP)

Au cours de ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans l'analyse de la structure des chaînes HS et de nombreuses études ont mis en évidence la contribution majeure des groupements O-sulfates dans l'activité biologique des chaînes HS. En effet, il est bien établi que l'interaction entre les chaînes HS et les protéines de type Heparin Binding Protein (HBP), telles que les facteurs de croissance et les chimiokines, implique des unités saccharidiques avec des motifs de sulfatation bien définis. Ainsi, le degré de spécificité structurale de ces sites de liaison varie d'un ligand à l'autre, en fonction de la nature des sulfates impliqués (El Masri et al. 2017). Les groupements 3-O-sulfates ont rarement été associés à une interaction hautement sélective, tandis que les N-, 2-O-sulfates, abondants, font partie de la plupart des sites de liaison aux protéines. Enfin, la 6-O-sulfatation peut occuper un statut intermédiaire (El Masri et al. 2017).

A. Les facteurs de croissance : exemple du FGF

Les Fibroblast Growth Factors (FGF) sont une famille de 22 protéines qui, en fonction de leur mécanisme d'action, peuvent être classées en trois types : FGF intracrine, FGF paracrine et FGF endocrine (Li et al. 2016). Ces facteurs de croissance jouent un rôle majeur dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et la différenciation (Pye et al. 2000a). Ils sont également associés à la progression de plusieurs types de cancer notamment le cancer du sein (Presta et al. 2017).

Seuls les FGFs paracrines, tels que le FGF-1 et FGF-2, se lient aux chaînes HS et forment un complexe ternaire FGF/HS/FGFR, essentiel à l'activité mitogénique du FGF qui aboutit à l'activation des voies de signalisation intracellulaires telle que la voie des MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire (Gallagher 2015; Li et al. 2016 ; Presta et al. 2017). Ces mécanismes confèrent ainsi aux HSPG un rôle de co-récepteur, associé à la formation d'un gradient de FGF, essentiel à la signalisation paracrine (Presta et al. 2017).

L'étude biochimique et cristallographique du complexe FGF/HS/FGFR a permis de mettre en évidence que la fixation du FGF-1 et FGF-2 aux chaînes HS, requiert la présence des motifs 2-O-sulfate, N-sulfate et que la présence du motif 6-O-sulfate est indispensable à l'activité de ces deux facteurs de croissance (Pye et al. 2000; Powell, Fernig, et Turnbull

2002). En revanche, l'induction de l'activité du FGF-2 nécessite des oligosaccharides plus longs (10-12 unités saccharidiques) (El Masri et al. 2017).

B. Les chimiokines : exemple de CXCL12 (SDF-1) et de CCL5 (RANTES)

- **Définition**

Les chimiokines sont de petites protéines chimio-attractantes, appartenant à la famille des cytokines. Elles sont caractérisées par la présence de résidus cystéine très conservés, qui se répartissent en quatre sous-familles CC, CXC, CX3C et C, selon le nombre et l'espacement de ces résidus cystéine dans la partie N-terminale de la protéine. Ces chimiokines sont impliquées dans la signalisation cellulaire en se liant à leurs récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Lortat-Jacob, Grosdidier, et Imberty 2002). Elles jouent ainsi un rôle important dans plusieurs processus biologiques tels que le développement embryonnaire, l'angiogenèse, la régulation de l'hématopoïèse et la maturation des leucocytes (Charnaux et al. 2005).

Les chaînes HS jouent un rôle important dans la régulation de la diffusion et la séquestration des chimiokines. Dans certains cas, la capture de la chimiokine par les chaînes HS empêche sa libération et donc son activité. Cependant, en régulant la diffusion des chimiokines, les chaînes HS participent à la formation et à la stabilisation des gradients chimiotactiques nécessaires à l'orientation de la migration des leucocytes vers les sites inflammatoires. Les chaînes HS protègent également les chimiokines de l'inactivation et de la dégradation enzymatiques par notamment les sérine protéases telle que la dipeptidyl peptidase IV (Metzemaekers et al. 2016). Enfin, elle peuvent moduler l'activité des chimiokines en induisant leur oligomérisation (El Masri et al. 2020). C'est notamment le cas de la chimiokine Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1), nommée également CXCL12, qui se présente sous forme monomérique en solution et sous forme de dimère en présence d'oligosaccharides dérivés d'héparine (Sadir et al. 2001).

- **La chimiokine CXCL12 (SDF-1)**

La chimiokine CXCL12 ou (SDF-1) est un membre de la sous-famille des chimiokines CXC présentant un rôle de médiateurs pro-inflammatoires et chimio-attractants pour plusieurs types cellulaires, y compris les monocytes et les cellules T. D'un point de vue structural, il a

été montré que la chimiokine CXCL12 contient un motif heparin binding de type BBXB (Lys-24, His-25 et Lys-27). Ce motif est essentiel à liaison de la chimiokine aux chaînes HS et requiert, plus précisément, la présence des motifs 6-O-sulfates au niveau des unités saccharidiques des chaînes HS, générant ainsi des interactions électrostatiques (Sadir et al. 2001; S. Zhang et al. 2012).

Des travaux antérieurs de notre équipe de recherche ont montré que parmi les SDCs, seul le SDC-4 joue un rôle de co-récepteur de la chimiokine CXCL12 dans les cellules HeLa, les cellules T et les macrophages (Charnaux et al. 2005). Par la suite, notre équipe a montré que cette interaction entre les chimiokines et les chaînes HS serait impliquée dans la progression du CHC. En effet, la liaison de CXCL12 à son récepteur CXCR4 et au SDC-4 active les voies de signalisation MAPK et induit la prolifération, la migration et l'invasion des cellules d'hépatome humain (Huh7). Ces effets biologiques induits par SDF-1 ont été fortement réduits en inhibant l'expression du SDC-4 par une stratégie d'ARN interférent (Sutton, Friand, Brulé-Donneger, et al. 2007; Friand et al. 2009).

- **La chimiokine CCL5 (RANTES)**

La chimiokine CCL5 (RANTES), membre de la sous-famille des chimiokines CC, induit la migration des cellules T, des monocytes et des cellules dendritiques en se liant à plusieurs RCPG, à savoir CCR1, CCR3 et CCR5. Le motif BBXB a également été identifié dans la chimiokine CCL5. La caractérisation de la structure cristallographique de CCL5, en complexe avec l'héparine, a montré la contribution des motifs 6-O-sulfates présents au sein des unités saccharidiques de l'héparine dans l'interaction avec CCL5. Cette interaction est par ailleurs, essentielle à la formation d'un gradient chimiotactique au niveau des sites inflammatoires, nécessaire à la migration directionnelle des cellules (Shaw et al. 2004). Des travaux antérieurs de notre équipe ont également montré que la liaison de la chimiokine CCL5 au SDC-1, SDC-4 et à son récepteur CCR1 induit la migration et l'invasion des cellules d'hépatome humain (Huh7, HepG2 et Hep3B) (Charni et al. 2009).

IV. Modification post-synthèse des chaînes héparane sulfate

Les modifications de la structure des chaînes HS à la suite de leur synthèse, que ce soit au niveau de leurs profils de sulfatation (6-O-sulfatation) ou de leur longueur, peuvent être une conséquence de l'action de différentes enzymes extracellulaires, à savoir les sulfatases 1

et 2 et l'héparanase. Ces modifications structurales peuvent avoir des conséquences fonctionnelles sur l'activité des HBP.

A. Les sulfatases-1 et -2

Il existe 17 isoformes de sulfatases identifiées chez l'homme qui sont codées par 17 gènes distincts. Les premières sulfatases de mammifères ont été identifiées grâce à l'étude des maladies de surcharge lysosomale telles que les mucopolysaccharidoses (MPS) et la leucodystrophie métachromatique (LDM). Ces maladies héréditaires, récessives, sont dues à une mutation des gènes codant les enzymes sulfatases impliquées dans le catabolisme des GAG ou des sulfolipides (glycolipides sulfatés) dans les lysosomes, ayant pour conséquence l'accumulation de ces molécules dans les tissus et les fluides corporels (Diez-Roux et Ballabio 2005).

Les premières sulfatases identifiées ont été nommées en fonction de leur capacité à cliver les substrats naturels ou artificiels. Les sulfatases qui peuvent cliver des composés artificiels chromogènes ou fluorogènes portant un noyau benzénique hétérocyclique (groupe aryle) ont été nommées arylsulfatases (par exemple, arylsulfatase A, B, C, D et E). Par la suite, certaines sulfatases nouvellement découvertes ont été également appelées arylsulfatases, mais uniquement sur la base de l'homologie de séquence, même si leur activité arylsulfatase est soit absente, soit non testée (arylsulfatase F, G, H, I et J) (Diez-Roux et Ballabio 2005).

Par la suite, d'autres sulfatases à activité arylsulfatase, nommées sulfatase-1 (SULF-1) et sulfatases-2 (SULF-2) ont été découvertes. La particularité des enzymes SULF-1 et SULF-2 (ou SULFs pour désigner les deux), associées aux modifications des chaînes HS, réside dans le fait qu'elles soient actives dans les compartiments extracellulaires à la fois à la surface cellulaire et dans la MEC, avec une activité optimale à pH neutre (Uchimura et al. 2006).

1. Structure

Il y a une importante homologie structurale entre SULF-1 et SULF-2. Ces dernières proviennent d'un polypeptide précurseur de 125 kDa qui est clivé par une protéase pour générer un hétérodimère mature comprenant deux sous-unités de 75 et 50 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures [Figure 11]. Bien que le site actif se situe au niveau de la sous-unité de 75 kDa, les deux sous-unités sont indispensables à l'activité des SULFs (Vivès, Seffouh, et Lortat-Jacob 2014).

Ces enzymes comportent, à partir du domaine N-terminal, un domaine catalytique (CAT) contenant un résidu cystéine très conservé, qui subit une modification post-traductionnelle pour être converti en N-formylglycine (FGly), essentielle pour son activité enzymatique ; un domaine basique, hautement chargé (HD), qui s'étend sur la sous-unité N-terminale et C-terminale. Le domaine HD est impliqué dans la fixation des chaînes HS et est donc nécessaire à l'activité endo-6-O-sulfatase de l'enzyme. Ce domaine représente une caractéristique propre des SULFs et il n'est retrouvé dans aucune autre enzyme à activité sulfatase, il n'est donc pas nécessaire à l'activité arylsulfatase partagée avec les autres sulfatases. Enfin, la région C-terminale de l'enzyme présente une homologie avec la glucosamine-6-sulfatase (G6S) et la GlcNAc transférase de la plante *Arabidopsis thaliana*, ce qui suggère un rôle de ce domaine dans la reconnaissance des motifs glucosamine des chaînes HS (Vivès, Seffouh, et Lortat-Jacob 2014; El Masri et al. 2017; 2020).

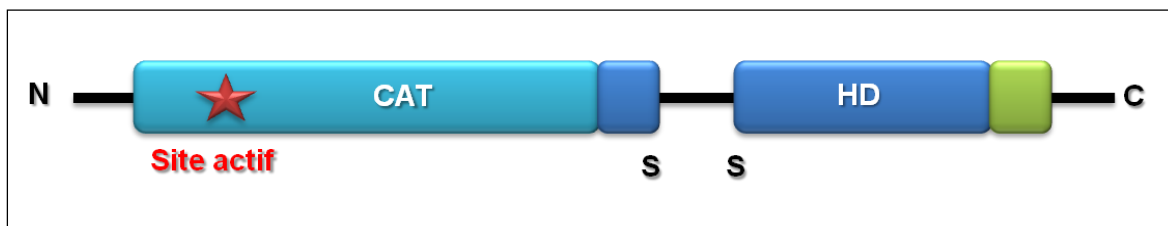


Figure 11. Structure des Sulfatases-1 et -2.

Les enzymes SULF-1 et SULF-2 ont une activité 6-endosulfatase, elles comportent, à partir du domaine N-terminal, un domaine catalytique (CAT) contenant le site actif de l'enzyme, représenté par une étoile rouge ; un domaine basique, hautement chargé (HD), nécessaire à la fixation des chaînes HS ; enfin la région C-terminale de l'enzyme qui semble jouer un rôle dans la reconnaissance des motifs glucosamine. D'après (El Masri et al. 2020).

2. Rôle fonctionnel des sulfatases-1 et -2 : conséquences sur l'interaction HS-HBP

Les SULFs catalysent la 6-O-désulfatation des chaînes HS avec une forte préférence pour les disaccharides trisulfatés [GlcA/IdoA(2S)-GlcNS(6S)] qui se trouvent essentiellement dans les domaines S des chaînes HS (Uchimura et al. 2006). Bien qu'il soit abondant dans l'héparine, ce motif disaccharidique est relativement rare dans les chaînes HS. La modification de la structure des chaînes HS induite par les SULFs est donc structurellement subtile, mais avec de grandes conséquences fonctionnelles, car le motif 6-O-sulfate des domaines S est essentiel pour la liaison de nombreuses protéines de signalisation (El Masri et al. 2017; 2020).

Il est par conséquent impliqué dans de nombreux processus physiopathologiques, y compris le développement, la réparation tissulaire et le cancer.

À l'appui de cette analyse, il a été démontré que la 6-O-désulfatation des chaînes HS peut avoir différentes conséquences sur la signalisation cellulaire. Par exemple, elles peuvent réguler négativement l'activité mitogénique du FGF, en empêchant la formation du complexe ternaire FGF/HS/FGFR (El Masri et al. 2017). Ces enzymes peuvent, au contraire, réguler positivement la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en permettant la libération de Wnt et son interaction avec son récepteur [Figure 12]. Cette fixation aboutit à l'activation des médiateurs de signalisation responsables de la translocation de la β -caténine dans le noyau et la transcription des gènes impliqués dans des processus physiopathologiques tels que le développement embryonnaire et la tumorigenèse (voie de signalisation décrite précédemment dans la partie GPCs page 27) (Ai et al. 2003; Guo et al. 2020).

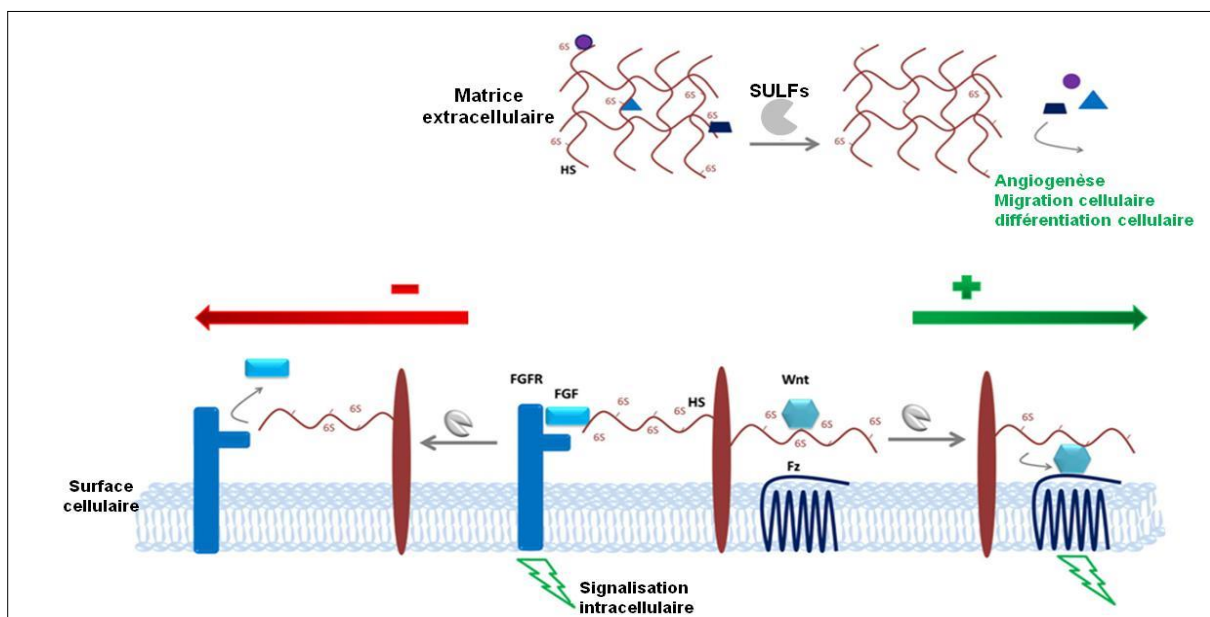


Figure 12. Régulation de la signalisation des heparin binding proteins par les SULFs.

La 6-O-désulfatation des chaînes HS médiée par les SULFs peut avoir différentes conséquences sur la signalisation des HBP. D'une part, les SULFs peuvent réguler négativement l'activité du FGF (à gauche), en empêchant la formation du complexe ternaire FGF/HS/FGFR, essentiel à la signalisation intracellulaire. D'autre part, les SULFs peuvent libérer des protéines séquestrées par les chaînes HS pour déclencher leurs fonctions. Par exemple, elles régulent positivement la voie Wnt/ β -caténine (à droite) en permettant la libération de Wnt des HSPG membranaires ou HS de la matrice extracellulaire, et ainsi une liaison ultérieure à son récepteur. D'après (El Masri et al. 2017).

3. Expression des sulfatases-1 et -2 au cours du développement

Une mortalité néonatale élevée et de multiples anomalies squelettiques ont été observées chez les souris KO (-/-) pour les gènes codant SULF-1 et SULF-2 (Holst et al. 2007). A l'inverse, les souris KO (-/-) uniquement pour SULF-1 ou SULF-2 sont viables et ne présentent pas d'anomalies sévères, suggérant une compensation fonctionnelle entre les deux isoformes au cours du développement. En accord avec cela, l'analyse structurale des chaînes HS a révélé que la teneur en 6-O-sulfatation est significativement plus élevée chez les souris KO (-/-) pour les deux SULFs que chez les souris KO simple, ce qui conforte une coopération fonctionnelle des isoformes SULF-1 et SULF-2 (Lamanna et al. 2006). Cependant, ces études ont également fourni des indications sur la spécificité de ces isoformes. En effet, il est intéressant de noter qu'une surexpression de SULF-1 pourrait compenser la perte de SULF-2 en termes d'activité, mais que la surexpression de SULF-2 ne pourrait pas compenser complètement l'absence de SULF-1 (Lamanna et al. 2006). Ces résultats suggèrent que la différence entre ces deux SULFs résiderait au niveau de leur domaine HD qui pourrait contribuer à des différences dans l'affinité avec les chaînes HS.

4. Expression et implication des sulfatases-1 et -2 dans le cancer

Bien que SULF-1 et SULF-2 semblent avoir la même activité endosulfatase et la même spécificité vis-à-vis des unités saccharidiques sulfatées des chaînes HS, au cours de la tumorigenèse, les sulfatases peuvent avoir des fonctions d'inducteurs ou d'inhibiteurs des voies de signalisations favorisant ou non la cancérogenèse.

Il a été montré que l'expression de SULF-1 est diminuée dans 75% des cancers de l'ovaire (Narita et al. 2006). Une abolition de l'expression de SULF-1 a été retrouvée dans les lignées de cellules cancéreuses dérivées du cancer du sein, du pancréas, du rein et du foie, ce qui suggère que la répression de l'expression de SULF-1 est relativement répandue parmi les cancers épithéliaux (J. Lai et al. 2003).

La signalisation cellulaire induite par le FGF-2 est inhibée par la surexpression de SULF-1 avec une inhibition de la dimérisation du FGFR et une inhibition de l'activation du domaine tyrosine kinase du FGFR, entraînant par conséquent une inhibition de l'angiogenèse

tumorale dans un modèle de xénogreffe du cancer du sein. Des effets similaires de SULF1 sur la signalisation du FGF-2 ont été observés avec le VEGF (Narita et al. 2006).

Contrairement à l'effet suppresseur de tumeurs de SULF-1, SULF-2 favorise la tumorigenèse dans plusieurs types de cancers, notamment le cancer du sein (Morimoto-Tomita et al. 2005). De plus, l'étude de l'interaction entre SULF-2 et les HSPG tel que le GPC-3, dans un modèle de CHC a révélé que la surexpression de SULF-2 induit l'augmentation de l'expression du GPC-3, la liaison du FGF-2 à son récepteur et la signalisation du FGF-2, à la fois *in vitro* et *in vivo*. En revanche, la diminution de l'expression de SULF-2, par une stratégie d'ARN interférent dans les lignées de CHC, a comme conséquence une diminution de l'expression du GPC-3 et une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules de CHC (J.-P. Lai et al. 2008). Il est également intéressant de noter que le taux sérique de SULF-2 a été montré comme élevé chez des patients atteints de cirrhose, ce qui suggère une utilisation potentielle comme biomarqueur sérique (Singer et al. 2015).

B. L'héparanase

1. Structure de l'héparanase

L'héparanase (HPSE) est une endo- β -D-glycosidase qui clive les chaînes HS. Le gène *HPSE* code un polypeptide précurseur appelé pré-prohéparanase. Ce polypeptide contient un peptide signal clivable au niveau de son domaine N-terminal, lors de sa translocation vers le réticulum endoplasmique, générant une pro-enzyme (pro-héparanase) de 65 kDa [Figure 13]. La pro-héparanase est ensuite transloquée vers l'appareil de Golgi puis sécrétée dans la matrice extracellulaire. Une fois sécrétée, elle interagit avec les composants extracellulaires, tels que le SDC-1 et le SDC-4, avant qu'ils soient co-intériorisés et mobilisés vers l'endosome/lysosome tardif. La pro-héparanase subit alors un clivage protéolytique par une enzyme, la cathepsine L. Ce clivage, génère deux sous-unités de 50 et de 8 kDa, qui s'associent, de manière non covalente, en un hétérodimère pour former l'HPSE active (Goldshmidt et al. 2002; Israel Vlodavsky et al. 2016).

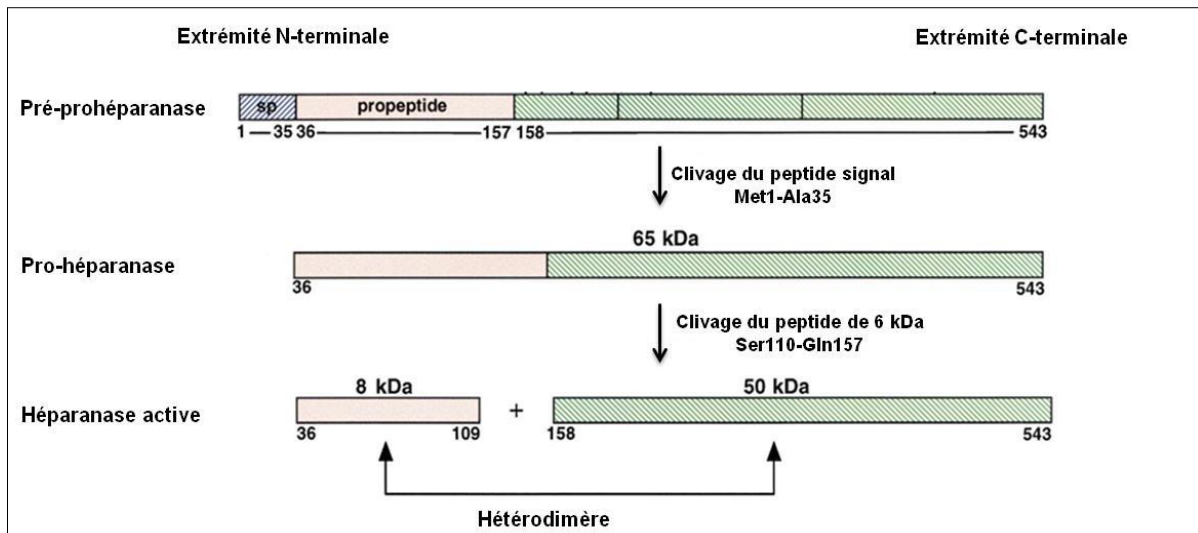


Figure 13. Structure de l'héparanase

L'héparanase est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif (pré-prohéparanase), de 543 acides aminés. Ce précurseur contient un peptide signal N-terminal (SP, Met1-Ala35), clivé lors de sa translocation vers le réticulum endoplasmique pour former la pro-héparanase de 65 kDa. La pro-héparanase subit ensuite un deuxième clivage protéolytique, donnant des sous-unités protéiques de 8 et 50 kDa qui s'hétérodimérisent pour former l'enzyme active. D'après (Parish, Freeman, et Hulett 2001).

2. Rôle fonctionnel de l'héparanase : conséquences sur l'interaction HS-HBP

L'HPSE active, clive les chaînes HS au niveau des GlcA en fragments d'environ 5-7 kDa, composés de 10 à 20 unités saccharidiques. Cette enzyme présente une activité endoglycosidase maximale entre pH 5 et 6 (I. Vlodayvsky et Friedmann 2001a; Gingis-Velitski et al. 2004). Ainsi, les fragments de HS générés peuvent activer des cascades de signalisation, en libérant des facteurs de croissance qui favorisent la prolifération cellulaire, la migration et l'angiogenèse tels que le HGF, FGF2 et VEGF (Coombe et Gandhi 2019).

De plus, il a été montré que l'activité de l'HPSE pouvait générer des fragments HS, fonctionnels, qui sont nécessaires à la formation de complexes ternaires comme le FGF2-HS-FGFR, conduisant à la dimérisation du récepteur et son autophosphorylation, activant ainsi des voies de signalisation intracellulaires telle que la voie MAPK, essentielle à la prolifération cellulaire (Vreys et David 2007).

3. Expression et implication de l'héparanase dans le cancer

Des souris dont le gène codant l'HPSE a été invalidé ont été développées. Ainsi, en dépit de l'absence totale d'expression génique et d'activité enzymatique de l'HPSE, les souris HPSE (-/-) se développent normalement, sont fertiles et ne présentent aucune anomalie anatomique ou fonctionnelle apparente. En revanche, une accumulation de longues chaînes HS et une augmentation de l'expression des MMP telles que les MMP-2, MMP-9 et MMP-14 ont été observées, ce qui suggère que les MMP peuvent compenser au moins partiellement les effets d'un déficit en HPSE (Zcharia et al. 2009).

Une augmentation des taux sériques de l'HPSE et du SDC-1 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de myélome. Dans ce sens, un lien entre l'HPSE et le shedding du SDC-1 a été établi. En effet, la surexpression de l'HPSE dans un modèle de myélome entraîne une augmentation de l'expression de la MMP-9 et une augmentation du shedding du SDC-1, tandis que l'inhibition de l'expression de l'HPSE, par une stratégie d'ARN interférent (shRNA), entraîne une diminution de l'activité de la MMP-9 et ainsi une diminution du potentiel métastatique des cellules tumorales associée à une diminution du shedding du SDC-1 (Purushothaman et al. 2008).

L'expression de l'HPSE est en corrélation avec le potentiel métastatique des cellules tumorales et est associée à un mauvais pronostic (I. Vlodavsky et Friedmann 2001). En effet, une augmentation de l'expression de l'HPSE est retrouvée dans le cancer du poumon non à petites cellules et est en corrélation avec l'apparition de métastases ganglionnaires (Fernandes dos Santos et al. 2014).

De manière similaire, une augmentation de l'expression de l'HPSE a été retrouvée dans les cellules d'hépatome humain. Une diminution de l'expression de l'HPSE par une stratégie d'ARN interférent entraîne une réduction significative du phénotype invasif traduite par une diminution de la migration et l'invasion des cellules tumorales (X.-P. Chen et al. 2015).

4. Inhibition de l'héparanase dans le cancer

Des mimétiques de GAGs hautement sulfatés tels que ssLMWH (supersulfated Low-Molecular-Weight Heparin) et le phosphomannopentose sulfate (PI-88) semblent inhiber, de manière compétitive, l'activité endoglucuronidase de l'HPSE.

- **ssLMWH**

L'utilisation de l'héparine comme agent thérapeutique contre le cancer est limitée en raison de sa puissante activité anticoagulante et le risque de complications hémorragiques. Il a été montré que l'héparine supersulfatée de faible poids moléculaire (ssLMWH), obtenue par dépolymérisation contrôlée de l'héparine, présente une faible activité anticoagulante (Naggi et al. 1987). L'activité anti-tumorale de ssLMWH a été étudiée à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des modèles expérimentaux de sarcomes synoviaux (Cassinelli et al. 2018). L'inhibition de la prolifération et de l'invasion des cellules de sarcome synovial est associée à la diminution de l'activité de l'HPSE et une diminution de l'activité des récepteurs tyrosine kinases tels que l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et PDGFR (Platelet Derived Growth Factor). *In vivo*, l'administration de ssLMWH en plus des inhibiteurs des RTK, inhibe la prolifération des sarcomes synoviaux et l'apparition des métastases pulmonaires (Cassinelli et al. 2018).

- **PI-88**

Le PI-88 est un mélange d'oligosaccharides de mannose monophosphorylés hautement sulfatés, dérivés du phosphomannane extracellulaire de la levure *Pichia (Hansenula) holstii* (Kudchadkar, Gonzalez, et Lewis 2008). Dans les modèles précliniques, l'administration continue de PI-88 inhibe la prolifération, la vasculogénèse et les métastases ganglionnaires des adénocarcinomes mammaires chez le rat (Parish et al. 1999). Le PI-88 a été étudié dans un essai de phase II comme traitement chez les patients atteints de CHC après résection chirurgicale. La diminution des taux de récurrence a conduit à un essai de phase III (NCT01402908). En revanche, le PI-88 ne semble pas présenter une efficacité thérapeutique à long terme, par conséquent l'étude a été interrompue (C.-J. Liu et al. 2014).

La régulation de l'expression des enzymes SULFs et HPSE, notamment dans le contexte de la carcinogénèse, est encore très peu connue. Certains polymorphismes associés aux gènes codant ces enzymes, contribuent à la modification de leur expression et ainsi à la modulation de leurs fonctions biologiques.

La modification de l'expression génique et protéique de ces enzymes, due à la présence de ces variations génétiques, pourrait être la conséquence d'une diminution de l'interaction des facteurs de transcription avec la région promotrice du gène, l'altération de la fixation de l'ARN polymérase ou l'altération de l'épissage (Yue et al. 2010 ; Han et al. 2011). Ainsi, ces

variations génétiques sont associées à la susceptibilité de développer des maladies telles que l'obésité, le cancer du sein et le CHC (Matikainen et al. 2013; Okolicsanyi et al. 2014; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020).

C. Les polymorphismes génétiques des enzymes impliquées dans la modification post-synthèse des chaînes héparane sulfate

La variation de séquence la plus courante dans le génome humain est la substitution d'une seule base, communément appelée « single nucleotide polymorphism » (SNP). Par définition, un SNP est une variation génétique stable dans la séquence d'un gène avec une fréquence supérieure à 1% dans au moins une population (O. Ostrovsky et al. 2007). Le NCBI (National Center for Biotechnology Information) a répertorié dans une base de données plus de 60 millions de SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Ces SNPs sont dispersés sur l'ensemble du génome, dont 50 % sur la région codante et le reste sur la région non codante.

Sur la base de la modification de la séquence des acides aminés, les SNPs de la région codante peuvent être divisés en 2 classes : les SNP synonymes dont la substitution de la base ne modifie pas la séquence de la protéine et les SNP non synonymes qui modifient la séquence des acides aminés (T. Huang, Shu, et Cai 2015). Barbujani et ses collaborateurs ont estimé que 85 % des SNPs sont communs à toutes les populations humaines et que seulement 15 % environ des SNPs sont spécifiques à une population (Barbujani et al. 1997).

Les combinaisons de SNP, soit sous forme d'haplotypes, soit entre des gènes éloignés, peuvent contribuer de manière coordonnée au risque de développer des maladies. Les études d'association génétique sont apparues comme la principale méthode pour étudier l'effet des SNPs sur l'évolution des maladies, qu'il s'agisse de la sensibilité à une maladie donnée ou de l'expression phénotypique d'un gène connu (O. Ostrovsky et al. 2007).

1. Les SNPs du gène codant la sulfatase-1

Le SNP rs2623047 (C>T), situé au niveau de la région promotrice du gène codant SULF-1 (chromosome 8q13), a été décrit comme une substitution de C en T. Les génotypes CC/CT sont associés à une forte expression de SULF-1 en ARNm et à une plus longue survie sans progression chez les patients atteints d'un cancer de l'ovaire, issus du sud des États-Unis

(Texas), ce qui suggère que les porteurs de l'allèle C (rs2623047) peuvent être plus réactifs à la chimiothérapie (Han et al. 2011).

Ce même SNP rs2623047 (C>T) a révélé une association significative entre le génotype TT et le risque de développer un cancer du sein chez des patients Australiens (Okolicsanyi et al. 2014). Dans cette étude, l'association entre ce SNP et l'expression de SULF-1 n'a pas été étudiée. Selon l'étude de Han et ses collaborateurs, le génotype TT du SNP rs2623047 serait plutôt associé à une diminution de l'expression de SULF-1 dans la population étudiée (Han et al. 2011). Khurana et ses collaborateurs ont rapporté que l'expression de SULF-1 est associée à une augmentation de la survie chez les patients atteints du cancer du sein métastatique (Khurana et al. 2011).

2. Les SNPs du gène codant la sulfatase-2

Le principal polymorphisme du gène codant SULF-2 (chromosome 20q13) a été étudié dans un contexte d'hyperlipidémie postprandiale retardée. Cette dernière implique une diminution de la clairance hépatique des lipoprotéines plasmatiques riches en triglycérides (LRT), processus médié par le SDC-1 et le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR, Low density lipoprotein Receptor). Ce mécanisme d'hyperlipidémie est associé à l'augmentation de l'expression de SULF-2 dans le foie des patients souffrant d'obésité (Matikainen et al. 2013), suggérant que la fixation des LRT aux chaînes HS du SDC-1 nécessite la présence des motifs 6-O-sulfates. Ce phénomène est également retrouvé chez les souris obèses et atteintes de diabète de type 2 (K. Chen et al. 2010; Hassing et al. 2012). L'étude du SNP rs2281279 (A>G) a montré que les génotypes AG/GG sont associés à une diminution de l'expression génique de SULF-2 dans le foie (biopsie) et à une diminution des taux de LRT et de triglycérides plasmatiques chez les sujets sains (Matikainen et al. 2013).

3. Les SNPs du gène codant l'héparanase

Le gène HPSE comprend près de 300 SNP décrits (Olga Ostrovsky et al. 2009). Parmi les principaux polymorphismes étudiés, on retrouve le SNP rs11099592 G >A qui correspond à une substitution d'une guanine (G) en adénine (A) en position 307 de la région codante du gène HPSE (exon 8). Cette substitution a comme conséquence la substitution de l'arginine en lysine (R307K) dans la séquence protéique de l'HPSE (Yue et al. 2010). Bien que l'arginine et la lysine soient des acides aminés basiques, ce type de modification peut affecter la

transcription du gène HPSE. En effet, Ostrovsky et ses collaborateurs ont constaté que les génotypes GA et AA sont corrélés à une faible expression de la protéine HPSE dans les cellules du sang périphérique chez des sujets sains (O. Ostrovsky et al. 2007).

Une association a été établie entre le génotype GA du SNP rs11099592 et la survenue de la leucémie lymphoïde aiguë (LLA) chez des patients israéliens (O. Ostrovsky et al. 2007). En revanche, ce SNP ne présente aucune corrélation avec la survenue de la LLA et du cancer de l'estomac chez des patients issus d'Irlande du Nord et de Chine, respectivement. Ces divergences apparentes peuvent être liées aux différences entre les maladies, aux différences spécifiques à chaque population ethnique, non seulement en termes de variation génétique, mais aussi d'interactions gène-environnement (Winter, McMullin, et Catherwood 2008; Yue et al. 2010).

L'association entre les SNPs rs4693608 (G>A) et rs4364254 (C>T) du gène HPSE et les taux sériques de l'HPSE a également été étudiée. Les individus sains israéliens ayant des génotypes rares GG (rs4693608) ou TT (rs4364254) présentent un taux sérique élevé d'HPSE, tandis que ceux ayant des génotypes AA (rs4693608) ou CC (rs4364254) présentent un taux sérique d'HPSE relativement faible (Olga Ostrovsky et al. 2018).

Gène	SNP	Localisation	Type de variation	Etude	Population	Taille de l'étude	Fréquence de l'allèle de référence	Fréquence de l'autre allèle retrouvé
SULF-1	rs2623047	chr8: 69466261	A>G	1000 génomes	Europe	1006	A=0.6083	G=0.3917
SULF-2	rs2281279	chr20:47661506	T>C	1000 génomes	Europe	1006	T=0.7147	C=0.2853
HPSE	rs11099592	chr4:83309466	T>C	1000 génomes	Europe	1006	T=0.2505	C=0.7495
HPSE	rs4693608	chr4: 83320204	G>A	1000 génomes	Europe	1006	G=0.4970	A=0.5030
HPSE	rs4364254	chr4: 83302560	C>T	1000 génomes	Europe	1006	C=0.3171	T=0.6829

Tableau 1. Différents polymorphismes génétiques des enzymes impliquées dans la modification post-synthèse des chaînes héparane sulfate.

Le projet 1000 génomes est une étude qui vise à caractériser notamment la localisation et la fréquence des allèles d'environ 15 millions de SNP dans différentes populations. Ces informations sont intégrées dans la base de données « dbSNP », accessible sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?cmd=search>, et servent de base à l'étude de la relation entre le génotype et le phénotype.

V. Le carcinome hépatocellulaire

A. Incidence

Le cancer du foie est le sixième cancer le plus souvent diagnostiqué et la quatrième cause de décès lié au cancer dans le monde, après le cancer du poumon, du côlon, du rectum, et le cancer de l'estomac. Le cancer du foie est associé à une forte mortalité, ceci est en partie dû au fait que la plupart des cas sont détectés à des stades tardifs avec un ratio d'incidence sur la mortalité qui se rapproche de 1. En 2015, il y a eu environ 854 000 nouveaux cas de cancer du foie, alors que l'on estime à 810 000 le nombre de décès liés au cancer du foie par an dans le monde (Singal, Lampertico, et Nahon 2020).

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente environ 75 à 85 % des cancers primitifs du foie et représente un enjeu majeur de santé dans le monde (Singal, Lampertico, et Nahon 2020). En France, on enregistre environ 8000 nouveaux cas de CHC et 7000 cas de décès liés au CHC par an (Cadier et al. 2017; Costentin et al. 2017). Dans les pays occidentaux, 90 % des cas de CHC se développent dans un contexte d'hépatopathie chronique, généralement avancée, au stade de cirrhose sévère (Ganne-Carrié et Nahon 2019).

B. Prévalence

L'incidence mondiale du CHC est hétérogène en raison de la prévalence variable des facteurs de risque. On estime que 72 % des cas se produisent en Asie (plus de 50 % en Chine), 10 % en Europe, 7,8% en Afrique, 5,1% en Amérique du Nord, 4,6% en Amérique latine et 0,5% en Océanie (Singal, Lampertico, et Nahon 2020). L'incidence du CHC semble avoir une forte prédominance chez les hommes, avec un rapport hommes/femmes supérieur à 2,5. Cette distribution différentielle par sexe serait liée à un regroupement de facteurs de risque, ainsi qu'un effet potentiel des androgènes chez les hommes sur le risque de CHC (Singal, Lampertico, et Nahon 2020).

C. Etiologies

Dans le monde, parmi les différentes étiologies, le virus de l'hépatite B (VHB) est le principal facteur de risque pour le développement de CHC (33%), suivi par la consommation abusive d'alcool (30%), le virus de l'hépatite C (VHC) (21 %) et d'autres causes telle que la stéatose hépatique non alcoolique à l'origine d'un syndrome métabolique (16 %) (Singal, Lampertico, et Nahon 2020).

1. Infection par le virus de l'hépatite B (VHB)

L'infection chronique par le VHB est l'étiologie la plus courante du CHC en Asie. Le VHB est un virus à ADN, partageant avec les rétrovirus oncogènes une stratégie de réplication unique par transcription inverse et un cycle de vie caractéristique qui comprend l'intégration dans le génome de l'hôte.

L'intégration de l'ADN viral du VHB dans le génome humain peut induire une instabilité chromosomique et entraîner des réarrangements ou des délétions. Les mutations d'insertion résultant de l'intégration du génome de l'ADN du VHB à des sites spécifiques peuvent activer des gènes endogènes tels que la cycline A, qui joue un rôle important dans la régulation de la division et la prolifération cellulaire, aboutissant à une prolifération cellulaire incontrôlée (Chami et al. 2000). L'intégration de l'ADN du VHB peut également entraîner une dérégulation de l'expression de certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent la survie ou la mort cellulaire (R. W. C. Pang et al. 2008).

Un autre mécanisme par lequel le VHB induit l'hépatocarcinogenèse est la répression de l'expression du gène suppresseur de tumeur p53. En effet, la protéine HBx inactive la protéine p53 par liaison directe et réprime l'activation transcriptionnelle médiée par la protéine p53, ce qui bloque les activités dépendantes de p53, telle que l'apoptose. Par conséquent, les effets modulateurs de HBx sur la protéine p53 fournissent un mécanisme de transformation maligne des cellules hépatiques infectées par le VHB (R. W. C. Pang et al. 2008).

La protéine HBx peut également se lier à une protéine, la peptidyl prolyl isomérase nommée PIN1, surexprimée dans 50 % des cas de CHC et agir en synergie dans la régulation de signalisation de la β -caténine, en empêchant sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome, activant ainsi la transcription de gènes essentiels à la prolifération cellulaire, tels que la cycline D1 (R. Pang et al. 2004; 2007).

La mise en œuvre de programmes de vaccination des nourrissons contre le VHB dans de nombreux pays d'Asie de l'Est devrait faire baisser le taux de CHC lié au VHB à l'avenir, comme cela a été démontré à Taïwan où l'incidence annuelle du CHC a considérablement diminué, passant de 0,92 pour 10.000 personnes dans une cohorte de patients non vaccinés à 0,23 pour 10⁵ personnes vaccinées à la naissance. Cependant, il existe plusieurs pays qui n'ont pas encore mis en œuvre la vaccination contre le VHB, une estimation indiquait en 2015 qu'environ 257 millions de personnes étaient infectées par le VHB, principalement en Asie et

en Afrique subsaharienne. Des études d'observation évaluant l'effet de l'interféron pégylé dans le traitement de l'hépatite chronique B ont montré un effet potentiel dans la réduction de l'incidence du CHC (EASL 2018).

2. Infection par le virus de l'hépatite C (VHC)

Contrairement au VHB, le VHC est un virus à ARN qui ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte. Le VHC est associé à l'hépatocarcinogénèse par le biais d'interactions entre l'hôte et les protéines virales structurales (la protéine de core de la capsid virale) et non structurales (NS3 et NS5A). Ces protéines peuvent agir en inhibant l'expression post-transcriptionnelle de p21, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, qui joue un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire, modulant ainsi la prolifération et l'apoptose cellulaire (Lee et al. 2002).

La protéine de core du VHC a des fonctions de régulation transcriptionnelle sur différents gènes cellulaires impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, notamment le proto-oncogène c-myc. Les souris transgéniques exprimant la protéine de core du VHC développent des tumeurs hépatiques qui apparaissent d'abord sous forme d'adénomes, à l'intérieur desquels se développe ensuite un CHC, présentant les caractéristiques histopathologiques des nodules retrouvés au stade précoce de CHC chez les patients atteints de VHC chronique (Moriya et al. 1998).

Malheureusement, il n'existe pas de vaccin contre le VHC, donc la prévention primaire du CHC lié au VHC n'est pas possible. Chez les patients infectés par le VHC, les thérapies antivirales, basées sur l'utilisation de l'interféron, semblent efficaces pour réduire l'incidence annuelle du CHC, passant de 6,2 % à 1,5 % (Singal, Lampertico, et Nahon 2020).

3. Le syndrome métabolique et la stéatohépatite non alcoolique

a) Définition

La stéatose hépatique non alcoolique (en anglais "non alcoholic fatty liver disease", NAFLD) est caractérisée par un dépôt important de lipides (stéatose), principalement sous forme de triglycérides (TGs), dans les hépatocytes du parenchyme hépatique. Un patient peut être considéré comme atteint de NAFLD lorsque cette stéatose affecte au moins 5% du volume ou du poids du foie, en l'absence d'une consommation d'alcool supérieure à 30 g/jour pour les hommes et 20 g/jour pour les femmes (Ozturk et al. 2020). La plupart des sujets

atteints de la NAFLD sont cliniquement asymptomatiques (Abd El-Kader et El-Den Ashmawy 2015).

b) Classification des maladies hépatiques liées au syndrome métabolique

Selon des critères histologiques, le spectre de la NAFLD peut être simplifié en deux catégories :

(1) La stéatose hépatocellulaire simple (NAFL)

La stéatose hépatocellulaire simple (ou NAFL, de son acronyme anglophone, non alcoholic fatty liver) est réversible, caractérisée par une accumulation excessive de lipides, sans atteinte de la fonction hépatique et sans inflammation.

(2) La stéatohépatite non alcoolique (NASH)

La stéatohépatite non alcoolique (ou NASH, non alcoholic steatohepatitis) est caractérisée par une accumulation excessive de lipides avec une inflammation, peu ou pas réversible, des lésions tissulaires associées à une nécrose, à des lésions mitochondriales, à un ballonnement des hépatocytes et à une fibrose hépatique, souvent en association avec d'autres caractéristiques histologiques telles qu'une accumulation de filaments intermédiaires de cytokératine, agrégés pour former les corps de Mallory (Bradbury et Berk 2004; Ozturk et al. 2020).

Les facteurs de risque pour la NASH comprennent la dyslipidémie, le diabète de type 2, une insulino-résistance des tissus hépatiques et adipeux, l'obésité et le syndrome métabolique, associés à une prédisposition génétique (Ozturk et al. 2020). Dans un important sous-ensemble de patients atteints de NASH, les lésions hépatiques en cours évoluent vers une cirrhose hépatique et un CHC.

• Les stratégies thérapeutiques proposées dans la NASH

Malgré la prévalence croissante de la NASH, l'efficacité des pharmacothérapies actuelles est limitée et il n'existe pas de médicaments approuvés par la Food and Drug Administration (FDA). Divers régimes alimentaires, tels que le régime cétogène et le jeûne intermittent, en combinaison avec l'exercice physique ont montré des avantages potentiels pour la perte de poids et la diminution de l'accumulation d'acide gras dans le foie. La

chirurgie bariatrique ou des dispositifs mécaniques non invasifs tels que les ballons intragastriques sont indiqués chez les patients qui ne peuvent pas atteindre une perte de poids totale supérieure à 5 %, malgré des interventions sur le mode de vie (régime alimentaire et activité physique) (Muthiah et Sanyal 2020).

4. La consommation chronique d'alcool

La consommation chronique d'alcool dépassant plus de 20 g/jour pour les femmes et 30 g/jour pour les hommes est reliée à 20 % des cas de CHC dans les pays du sud de l'Europe (par exemple l'Italie ou l'Espagne), mais jusqu'à 63 % dans les pays d'Europe de l'Est (Reddy et Rao 2006; Ganne-Carrié et Nahon 2019).

En France, la consommation chronique d'alcool et les maladies hépatiques qui en résultent sont la cause principale du développement du CHC (70% des cas), suivie par la NASH (Costentin et al. 2017; Singal, Lampertico, et Nahon 2020). L'estimation de l'incidence du CHC chez les patients atteints de cirrhose alcoolique est de 2,9 pour 100 patients/année dans une cohorte de 652 patients Français au cours d'un suivi médian de 29 mois (Singal, Lampertico, et Nahon 2020).

La toxicité hépatique induite par l'alcool est accompagnée d'un certain nombre de mécanismes pathologiques comprenant : i) la formation d'acétaldéhyde et ses effets directs sur les protéines et l'ADN ; ii) une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO), aggravée par la défaillance du système antioxydant et des mécanismes de réparation de l'ADN ; iii) l'induction d'une inflammation chronique.

a) Métabolisme de l'alcool (éthanol)

Au niveau des hépatocytes, l'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase (ADH) dans le cytosol. L'acétaldéhyde entre dans la mitochondrie où il est oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale (ALDH). Une autre voie du métabolisme de l'éthanol comprend son oxydation dans les microsomes (RE) par l'enzyme CYP2E1, une étape qui nécessite le NADPH plutôt que le NAD⁺, comme pour l'ADH [Figure 14] (Addolorato et al. 2020). En parallèle, les ERO telles que l'anion superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), sont formées par la réoxydation du NADH dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Ganne-Carrié et Nahon 2019). Ces ERO, réagissent avec des

métaux de transition (par exemple, des ions de cuivre Cu^{2+} et de fer Fe^{2+}) et génèrent ainsi le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) hautement réactif (Sarsour et al. 2009).

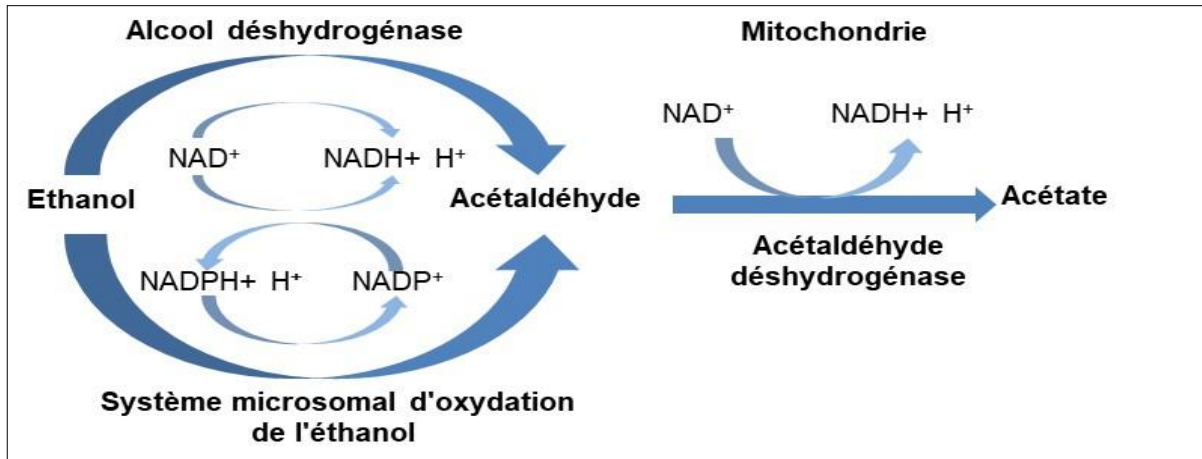


Figure 14. Voies du métabolisme hépatique de l'alcool impliquant l'alcool déshydrogénase cytosolique et le système microsomal d'oxydation de l'éthanol.

Le premier métabolite toxique est l'acétaldéhyde, qui est ensuite transformé en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase mitochondriale (ALDH). D'après (Teschke 2018).

b) Mécanismes moléculaires de la toxicité hépatique induite par l'alcool

• Formation des adduits de protéines et d'ADN

L'acétaldéhyde peut se lier aux protéines pour former des adduits entraînant leur modification structurale et fonctionnelle, c'est notamment le cas des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN (6-O-Méthylguanine-ADN méthyltransférase). L'accumulation de ces protéines dans le RE induit un stress du RE qui active la réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui en cas de non dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome, peut aboutir à une mort cellulaire par apoptose (Seitz et Stickel 2007; Addolorato et al. 2020). L'acétaldéhyde peut également se lier à l'ADN dont l'un des adduits le plus abondant est le N2-éthyl-2'-déoxyguanosine. Ces adduits peuvent également être produits par les ERO. Ces adduits seraient ainsi impliqués dans l'échec de la réparation de l'ADN, la peroxydation lipidique due à l'accumulation des ERO, favorisant par conséquent la cancérogenèse (Seitz et Stickel 2007).

- **Stress oxydant et peroxydation des lipides**

Un mécanisme important impliqué dans l'hépatocarcinogénèse liée à l'alcool est le stress oxydant, qui représente un déséquilibre entre la production d'ERO et les mécanismes de défense anti-oxydants. A faible concentration, les ERO peuvent jouer un rôle de second messenger dans diverses voies de signalisation. Cependant, à forte concentration, ils peuvent interagir avec les acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique et l'acide arachidonique et générer des produits de peroxydation lipidique tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Le 4-HNE peut réagir avec des bases d'ADN telles que la désoxyguanine pour former les adduits exocycliques de l'ADN (4-HNE-dG). Ces adduits sont hautement mutagènes, par exemple, le 4-HNE-dG est responsable d'une mutation du gène p53 (transversion de G en T au niveau de la troisième base du codon 249 (-AGG-)), bloquant ainsi l'apoptose ou les mécanismes de réparation de l'ADN, dépendants de la protéine p53 (Hu et al. 2002). De plus, au niveau des cellules de Küpffer, les ERO peuvent activer le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) et induire la transcription du TNF- α qui à son tour induit une augmentation des ERO (Kono et al. 2000; Seitz et Stickel 2007).

D. Mécanismes moléculaires et histoire naturelle des maladies hépatiques

1. La stéatose

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme et la clairance des lipides. Ces lipides proviennent, sous forme de lipoprotéines riches en triglycérides (LRT), de trois sources distinctes: les sources alimentaires, la lipolyse des TGs dans le tissu adipeux et dans la circulation périphérique, et la lipogénèse *de novo* (Dowman, Tomlinson, et Newsome 2010; Gonzales et al. 2013).

Les récepteurs endocytaires dominants dans le foie pour les LRT comprennent notamment le LDLR et les HSPG, plus particulièrement le SDC-1 (Gonzales et al. 2013). Le SDC-1 joue un rôle important dans la clairance des LRT. En effet, le SDC-1 peut agir seul ou sous forme de complexe SDC-1/VLDL (Hodoğlugil et al. 2011). Au niveau de la membrane basale des hépatocytes, le SDC-1 se lie, par le biais de ses chaînes HS, aux LRT riches en apoprotéines E (apoE) et apoprotéines B (l'apoB), à la lipase hépatique et aux lipoprotéines

lipases, ce qui entraîne leur absorption hépatocytaire et la lipolyse des TGs en glycérol et acides gras libres (Hodoğlugil et al. 2011 ; Gonzales et al. 2013).

Les enzymes impliquées dans la synthèse des HSPG modulent également le métabolisme et la clairance des lipoprotéines. En effet, l'inactivation de la NDST-1 ou de la 2-O-sulfotransférase dans les hépatocytes, médiée par le système Cre-lox, chez la souris, entraîne l'accumulation des TGs plasmatiques à jeun et retarde la clairance des lipoprotéines d'origine intestinale en raison de la diminution du taux de sulfatation des chaînes HS synthétisées (Foley et al. 2013). De manière similaire, comme décrit précédemment dans la partie « SNPs du gène codant la protéine SULF-2 », l'étude du polymorphisme rs2281279 (A>G) du gène codant SULF-2 a montré que les génotypes AG/GG, liés à une diminution de l'expression de SULF-2 en ARNm au niveau du foie, sont associés à une diminution du taux des LRT et des TGs plasmatiques chez les sujets sains, soulignant ainsi l'importance des motifs 6-O-sulfates dans la fixation des lipoprotéines aux HSPG (Matikainen et al. 2013).

Au niveau des hépatocytes, les acides gras libres peuvent être utilisés soit par la β -oxydation dans les mitochondries pour la production d'énergie, soit ré-estérifiés en TGs et stockés sous forme de gouttelettes lipidiques, soit être conditionnés et exportés en particules de lipoprotéines de très basse densité (VLDL, formées par l'incorporation de triglycérides dans l'apoB). Ainsi, l'accumulation des lipides dans le foie peut se produire à la suite d'une synthèse accrue d'acides gras, d'une augmentation de l'apport d'acides gras, d'une diminution de l'exportation d'acides gras et/ou d'une diminution de l'oxydation des acides gras (Dowman, Tomlinson, et Newsome 2010; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020).

2. L'inflammation hépatique

Dans la NASH, l'accumulation des acides gras saturés, qui sont le produit de la lipogenèse *de novo*, est cytotoxique pour les hépatocytes. En effet, leur accumulation est accompagnée de l'augmentation de l'expression des récepteurs de mort cellulaire (Fas) et de leurs ligands (FasL), ce qui aboutit à l'activation de la mort cellulaire "extrinsèque". Ils peuvent également induire la mort cellulaire "intrinsèque" en déclenchant le stress du réticulum endoplasmique (Malhi et Gores 2008; Brunt et al. 2015).

Quelle que soit la voie impliquée, la mort cellulaire induite par les acides gras saturés entraîne la libération, dans l'espace extracellulaire, de motifs moléculaires associés aux dommages ou en anglais "Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs)", tels que les

acides nucléiques, les protéines intracellulaires, l'ATP, ou les composés mitochondriaux ou nucléiques (Roehlen, Crouchet, et Baumert 2020; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020). Les DAMPs induisent l'activation des macrophages résidents du foie (cellules de Küpffer), ce qui stimule la production et la libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α , l'interleukine IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et la chimiokine Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) favorisant le recrutement des neutrophiles et des monocytes, ce qui amplifie la réponse inflammatoire dans la NASH (Brunt et al. 2015 ; Friedman et al. 2018; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020).

La consommation chronique d'alcool augmente la perméabilité intestinale et la translocation des lipopolysaccharides (LPS) issus des bactéries de l'intestin vers le foie. La reconnaissance du LPS par les cellules de l'immunité innée, dont les cellules de Küpffer, joue un rôle central dans le développement des lésions hépatiques précoces dues à la consommation d'alcool, telles que l'hépatite alcoolique ou la stéatohépatite alcoolique. En effet, dans les cellules de Küpffer, le LPS interagit avec les Toll-like receptors 4 (TLR4), ce qui entraîne l'activation des facteurs de transcription STAT3 et NF- κ B et l'activation de la transcription des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. Ces cytokines pro-inflammatoires favorisent le recrutement des neutrophiles et des monocytes, ce qui amplifie la réponse inflammatoire, favorisant l'accumulation des ERO (Mandrekar et Szabo 2009; Stauffer et al. 2012).

De plus, l'éthanol module les fonctions métaboliques et immunitaires du tissu adipeux en augmentant l'expression et la libération de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (tels que le TNF- α , IL-6 et MCP-1) dans et à partir du tissu adipeux qui peuvent contribuer à des perturbations métaboliques. Par exemple, le TNF- α peut modifier le métabolisme du tissu adipeux en augmentant la lipolyse et la libération d'acides gras libres et en diminuant la LPL et la lipogénèse, favorisant l'efflux des acides gras libres vers le foie et leur estérification en triglycérides (Steiner et Lang 2017). Cette accumulation d'acides gras au niveau du foie, associée à une inflammation, est appelée stéatohépatite alcoolique (en anglais « alcoholic steatohepatitis », ASH) (Teschke 2018). Parmi les signes cliniques associés à la sévérité de la stéatohépatite alcoolique on retrouve la malnutrition, la perte de poids, l'ictère et l'ascite (Teschke 2018; EASL 2018b). Pour les patients présentant une évolution clinique sévère, une approche communément recommandée est l'abstinence totale d'alcool qui pourrait retarder l'évolution de la maladie vers une cirrhose (Teschke 2018).

a) Les polymorphismes liés au métabolisme lipidiques

Plusieurs facteurs génétiques de risque, en particulier sous forme de SNP, influencent le flux hépatique d'acides gras libres et peuvent ainsi être associés au développement et à la progression de la NASH. Il s'agit notamment des variants de gènes codant : patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) ou adiponutrine, transmembrane 6 superfamily 2 (TM6SF2), hydroxysteroid 17 β -dehydrogenase 13 (HSD17B13) et membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 (MBOAT7) (Lonardo et al. 2020).

(1) PNPLA3 (rs738409 C>G)

Le gène PNPLA3, également connu sous le nom d'adiponutrine, code pour une protéine de 481 acides aminés appartenant à la famille des phospholipases de type patatine (Kanda et al. 2020). La protéine PNPLA3 est présente dans les hépatocytes et les adipocytes (Buzzetti, Pinzani, et Tsochatzis 2016; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020). L'étude de l'activité enzymatique de la protéine PNPLA3, *in vitro*, a montré que l'enzyme présente une activité hydrolase sur les glycérolipides (triacylglycérol (TAG), diacylglycérol (DAG), et monoacylglycérol (MAG)) (Y. Huang, Cohen, et Hobbs 2011). Le SNP rs738409 C>G du gène PNPLA3 induit une substitution de l'isoleucine en méthionine en position 148 (I148M) dans la séquence protéique de l'adiponutrine. Ainsi, la protéine PNPLA3-148M est résistante à la dégradation par le protéasome et s'accumule à la surface des gouttelettes lipidiques, ce qui interfère avec la lipolyse. Plusieurs études indépendantes ont rapporté que l'allèle G (génotype CG ou GG) est fortement associé à la NASH, à l'étendue de la stéatose, à la gravité des lésions histologiques, à la fibrose hépatique et au CHC dans des études de validation avec des cohortes (pour différentes étiologies) (Guyot et al. 2013 ; Friedman et al. 2018; Cotter et Rinella 2020; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020).

(2) TM6SF2 (rs58542926 C>T)

TM6SF2 est une protéine impliquée dans la production et la sécrétion hépatique de VLDL (Buzzetti, Pinzani, et Tsochatzis 2016). Le SNP rs58542926 C>T du gène TM6SF2 induit une substitution du glutamate en lysine en position 167 (E167K) dans la séquence protéique de TM6SF2. Cette protéine, par une perte de fonction, est associée à une réduction de la sécrétion hépatique de VLDL et à une augmentation de la concentration intracellulaire de TGs et de la teneur en gouttelettes lipidiques et ainsi à des taux plasmatiques plus faibles de VLDL (Buzzetti, Pinzani, et Tsochatzis 2016; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020).

L'allèle T (génotype CT ou TT) est associé à un risque plus élevé de développer une stéatose, une NASH, une cirrhose et un CHC (Grgurevic et al. 2020).

(3) HSD17B13 (rs72613567 A>AA)

HSD17B13 est une protéine exprimée principalement par le foie et membre de la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte, un groupe d'enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes, des prostaglandines, des lipides, des xénobiotiques et des rétinoïdes. La protéine HSD17B13 contient un site de liaison du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NAD(P)H), un site catalytique et un domaine de liaison aux gouttelettes lipidiques qui cible la partie protéique à la surface des gouttelettes lipidiques (Gellert-Kristensen et al. 2020). La surexpression hépatique de HSD17B13 favorise l'accumulation de lipides dans le foie, ce qui soutient le rôle délétère de cette protéine dans la NAFLD (Cotter et Rinella 2020). En revanche, l'allèle rs72613567 A-INS (insertion d'une adénine au niveau d'un site donneur d'épissage (exon 6)) du gène HSD17B13 code une protéine instable et tronquée avec une activité enzymatique réduite, qui s'est avérée diminuer le risque de maladie hépatique chronique et de progression de la stéatose à la stéatohépatite, y compris un risque réduit de NASH associé à l'allèle G-PNPLA3, par un mécanisme non élucidé à ce jour (Cotter et Rinella 2020; Chakravarthy et Neuschwander-Tetri 2020). De plus, une étude d'association pangénomique (en anglais "genome-wide association study", GWAS) a rapporté que ce variant est associé à une diminution du taux sérique des transaminases chez les patients présentant une stéatose, ce qui suggère une diminution de l'inflammation et des lésions hépatiques (Friedman et al. 2018).

(4) MBOAT7 (rs641738 C>T)

MBOAT7 est une enzyme transmembranaire présente dans les endomembranes (réticulum endoplasmique, membranes associées aux mitochondries et gouttelettes lipidiques) (Caddeo et al. 2019). MBOAT7 est impliquée dans la voie du remodelage des phospholipides en présentant une activité acyltransférase, qui estérifie spécifiquement l'arachidonyl-CoA en lysophosphatidylinositol (LPI) pour générer le phosphatidylinositol (PI) au niveau de la membrane cellulaire (Helsley et al. 2019 ; Thangapandi et al. 2020). L'allèle T (génotype CT, TT) est associé à une diminution de l'expression de la protéine dans le foie et par conséquent à une diminution du PI au niveau de la membrane cellulaire (Thangapandi et al. 2020). Ce variant est associé à la cirrhose alcoolique, à la NAFLD, à l'inflammation et à la fibrose dans

les hépatites chroniques B et C. Cependant, les mécanismes par lesquels ce variant conduit au développement de la NAFLD et en particulier de la fibrose hépatique ne sont pas suffisamment compris à ce jour (Thangapandi et al. 2020).

Gène	SNP	Localisation	Type de variation	Etude	Population	Taille de l'étude	Fréquence de l'allèle de référence	Fréquence de l'autre allèle retrouvé
PNPLA3	rs738409	chr22:43928847	C>G	1000 génomes	Europe	1006	C=0.7744	G=0.2256
TM6SF2	rs58542926	chr19:19268740	C>T	1000 génomes	Europe	1006	C=0.9324	T=0.0676
MBOAT7	rs641738	chr19:54173068	T>C	ALFA	Europe	99590	T=0.43627	C=0.56373
HSD17B13	rs72613567	chr4:87310241	A>AA	1000 génomes	Europe	1006	Non indiquée	dupA=0.2435
HSD17B13	rs72613567	chr4:87310241	A>AA	ALFA	Europe	11942	A=0.75381	dupA=0.24619

Tableau 2. Différents polymorphismes liés au métabolisme lipidique.

L'objectif de l'étude ALFA est de fournir la fréquence des allèles de plus d'un million de sujets en ajoutant 100 à 200 000 nouveaux sujets à chaque publication trimestrielle. Ces données sont également intégrées dans la base de données « dbSNP ».

3. La fibrose hépatique

L'accumulation des lipides, de l'acétaldéhyde et des ERO dans les hépatocytes est l'un des principaux facteurs d'hépatotoxicité, ceci accélère le développement d'un stress oxydant et induit une inflammation progressive qui provoque par conséquent une apoptose ou une nécrose cellulaire. Ainsi, la nécrose et l'apoptose des hépatocytes induit la libération des molécules DAMPs. Ces molécules activent les cellules étoilées hépatiques (cellules de Ito) de manière paracrine et induisent également le recrutement et l'activation de lymphocytes et de macrophages (pro-inflammatoires, phénotype M1). Ces derniers produisent des cytokines pro-inflammatoires qui contribuent à l'activation et la trans-différenciation des cellules de Ito en myofibroblastes (Roehlen, Crouchet, et Baumert 2020).

Dans un foie normal, sans lésion, les cellules de Ito sont des cellules périsinusoïdales quiescentes et non prolifératives, qui servent, entre autres, à stocker la vitamine A. Elles sont caractérisées par leur morphologie en étoile et un nombre élevé de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. En cas de lésion hépatique, les cellules de Küpffer résidentes sécrètent l'IL-1, le TNF- α , le TGF- β , les chimiokines CCL-2 et CCL5, ce qui entraîne l'activation des cellules de Ito qui passent d'un phénotype quiescent à un phénotype myofibroblastique prolifératif et contractile, tout en produisant en abondance des composants de la MEC (y compris les

collagènes de type I, III et IV et les PGs), des médiateurs pro-inflammatoires, l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-1 (TIMP-1) et l'expression de l'actine musculaire lisse (α -SMA). Physiologiquement, ce processus est impliqué dans la réparation et la cicatrisation tissulaire à court terme. Il associe rapidement des mécanismes anti-fibrotiques contrebalançant cette cicatrisation en entraînant l'inactivation ou l'apoptose des myofibroblastes, l'activation des macrophages anti-inflammatoires (phénotype M2) participant à la résolution de la fibrose grâce à la sécrétion d'IL-4, IL-1 ainsi que l'expression des MMPs (Roehlen, Crouchet, et Baumert 2020).

En conditions pathologiques, dans les maladies chroniques du foie, un déséquilibre entre les mécanismes pro-fibrogènes et anti-fibrogènes entraîne une activation persistante des myofibroblastes prolifératifs, contractiles et migratoires, ce qui conduit à une production excessive de MEC, provoquant ainsi le développement d'une fibrose hépatique progressive. Les cellules de Ito, à leur tour produisent le facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF) et l'IL-6 pour perpétuer l'activité des macrophages pro-fibrotiques.

Les interactions cellulaires générales impliquées dans le développement de la fibrose hépatique, de manière indépendante de toute étiologie, sont représentées dans la figure 15 ci-dessous (Roehlen, Crouchet, et Baumert 2020).

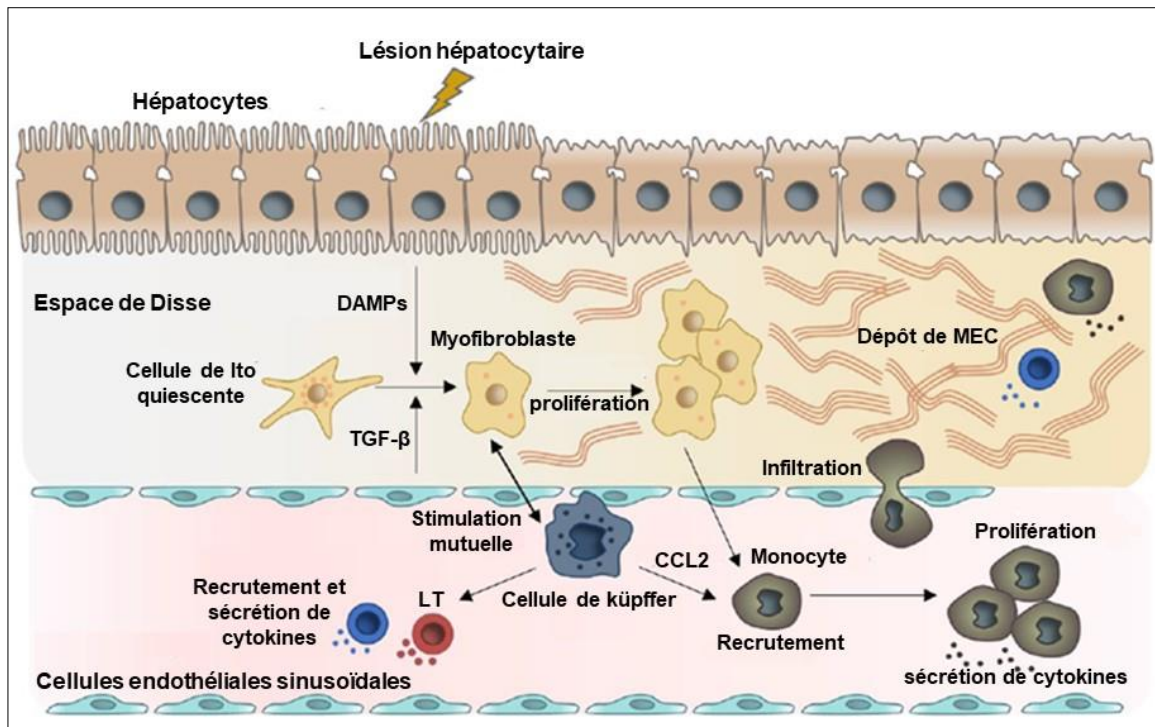


Figure 15. Mécanismes moléculaires de fibrogenèse hépatique.

La lésion chronique des hépatocytes entraîne la libération de motifs moléculaires associés aux dommages ou en anglais "damage-associated molecular patterns" (DAMPs) qui activent les cellules étoilées du foie (cellules de Ito) et recrutent des cellules immunitaires, telles que les monocytes et les lymphocytes T. Les interactions cytokiniques, multidirectionnelles, entre les cellules de Ito activées et les cellules de Kuppfer, ainsi que les cellules immunitaires innées favorisent la transdifférenciation des cellules de Ito en myofibroblastes prolifératifs, produisant une matrice extracellulaire (MEC). TGF-β: Transforming Growth Factor Beta; CCL-2: chimiokine (motif C-C) ligand 2. D'après (Roehlen, Crouchet, et Baumert 2020).

Au cours de la progression de la fibrose, le nombre élevé de cellules de Ito activées et la contractilité des myofibroblastes favorisent l'obstruction ou capillarisation des sinusoides hépatiques, affectant le flux sanguin et l'échange de nutriments entraînant ainsi une hypoxie tissulaire. De plus, la MEC peut également stocker des cytokines et des facteurs de croissance contribuant à l'inflammation, à la fibrogenèse, à la prolifération des hépatocytes et à la carcinogenèse en passant par un stade cirrhose. Malgré de nombreux essais précliniques et cliniques, il n'existe à ce jour aucun médicament anti-fibrotique approuvé par la FDA (Roehlen, Crouchet, et Baumert 2020).

4. La cirrhose

La cirrhose représente l'étape ultime de la fibrose, elle est caractérisée par la formation de nodules de régénération qui peuvent être de différentes tailles, micronodules uniformes (<3

mm) ou macronodules irréguliers (>3 mm), encapsulés et séparés par des septa fibreux altérant l'architecture lobulaire du foie. Selon le type de nodules retrouvés on caractérise une cirrhose micronodulaire, macronodulaire ou mixte (Saffioti et Pinzani 2016). La cirrhose peut être asymptomatique ou symptomatique, selon que la cirrhose soit cliniquement compensée ou décompensée.

Dans la cirrhose compensée, les patients sont généralement asymptomatiques, et leur maladie est détectée de manière fortuite par imagerie. Les patients atteints de cirrhose décompensée présentent généralement une hypertension portale, une ascite ou un CHC. Le seul traitement de la cirrhose hépatique décompensée est la transplantation du foie (EASL 2018b; A. Sharma et Nagalli 2020; B. Sharma et John 2020).

5. Le carcinome hépatocellulaire

Quelle que soit l'étiologie, la cirrhose représente le plus grand facteur de risque pour le développement du CHC et constitue la principale indication de dépistage et de surveillance pour une prise en charge thérapeutique du CHC à un stade précoce (Hartke, Johnson, et Ghabril 2017).

E. Diagnostic et classification des maladies hépatiques chroniques

Pour tout diagnostic, il est important d'identifier l'étiologie et les causes communes coexistantes de la maladie. Par exemple pour la NASH, il est nécessaire d'exclure les hépatites chroniques B et C, la consommation chronique d'alcool dépassant 30 g/jour pour les hommes et 20 g/jour pour les femmes et d'autres facteurs exogènes tels que les médicaments stéatogènes. Dans ce contexte, la présence de comorbidités communément associées à la stéatose, telles que l'obésité, la dyslipidémie ou le diabète doivent être déterminées.

1. Méthode invasive de diagnostic : la biopsie hépatique

En général, la biopsie du foie est effectuée par voie percutanée sous guidage échographique. Elle peut également être réalisée par laparoscopie ou par une approche transjugulaire. Cependant, une biopsie du foie est une procédure invasive associée parfois à des complications graves, telle que des hémorragies intrahépatiques, qui surviennent chez environ 2% des patients (EASL 2018b).

Malgré son caractère invasif, la biopsie du foie est la "norme de référence" la plus courante et la plus recommandée pour le diagnostic ou pour la confirmation du diagnostic et la classification des maladies chroniques du foie. Ainsi, l'étude histopathologique permet de définir le degré de sévérité de la maladie, ayant un potentiel pronostique et prédictif, en caractérisant les lésions hépatiques, telles que la stéatose, l'inflammation lobulaire avec essentiellement une infiltration de neutrophiles, de lymphocytes T et macrophages définissant l'activité nécroinflammatoire qui permet de distinguer la stéatose simple de la stéatohépatite, le ballonnement hépatocytaire avec ou sans corps de Mallory, une fibrose et une cirrhose (Toosi 2015; Addolorato et al. 2020).

- **Classification histologique de la NAFLD**

Pour aider à caractériser ces lésions, les pathologistes ont mis au point des systèmes de notation ou scores histologiques fournissant une évaluation semi-quantitative pour le pronostic clinique individuel. Par exemple le comité américain, NASH des National Institutes of Health (NIH NASH CRN) a mis au point un système de notation appelé « NAFLD Activity Score » (NAS). Après avoir étudié la variabilité inter-observateurs et intra-observateurs de diverses caractéristiques histologiques, les caractéristiques présentant la plus grande reproductibilité (gravité de la stéatose, ballonnement hépatocellulaire et inflammation lobulaire) ont été choisies pour formuler le score NAS. Le système NAS attribue ensuite une note numérique à chaque caractéristique, de sorte que la gravité de la stéatose soit notée de 0 à 3, le ballonnement hépatocellulaire soit noté de 0 à 2, et l'inflammation lobulaire soit notée de 0 à 3. Le score NAS est la somme non pondérée de ces 3 notations avec une fourchette de 0 à 8 [Tableau 3] (Younossi et al. 2018).

Stade ou lésion hépatique	Caractéristiques histologiques	Score
Stéatose	Etendue de la stéatose dans le parenchyme hépatique	
	<5%	0
	5%–33%	1
	33%–66%	2
	>66%	3
Inflammation lobulaire	Nombre de foyers inflammatoires /200 champs analysés	
	Pas de foyers	0
	<2 foyers	1
	2–4 foyers	2
	>4 foyers	3
Ballonnement hépatocytaire	Pas de ballonnement	0
	Peu de cellules	1
	Plusieurs cellules	2
NAS	La somme des 3 scores attribués à la stéatose, inflammation lobulaire et ballonnement hépatocytaire	0-8

Tableau 3. Classification histologique de la NAFLD selon le score « NAFLD Activity Score » (NAS).

D'après (Younossi et al. 2018).

- **Classification histologique de la fibrose**

La caractéristique histologique qui présente la plus grande reproductibilité est la fibrose. Une caractéristique qui ne fait pas partie du score NAS, le stade de la fibrose est donc noté séparément. Par conséquent, dans le système NASH CRN, le stade 0 de la fibrose correspond à l'absence de fibrose ; le stade 1, à la fibrose périsinusoïdale ou périportale/portale ; le stade 2, à la fibrose périsinusoïdale et périportale/portale; le stade 3, à la fibrose avec pontage fibreux ; et le stade 4 correspond à la cirrhose (Younossi et al. 2018). Ce système de notation est valable quelle que soit l'étiologie de la maladie et est similaire au système Metavir décrit pour la première fois dans l'hépatite C chronique par Bedossa et ses collaborateurs en 1996 [Figure 16] (Bedossa et Poynard 1996).

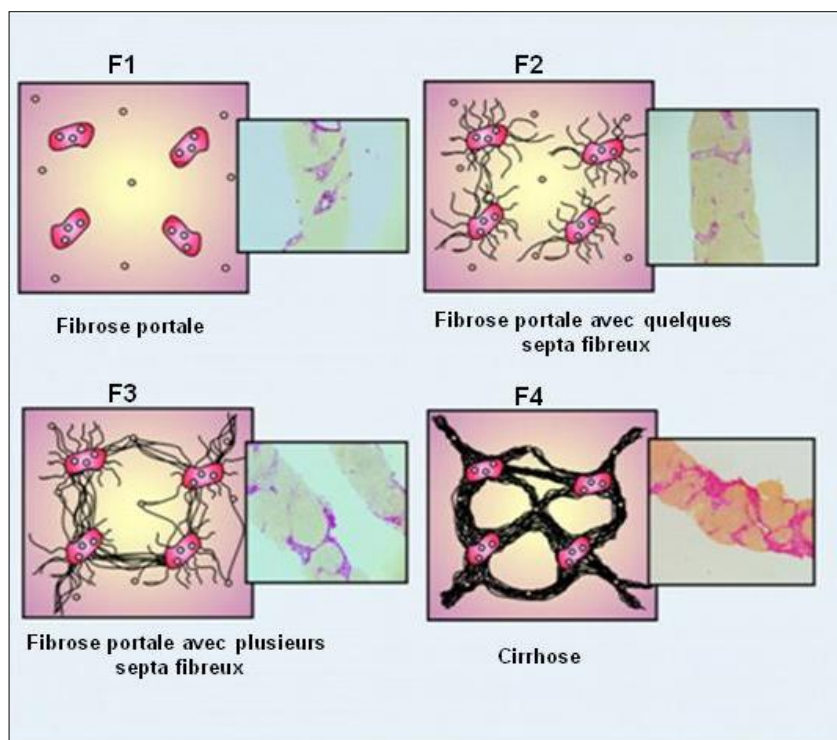


Figure 16. Le système de notation METAVIR décrit dans l'hépatite C chronique, sur biopsie hépatique.

La biopsie du foie est la "norme de référence" pour le diagnostic et la classification de la fibrose. La fibrose est notée comme F0 (absence), F1 (fibrose portale), F2 (fibrose portale avec peu de septa), F3 (fibrose septale) et F4 (cirrhose). D'après (Asselah et al. 2009).

2. Méthodes non invasives de diagnostic

Le développement progressif de nouvelles méthodes non invasives, alternatives à la biopsie du foie pour le diagnostic et une évaluation précise de la sévérité des maladies hépatiques chroniques, telles que la NASH, l'hépatite alcoolique et la fibrose, ont conduit à l'utilisation de deux stratégies alternatives à la biopsie, à savoir les approches "biologiques" ou "physiques".

a) Les approches biologiques de diagnostic : les marqueurs sériques

Plusieurs études ont démontré la valeur prédictive de plusieurs combinaisons de marqueurs biochimiques sériques chez les patients ayant un risque de développer des maladies chroniques du foie telles que la NASH, la stéatohépatite alcoolique et la fibrose hépatique.

Le **FibroTest®** analyse un panel de marqueurs sanguins, l'alpha-2-macroglobuline, l'haptoglobine, la gamma glutamyl-transférase (GGT), l'ApoA1 et la bilirubine, ajusté en fonction de l'âge et du sexe du patient. Les scores allant de 0 à 0,21 ont une valeur prédictive négative (VPN) de 100% pour l'absence de fibrose hépatique, tandis que les scores allant de 0,60 à 1 ont une valeur prédictive positive (VPP) de plus de 90% pour une fibrose (F3-F4 selon METAVIR) (Morra et al. 2007 ; Bril et al. 2019).

Le **AshTest®** combine les 5 composants du FibroTest®, des transaminases aspartame aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT) sériques ajustés selon l'âge et le sexe, montrant un potentiel diagnostique élevé pour la détection de la stéatohépatite alcoolique. Le score de l'AshTest varie de 0 à 1, avec une VPN de 0,16 et une VPP de 0,55 à 1 pour prédire la stéatohépatite alcoolique modérée à sévère (Morra et al. 2007; Bril et al. 2019).

Le **NashTest®** permet de détecter la présence de la NASH en combinant l'analyse des 5 composants du FibroTest®, plus le taux sérique d'ASAT et ALAT, cholestérol, triglycérides, la glycémie à jeun, ajustés également en fonction de l'âge, du sexe et de l'IMC du patient. Le score du NashTest varie de 0 à 1, avec une VPN de 0,49 et une VPP de 0,75 pour prédire la stéatohépatite non alcoolique (Bril et al. 2019).

b) Les approches physiques de diagnostic de la stéatose et de la fibrose

• Méthodes d'imagerie

Les techniques d'imagerie telles que l'échographie, l'IRM et la tomodensitométrie (CT-scan) peuvent permettre de dépister et quantifier la stéatose et contribuer à l'évaluation des maladies avancées du foie et de leurs complications indépendamment de l'étiologie. Parmi ces méthodes d'imagerie, l'échographie a probablement la plus faible sensibilité et spécificité, surtout lorsque l'étendue de la stéatose est inférieure à un seuil de 20 à 30 %. L'IRM est un outil fiable pour évaluer la quantité de stéatose et peut détecter 5 à 10% de la stéatose (EASL 2018b).

• Mesure de l'élasticité hépatique : le Fibroscan®

L'élastométrie hépatique ou élastographie transitoire (TE) (Fibroscan®-Paris, France) est la méthode d'imagerie la plus utilisée pour la mesure rapide et non invasive de la rigidité des tissus hépatiques (Costentin et al. 2017). La TE utilise une sonde composée d'un

transducteur ultrasonique qui émet des vibrations dans le foie créant des ondes de cisaillement à basse fréquence (5 MHz) qui se propagent dans le tissu hépatique. La vitesse des ondes de cisaillement est directement liée à la rigidité du tissu hépatique et l'unité est exprimée en kiloPascal (kPa). Les résultats sont obtenus à partir de dix mesures. La valeur finale est la médiane de ces mesures et représente la résistance du foie à la déformation. La TE mesure la rigidité en 1 cm de diamètre et 4 cm de longueur, environ 1/500 du volume du foie, soit 100 fois plus que le volume d'une biopsie hépatique (Almpanis, Demonakou, et Tiniakos 2016; Addolorato et al. 2020). De nombreuses études ont évalué la précision de diagnostic de TE pour diagnostiquer la cirrhose avec une spécificité et une sensibilité proche de 90 %. La précision de la détection de la fibrose est plus faible, avec une sensibilité et une spécificité approchant les 70-80%. L'obésité et l'ascite peuvent réduire la précision du TE, car le tissu adipeux et la présence de liquide peuvent tous deux influencer la vitesse de l'onde de cisaillement (Almpanis, Demonakou, et Tiniakos 2016).

F. Diagnostic et surveillance du carcinome hépatocellulaire

1. Diagnostic et surveillance du CHC par imagerie

Au cours des dernières décennies, Les efforts de la recherche se sont concentrés sur l'épidémiologie, les facteurs de risque et les profils moléculaires et génétiques du CHC, contribuant ainsi à l'évolution des stratégies de prévention, de surveillance et de traitement. La résection, l'ablation et la transplantation du foie sont potentiellement curatives mais nécessitent un diagnostic à un stade suffisamment précoce. Malheureusement, une proportion importante des patients atteints de CHC présente souvent une maladie à un stade intermédiaire ou avancé, malgré une surveillance étroite. Par conséquent les traitements curatifs sont souvent inapplicables (A. Huang et al. 2020).

Sur la base des données disponibles, l'association américaine pour l'étude des maladies du foie (AASLD), l'association européenne pour l'étude des maladies du foie (EASL), l'association Asie-Pacifique pour l'étude des maladies du foie (APASL) et le National Comprehensive Cancer Network recommandent une surveillance du CHC, par échographie, tous les 6 mois chez les personnes à risque, y compris tous les patients atteints de cirrhose, quelle qu'en soit l'étiologie, et les patients atteints de VHB en l'absence de cirrhose (Kanwal et Singal 2019).

Chez les patients à haut risque de développer un CHC, le ou les nodule(s) de moins de 1 cm de diamètre détecté(s) par échographie doivent être suivis à ≤ 4 mois d'intervalle au cours de la première année. S'il n'y a pas d'augmentation de la taille ou du nombre de nodules, la surveillance pourrait être ramenée à l'intervalle habituel de 6 mois par la suite (EASL 2018). Chez les patients cirrhotiques, le diagnostic de CHC pour des nodules de ≥ 1 cm de diamètre peut être réalisé avec des critères non invasifs. Si un diagnostic définitif ne peut être établi avec des critères radiologiques non invasifs, alors une biopsie est fortement recommandée, selon les dernières directives de l'EASL de 2018 (EASL 2018).

2. Classification du carcinome hépatocellulaire

Une fois le diagnostic établi, l'évaluation du pronostic est une étape critique dans la gestion du CHC. La classification des cancers vise à établir un pronostic et à permettre la sélection d'un traitement adéquat. Les principaux facteurs de pronostic clinique chez les patients atteints de CHC, basés sur des études relatant l'histoire naturelle de la maladie, sont liés au statut de la tumeur (défini par le nombre et la taille des nodules, la présence d'une invasion vasculaire, la propagation extra-hépatique), à la fonction hépatique (définie par le score de Child-Pugh, la bilirubine, l'albumine, l'hypertension portale, l'ascite) et à l'état de santé général (défini par la classification de l'Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] et la présence de symptômes).

La détermination d'un stade du cancer du foie établi par la clinique de Barcelone "Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging system" est approuvée et recommandée par l'AASLD et l'EASL (T.-H. Kim et al. 2019). Les patients atteints de CHC sont classés en 5 stades (0, A, B, C et D) selon des variables pronostiques liées aux caractéristiques de la (ou des) tumeur(s), à la fonction hépatique et à l'état de santé, ainsi que des variables dépendantes du traitement comme la bilirubine, l'hypertension portale ou la présence de symptômes ECOG, obtenues à partir d'études de cohorte et d'essais randomisés [Figure 17].

a) CHC très précoce (stade 0 du BCLC)

Ce stade est défini comme la présence d'une seule tumeur de < 2 cm de diamètre sans invasion vasculaire/satellites chez des patients ayant un bon état de santé (ECOG-0) et une fonction hépatique bien préservée (Child-Pugh A) (EASL 2018). Comme pour la résection chirurgicale, l'ablation par radiofréquence (RFA) est capable de provoquer une nécrose tumorale par destruction thermique, par voie percutanée ou chirurgicale, et est recommandée

pour les patients atteints de CHC à un stade très précoce ou précoce (BCLC 0-A) qui ne peuvent pas bénéficier d'une résection chirurgicale. La RFA est efficace dans le traitement des lésions de 2 cm ou moins, induisant une réponse complète de 97,2 % sur un suivi médian de 31 mois. Son efficacité est limitée par la taille importante de la tumeur et la proximité des vaisseaux sanguins, des voies biliaires, ce qui entraîne une dissipation de la chaleur (Ferrante, Pillai, et Singal 2020). Enfin, plusieurs études de cohorte ont fait état d'une survie à 5 ans supérieure à 70 % après la RFA chez des patients bien sélectionnés présentant un CHC très précoce (EASL 2018).

b) CHC précoce (stade A du BCLC)

Ce stade est défini chez les patients présentant une tumeur unique >2 cm ou trois nodules ≤ 3 cm de diamètre, un ECOG-0 et une fonction hépatique relativement préservée (Child-Pugh A-B). La survie médiane des patients atteints d'un CHC précoce atteint 50 à 70 %, 5 ans après résection ou transplantation hépatique. Le statut de la tumeur est défini par la taille du nodule principal et la multicentricité (nodule unique, trois nodules ≤ 3 cm), chacune de ces catégories présentant des résultats significativement différents. Pour les tumeurs isolées > 5 cm, la résection chirurgicale est toujours considérée comme une première option, car si l'IRM ne montre pas d'invasion vasculaire, ceci reflète un comportement biologique plus bénin. De plus, l'absence d'hypertension portale cliniquement pertinente (≤ 10 mm Hg) et un taux normal de bilirubine sont des facteurs prédictifs clés de la survie des patients atteints de tumeurs isolées en cours de résection (EASL 2018).

c) CHC intermédiaire (BCLC stade B)

Les patients au stade intermédiaire (BCLC B) ont une fonction hépatique relativement préservée (Child-Pugh A-B), une absence de symptômes liés au cancer et un CHC multinodulaire asymptomatique sans invasion vasculaire ni métastases extra-hépatiques. La survie médiane des patients non traités à un stade intermédiaire est de 16 mois ou 49 % à deux ans. La chimioembolisation transartérielle est la norme de soins pour ces patients et permet d'obtenir une survie médiane qui pourrait atteindre 4 ans chez les candidats optimaux (Ayuso et al. 2018; EASL 2018).

d) CHC avancé (BCLC stade C)

Les patients au stade avancé (BCLC C) présentent des symptômes liés au cancer (tumeurs symptomatiques, ECOG 1-2), une invasion macrovasculaire (soit segmentaire, soit

portale) ou une dissémination extrahépatique (atteinte des ganglions lymphatiques ou métastases), avec une fonction hépatique relativement préservée (Child-Pugh A ou B). Ces patients ont un pronostic défavorable, avec une durée médiane de survie attendue de 6 à 8 mois, ou de 25 % à un an. Le sorafenib®, un inhibiteur des tyrosines kinases, est le traitement systémique de première ligne standard pour le CHC montrant des avantages en termes de survie. Par la suite, le regorafenib®, un inhibiteur multikinase oral dont le mécanisme d'action est similaire à celui du sorafenib®, a démontré un impact sur la survie dans un essai clinique de phase III. Selon cette étude, le regorafenib® est recommandé comme traitement de seconde ligne chez les patients dont l'état a progressé mais qui ont été tolérants au sorafenib® (Ayuso et al. 2018; EASL 2018).

e) CHC en phase terminale (BCLC stade D)

Les patients atteints d'un CHC en phase terminale (BCLC D) sont caractérisés par une atteinte de la fonction hépatique (Child-Pugh C) et un très mauvais état de santé (ECOG 3-4) qui reflète un grave handicap lié à la tumeur. Ces patients reçoivent uniquement des soins palliatifs pour éviter toute souffrance inutile. Leur survie médiane est de 3-4 mois ou 11 % à un an (EASL 2018).

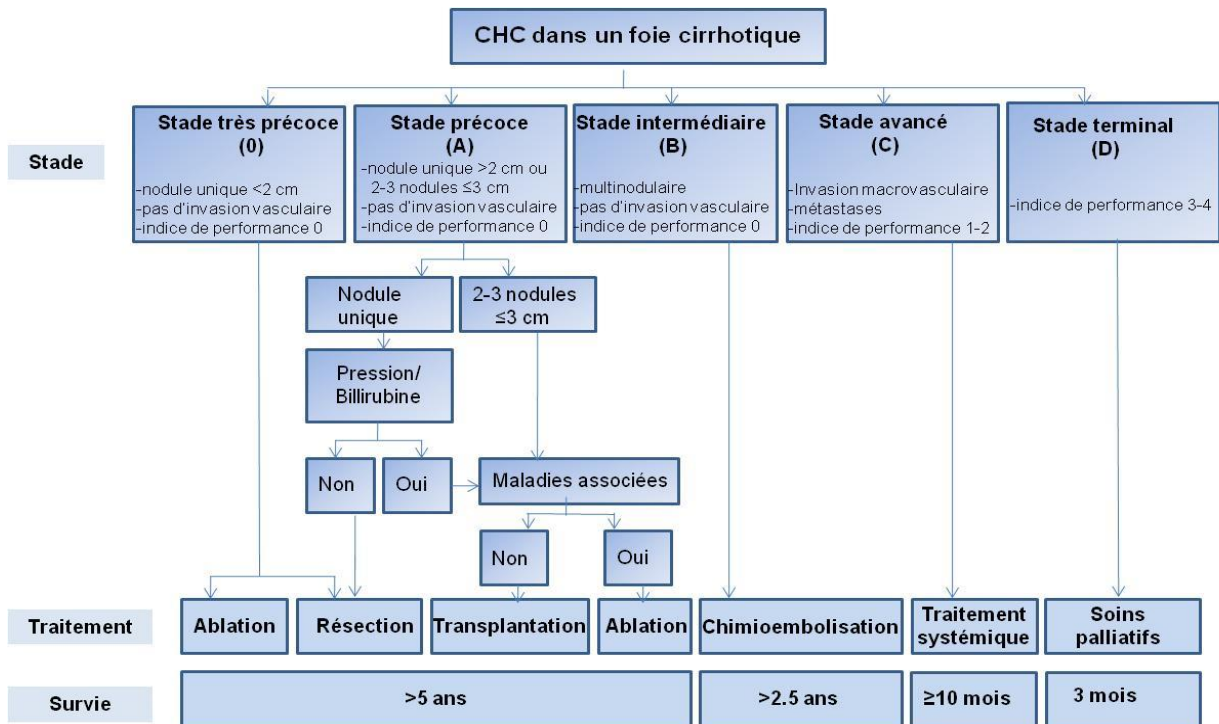


Figure 17. Le système de classification du CHC selon le Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) et stratégies de traitement proposées pour le CHC.

Le stade très précoce (0) : les patients présentant un CHC très précoce, avec une fonction hépatique préservée (Child-Pugh A), sont les meilleurs candidats pour l'ablation par radiofréquence (RFA) ou résection chirurgicale. Le stade précoce (A) : les patients atteints d'un CHC précoce sont des candidats aux thérapies radicales (résection, ablation ou transplantation de foie), dont le choix de la thérapie est basé sur une évaluation multiparamétrique, prenant en compte la fonction hépatique (Child-Pugh), le taux de bilirubine, la présence d'une hypertension portale et la présence de comorbidités. Le stade intermédiaire (B) : les patients présentant un CHC intermédiaire peuvent bénéficier d'une chimioembolisation transartérielle (TACE). Le stade avancé (C) : Les patients atteints d'un CHC avancé peuvent recevoir un traitement systémique. A partir de 2017, le sorafenib® s'est révélé efficace en première ligne, tandis que le regorafenib® est efficace en deuxième ligne en cas de progression radiologique sous sorafenib®. Le stade terminal (D) : Les patients atteints d'une maladie au stade final recevront des soins palliatifs visant à atténuer leur souffrance. D'après (Llovet et al. 2004; EASL 2018).

3. Biomarqueurs pour le diagnostic et la surveillance du CHC

En plus du risque de diagnostic tardif du CHC, le taux de récurrence dans les 5 ans suivant une résection chirurgicale ou une ablation par radiofréquence pour le CHC est estimé à 70 %, ce qui contribue au mauvais pronostic de ce type de cancer. Pour améliorer le pronostic, il est important de diagnostiquer le CHC ou la récurrence à un stade précoce et d'entamer les thérapies appropriées le plus tôt possible (Miura et al. 2020). Dans ce sens, des

marqueurs tumoraux pourraient être utilisés pour le diagnostic clinique, mais aussi pour le suivi de la réponse à la thérapie et la surveillance de la récurrence après un traitement curatif (Piñero, Dirchwolf, et Pessôa 2020). Idéalement, les marqueurs tumoraux pour le CHC devraient posséder une sensibilité et une spécificité élevées pour le diagnostic du CHC précoce, être indétectables dans les maladies hépatiques pré-malignes et devraient être faciles à détecter dans la circulation périphérique (R. W. C. Pang et al. 2008; Kanwal et Singal 2019).

De nombreuses études scientifiques ont exclu l'utilité clinique de plusieurs biomarqueurs sériques ou tissulaires. Malgré leur spécificité élevée, l'un des problèmes majeurs est leur faible sensibilité (avec des résultats faux-négatifs) qui empêche les biomarqueurs du CHC d'être cliniquement utiles pour le diagnostic précoce du CHC (Piñero, Dirchwolf, et Pessôa 2020). A l'heure actuelle, l'alpha-foetoprotéine (AFP) est couramment utilisée comme marqueur tumoral (Chia, Wong, et Luk 2019; Miura et al. 2020).

a) L'alpha-foetoprotéine

L'alpha-foetoprotéine (AFP) est le biomarqueur le plus couramment utilisé pour la surveillance du CHC. Cette glycoprotéine de 70 kDa est produite par le foie et le sac vitellin du fœtus pendant le premier trimestre de la grossesse et diminue rapidement après la naissance. L'AFP est analogue à l'albumine chez l'adulte, elles sont structurellement très similaires. Depuis son introduction comme outil de dépistage du CHC, son utilité en tant que marqueur tumoral a été remise en question, en raison de sa détection dans les maladies hépatiques, notamment dans l'hépatite virale chronique et la cirrhose (Piñero, Dirchwolf, et Pessôa 2020).

De nombreuses études biocliniques ont évalué le potentiel diagnostique et pronostique de plusieurs PGs tissulaires ou sériques. Parmi ces PGs, on retrouve le GPC-3, le SDC-1 et l'endocan (ESM-1), cités précédemment dans la partie PGs de l'introduction.

b) Le glypican-3

Le GPC-3 est, comme l'AFP, principalement exprimé au cours du développement embryonnaire. Le rôle principal du GPC-3 serait de réguler la réponse cellulaire de plusieurs facteurs de croissance pendant la morphogénèse. Son expression réapparaît, au niveau tissulaire, dans 70% des cas de CHC, tandis qu'il n'est pas détecté dans les tissus hépatiques d'adultes sains (Guo et al. 2020). La fraction soluble N-terminale du GPC-3 a été proposée

comme biomarqueur sérique, avec une meilleure performance diagnostique que l'AFP, en raison de sa capacité à distinguer avec précision entre les patients atteints d'un petit CHC et ceux atteints d'une cirrhose (Lou et al. 2017).

c) Le syndécanne-1

Physiologiquement, le SDC-1 est le principal PG exprimé par le foie. En interagissant avec les facteurs de croissance, les chimiokines et les composants de la MEC, il joue un rôle important dans la tumorigenèse. En effet, une surexpression du SDC-1 a été retrouvée dans des biopsies hépatiques de patients atteints d'un CHC développé sur cirrhose. En revanche, cette surexpression tissulaire, semble être étroitement associée à la cirrhose hépatique, car elle n'est pas significative dans les cas de CHC développés sur un foie non cirrhotique (Regős et al. 2020). Des taux sériques élevés de SDC-1 sont associés à un risque élevé de récurrence tumorale chez les patients atteints de CHC précoce traités par ablation par radiofréquence. De plus, chez les patients atteints d'un CHC avancé, des taux sériques élevés de SDC-1 ont été associés de manière significative à un mauvais pronostic (Nault et al. 2013).

d) L'endocan ou endothelial cell-specific molecule-1

L'endocan est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs malignes, notamment le CHC, avec des niveaux d'expression en corrélation positive avec la sévérité de la maladie. L'immunomarquage de l'endocan sur des biopsies hépatiques provenant de 67 patients atteints d'un CHC, suivis pendant 5 ans à l'hôpital Jean Verdier (Bondy) et à l'hôpital Henri Mondor (Créteil), a permis d'identifier et de valider un sous-type histologique de CHC, appelé CHC macrotrabéculaire, avec une sensibilité de 97% et une spécificité de 92%. Ce phénotype est associé à une forte activation de l'angiogenèse, à une récurrence après une résection ou une ablation percutanée et à un mauvais pronostic, indépendamment des paramètres pronostiques classiques du CHC (stade BCLC, taux sérique d'AFP) (Calderaro et al. 2019). Au niveau sérique, notre équipe a également montré qu'un taux élevé d'endocan est associé à un risque de récurrence tumorale chez les patients atteints de CHC précoce ayant subi une ablation par radiofréquence (Nault et al. 2013).

La combinaison de plusieurs biomarqueurs pourrait également être efficace et plus précise pour le diagnostic et/ou le pronostic du CHC. Ainsi, dans mes travaux de thèse, nous avons évalué l'association potentielle entre les niveaux circulants du SDC-1, du GPC-3 et de

SULF-2 avec l'apparition d'un CHC chez 287 patients atteints de cirrhose alcoolique. Nous décrivons les biomarqueurs sériques en nous concentrant sur leur utilité clinique pour la surveillance du CHC, le diagnostic précoce et pour leur potentiel pronostique. Les résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique en révision dans le journal Cancers.

Nous présentons par la suite un deuxième article sur l'axe fondamental de ma thèse, caractérisant l'effet du TNF- α sur l'expression des enzymes de biosynthèse et de modification post-synthèse des chaînes HS et la conséquence sur la modification structurale des chaînes HS dans un modèle d'hépatome humain (Huh7).

Enfin, nous présentons un résumé des travaux portant sur l'identification des facteurs de susceptibilité génétique pour les maladies hépatiques chroniques, en particulier sous forme de polymorphismes d'un seul nucléotide présents au sein des gènes codant les enzymes SULF-1, SULF-2 et HPSE. La valeur pronostique de ces variants génétique a été évaluée de manière rétrospective dans une cohorte de 273 patients atteints d'une NASH, en tenant compte des évènements cliniques qui surviennent au cours du suivi tels que la fibrose, la cirrhose, le CHC et le décès.

RESULTATS

I. Article 1 : Sulfatase 2 along with Syndecan 1 and Glypican 3 serum levels are associated with a prognostic value in patients with alcohol-related advanced Hepatocellular Carcinoma.

Article en révision dans le journal *Cancers* à un facteur d'impact 6.126

Résumé :

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la troisième cause de décès liée au cancer dans le monde. Dans les pays occidentaux, 90% des cas de CHC se développent dans le cadre d'une cirrhose due notamment à une stéatohépatite non alcoolique (NASH), une infection chronique par le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC) et la consommation chronique d'alcool. En France, la consommation chronique d'alcool et la cirrhose qui en résulte sont la cause principale du développement du CHC (70% des cas). En pratique clinique, la surveillance de l'apparition des nodules de CHC est réalisée à des intervalles réguliers de 6 mois par échographie et une évaluation du taux sérique de l' α -foetoprotéine (AFP), couramment utilisée comme marqueur tumoral. Néanmoins, les sensibilités de l'échographie et du taux sérique de l'AFP pour la détection d'un CHC précoce sont de l'ordre respectivement de 60% et 40%. Par conséquent, la plupart des cas de CHC sont encore détectés à un stade avancé. Les traitements radicaux tels que l'ablation par radiofréquence ou la résection chirurgicale améliorent la survie globale des patients atteints de CHC à un stade précoce mais la majorité des patients diagnostiqués avec un CHC ne sont pas éligibles pour de tels traitements et ont plutôt un mauvais pronostic et seul un traitement palliatif est proposé pour soulager les symptômes liés au CHC. Les investigations sur des biomarqueurs sériques liés à la sévérité de la cirrhose et à la progression tumorale sont aussi pertinentes et pourraient permettre à la fois de définir une prise en charge plus adaptée des patients et d'initier de nouvelles pistes thérapeutiques.

Dans ce contexte, le potentiel diagnostique et pronostique de plusieurs protéoglycannes à chaînes héparane sulfate (HSPG), tels que le syndécanne-1 (SDC-1) et le glypican-3 (GPC-3), a été identifié à partir d'études aux niveaux tissulaire et sérique. En utilisant des motifs de sulfatation spécifiques sur leurs chaînes héparane sulfate (HS) comme éléments de reconnaissance, les HSPG peuvent interagir avec des chimiokines et des facteurs de

croissance appelés « Heparin Binding Proteins » (HBP) impliqués dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et l'angiogenèse. Plusieurs études ont montré que les taux du SDC-1 et du GPC-3, tant au niveau tissulaire (biopsie) qu'au niveau sérique, sont beaucoup plus élevés dans les petits CHC que dans la cirrhose.

La modification structurale des chaînes HS médiée par la sulfatase-2 (SULF-2), une enzyme à activité 6-O-endosulfatase, peut réguler positivement l'action des HBP en diminuant leur affinité aux chaînes HS, permettant leur libération et leur fixation à leurs récepteurs spécifiques. A l'heure actuelle, seules les études montrant une surexpression tissulaire de SULF-2, par immunohistochimie, ont révélé une valeur pronostique de cette enzyme dans le CHC.

L'objectif de notre étude a été d'évaluer la valeur pronostique des niveaux circulants de SULF-2 avec l'apparition du CHC chez 287 patients atteints de cirrhose alcoolique avec ou sans CHC. Ces patients ont été classés selon l'absence (n=164) ou la présence d'un CHC précoce (n=57) ou avancé (n=66) à la date d'inclusion puis suivis périodiquement au sein du service d'hépatologie de l'hôpital Jean Verdier (APHP, Bondy). Le dosage du taux sérique à l'inclusion de SULF-2 a été réalisé par ELISA. Les dosages des concentrations sériques du SDC-1 et GPC-3 sur cette cohorte de patients avaient été effectués par notre équipe de recherche avec des résultats publiés (Nault et al. 2013).

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que des valeurs élevées de concentrations sériques de SULF-2 (> 65ng/mL) possèdent une valeur pronostique péjorative chez les patients atteints de cirrhose alcoolique, en particulier, chez les patients atteints de CHC avancé. Les niveaux circulants de SULF-2 sont en outre associés au score de Child-Pugh C et prédisent le risque de décès à court terme. Par ailleurs, nous avons observé une modeste corrélation positive entre les taux sériques de SULF-2, GPC-3 et SDC-1. L'étude de la valeur pronostique du taux sérique de SULF-2 en association avec le taux sérique du SDC-1 et du GPC-3 a montré que la combinaison des valeurs sériques supérieures à la médiane de ces trois biomarqueurs (SULF2>65,2 ng/mL, GPC-3>2,5 ng/mL et SDC-1>50 ng/mL) était associée à un fort risque de décès chez les patients atteints d'un CHC avancé. Ainsi Les taux sériques de SULF2, de GPC3 et de SDC1 sont associés à une valeur pronostique dans le CHC avancé. En conclusion, nos résultats semblent caractériser le taux sérique de SULF-2 plutôt comme un marqueur de sévérité des lésions hépatiques que comme un marqueur de CHC.

Mots-clés : Sulfatase-2, héparane sulfate, biomarqueur, pronostic, cirrhose, carcinome hépatocellulaire.



1

2 Article

3 **Sulfatase 2 along with Syndecan 1 and Glypican 3 serum levels**
4 **are associated with a prognostic value in patients with**
5 **alcohol-related advanced Hepatocellular Carcinoma**

6

7 Nesrine Mouhoubi¹, Jessica Bamba-Funck^{1,2}, Angela Sutton^{1,2}, Lorraine Blaise³, Olivier Seror⁴, Nathalie Ganne-Carrie^{3,7},
8 Marianne Zio^{5,6}, Gisèle N'Kontchou³, Nathalie Charnaux^{1,2}, Pierre Nahon^{3,7}, Jean-Charles Nault^{3,7*}, Erwan Guyot^{1,2*}

9

10 ¹ Université Sorbonne Paris Nord, Laboratory for Vascular Translational Science, LVTS, INSERM, UMR 1148, F-
11 93000, Bobigny, France

12 ² Service de biochimie, Hôpital Avicenne, hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, Assistance publique
13 Hôpitaux de Paris, F-93000, Bobigny, France.

14 ³ Service d'hépatologie, Hôpital Avicenne, AP-HP, hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, Assistance
15 publique Hôpitaux de Paris, F-93143, Bondy, France.

16 ⁴ Service de radiologie, Hôpital Avicenne, hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis, Assistance publique
17 Hôpitaux de Paris, F-93000, Bobigny, France.

18 ⁵ Centre de Ressources Biologiques BB-0033-00027, Hôpital Avicenne, hôpitaux universitaires
19 Paris-Seine-Saint-Denis, Assistance publique Hôpitaux de Paris, F-93000, Bobigny, France.

20 ⁶ Service d'anatomie et cytologie pathologique, Hôpital Avicenne, hôpitaux universitaires
21 Paris-Seine-Saint-Denis, Assistance publique Hôpitaux de Paris, F-93000, Bobigny, France.

22 ⁷ Inserm, UMR 1162, Génomique fonctionnelle des tumeurs solides, F-75010 Paris, France

23 * Correspondence: JCN: jean-charles.nault@aphp.fr; Tel.: (+33)1.48.95.53.73 ; EG: erwan.guyot@aphp.fr;
24 Tel.: (+33)1.48.95.56.29

25 Academic Editor: Firstname Last-
26 name

27 Received: date

28 Accepted: date

29 Published: date

30 **Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional
31 claims in published maps and institutional affiliations.

32 **Simple Summary:** Chronic alcohol consumption can lead to liver cirrhosis and then to
33 hepatocellular carcinoma (HCC). Along with a diligent clinical monitoring, biomarkers
34 are currently limited tools to help physicians to assess the prognosis for patients with
35 HCC. Syndecan 1 (SDC1) and glypican 3 (GPC3), previously associated to biomarker
36 characteristics in these patients, and their modifying enzyme sulfatase 2 (SULF2), have
37 already been associated to liver carcinogenesis. The aim of our study was to assess the
38 prognostic value of serum levels of SULF2 in patients with alcohol-related cirrhosis with
39 or without HCC. We demonstrate in these patients that serum levels of SULF2 were
40 associated to the severity of liver disease and with less favorable overall survival in
41 patients with advanced HCC. Combination of SULF2 with SDC1 and GPC3 serum levels
42 enhanced the ability to discriminate worst prognostic in advanced HCC and could be
43 helpful for the choice of adapted therapeutic procedures.

44 **Copyright:** © 2021 by the author
45 Submitted for possible open access
46 publication under the terms and
47 conditions of the Creative Commons
48 Attribution (CC BY) license
49 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

40

41

42

Abstract:

43

Sulfatase 2 (SULF2) is an enzyme related to heparan sulfate modifications. Its expression, as for some heparan sulfate proteoglycans expression, has been linked to hepatocellular carcinoma (HCC) at mRNA level and immunohistochemistry staining on biopsy samples. This study aimed to evaluate the prognostic value of serum levels of SULF2 in patients with alcoholic cirrhosis with or without HCC.

44

45

46

47

48

287 patients with alcoholic cirrhosis were enrolled in this study: 164 without HCC, 57 with early HCC, and 66 with advanced HCC at inclusion. We analyzed the association between SULF2 serum levels and prognosis using Kaplan-Meier method and univariate and multivariate analysis using a cox model.

49

50

51

52

Child-Pugh C Patients have higher serum levels of SULF2 than Child-Pugh A patients. Serum levels of SULF2 were also higher in patients with advanced HCC compared with the other groups. In patients with advanced HCC, high serum levels of SULF2 were associated with less favorable overall survival. Combination of SULF2 with Glypican 3 (GPC3) and Syndecan 1 (SDC1) serum levels enhanced the ability to discriminate worst prognostic in advanced HCC.

53

54

55

56

57

58

SULF2 along with GPC3 and SDC1 serum levels have been shown to be associated with a prognostic value in advanced HCC.

59

60

61

Keywords: Sulfatase 2, biomarker, prognosis, Hepatocellular carcinoma, cirrhosis.

62

63

64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer related-death worldwide [1]. In western countries, 90% of the HCC cases develop within an established chronic liver disease [2] including cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [3], chronic infection with hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and alcohol abuse [4]. Chronic alcohol abuse represents a public health scourge [5] and the incidence of alcoholic cirrhosis is increasing especially in Europe [6]. HCC developed on alcoholic cirrhosis remains poorly studied compared with HBV and HCV associated HCC. In clinical practice, HCC surveillance of cirrhotic patients currently consists of patients visits at regular intervals (6 months), including liver ultrasonography and serum level of α -fetoprotein (AFP) assessment [7]. Nevertheless, most proportion of HCC is still detected at an advanced stage. Radical treatment such as radiofrequency ablation or surgical resection have improved overall survival of patients with early HCC stage [8,9] but the majority of the patients diagnosed with HCC are not eligible for such treatments and have rather a poor prognosis and only palliative treatment is offered to support symptoms management [10,11]. Investigations about serologic biomarkers related to the severity of cirrhosis and tumor progression remain relevant in order to define more adapted patient care and progress in therapeutic strategies.

Among different molecules, heparan sulfate proteoglycans (HSPG) and enzymes linked to their biosynthesis and metabolism could be considered as biomarker candidates with growing evidence body in this field [12,13]. Many proteoglycans have been studied in liver cancer such as syndecan 1 (SDC1) and glypican 3 (GPC3) that seem to be of particular interest. Over-expression of SDC1, a cell surface HSPG, has been observed by immunohistochemistry in primary liver HCC comparatively to cirrhosis and healthy individuals [14]. Such HSPG can be shed by different enzymes and be found in serum samples; we have previously shown that levels of SDC1 increased in serum of patients with advanced HCC comparatively to early HCC and that high levels are associated with poor overall survival [15]. SDC1 is also overexpressed in other types of tumors [16].

Glypican 3 (GPC3) is an onco-fetoprotein also characterized as a cell membrane HSPG. Not detected in adult organs, its expression reappears in various tumors and is particularly elevated in more than 70% of HCC tissues, characterized by poor differentiation which is related to a poor prognosis and a higher incidence of tumor recurrence [17]. Serum GPC3 levels and GPC3 immunohistochemistry are useful as biomarkers and prognostic factors for HCC patients [18,19]. A large number of studies have shown that GPC3 is more sensitive than AFP in the diagnosis of HCC. GPC3 can be used not only for the diagnosis of surgically resected samples, but also for the diagnosis of biopsy samples [20]. In a previous work, we focused on these two proteoglycans, SDC1 and GPC3, because of their well-established relevance in carcinogenesis.

Different enzymes operate in the edition and the remodeling of these HSPG. Regarding the remodeling of HSPG, some enzyme, such as MMPs, target the protein part resulting in the shedding of these membrane associated proteoglycans and thus, the liberation of the shedded part into the extracellular matrix (ECM). The second group of enzymes

106 targets the glycosaminoglycan chains in the ECM and provokes two types of
107 modifications. Heparanase is able to cleave heparan sulfate chains acting as an
108 endoglucuronidase [21] and extracellular sulfatases (SULF1 and SULF2) are highly
109 specific and remove sulfates groups from the C-6 position of glucosamine within specific
110 subregions [22]. One of the main consequences is the release of heparan binding proteins
111 (HBP), which include growth factors and chemokines, from HSPG. These dissociations
112 either cause the facilitation or are an hamper to the activation of signaling pathways
113 triggered by different HBP. Thus, fine structural changes produced by SULFs have been
114 associated to tumor growth, angiogenesis, and metastasis [23-25].
115 Over-expression of sulfatase-2 (SULF2) has been observed in a variety of cancer
116 including HCC [23], lung [26] and breast carcinoma [27]. High levels of SULF2 have also
117 been found in the serum of cirrhotic patients, suggesting potential use as serologic
118 biomarker [28]. These findings encourage us to further investigate whether SULF2 could
119 be used as a prognostic biomarker in HCC. In this regard, a retrospective cohort of
120 patients with alcoholic cirrhosis has been established in which frozen serum samples are
121 available from the day of inclusion. After a long follow-up, which resulted in the
122 diagnosis of a large number of HCC cases, the cohort was divided into three subgroups,
123 composed of patients with alcoholic cirrhosis without HCC, patients with early HCC and
124 patients with advanced HCC classified as Barcelona clinic liver cancer (BCLC). The aim
125 of the present study was to assess a potential association between circulating levels of
126 proteoglycans and SULF2 with HCC occurrence and overall survival in patients with
127 alcoholic cirrhosis with or without HCC, as well as evaluate if these circulating levels are
128 associated with the prognosis of cirrhotic patients with HCC eligible for curative or
129 palliative treatment. Eventually, this study contributes to initiate the investigations about
130 how this biomarker could contribute to patient care.

131 2. Materials and Methods

132 Patient selection

133 To evaluate serum levels of sulfatase 2 (SULF2), we retrospectively used collected
134 samples of sera from a cohort of prospectively followed-up cirrhotic patients. All
135 cirrhotic patients referred to our institution (Jean Verdier Hospital, Bondy, France) for
136 management of cirrhosis between January 2007 and December 2009 were considered. For
137 this study, only patients fulfilling the following inclusion criteria were selected: (i)
138 biopsy-proven cirrhosis; (ii) alcoholic liver disease defined by alcohol intake of more than
139 50 g per day and absence of other etiologies; (iii) a frozen serum sample collected before
140 any treatment; and iv) availability of a written consent for the use of frozen blood
141 sampling provided by patient. Exclusion criteria included HIV infection and severe
142 alcoholic hepatitis.

143 The date of inclusion corresponds to the date of the first serum collected before any
144 treatment. Clinical, biologic, endoscopic, and radiological features were recorded at
145 inclusion. These samples then served for sulfatase 2 levels assessments.

146 Patients were classified into three groups according to the absence/presence and status of
147 HCC as follows:

- 148 1. Patients with alcoholic cirrhosis “without” HCC confirmed by normal
149 ultrasonography and α -fetoprotein (AFP) < 100 ng/mL at baseline.
150 2. Patients with early HCC classified as Barcelona clinic liver cancer (BCLC) stage 0
151 (one nodule < 2 cm) or A (one nodule < 5 cm or maximum 3 nodules < 3 cm).
152 3. Patients with “advanced” HCC classified as BCLC stage B (multinodular form
153 apart from Milan criteria), BCLC stage C (portal invasion or metastasis), or BCLC stage D
154 (poor performance status or Child-Pugh C).

155 HCC was diagnosed using either guided biopsy or Barcelona non-invasive criteria
156 endorsed by the European Association for the Study of the Liver (EASL) [29].

157 **Endpoints and follow-up**

158 All cirrhotic patients without HCC at baseline were screened for HCC every 6 months
159 using liver ultrasonography and serum AFP levels [29]. The two main endpoints were
160 occurrence of HCC and occurrence of liver transplantation or death.

161 Patients with early HCC were treated in our liver unit by radiofrequency ablation (RFA)
162 by the same operator. All were then followed-up using abdominal CT scan and serum
163 AFP assessment at one month and then every 3 months. Patients showing a partial
164 response at one month defined by persistent enhancement of the lesion on CT scan could
165 then be retreated with RFA. The two main endpoints were recurrence-free survival (RFS)
166 and overall survival.

167 Patients with “advanced” HCC were treated and followed-up according to EASL
168 recommendations: arterial chemoembolization for BCLC stage B, sorafenib since 2008 for
169 BCLC stage C, and best supportive care for BCLC stage D [20,29]. Primary endpoint was
170 overall survival.

171 **Ethics statement**

172 A written consent for blood sampling has been provided by every patient (in accordance
173 with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki));
174 local ethics committee (USPN) approval for the protocol was obtained.

175

176 ***Quantification of circulating Sulfatase-2 and Heparan Sulfate proteoglycans (Syndecan 177 1 and Glypican 3)***

178 Blood samples were collected from patients under fasting conditions prior to treatment.
179 Sera were separated after centrifugation at 4000 rpm for 15 minutes and stored at -80°C
180 for later use. Commercial ELISA kits with high specificity for detection of Sulfatase 2
181 (SULF2) were purchased from Cloud Clone (SEH107Hu) and used according to the
182 manufacturer's instructions. The sera were diluted at 1/10. Repeatability and
183 reproducibility for 6 samples were tested 3 times on one plate and 4 times on 4 different
184 plates, respectively. The calculated coefficients of variation (CV) were 5.0% for
185 intra-assay and 10.9% for inter-assay. The proteoglycans Glypican 3 and Syndecan 1 have
186 been assessed previously [15].

187

188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219

Statistical analysis

Variables were compared using Fisher exact test for qualitative data and Kruskal–Wallis tests for continuous data.

Overall survival was defined by time from inclusion to death; patients free of events were censored at their last visit, recorded until July 31, 2019. In each subgroup of patients, follow-up ended at the date of liver transplantation or death or at the last recorded visit (or information) during the 6 months before July 2019.

For the patient group without HCC, time to HCC occurrence was defined as time between date of inclusion and date of onset of HCC. For the patient group with early HCC, recurrence free survival (RFS) was defined as time between date of inclusion and date of HCC recurrence or date of death.

For the patient group with advanced HCC, progression free survival (PFS) was defined as time between date of inclusion and date of HCC recurrence or date of death.

Distribution of time-to-failure endpoints was estimated by the Kaplan–Meier method. Levels of circulating Heparan Sulfate Proteoglycans (SDC1 and GPC3) and SULF2 were dichotomized (low level vs. high level) using median values.

Univariate and multivariate analyses were conducted using Cox models for overall survival and RFS. All statistical tests were two-sided and P values ≤ 0.05 were considered significant. Statistical analysis was conducted using Prism (Graphpad) and R (R Development Core Team) software packages.

3. Results

3.1. Patients' baseline characteristics

287 patients with alcoholic cirrhosis were enrolled in the study. These patients were classified according to the absence or presence of HCC at the date of inclusion. Among them, 164 patients had alcoholic cirrhosis without HCC and were prospectively screened for HCC, 57 patients had early HCC, and 66 patients had advanced hepatocellular carcinoma. Their characteristics are displayed in Table 1. Patients with early HCC had a unique nodule in 46 cases (81%), with a main nodule of less than 3 cm in 37 cases (65%). Patients with advanced HCC had multiple nodules in 34 cases (55%), with a tumor portal thrombosis in 24 cases (36%).

	Cirrhosis (n= 164)	Early HCC (n= 57)	Advanced HCC (n= 66)	<i>P</i> value
Age (years old) ^a	59 (34-94)	68 (52-82)	68.5 (50-85)	<0.0001
Gender (male) ^b	137 (83.5%)	46 (80.7%)	61 (93.8%)	0.0758
Child Pugh A(number/%)	82 (50%)	48 (84%)	29 (44%)	<0.0001

Child Pugh B(number/%)	49 (30%)	8 (14%)	25 (38%)	
Child Pugh C(number/%)	33 (20%)	1 (2%)	12 (18%)	
AFP (ng/mL) ^a	4 (1-326)	4.5 (1-39347)	4 (1-59007)	0.3421
Total Bilirubin (mg/dL) ^a	1.375	0.88 (0.23-3.16)	1.43	0.0046
Albumin (g/L) ^a	36.95	39.5 (26.7-51.4)	39.43	0.0298
ASAT (UI/L) ^a	51 (7-728)	55 (19-179)	53.5 (19-551)	0.9306
ALAT (UI/L) ^a	32 (12-454)	34 (7-331)	34.5 (10-290)	0.6054
ALP (UI/L) ^a	116 (25-1014)	119 (33-512)	120 (45-271)	0.8531
GGT (UI/L) ^a	154 (15-2264)	195 (38-1125)	157 (12-2620)	0.5635
Platelets count (G/L) ^a	118 (14-416)	123 (34-316)	132 (34-312)	0.6079
Prothrombin time (%) ^a	63.5 (12-100)	70 (28-100)	69 (23-100)	0.3290
Creatinine (µmol/L) ^a	77 (31-258)	80 (11.3-223)	88.5 (36-533)	0.023
SULF2 (ng/mL) ^a	57.61	63.34	79.28	<0.0001

220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232

Table 1. Baseline characteristics of the 287 patients with alcohol-related cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma. All biological and clinical parameters were recorded at inclusion. Fisher exact or chi-2 test was used for binary variables and the Kruskal–Wallis test for continuous variables.

Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; ASAT, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HCC, hepatocellular carcinoma; AFP, alpha-fetoprotein.

^a Mean ± SEM.

^b Number (percentage) of patients.

The levels of serum SULF2 were significantly increased in patients with advanced HCC compared to patients without or with early HCC (Table 1; Table 2; Figure 1a).

	SULF2 < median value (65.2ng/mL)	SULF2 > median value (65.2ng/mL)	P value
Age (yearsold) ^a	60.5 (35-94)	63 (34-85)	0.0171
Gender (male) ^b	124 (86%)	120 (84%)	0.6236
Child Pugh A	98 (68%)	61 (43%)	<0.0001
Child Pugh B	36 (25%)	46 (32%)	
Child Pugh C	10 (7%)	36 (25%)	
Cirrhosis without HCC	95 (58%)	69 (48%)	<0.0001
Early HCC (number/%) ^b	49 (30%)	27 (19%)	

Advanced HCC	19 (12%)	47 (33%)	
AFP (ng/mL) ^a	4 (1-59007)	4 (1-9765)	0.1133
Total Bilirubin (mg/dL) ^a	0.94 (0.23-32.1)	1.7 (0.23-39.02)	0.0003
Albumin (g/L) ^a	33.8 (19.2-51.8)	34.6 (21-49.3)	<0.0001
ASAT (UI/L) ^a	53 (19-728)	50.5 (7-304)	0.6526
ALAT (UI/L) ^a	34.5 (7-454)	34.5 (7-454)	0.9993
ALP (UI/L) ^a	116 (33-315)	120 (25-1014)	0.9740
GGT (UI/L) ^a	165 (17-2264)	157 (12-2620)	0.3746
Platelets count(G/L) ^a	123.5 (14-349)	128 (33-416)	0.2141
Prothrombin time(%) ^a	72 (12-100)	62 (14-100)	<0.0001
Creatinine (μmol/L) ^a	75 (31-218)	85 (11.3-533)	<0.0001

Table 2. Clinical and biologic variables associated with SULF2 serum levels in patients without hepatocellular carcinoma at baseline. All biological and clinical parameters were recorded at inclusion. Serum level of SULF2 represented variable of interest. Median value (= 65.2 ng/mL) has been set for cut-off limit to define the groups of patients.

Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; ASAT, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; HCC, hepatocellular carcinoma; AFP, alpha-fetoprotein

^a Mean ± SEM

^b Number (percentage) of patients.

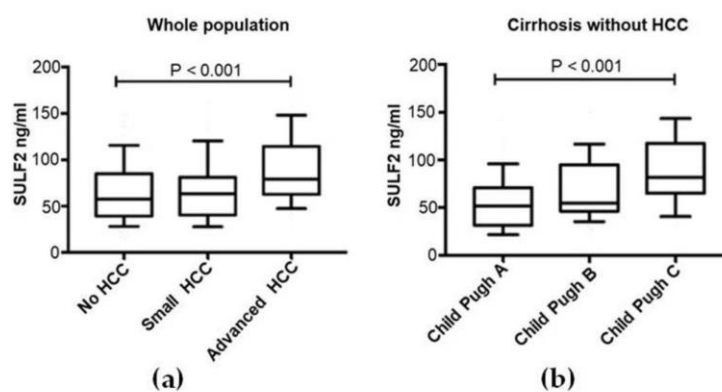


Figure 1. Serum SULF2 is associated to the stage of the liver disease. Serum levels of SULF2 in patients with alcohol-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) according to **a**) the presence and stage of HCC in the whole population and **b**) Child-Pugh score in patients with cirrhosis without HCC. Box plots were used to depict data. Data were compared using the nonparametric Kruskal–Wallis test.

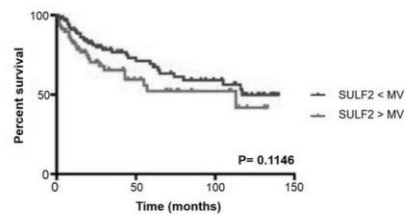
The 3 subgroups of cirrhotic patients were heterogeneous in their underlying stage of liver disease, as reflected by the Child-Pugh classification (Table 1). There was a positive

251 correlation between Child-Pugh classification and levels of SULF2 serum in patients with
 252 alcoholic cirrhosis without HCC (consistently, as for Albumin and Bilirubin levels).
 253 Indeed, Child-Pugh C patients possessed significantly higher levels of serum SULF2
 254 (Figure 1b).

255 Next, we compared the clinical and biological features of patients without HCC
 256 dichotomized according to their median serum SULF2 value. The results show
 257 significant associations between worse values in parameters linked to liver function and
 258 highest values of SULF2 (Table 2) supporting the previous result. These results strongly
 259 suggest that serum SULF2 is associated to the stage of liver disease.
 260

261 3.2. Serum SULF2 predicted overall survival in patients with advanced hepatocellular 262 carcinoma

263 We subsequently evaluated the ability of SULF2 serum levels to predict survival in
 264 patients with alcohol-related cirrhosis and advanced HCC. Levels of circulating SULF2
 265 were not associated with higher risk of death in patients with alcohol-related cirrhosis
 266 (Figure 2; median survival of 113 months vs 117 months for SULF2 < 65.2 ng/mL,
 267 $p=0.1146$).



268 **Figure 2. Overall survival in patients with alcohol-related cirrhosis according to serum levels of SULF2.**
 269 Analysis of the overall survival of patients only without HCC ($n=164$) on a long term period (150 months).
 270 Patients with a level of circulating SULF2 over the median (>65.2 ng/mL) value have not a worse prognostic
 271 ($P=0.1146$).

272 The Kaplan–Meier method was used to estimate overall survival for level of SULF2 and compared using the log
 273 rank test. Numbers at risk are shown under the x-axis.
 274

275
 276 Regarding the tumor occurrence in patients with cirrhosis and without HCC at baseline
 277 or recurrence after ablation for early HCC, the analysis performed show that serum
 278 levels of SULF2 were not predictive neither of tumor occurrence or recurrence nor of free
 279 survival in patients with alcohol-related cirrhosis (Figure 3). We therefore conclude that
 280 SULF2 serum levels are not associated with HCC occurrence or recurrence.

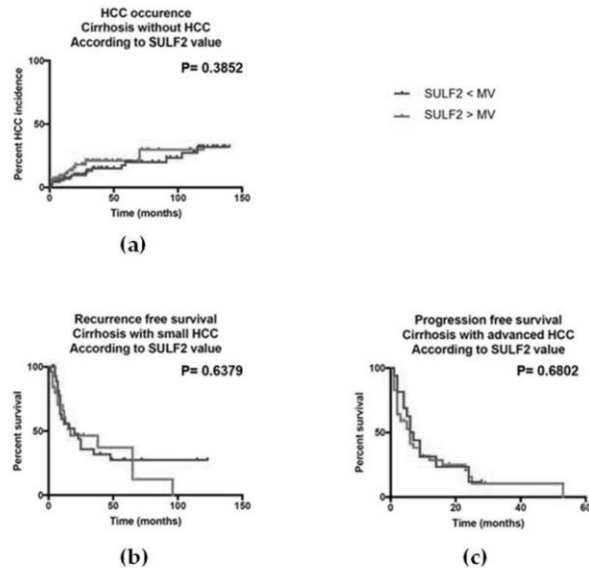


Figure 3. Association between SULF2 serum levels and different outcomes in patients with alcohol-related cirrhosis, early or advanced HCC. Patients were stratified according to the median level of serum SULF2: low levels of circulating SULF2 ($65.2 < \text{ng/mL}$) versus high levels of circulating SULF2 ($>65.2 \text{ ng/mL}$). **A)** High levels of serum SULF2 were not associated with risk of tumor occurrence in patients with alcohol-related cirrhosis. **B)** High levels of serum SULF2 were not a risk of tumor recurrence in patients with early hepatocellular carcinoma. **C)** High levels of serum SULF2 were not associated with strong risk of death in patients with advanced hepatocellular carcinoma. The Kaplan–Meier method was used to estimate overall survival and tumor occurrence or recurrence. Abbreviations: MV=median value

Moreover, the same analysis has been performed for the patients with early HCC ($n=57$), no statistical difference has been found between the subgroups of patients according to their serum levels of SULF2 (data not shown).

Besides, we focused on patients with advanced HCC. Among this latter group of 66 patients, circulating SULF2 levels allowed a significant stratification regarding the risk of death (Figure 4; median survival of 5 months vs median survival not reached for SULF2 $< 65.2 \text{ ng/mL}$, $p=0.03$). In univariate analysis, circulating SULF2 levels, tumor portal vein thrombosis and Child Pugh Score were associated with the risk of death. In a first multivariate analysis, circulating SULF2 levels ($\text{HR}=2.722$, $\text{CI}95\% [1.08-6.489]$, $p=0.033$) and tumor portal vein thrombosis ($\text{HR}=4.338$, $\text{CI}95\% [1.88-9.976]$, $p=0.000554$) remains independently associated with a higher risk of death (data not shown).

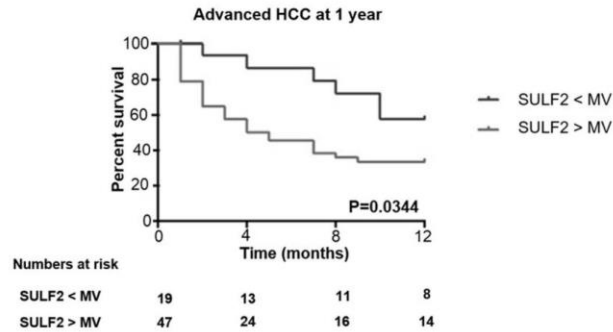


Figure 4. Overall survival in patients with advanced HCC according to serum levels of SULF2. Analysis of patients only with advanced HCC (n= 66). Patients at 1 year were stratified according to the median level of serum SULF2: low levels of circulating SULF2 (<65.2 ng/mL) versus high levels of circulating SULF2 (>65.2 ng/mL).

The Kaplan–Meier method was used to estimate overall survival for level of SULF2 and compared using the log rank test. Numbers at risk are shown under the x-axis.

Abbreviations: MV=median value

3.3. Correlations between SULF2 and other biomarkers: HSPG (SDC1 and GPC3) and ALAT

Many *in vitro* studies show links between the different HSPG and enzymes associated to HS modifications especially regarding their expression. In our previous study, we found a significant increase of SDC1 and GPC3 levels in sera of patients with advanced hepatocellular carcinoma [15].

We subsequently evaluated the correlation between serum levels of SULF2 and SDC1 or GPC3. Our analysis showed that such positive correlations exist in our study for both parameters (Figure 5). Conversely, SULF2 serum levels were not significantly correlated with ALAT (Figure 5).

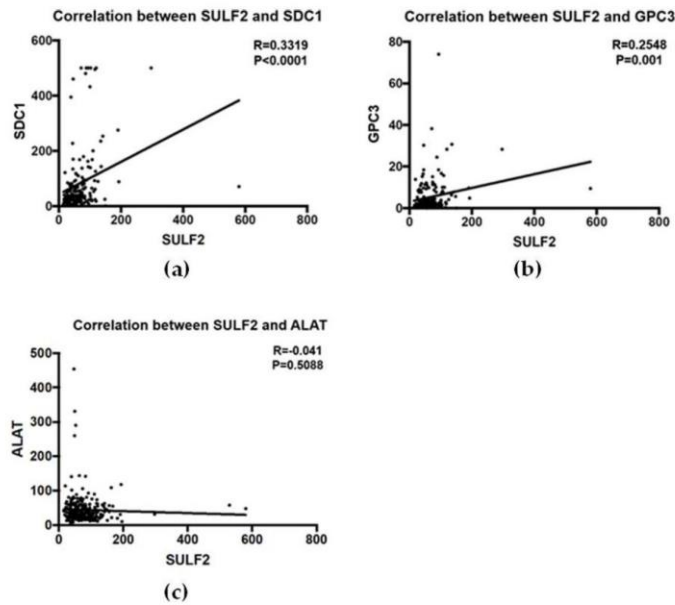


Figure 5. Correlations between SULF2 serum levels and other serum biomarkers: HSPG (SDC1 and GPC3) and ALAT.

a) Correlation chart between SULF2 serum levels and SDC1; b) Correlation chart between SULF2 serum levels and GPC3; c) Correlation chart between SULF2 serum levels and ALAT. Levels of serum SulF2 were correlated with other biomarkers related to heparan sulfate proteoglycans, SDC1 and GPC3 (respectively $p < 0.0001$ and $p = 0.001$) but not with ALAT ($p = 0.51$). Correlations were performed using the spearman test.

3.4. Prognostic values of SULF2 in combination with Heparan Sulfate Proteoglycans (GPC3 and SDC1) serum levels in patients with advanced HCC

We previously analyzed the prognostic value of two proteoglycans, SDC1 and GPC3, in the serum of the same patients enrolled in this study. High serum levels of SDC1 and GPC3 were strongly associated with a prognostic value in patients with alcoholic cirrhosis [15]. To predict the outcome according to levels of serum SULF2 in combination with SDC1 and GPC3, patients were stratified according to the median level of each biomarkers, a group of patients whom all markers were increased (serum SULF2 > 65.2 ng/mL) in combination with high levels of circulating GPC3 (> 2.5 ng/mL) and circulating SDC1 (> 50 ng/mL) were compared to the other cases in patients with alcohol-related cirrhosis or advanced HCC (Figure 6a).

327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346

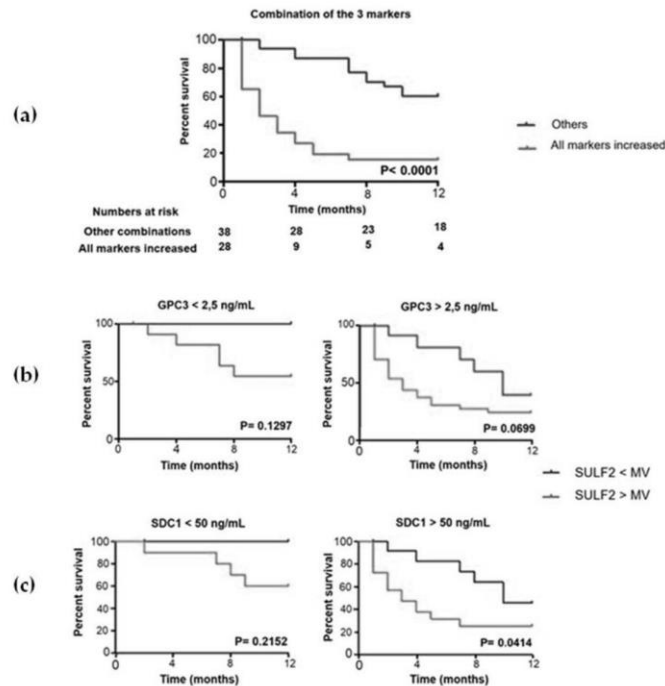


Figure 6. Prognostic values of SULF2 in combination with Heparan Sulfate Proteoglycans (GPC3 and SDC1) serum levels in patients with advanced HCC

a) Patients with advanced HCC were stratified according to the median levels of circulating biomarkers, patients with high levels of SULF2 (> 65.2 ng/mL) combined with high levels of circulating glypican-3 (> 2.5 ng/mL) and high levels of circulating syndecan-1 (< 50 ng/mL), referred as “All markers increased” were compared to the other patients. The combination of elevated serum levels for the 3 biomarkers was associated with a strong risk of death in patients with advanced hepatocellular carcinoma. **b)** Patients with advanced HCC were stratified according to the median level of serum SULF2 (< 65.2 ng/mL or > 65.2 ng/mL) in patients whom circulating GPC3 levels were under 2.5 ng/mL and, separately, in patients whom circulating GPC3 levels were over 2.5 ng/mL. **c)** Patients with advanced HCC were stratified according to the median level of serum SULF2 (< 65.2 ng/mL or > 65.2 ng/mL) in patients whom circulating SDC1 levels were under 50 ng/mL and, separately, in patients whom circulating SDC1 levels were over 50 ng/mL.

The Kaplan–Meier method was used to estimate overall survival in these groups and comparison was done using the log rank test. Numbers at risk are shown under the x-axis.

Abbreviations: MV=median value

The combination of the three biomarkers (highest concentrations for each) was associated with strong risk of death in patients with advanced HCC ($p < 0.0001$; Figure 6a). Furthermore, SULF2 serum levels remain discriminative if we consider separately the subgroups of patients with elevated serum levels of GPC3 ($p = 0.0699$; Figure 6b) and SDC1 ($p = 0.0414$; Figure 6c) consistent with the fact that SULF2 possess an additional value as a prognostic biomarker along with GPC3 and SDC1 in advanced HCC.

347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370

371
372
373
374
375
376

In the multivariate analysis, the combination of elevated circulating biomarkers levels (HR=3.13, CI95% [1.3641-7.182], p=0.007) is strongly associated with a higher risk of death (Table 3).

Table 3.

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis				
	HR	CI 95%	p value	HR	CI 95%	p value		
SULF2 level>median	2.321	1.02	5.28	0.0447				
Age	0.9867	0.9507	1.024	0.482				
Unique tumor	1.316	0.6762	2.56	0.419				
Portal veinthrombosis	4.956	2.396	10.25	1.6e-05	2.411	0.9910	5.866	0.052
Child Pugh Score	1.309	1.136	1.507	0.00018	1.137	0.9606	1.345	0.136
AFP	1	1	1	0.272				
Platelets count	0.9982	0.993	1.003	0.492				
GPC3 level>median	2.8131	1.172	6.751	0.0206				
SDC1 level>median	3.8768	1.37	10.97	0.0107				
Elevated serum levels for the 3 markers*	4.5414	2.303	8.956	1.3e-05	3.130	1.3641	7.182	0.007

377
378
379
380
381
382
383
384

Table 3. Clinical and biological variables associated with overall mortality in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Univariate and multivariate analysis based on Cox models evaluating the associations between Clinical and biological variables and overall mortality in patients with advanced hepatocellular carcinoma.

Abbreviations: HR : Hazard Ratio ; CI : Confidence Interval

* SULF2, GPC3 and SDC1 serum levels over their respective median values

385

386

4. Discussion

387

In this study, we assessed serum SULF2 as a prognostic biomarker in 287 patients with alcohol-related cirrhosis prospectively screened for HCC and classified according to the absence or presence of early and advanced HCC at the date of inclusion.

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

Heparan sulfate proteoglycans such as syndecans have been shown to play an important role in inflammation in various models [30]. In liver disease, several modifications of heparan sulfate related proteins have been described. For instance, Tatrai and colleagues observed that Sul2 mRNA was significantly overexpressed (2.8-fold) in fibrotic biopsies [31]. Immunohistochemistry studies show that SULF2 is overexpressed in fetal liver and adult liver disease (fatty degeneration, chronic hepatitis, cirrhosis and HCC) but not in normal tissue, this expression has not been found in the same proportion depending on the type of the lesion [32]. Another study shows that SULF2 protein is upregulated in HCC, compared to surrounding non tumoral liver [33]. In line with these observations, SULF2 has been shown to be overexpressed in different human HCC derived cell lines [34].

Only few studies have evaluated serum levels of SULF2. A first study observed a significant increase of SULF2 serum level in patients with cirrhosis (HCV (n=19) and alcohol related (n=15)) compared to “healthy individuals” (n=37) [28]. In this study using a “home-made” ELISA kit, Singer and colleagues obtained a difference of approximately 50% between median values of serum SULF2 in the group of cirrhotic patients compared to the group of healthy subjects (1050 pg/mL vs 703 pg/mL; p=0.001).

Even if our study does not include healthy subjects since all the patients enrolled here are cirrhotic, our results also show that SULF2 serum levels is associated with the Child Pugh score, another reflect of the degree of liver damage (Figure 1).

Our results displayed a significant increase levels in sera of patients with advanced HCC. Consistently with our study, Zaghoul and colleagues measured increased levels of serum SULF2 in patients with HCC [35]. Because serum levels of this enzyme were not increased in patients with early HCC, it seems not to be useful for diagnostic purposes. Indeed, diagnosis of early HCC is the most clinically relevant setting, as this subgroup of patients may benefit from curative treatment thus far. Nevertheless, patients with advanced HCC have a poor but heterogenous prognostic. It is worth to identify factors associated to the prognostic for these patients.

Altogether, our results show that SULF2 high serum level (> 65ng/mL) has a prognostic value in patients with alcohol-related cirrhosis, especially, a shorter survival time in patients with advanced HCC. Circulating SULF2 levels are indeed associated to Child Pugh score C and predict short-term death risk. At this time, only studies looking at SULF2 expression using IHC revealed a prognostic value of this protein in liver cancer and other types of cancer [34,36,37]. Beside, about a hypothetic reflect of HCC development, our results seems to characterize SULF2 high serum level rather as a marker of the severity of hepatic lesions (or health status of the cirrhotic patient) than a marker of HCC. In fact, we do not know the main tissue of origin or secreting cells which

427 supply blood in SULF2. SULF2 serum levels remain to be correlated with the expression
428 in a tissue IHC staining would likely still be more interesting if we consider HCC
429 development as the main endpoint.

430 Functions of SULF2 as an enzyme and the presence of HSPG on the cell membranes are
431 very interrelated. Few studies have focused investigations about the concomitant
432 regulation of these components. However, this aspect has been particularly well
433 established regarding the impact of modifications of expression of SULF2 on GPC3
434 expression [23]. In this latter study, the authors demonstrated both on a HCC cell line
435 and *in vivo* using a xenograft model that induced variations of the expression of SULF2
436 by molecular tools (plasmid and small hairpin RNA) triggers parallel variations of
437 expression of GPC3. In our study, we observed a modest but consistent positive
438 correlation between SULF2 and both GPC3 and SDC1 serum concentrations. Because of
439 the biological rationale, we found it interesting to analyze if SULF2 were still discriminant
440 when HSPG such as GPC3 and SDC1 were also highly expressed (hypothesizing that
441 serum levels reflect their liver expression). Our results indicate that serum level of SULF2
442 keeps a discriminative value when HSPG (such as GPC3 and SDC1) levels are elevated in
443 patients with advanced HCC. We have combined these markers and compared a group
444 of patients with elevated values for all the markers to another group including the other
445 patients. The comparison between Kaplan-Meier curves obtained with a lone marker to
446 the combination of these three elevated (SULF2, SDC1, GPC3) markers suggest
447 additional but not synergistic effects.

448 It is not known whether SULF2 plays a key role in the initiation and promotion of
449 neoplastic process in HCC or if its contribution is ancillary to HCC occurrence. Several
450 studies show that SULF2, like some HSPG, is involved in neoangiogenesis and
451 microenvironment remodeling, notably during liver cancer progression [38]. Enzymatic
452 action of SULF2 could be associated to liver pathogenesis through different mechanisms.
453 SULF enzymatic activity impacts HS chains in the tumor environment of HCC [39]. The
454 demonstration has been done that SULF2 could have some promoting tumor growth and
455 metastasis effects via enhancement of fibroblast growth factor-2 (FGF2) and
456 WNT/ β -catenin signaling pathways [23,40]. SULF2 has also been shown to activate the
457 transforming growth factor beta (TGF β) and Hedgehog/GLI1 pathways in HCC [38,41].
458 A SULF2 inhibitor (OKN-007) has been shown to possess an interesting therapeutic
459 perspective in HCC through the inhibition of this latter pathway [42]. Effects of SULF2
460 on lipid metabolism would be associated with steatohepatitis and fibrosis process in an
461 animal model [43]. It has been demonstrated in humans that SULF2 genetic variants are
462 associated with triglyceride levels [44,45].

463
464 Many other questions related to SULF2 in HCC are not addressed here but of interest.
465 Among them, the importance of SULF2 splice variants should be studied in the context of
466 liver cancer. Other enzymes of HS extracellular modifications, namely SULF1 and
467 Heparanase, have to be investigated in parallel to decipher the way they interact and
468 if/how their serum levels could be used as biomarkers altogether in HCC. Molecular

469 classifications of HCC have defined subsets of tumors according to their genetic
470 alterations that are closely related to pathological features and prognosis [46]. It would be
471 also interesting to evaluate if high levels of SULF2 are over represented in particular
472 subgroups of HCC from this classification. This classification or a surrogate biomarker
473 such as SULF2 could help to identify patients who can benefit from targeted therapies.
474 Yoon and colleagues has already demonstrated that the loss-of-function mutation of
475 SULF2 or its inhibition by a pharmacological agent (OKN-007) enhanced sorafenib
476 sensitivity in liver cancer cells and *in vivo* mouse models through a deregulation of EGFR
477 signalling. They also report that non-responding patients exhibit higher expression of
478 SULF2 in immunostaining analysis [47].

479 5. Conclusions

480 Biomolecules identified both from pathologic livers, carcinoma samples and with clear
481 links to neoplastic processes are fair candidates to become *bona fide* biomarkers in HCC.
482 This is the case with numerous HS associated proteins. Considering blood samples are
483 much more accessible than biopsy samples and can be used less cautiously, circulating
484 molecules remain of prime interest. Regarding SULF2, our study is the first one to show a
485 prognostic value for its serum levels in HCC. It confirms the interesting data obtained
486 elsewhere from immunostaining experiments about SULF2 and reveals the use of serum
487 SULF2 as a potential biomarker. We also combined this feature with previously demon-
488 strated HSPG biomarkers. Along with other new biomarkers, serum SULF2 level appears
489 to be candidate to integrate algorithm to better classify patients with HCC.

491 **Author Contributions:** Conceptualization, E.G., J.C.N.; methodology, E.G., J.C.N.; software, J.C.N.;
492 investigation, N.M., J.B., L.B., O.S., N.G., M.Z., G.N., P.N., J.C.N., E.G.; resources, N.C., A.S.; data
493 curation, N.M., J.C.N.; writing—original draft preparation, N.M., J.B., A.S., J.C.N., E.G.; writ-
494 ing—review and editing, N.G., M.Z., E.G.; supervision, A.S., E.G.; project administration, E.G.;
495 funding acquisition, E.G. All authors have read and agreed to the published version of the manu-
496 script.

497 **Funding:** This research was funded by grants from the Fondation Recherche en Alcoolologie (FRA)
498 and Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE).

499 **Institutional Review Board Statement:** The liver biobank is registered with the french Ministry of
500 Research and is declared to CNIL (reference 1254760). The protocol obtained approval from the
501 Ethics Committee (CPP, Aulnay-sous-Bois, France).

502 **Informed Consent Statement:** All patients gave written informed consent to participate in the
503 study and all research carried out in participants was in compliance with the 1975 Declaration of
504 Helsinki as reflected in a priori approval by the institution's human research committee.

505 **Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available on re-
506 quest from the corresponding author, [EG,JCN]. The data are not publicly available due to the fact
507 that it could compromise research participant privacy/consent.

508 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

509
510

511 References

- 512 1. Ozakyol, A. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma (HCC Epidemiology). *J.*
513 *Gastrointest. Cancer* **2017**, *48*, 238–240, doi:10.1007/s12029-017-9959-0.

- 514 2. Ganne-Carrié, N.; Nahon, P. Hepatocellular Carcinoma in the Setting of Alcohol-Related
515 Liver Disease. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 284–293, doi:10.1016/j.jhep.2018.10.008.
- 516 3. Negro, F. Natural History of NASH and HCC. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **2020**, *40*
517 *Suppl 1*, 72–76, doi:10.1111/liv.14362.
- 518 4. El-Serag, H.B. Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1118–1127,
519 doi:10.1056/NEJMra1001683.
- 520 5. Borie, F.; Trétarre, B.; Bouvier, A.-M.; Faivre, J.; Binder, F.; Launoy, G.; Delafosse, P.; Tissot, J.;
521 Peng, J.; Grosclaude, P.; et al. Primitive Liver Cancers: Epidemiology and Geographical Study
522 in France. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *21*, 984–989, doi:10.1097/MEG.0b013e3283293783.
- 523 6. Pimpin, L.; Cortez-Pinto, H.; Negro, F.; Corbould, E.; Lazarus, J.V.; Webber, L.; Sheron, N.;
524 EASL HEPAHEALTH Steering Committee Burden of Liver Disease in Europe: Epidemiology
525 and Analysis of Risk Factors to Identify Prevention Policies. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 718–735,
526 doi:10.1016/j.jhep.2018.05.011.
- 527 7. Kanwal, F.; Singal, A.G. Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: Current Best Practice and
528 Future Direction. *Gastroenterology* **2019**, *157*, 54–64, doi:10.1053/j.gastro.2019.02.049.
- 529 8. Bruix, J.; Sherman, M.; American Association for the Study of Liver Diseases Management of
530 Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Hepatol. Baltim. Md* **2011**, *53*, 1020–1022,
531 doi:10.1002/hep.24199.
- 532 9. Qi, X.; Berzigotti, A.; Cardenas, A.; Sarin, S.K. Emerging Non-Invasive Approaches for
533 Diagnosis and Monitoring of Portal Hypertension. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *3*,
534 708–719, doi:10.1016/S2468-1253(18)30232-2.
- 535 10. Llovet, J.M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J.-F.; de Oliveira, A.C.;
536 Santoro, A.; Raoul, J.-L.; Forner, A.; et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma.
537 *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 378–390, doi:10.1056/NEJMoa0708857.
- 538 11. Woodrell, C.D.; Hansen, L.; Schiano, T.D.; Goldstein, N.E. Palliative Care for People With
539 Hepatocellular Carcinoma, and Specific Benefits for Older Adults. *Clin. Ther.* **2018**, *40*,
540 512–525, doi:10.1016/j.clinthera.2018.02.017.
- 541 12. Lai, J.-P.; Thompson, J.R.; Sandhu, D.S.; Roberts, L.R. Heparin-Degrading Sulfatases in
542 Hepatocellular Carcinoma: Roles in Pathogenesis and Therapy Targets. *Future Oncol. Lond.*
543 *Engl.* **2008**, *4*, 803–814, doi:10.2217/14796694.4.6.803.
- 544 13. Baghy, K.; Tátrai, P.; Regős, E.; Kovalszky, I. Proteoglycans in Liver Cancer. *World J.*
545 *Gastroenterol.* **2016**, *22*, 379–393, doi:10.3748/wjg.v22.i1.379.
- 546 14. Regős, E.; Karászi, K.; Reszegi, A.; Kiss, A.; Schaff, Z.; Baghy, K.; Kovalszky, I. Syndecan-1 in
547 Liver Diseases. *Pathol. Oncol. Res. POR* **2020**, *26*, 813–819, doi:10.1007/s12253-019-00617-0.
- 548 15. Nault, J.-C.; Guyot, E.; Laguillier, C.; Chevret, S.; Ganne-Carrie, N.; N’Kontchou, G.;
549 Beaugrand, M.; Seror, O.; Trinchet, J.-C.; Coelho, J.; et al. Serum Proteoglycans as Prognostic
550 Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Alcoholic Cirrhosis. *Cancer*
551 *Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **2013**, *22*,
552 1343–1352, doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0179.
- 553 16. Teixeira, F.C.O.B.; Götte, M. Involvement of Syndecan-1 and Heparanase in Cancer and
554 Inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, *1221*, 97–135, doi:10.1007/978-3-030-34521-1_4.

- 555 17. Capurro, M.; Wanless, I.R.; Sherman, M.; Deboer, G.; Shi, W.; Miyoshi, E.; Filmus, J.
556 Glypican-3: A Novel Serum and Histochemical Marker for Hepatocellular Carcinoma.
557 *Gastroenterology* **2003**, *125*, 89–97, doi:10.1016/s0016-5085(03)00689-9.
- 558 18. Haruyama, Y.; Yorita, K.; Yamaguchi, T.; Kitajima, S.; Amano, J.; Ohtomo, T.; Ohno, A.;
559 Kondo, K.; Kataoka, H. High Preoperative Levels of Serum Glypican-3 Containing
560 N-Terminal Subunit Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular
561 Carcinoma after Partial Hepatectomy. *Int. J. Cancer* **2015**, *137*, 1643–1651, doi:10.1002/ijc.29518.
- 562 19. Zhang, J.; Zhang, M.; Ma, H.; Song, X.; He, L.; Ye, X.; Li, X. Overexpression of Glypican-3 Is a
563 Predictor of Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma: An Updated Meta-Analysis.
564 *Medicine (Baltimore)* **2018**, *97*, e11130, doi:10.1097/MD.00000000000011130.
- 565 20. Guo, M.; Zhang, H.; Zheng, J.; Liu, Y. Glypican-3: A New Target for Diagnosis and Treatment
566 of Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* **2020**, *11*, 2008–2021, doi:10.7150/jca.39972.
- 567 21. Vlodaysky, I.; Friedmann, Y.; Elkin, M.; Aingorn, H.; Atzmon, R.; Ishai-Michaeli, R.; Bitan, M.;
568 Pappo, O.; Peretz, T.; Michal, I.; et al. Mammalian Heparanase: Gene Cloning, Expression and
569 Function in Tumor Progression and Metastasis. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 793–802, doi:10.1038/10518.
- 570 22. Seffouh, A.; Milz, F.; Przybylski, C.; Laguri, C.; Oosterhof, A.; Bourcier, S.; Sadir, R.;
571 Dutkowski, E.; Daniel, R.; Kuppevelt, T.H. van; et al. HSulf Sulfatases Catalyze Processive
572 and Oriented 6-O-Desulfation of Heparan Sulfate That Differentially Regulates Fibroblast
573 Growth Factor Activity. *FASEB J.* **2013**, *27*, 2431–2439, doi:10.1096/fj.12-226373.
- 574 23. Lai, J.-P.; Sandhu, D.S.; Yu, C.; Han, T.; Moser, C.D.; Jackson, K.K.; Guerrero, R.B.; Aderca, I.;
575 Isomoto, H.; Garrity-Park, M.M.; et al. Sulfatase 2 Up-Regulates Glypican 3, Promotes
576 Fibroblast Growth Factor Signaling, and Decreases Survival in Hepatocellular Carcinoma.
577 *Hepatology* **2008**, *47*, 1211–1222, doi:10.1002/hep.22202.
- 578 24. El Masri, R.; Crétonin, Y.; Gout, E.; Vivès, R.R. HS and Inflammation: A Potential Playground
579 for the Sulfs? *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 570, doi:10.3389/fimmu.2020.00570.
- 580 25. Vivès, R.R.; Seffouh, A.; Lortat-Jacob, H. Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin
581 and Yang of the Sulfs in Cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *3*, 331, doi:10.3389/fonc.2013.00331.
- 582 26. Lemjabbar-Alaoui, H.; van Zante, A.; Singer, M.S.; Xue, Q.; Wang, Y.-Q.; Tsay, D.; He, B.;
583 Jablons, D.M.; Rosen, S.D. Sulf-2, a Heparan Sulfate Endosulfatase, Promotes Human Lung
584 Carcinogenesis. *Oncogene* **2010**, *29*, 635–646, doi:10.1038/onc.2009.365.
- 585 27. Morimoto-Tomita, M.; Uchimura, K.; Bistrup, A.; Lum, D.H.; Egeblad, M.; Boudreau, N.;
586 Werb, Z.; Rosen, S.D. Sulf-2, a Proangiogenic Heparan Sulfate Endosulfatase, Is Upregulated
587 in Breast Cancer. *Neoplasia N. Y. N* **2005**, *7*, 1001–1010, doi:10.1593/neo.05496.
- 588 28. Singer, M.S.; Phillips, J.J.; Lemjabbar-Alaoui, H.; Wang, Y.Q.; Wu, J.; Goldman, R.; Rosen, S.D.
589 SULF2, a Heparan Sulfate Endosulfatase, Is Present in the Blood of Healthy Individuals and
590 Increases in Cirrhosis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2015**, *440*, 72–78,
591 doi:10.1016/j.cca.2014.10.038.
- 592 29. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu;
593 European Association for the Study of the Liver EASL Clinical Practice Guidelines:
594 Management of Hepatocellular Carcinoma. *J. Hepatology* **2018**, *69*, 182–236,
595 doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019.

- 596 30. Gopal, S. Syndecans in Inflammation at a Glance. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 227,
597 doi:10.3389/fimmu.2020.00227.
- 598 31. Tátrai, P.; Egedi, K.; Somorácz, A.; van Kuppevelt, T.H.; Ten Dam, G.; Lyon, M.; Deakin, J.A.;
599 Kiss, A.; Schaff, Z.; Kovalszky, I. Quantitative and Qualitative Alterations of Heparan Sulfate
600 in Fibrogenic Liver Diseases and Hepatocellular Cancer. *J. Histochem. Cytochem. Off. J.*
601 *Histochem. Soc.* **2010**, *58*, 429–441, doi:10.1369/jhc.2010.955161.
- 602 32. Graham, K.; Murphy, J.I.; Dhoot, G.K. SULF1/SULF2 Reactivation during Liver Damage and
603 Tumour Growth. *Histochem. Cell Biol.* **2016**, *146*, 85–97, doi:10.1007/s00418-016-1425-8.
- 604 33. Lai, J.-P.; Sandhu, D.S.; Yu, C.; Moser, C.D.; Hu, C.; Shire, A.M.; Aderca, I.; Murphy, L.M.;
605 Adjei, A.A.; Sanderson, S.; et al. Sulfatase 2 Protects Hepatocellular Carcinoma Cells against
606 Apoptosis Induced by the PI3K Inhibitor LY294002 and ERK and JNK Kinase Inhibitors. *Liver*
607 *Int.* **2010**, *30*, 1522–1528, doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02336.x.
- 608 34. Lai, J.-P.; Oseini, A.M.; Moser, C.D.; Yu, C.; ElSawa, S.F.; Hu, C.; Nakamura, I.; Han, T.;
609 Aderca, I.; Isomoto, H.; et al. The Oncogenic Effect of Sulfatase 2 in Human Hepatocellular
610 Carcinoma Is Mediated in Part by Glypican 3–Dependent Wnt Activation. *Hepatology* **2010**, *52*,
611 1680–1689, doi:10.1002/hep.23848.
- 612 35. Zaghloul, R.A.; El-Shishtawy, M.M.; El Galil, K.H.A.; Ebrahim, M.A.; Metwaly, A.A.;
613 Al-Gayyar, M.M. Evaluation of Antiglypican-3 Therapy as a Promising Target for
614 Amelioration of Hepatic Tissue Damage in Hepatocellular Carcinoma. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**,
615 *746*, 353–362, doi:10.1016/j.ejphar.2014.11.008.
- 616 36. Alhasan, S.F.; Haugk, B.; Ogle, L.F.; Beale, G.S.; Long, A.; Burt, A.D.; Tiniakos, D.; Televantou,
617 D.; Coxon, F.; Newell, D.R.; et al. Sulfatase-2: A Prognostic Biomarker and Candidate
618 Therapeutic Target in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **2016**, *115*,
619 797–804, doi:10.1038/bjc.2016.264.
- 620 37. Flowers, S.A.; Zhou, X.; Wu, J.; Wang, Y.; Makambi, K.; Kallakury, B.V.; Singer, M.S.; Rosen,
621 S.D.; Davidson, B.; Goldman, R. Expression of the Extracellular Sulfatase SULF2 Is Associated
622 with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43177–43187,
623 doi:10.18632/oncotarget.9506.
- 624 38. Chen, G.; Nakamura, I.; Dhanasekaran, R.; Iguchi, E.; Tolosa, E.J.; Romecin, P.A.; Vera, R.E.;
625 Almada, L.L.; Miamen, A.G.; Chaiteerakij, R.; et al. Transcriptional Induction of Periostin by a
626 Sulfatase 2-TGF β 1-SMAD Signaling Axis Mediates Tumor Angiogenesis in Hepatocellular
627 Carcinoma. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 632–645, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2556.
- 628 39. Yu, Y.; Li, H.; Yang, Y.; Ding, Y.; Wang, Z.; Li, G. Evaluating Tumor-Associated Activity of
629 Extracellular Sulfatase by Analyzing Naturally Occurring Substrate in Tumor
630 Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 12287–12293,
631 doi:10.1021/acs.analchem.6b03469.
- 632 40. Nakamura, I.; Fernandez-Barrena, M.G.; Ortiz-Ruiz, M.C.; Almada, L.L.; Hu, C.; ElSawa, S.F.;
633 Mills, L.D.; Romecin, P.A.; Gulaid, K.H.; Moser, C.D.; et al. Activation of the Transcription
634 Factor GLI1 by WNT Signaling Underlies the Role of SULFATASE 2 as a Regulator of Tissue
635 Regeneration. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 21389–21398, doi:10.1074/jbc.M112.443440.
- 636 41. Carr, R.M.; Romecin Duran, P.A.; Tolosa, E.J.; Ma, C.; Oseini, A.M.; Moser, C.D.; Banini, B.A.;
637 Huang, J.; Asumda, F.; Dhanasekaran, R.; et al. The Extracellular Sulfatase SULF2 Promotes

- 638 Liver Tumorigenesis by Stimulating Assembly of a Promoter-Looping GLI1-STAT3
639 Transcriptional Complex. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 2698–2712, doi:10.1074/jbc.RA119.011146.
- 640 42. Zheng, X.; Gai, X.; Han, S.; Moser, C.D.; Hu, C.; Shire, A.M.; Floyd, R.A.; Roberts, L.R. The
641 Human Sulfatase 2 Inhibitor 2,4-Disulfonylphenyl-Tert-Butylnitrone (OKN-007) Has an
642 Antitumor Effect in Hepatocellular Carcinoma Mediated via Suppression of TGF β 1/SMAD2
643 and Hedgehog/GLI1 Signaling. *Genes. Chromosomes Cancer* **2013**, *52*, 225–236,
644 doi:10.1002/gcc.22022.
- 645 43. Kim, T.H.; Banini, B.A.; Asumda, F.Z.; Campbell, N.A.; Hu, C.; Moser, C.D.; Shire, A.M.; Han,
646 S.; Ma, C.; Krishnan, A.; et al. Knockout of Sulfatase 2 Is Associated with Decreased
647 Steatohepatitis and Fibrosis in a Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am. J.*
648 *Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2020**, *319*, G333–G344, doi:10.1152/ajpgi.00150.2019.
- 649 44. Hassing, H.C.; Surendran, R.P.; Derudas, B.; Verrijken, A.; Francque, S.M.; Mooij, H.L.;
650 Bernelot Moens, S.J.; 't Hart, L.M.; Nijpels, G.; Dekker, J.M.; et al. SULF2 Strongly Prediposes
651 to Fasting and Postprandial Triglycerides in Patients with Obesity and Type 2 Diabetes
652 Mellitus. *Obes. Silver Spring Md* **2014**, *22*, 1309–1316, doi:10.1002/oby.20682.
- 653 45. Matikainen, N.; Burza, M.A.; Romeo, S.; Hakkarainen, A.; Adiels, M.; Folkersen, L.; Eriksson,
654 P.; Lundbom, N.; Ehrenborg, E.; Orho-Melander, M.; et al. Genetic Variation in SULF2 Is
655 Associated with Postprandial Clearance of Triglyceride-Rich Remnant Particles and
656 Triglyceride Levels in Healthy Subjects. *PLoS ONE* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0079473.
- 657 46. Nault, J.-C.; Martin, Y.; Caruso, S.; Hirsch, T.Z.; Bayard, Q.; Calderaro, J.; Charpy, C.;
658 Copie-Bergman, C.; Ziol, M.; Bioulac-Sage, P.; et al. Clinical Impact of Genomic Diversity
659 From Early to Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol. Baltim. Md* **2020**, *71*, 164–182,
660 doi:10.1002/hep.30811.
- 661 47. Yoon, S.; Lee, E.-J.; Choi, J.-H.; Chung, T.; Kim, D.Y.; Im, J.-Y.; Bae, M.-H.; Kwon, J.-H.; Kim,
662 H.-H.; Kim, H.C.; et al. Recapitulation of Pharmacogenomic Data Reveals That Invalidation of
663 SULF2 Enhance Sorafenib Susceptibility in Liver Cancer. *Oncogene* **2018**, *37*, 4443–4454,
664 doi:10.1038/s41388-018-0291-3.

665

666

II. Article 2: TNF- α alters heparan sulfate level and composition in human hepatocarcinoma cell line

Article à soumettre dans le journal Glycobiology (facteur d'impact 4)

Résumé :

Au niveau cellulaire, le processus de carcinogenèse hépatique est entre autres affecté par des chimiokines telles que CCL5 ou CXCL12 et des facteurs de croissance tels que le HGF qui peuvent être classés parmi les " Heparin Binding Proteins " (HBP). L'activité biologique de ces HBP est régulée par leur capacité de liaison aux glycosaminoglycannes à chaînes héparane sulfate (HS), utilisant sur ces derniers, des motifs de sulfatations spécifiques comme éléments de reconnaissance.

Ces chaînes HS peuvent être localisées au niveau de la membrane cellulaire, attachées de manière covalente à une protéine centrale pour former des protéoglycannes à chaînes HS (HSPG) tels que les syndécannes (SDC-1 et SDC-4). Une surexpression du SDC-1 a été retrouvée dans les biopsies hépatiques des patients atteints de CHC. Notre équipe de recherche a précédemment montré que la liaison de la chimiokine CCL5 (RANTES) au SDC-1, au SDC-4 et à son récepteur CCR1 induit la migration et l'invasion des cellules d'hépatome humain (Charni et al., 2009). Notre équipe a également montré que la liaison de la chimiokine CXCL12 (SDF-1) au SDC-4 et à son récepteur CXCR4 active les voies de signalisation ERK et JNK/SAPK et induit la prolifération, la migration et l'invasion des cellules d'hépatome humain (Friand et al., 2009 ; Sutton et al., 2007a).

Le microenvironnement inflammatoire joue un rôle essentiel dans la prolifération et l'invasion tumorale de divers cancers, dont le CHC, et est associé à un mauvais pronostic. Parmi les facteurs sécrétés par les cellules associées à ce microenvironnement, le TNF- α a été identifié comme un médiateur clé de l'inflammation régulant le microenvironnement tumoral et donc, la progression tumorale. Il a été montré que le TNF- α est surexprimé dans le CHC par rapport au foie sain et il est élevé dans le sérum des patients atteints de CHC. A ce jour, l'impact d'un environnement inflammatoire sur les caractéristiques aux plans qualitatif et quantitatif des chaînes HS dans le CHC n'est pas connu. Ainsi, nous avons étudié dans un modèle d'hépatome humain (Huh7) les effets du TNF- α sur :

- La quantité et la sulfatation des chaînes HS
- L'expression du SDC-1 et du SDC-4
- L'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des chaînes HS, à savoir les exostosines (EXT-1, EXT-2) et les N-désacétylase/N-sulfotransférase (NDST-1, NDST-2)
- L'expression des enzymes de modification post-synthèse des chaînes HS, à savoir l'héparanase (HPSE) et la sulfatase-2 (SULF-2)
- La liaison des chimiokines CCL5 et CXCL12

Dans l'ensemble, nos travaux ont montré que le TNF- α induit une augmentation de l'expression génique du SDC-4 et une diminution de l'expression génique du SDC-1 par rapport aux cellules non traitées. En revanche, le TNF- α n'a aucun effet sur l'expression membranaire de ces HSPG ou chaînes HS. De manière intéressante, nous avons remarqué une diminution de la forme clivée du SDC-1 et SDC-4 dans le milieu conditionné, accompagnée d'une diminution de l'activité de la MMP9 et MMP2 et d'une augmentation du taux de SDC-1 et SDC-4 au niveau intracellulaire. Nous avons également montré que le TNF- α induit une augmentation de la quantité totale des chaînes HS qui s'accompagne de changements structuraux impliquant une augmentation de la 6-O-sulfatation, de la N-sulfatation et de la 2-O-sulfatation, avec une sulfatation globale de ces chaînes plus élevée d'environ 75%. A l'appui à ces résultats, on observe une augmentation de l'expression génique de EXT-1, EXT-2, NDST-1, HPSE et une diminution de l'expression génique de SULF-2. De plus, nous avons démontré que le TNF- α induit une augmentation de la fixation des chimiokines CCL5 et CXCL12 à la surface cellulaire et une augmentation de l'expression génique de la cycline-D1 et de la prolifération cellulaire.

En conclusion, l'environnement inflammatoire médié par le TNF- α , a induit des changements structuraux des chaînes HS et l'internalisation du SDC-1/SDC-4 qui peuvent expliquer l'augmentation du niveau d'HS au niveau intracellulaire, suggérant un effet sur la modulation des fonctions des HBP par les chaînes HS.

Mots clés : Carcinome hépatocellulaire, héparane sulfate, Syndécanne, TNF- α .

**TNF- α alters heparan sulfate level and composition in human
hepatocarcinoma cell line**

N, MOUHOUBI¹ ; M, NAIM^{1*} ; RR VIVES^{2*} ; K, BASSAND¹ ; O, HADDAD¹ ; O,
SAINTE-CATHERINE¹ ; J, BAMBA-FUNCK^{1,4} ; C, LAGUILLIER-MORIZOT¹ ; L,
MARTIN³ ; N, CHARNAUX^{1,4} ; H, HLAWATY¹ ; E, GUYOT^{1,4#} ; A, SUTTON^{1,4#}

1. Laboratory for Vascular Translational Sciences, INSERM U1148, Université Sorbonne
Paris Nord (USPN), Paris, France.

2. Université Grenoble-Alpes, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France.

3. Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot, Ingénierie des protéines, CEA, Saclay,
France.

4. Service de biochimie, Hôpital Avicenne, hôpitaux universitaires Paris-Seine-Saint-Denis,
Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, F-93000, Bobigny, France.

*, # : equal contribution

Abstract

Hepatocellular carcinoma takes place in an inflammatory microenvironment, characterized by the local production of cytokines, such as Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and chemokines. These inflammatory mediators include heparin binding proteins (HBP) which are known to bind heparan sulfate (HS) glycosaminoglycans found in the extracellular matrix or on the cell surface covalently attached to a core protein in HS proteoglycans, such as syndecans (SDC). The interaction properties of HS are linked to specific saccharide sequences and sulfation patterns. Consequently, the action of several HS synthesizing and modifying enzymes can modulate HBP binding and their effects.

In this work, we aimed to characterize HS changes in TNF- α stimulated Huh7 hepatoma cells.

Our work revealed that TNF- α induced an increase of SDC-4 and a decrease of SDC-1 gene expression whereas no difference in their membrane expression was evidenced. Interestingly, we noticed a decrease of shed SDC-1 and SDC-4 in conditioned media, accompanied by a decrease in MMP-9 and MMP-2 activities and an increase of intracellular SDC-1 and SDC-4. Moreover, an increase of intracellular HS level and overall sulfation, in response to TNF- α treatment was observed. In support to these results, EXT-1, EXT-2, NDST-1, HPSE genes expression were increased and SULF-2 one was decreased by TNF- α . Lastly, we showed that TNF- α induced a slight increase of CCL5 and CXCL12 chemokines binding to cell surface and also an increase of cyclin-D1 gene expression and cellular proliferation. Altogether, these results disclose that TNF- α induced HS structural changes and SDC-1/SDC-4 internalization thus modulating HBP cellular effects.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, Heparan sulfate, Glycobiology, Syndecan, TNF- α .

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major health problem worldwide (Ferlay et al., 2010). It is the third most common cause of cancer-related deaths (Ozakyol, 2017). Risk factors for the development of HCC include cirrhosis due to viral hepatitis B or C, alcoholic cirrhosis due to alcohol abuse, non-alcoholic steatohepatitis due to metabolic syndrome (Singal et al., 2020). At the cellular level, the hepatic carcinogenesis process is regulated by chemokines such as CCL5 or CXCL12 (Sutton et al., 2007; Charni et al., 2009; Friand et al., 2009) and growth factors such as HGF (Gao et al., 2015). These signaling factors are named "Heparin Binding Proteins" (HBPs) and their biological activity is regulated by their binding capacity to sulfated glycosaminoglycans (GAG).

GAG are linear polymers of repeating disaccharide units which are ubiquitously present on cell surface and extracellular matrix (ECM) (Sarrazin et al., 2011). In the case of heparan sulfate (HS), they are composed of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucuronic or iduronic acid (GlcA or IdoA) residues repeats. This HS GAG can be expressed at cell membrane, covalently attached to a core protein to form HS proteoglycans (HSPGs) such as syndecans (SDC-1 and SDC-4) and glypicans (for exemple glypican-3), a glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteoglycans (Whitelock and Iozzo, 2005; Imberty et al., 2007). These HSPGs are overexpressed in liver biopsies from HCC patients (Guo et al., 2020; Regős et al., 2020). The biosynthesis of HS chains starts with the formation of a tetra saccharide from the protein core then, the elongation of a uniform polysaccharide composed of GlcA-GlcNAc repeats is performed by enzymes Exostosin-1 and Exostosin-2 (EXT-1, EXT-2). The polysaccharide chains are modified at various positions by N-deacetylation/N-sulfation of glucosamine, catalyzed by enzymes of the NDST family (4

isoforms), epimerization of GlcA into IdoA residues (by the C5 epimerase) and O-sulfation by the O-sulfotransferase family (2,3,6 OST) (Whitelock and Iozzo, 2005), yielding clusters of sulfated disaccharides (S domains) separated by low or not sulfated regions (NAc-domains) (Laguri et al., 2008; El Masri et al., 2017), responsible of an accumulation of negative charges in particular loci on the HS chains.

Saccharide motifs with specific sulfation patterns defining a “sugar code” may be critical for HS-HBP interactions and this specificity changes from one ligand to another depending on the position of the sulfates involved (Holst et al., 2007; El Masri et al., 2017). It is well established that 6-O-sulfates are essential for binding and activity of various HBP such as Fibroblast Growth Factor (FGF-1 and FGF-2) (Powell et al., 2002; Pye et al., 2000), Hepatocyte Growth Factor (HGF) (Lyon et al., 1994) and chemokines such as RANTES (CCL5) (Shaw et al., 2004) and SDF-1(CXCL12) (Sadir et al., 2001; Zhang et al., 2012). We have previously shown that among HSPG, only SDC-4 plays a role as a co-receptor of the chemokine SDF-1 in HeLa cells, T cells and macrophages (Charnaux et al., 2005). Afterwards, we have also shown that the interaction between chemokines and HS chains could be involved in cancer progression. Indeed, the binding of SDF-1 to SDC-4 and its CXCR4 receptor activates the ERK and JNK/SAPK signaling pathways and induces human hepatoma cell growth, migration, and invasion (Friand et al., 2009; Sutton et al., 2007a). We have also shown that the binding of the chemokine RANTES to SDC-1, SDC-4 and its receptor CCR1 induces migration and invasion of human hepatoma cells (Huh7, HepG2 and Hep3B) (Charni et al., 2009).

In addition, cleavage of HS 6-O-sulfation occurs post-synthetically, through the action of extracellular 6-endosulfatases (SULF-1 and SULF-2), with a strong preference for trisulfated disaccharides [Glc/IdoA(2S)-GlcNS(6S)], which are mainly found in the S domains of HS chains (Uchimura et al., 2006). Consequently, the modification of HS structure leads to the

alteration of their binding properties with variable functional consequences (Lai et al., 2010). Overexpression of SULF-2 has also been reported and associated with large variety of cancers, including HCC and have been involved in all major stages of the disease, including tumoral transformation, growth and invasion (Lai and al., 2010) and is also found increased in the serum of cirrhotic patients, suggesting potential use as serologic biomarker (Singer et al., 2015). Conversely, SULF-1 has been shown downregulated in this type of cancers (Lai et al., 2008).

HS are also subjected to cleavage by an endo- β -glucuronidase, heparanase (HPSE), releasing a fonctionnal fragments of HS, that are 5-7 kDa in size, that can still associate with HBPs. HPSE overexpression and activity have been shown correlated with cell invasion associated with inflammation and cancer metastasis (Vlodavsky and Friedmann, 2001).

SDC-1 and SDC-4 can undergo shedding cleavage at conserved sites in the ectodomain, mediated by matrix metalloproteinases (MMPs) such as MMP-2 and MMP-9 (Manon-Jensen et al., 2010). This shedding transforms the ectodomain of SDC into soluble, paracrine or autocrine, effectors which can compete for HBPs and modulate their binding to their specific receptor and signaling on the cell surface (Manon-Jensen et al., 2010). Indeed, it appears that HPSE may play an even more direct role in regulating shedding of SDC-1. It was recently demonstrated that enhanced expression of HPSE leads to increased MMP-9 levels (Yang et al., 2007). High levels of shed SDC-1 is found in patients sera with advanced HCC and is associated with poor prognosis (Nault et al., 2013). In addition, it has been shown that SDC-1 and SDC-4 can be internalized associated with HPSE, leading to their decrease on cell surface (Gingis-Velitski et al., 2004; Fux et al., 2009). Zong and *coll.* shown that SDC-1 and FGF-2 co-localize with HPSE in the nuclei of mesenchymal tumor cells (Zong et al., 2009), suggesting that the biological activity of these internalized SDCs is dependent on their GAG sulfation patterns and length (Buczek-Thomas et al., 2008).

Several studies reported that HS structure and expression are affected in pathologies, such as chronic renal fibrosis (Alhasan et al., 2014), cancer (Jayson et al., 1998; Safaiyan et al., 1998), and inflammation (Wang et al., 2002; Reine et al., 2012). These have shown a significant changes of HS 6-O-sulfation patterns which can thus modulate many biological processes.

Inflammatory microenvironment plays an essential role in the proliferation and tumor invasion in various cancers, including HCC and is associated with poor prognosis (Michalaki et al., 2004; Charles et al., 2009; Jang et al., 2012). Among the cell-secreted factors associated with this microenvironment, the tumor necrosis factor (TNF)- α has been identified as a key mediator of inflammation regulating tumor microenvironment and thus, tumor progression (Brenner et al., 2015). It has been shown that TNF- α is overexpressed in HCC comparatively to normal hepatic tissue (Liu et al., 2013) and significantly increased in patients serum (Huang et al., 1999).

Nevertheless, the role of TNF- α induced inflammation in HCC progression is still unknown. The aim of our study was to investigate the impact of TNF- α on HS modifying-enzymes expression and the consequence on HS structural modification in a human hepatoma model (Huh7) and thus evaluate how these effects may contribute to cellular tumoral process such as cell proliferation.

Results

TNF- α induced changes in total heparan sulfate chains quantity

TNF- α treatment efficiency was verified by a 3.5-fold significant increase of IL-8 mRNA (3.5 ± 0.9) expression by Huh7 cells after 24h (Fig. 1A). The chromatographic analysis of HS chains extracted from cells treated or not with TNF- α revealed that TNF- α treatment is associated with an increase (2.9-fold) of HS total amount as compared with untreated cells (381.24 ± 24.65 vs 130.31 ± 8.65 AU, these results and the following ones are expressed as mean \pm SEM of treated cells with TNF- α vs untreated cells respectively) (Fig. 1B). However, the analysis of cell surface HS expression by flow cytometry does not show any difference between treated or untreated cells with TNF- α (Fig. 1C). As the native HS chains are covalently bound to a core protein forming proteoglycans, we then investigated the effect of TNF- α on SDC-1 and SDC-4 expression, as major HSPG characterized in our model (Sutton et al., 2007a).

TNF- α affects syndecan-1 and syndecan-4 expression and cellular localization

Quantitative PCR results showed that TNF- α induces a significant decrease of mRNA *SDC-1* level by 36% (0.64 ± 0.06) and a significant increase of mRNA *SDC-4* level by 3-fold (3.19 ± 0.79) (Fig. 2A). However, TNF- α treatment causes no modification of both SDC-1 and SDC-4 cell surface levels compared with untreated cells, demonstrated by flow cytometry (Fig. 2B). The analysis of intracellular SDC levels in permeabilized cells by flow cytometry showed that TNF- α induced a significant increase in both SDC-1 and SDC-4 by respectively 38% (137.5 ± 4.3 vs 99.6 ± 15.4 AU) and 30% (306.5 ± 15 vs 236 ± 12.6 AU) as compared with untreated cells (Fig. 2C). Analysis of SDC-1 and SDC-4 ectodomains in conditioned media

(shed from cell membranes) showed that TNF- α induces a significant decrease in both SDC-1 and SDC-4 ectodomain in the cell media by respectively 58% ($41.6\% \pm 14.08\%$ vs $100\% \pm 10.3\%$) and 38% ($61.7\% \pm 12.7\%$ vs $100\% \pm 2.3\%$) (Fig. 2D).

These latter results are consistent with a decrease of MMP-2 and MMP-9 activity measured in zymography experiments in cells treated with TNF- α compared to untreated cells (Fig. 2E).

TNF- α induced SDC-1 and SDC-4 internalization

We then hypothesized that the increase of intracellular SDC-1 and SDC-4 is due to their endocytosis. The effect of endocytosis inhibitors on SDC-1, SDC4 and HS chains were assessed using dynasore (Dyn), an inhibitor of dynamin essential to clathrin-mediated endocytosis, cytochalasin D (CytD), an inhibitor of actin polymerization, that blocks both actin-dependent phagocytosis and macropinocytosis, and filipin (Fil), an inhibitor of caveolae-mediated uptake. In order to assess cell viability after treatments with these inhibitors, crystal violet staining were performed. No toxicity was established at the used concentrations (*Data not shown*).

Filipin alone or simultaneous filipin and TNF- α treatment does not affect SDC-1 and SDC-4 cell surface levels nor their ectodomains shedding as compared with untreated cells, suggesting that SDC-1 and SDC-4 endocytosis after TNF- α treatment does not occur by a caveolae-mediated endocytosis pathway (Fig. 3A, 3B, 3C).

In contrast, dynasore treatments decrease significantly SDC-1 cell surface expression by 20% (757.7 ± 27.1 vs 948.8 ± 53.3 AU, respectively) but increase SDC-1 ectodomain shedding as compared with untreated cells. Interestingly, treatments combining TNF- α and dynasore simultaneously exacerbate significantly these effects compared to treatments with dynasore alone by 13% (757.7 ± 27.1 vs 658.6 ± 47 AU, respectively), suggesting that TNF- α induced

SDC-1 internalization by a clathrin-dependent endocytosis (Fig. 3A, 3C).

Cytochalasin D does not affect SDC-1 cell surface expression and ectodomains shedding but increase significantly SDC-4 cell surface expression by 2.2-fold (316.6 ± 2.2 vs 709.1 ± 13 AU, respectively) and ectodomain shedding as compared with untreated cells. Moreover, treatment with TNF- α added simultaneously to cytochalasin D exacerbate significantly the effect of cytochalasin D by 38% (709.1 ± 13 vs 980.1 ± 72.8 AU, respectively). In addition, dynasore increase significantly SDC-4 cell surface expression as compared with untreated cells by 43% (316.6 ± 2.2 vs 452 ± 11.6 AU, respectively) but does not affect ectodomain shedding. However, treatment with TNF- α and dynasore simultaneously does not affect SDC-4 cell surface expression and ectodomain shedding as compared with treated cells with dynasore alone (Fig. 3B, 3C). These results suggest that SDC-4 internalization is mediated partially by clathrin-dependent endocytosis and mostly by actin-dependent macropinocytosis, but TNF- α induced SDC-4 internalization totally by actin-dependent macropinocytosis.

TNF- α induced structural HS modifications

Structural analysis of HS chains extracted from cells treated with TNF- α revealed clear changes in polysaccharide structure and sulfation patterns (Fig. 4A, 4B). TNF- α treatment induces an increase of the percentage of disaccharide units [Δ UA-GlcNS] ($27.70\% \pm 0.93\%$ vs $25.54\% \pm 0.38$ AU), [Δ UA-GlcNAc(6S)] ($12.04\% \pm 0.62\%$ vs $6.59\% \pm 0.23\%$, respectively), [Δ UA-GlcNS(6S)] ($11.12\% \pm 0.75\%$ vs $5.49\% \pm 0.14\%$, respectively) and the disaccharide [Δ UA(2S)-GlcNS(6S)] was the most affected, with an increase of ~2.3-fold ($34.5\% \pm 1.81\%$ vs $15.27\% \pm 0.36\%$, respectively) accompanied by a decrease in [Δ UA-GlcNAc] of ~8.5-fold ($36.09\% \pm 2.91\%$ and $4.23\% \pm 1.3\%$,) (Fig. 4A). The overall sulfation of these chains was higher (~75%), with notable increases in N-sulfation (~25%), 2-O-sulfation (~18%) and 6-O-sulfation (~30%) (Fig. 4B).

We next performed qPCR analysis evaluating the expression of enzymes involved in the biosynthesis and sulfation of HS chains. Our results are consistent with the previous results showing an increased expression of *NDST-1* mRNA and *NDST-2* mRNA by 2- and 3-fold respectively (2.2 ± 0.66 and 3 ± 1.29 , respectively) and reduced expression of *SULF-2* mRNA by 17% (0.83 ± 0.16) with TNF as compared to untreated cells (Fig. 4C).

TNF- α induces a significant increase in *EXT-1* and *EXT-2* mRNA level (2.3 ± 0.16 and 2 ± 0.22 , respectively) which is consistent with the increased amount of HS chains in treated with TNF- α as compared with untreated cells (Fig. 4C and 1A). Finally, TNF- α induces a significant increase of *HPSE* mRNA by 1.9-fold (1.92 ± 0.43) (Fig. 4C).

TNF- α increased CXCL12 and CCL5 binding to human hepatoma cell membrane.

The results showed that TNF- α induces a significant increase CXCL12 and CCL5 binding to cell membrane by 14 % (1443.6 ± 25.6 vs 1269.7 ± 46.9) and 13% (1901.1 ± 29.7 vs 1683.1 ± 0.45) respectively as compared with untreated cells (Fig. 5).

TNF- α induced Huh7 cell proliferation

Herein, we investigated the effect of TNF- α on cellular proliferation. TNF- α slightly increases by 10 % the number of Huh7 cells after 24h of treatment (Fig. 6A) and the percentage of cells being in S+G2/M phases of cell cycle (Fig. 6B). As cyclin D1 is a member of the cyclin protein family initiated during the G1 phase, it is implicated in the G1/S phase transition, thereby promoting cell proliferation. TNF- α induces a significant increase of Cyclin D1 by 2.9-fold (Fig. 6C).

Discussion

Chronic inflammation represents a major contributor to HCC carcinogenesis and tumor progression (Refolo et al., 2020), by promoting proliferative and survival signaling (Yu et al., 2018). The connection between cancer and inflammation is particularly highlighted in the case of HCC, as it usually develops as the end stage of chronic liver diseases (Yu et al., 2018). The purpose of this study focused on tumor glycobiology was to address the effects of the pro-inflammatory cytokine TNF- α on HS, HSPG and HS biosynthesis and modifying enzymes and on tumor cell proliferation in a HCC cellular model.

In the present work, we demonstrate that TNF- α increased total HS levels without any effect on cell surface HS levels (Figure 1). Moreover, disaccharide analysis, a sensitive and precise quantitative method, revealed that TNF- α affected the composition of HS in Huh7 human hepatoma cells, increasing the percentage of [Δ UA(2S)–GlcNS(6S)] and decreasing those of [Δ UA–GlcNAc]. TNF- α increased overall sulfation of HS chains with notable increases in N-sulfation, 2-O-sulfation, and 6-O-sulfation (Figure 4B). It was previously described an abundance of highly sulfated HS epitopes in HCC samples (Tátrai et al., 2010), in accordance with our cellular results. However, in 5/7 HCC human samples, a modest 6-O-undersulfation of HS was evidenced (Tátrai et al., 2010) in contrast to our results.

HS chains elongation is a central stage in HS biosynthesis. EXT1 and EXT2 represent the key enzymes of this step and their activity is regulated, through several mechanisms, including changes in gene expression levels (Annaval et al., 2020). NDST-1 and NDST-2 are major enzymes linked to the sulfation of HS chains during their biosynthesis. We hypothesised that the TNF- α -induced changes of HS chains may be related to the effect of this cytokine on gene expression of enzymes involved in HS biosynthesis and modifications. Our study demonstrated that TNF- α increased expression of *EXT-1*, *EXT-2*, *NDST-1*, *NDST-2* mRNA

levels, which is consistent with the increased amount of HS chains in TNF- α -treated Huh7 cells (Figure 1B). Depending on the type of cancer such as glioma, colorectal, breast and prostate cancer, mRNA levels of HS biosynthesis enzymes have been reported to be increased or decreased (Sembajwe et al., 2018).

HS chains and more globally HSPG undergo different enzymatic processes after their biosynthesis leading to deep modifications of their properties. Among the enzymes involved at this stage, SULFs are able to cleave 6-O sulfate groups on HS chains, HPSE exhibit endoglucuronidase activity and some MMPs possess proteolytic action towards HSPG.

Our results also showed that TNF- α increased *HPSE* mRNA (Figure 4C). This result may be linked to the reported promotion of HCC progression due to HPSE upregulation (Xiao et al., 2003). HS chains exist as either unconjugated or as conjugated to amino acids creating heparan sulfate proteoglycans (HSPG) (Zhang et al., 1995).

Mechanisms regulating the biosynthesis of HS are still poorly understood, and the evaluation of HSPG structure and function relevant to RNA data remains difficult (Sembajwe et al., 2018). HSPG deregulation are major contributing factors to cancer evolution (Nagarajan et al., 2018). The present work indicates that TNF- α decreased *SDC-1* and increased *SDC-4* mRNA levels, increased both intracellular SDC-1 and SDC-4 intracellular protein levels associated to decreased SDC-1 and SDC-4 ectodomain shedding due to TNF- α -induced MMP-2 and MMP-9 activity down-regulation.

In our cellular model, TNF- α induced SDC-1 internalization by a clathrin-dependent endocytosis and SDC-4 internalization totally by actin-dependent micropinocytosis (figure 3). The HSPG endocytic process is currently thought to depend more on the extracellular ligand than on the type of HSPG, which is the explanation of why HSPG endocytosis is not confined to a single pathway (Mandarini et al., 2020). TNF- α induced SDC-1 internalization by a clathrin-dependent endocytosis. SDC-4 internalization is mediated partially by

clathrin-dependent endocytosis and mostly by actin-dependent macropinocytosis, but TNF- α induced SDC-4 internalization totally by actin-dependent macropinocytosis.

We have previously shown that the binding of the chemokines CXCL12 and CCL5 to SDC-1 or/and SDC-4, induces pro-tumoral effects on human hepatoma cells (Sutton et al., 2007b, 2007a). We observed in TNF- α -treated Huh7 cells a slight increase of biotinylated CXCL12 and CCL5 binding to Huh7 cells, whereas neither HS or SDC-1 and SDC-4 were increased at Huh7 cell membrane (Figure 5). Nevertheless, membrane HS assessment required further experiments with a variety of antibodies recognizing other epitopes of HS. These chemokines contain a BBXB heparin binding motif, involving basic amino acids, essential for chemokine binding to the HS chains with highly selective interaction requiring the presence of saccharide motifs with 6-O-sulfation patterns (Sadir et al., 2001; Shaw et al., 2004; Zhang et al., 2012). As we evidenced that TNF- α increased HS and HSPG localization within the cells, it would be of interest to determine if they are present in the nucleus. The HS in the nucleus of hepatocytes was enriched in sulfated glucuronic acid residues and structurally distinct from that present in the other cellular fractions (Ishihara et al., 1986), indicating that a particular fraction of HS may be marked for trafficking to the nucleus (Ishihara et al., 1986). In the current study, we showed that TNF- α increased 2-O sulfated HS. These results concord with the observation that in hepatocytes, nuclear fraction of HS contains high amounts of 2-O sulfated glucuronic acid (Stewart and Sanderson, 2014). Full-length form of SDC-1 containing the ectodomain, trans-membrane, and cytoplasmic domains, as well as soluble ectodomain of SDC-1 have been found in the nucleus of cancer cells (Stewart and Sanderson, 2014). We could envisage that translocation of SDC-1 ectodomain into the nucleus may also occur for free heparan sulfate chains or heparanase-release oligosaccharides that are complexed with heparin-binding proteins (Stewart and Sanderson, 2014).

Remarkably, the fine tuning of HS structure influences the interaction of HS with the

chemokines. The discovery of HS and HSPG in the nucleus suggest that they would carry growth factors or chemokines directly to the nucleus and impact the cell cycle, proliferation and gene regulation (Stewart and Sanderson, 2014). Lost of nuclear HS was associated with mitosis, whereas HS reappears in the nucleus after mitosis (Stewart and Sanderson, 2014). Nevertheless, HS may also favor cell proliferation. Our results suggest that HS and HSPG metabolism modified by an inflammatory context favored Huh7 cell proliferation. Similarly, the addition of HS to hepatoma cells growing in serum-free and insulin-deficient conditions, increased cell proliferation (Fedarko et al., 1989). Thus, the effect of HS on tumor cells may depend on the HS structure, the type of tumor cell and/or the tumor microenvironment (Stewart and Sanderson, 2014). Further experiments are required to clarify whether the HSPGs in the nucleus regulate cell cycle progression or whether cell cycle stage regulates the localization of HSPGs in the nucleus.

The essential roles of HS and HSPG in cancer make these pathways promising areas for translational research and drug development (Knelson et al., 2014) and tumor glycobiology may represent a new field of interest in personalized medicine, particularly in cancer.

Materials and Methods

Cell culture

Huh7 human hepatoma cell line were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glucose (DMEM reference 21885-025, ThermoFisher Scientific, Brébières, France) and supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL of penicillin and 100 g/mL of streptomycin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Franc). The cells were cultured in an incubator at 37°C under a controlled atmosphere of 5% CO₂. Cells were counted automatically using cell counter (Coulter, Beckman, Brea, California, United States)

Cell treatment

24 h before each treatment, Huh7 were placed in culture plate. The cells were assigned to two groups as untreated cells (UT) and treated cells (TNF- α) with 5 ng/mL of TNF- α (PHC3015, Invitrogen, Cergy pantoise, France). The cells were treated with different endocytosis inhibitors : 2.5 μ g/mL of cytochalasin D (C8273, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1 μ g/mL of filipin (F9765, Sigma-Aldrich) was used at and 80 μ M dynasore (D7693, Sigma-Aldrich) were used in serum free medium with or without TNF- α for 24 h at 37°C (Guillemot et al., 2013; Ito et al., 2008).

Dot immunoassays

1.3×10^6 Huh7 cells were seeded on a T-25 flask in 2 mL serum free medium. The dot-blot apparatus (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) was assembled with a cationic nylon membrane (Amersham Hybond-N+.GE Healthcare, Biosciences, Orsay, France). This membrane was pre-incubated with PBS supplemented with 10 mM Tris, pH 7.4. The volume

of conditioned medium was normalized to the number of cells counted after treatment and applied in the vacuum chamber to allow the entire sample to filter through the membrane. The membrane was blocked for 1 h at 37°C in PBS supplemented with 0.5% BSA, 3% non-fat dry milk, and 0.5% Tween 20. After washing with PBS-BSA 0.5% supplemented with 0.5% Tween 20, HS or SDC were detected by incubating membranes overnight at 4°C with the primary antibodies (1/500): anti-HS mouse monoclonal antibody (F58- 10E4, AMS Biotechnology, Abingdon, UK), anti-SDC-1 mouse monoclonal antibody (mAb DL101, Santa Cruz Biotechnology Tebu Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), or anti-SDC-4 mouse monoclonal antibody (mAb 5G9, Santa Cruz), or with their respective isotypes (murine IgM, IgG1 or IgG2a respectively, R&D). After washing, the membrane was incubated with a secondary goat anti-mouse antibody (1/5000 ; P044701, DAKO, Trappes, France) for 1 h at room temperature and then the revelation was made by adding the ECL solution (ECL Western Blotting Substrate, 32106, Pierce® Thermo Fisher Scientific Pierce, Brébières, France) and digital reading using dot blots were revealed by chemiluminescence using a Chemidoc apparatus and the Image Lab 4.2 software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Gelatin zymographic assay

1,3 x10⁶ Huh7 cells were cultured in a T-25 flask in 2 mL serum free medium. After 24 h of treatment with or without TNF- α , conditioned media were collected and stored at -20°C until analysis. MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activities were determined by gel zymography on unreduced conditioned media diluted with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) glycerol) and loaded on a 9% acrylamide gel containing 2.5 mg/ml gelatin. After electrophoresis, the proteins were renatured by replacing SDS with 2.5 % Triton X-100, two times for 30 min incubation at room temperature. For detection of gelatinolytic activity, the

gel was incubated for 19 h at 37°C in a solution containing 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 containing 10 mM CaCl₂. Gels were stained with 0.45% Coomassie brilliant blue. Detection was visualized using the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

Flow cytometry

6 x10⁵ Huh7 cells were cultured in 6-well plate surface in 1.5 mL serum free medium in different conditions. After three washes with PBS, cells were detached with 10 mM PBS-EDTA and after centrifugation the cells were incubated for 1 h at 4°C with an anti-SDC-1 (AF2780, R&D systems) or anti-SDC-4 (AF2918, R&D systems, Villejust, France) or anti-HS (Mouse IgM, Clone F58- 10E4, AMS Biotechnology, Abingdon, UK) specific antibodies diluted at 10 µg/mL in PBS-BSA 0.1% or in saponine 0.1 %, BSA 0.2% for cell permeabilization. To analyze CXCL12 and CCL5 binding to Huh7 cell surface, cells were incubated for 1 h at 4°C with 40 nM biotinylated CCL5 at residue 1, synthesized by L. Martin (CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France) or biotinylated CXCL12 at 125 nM (Sutton Mol Cancer Res 2007a, Sutton Mol Cancer Ther 2007b). After washing, cells were labeled for 30 min at 4°C with FITC-labeled goat-anti-mouse Ig antibody (1/50; Pharmingen) or streptavidin-Alexa Fluor 488 complex (1/100; Molecular probe Inc., Eugene, OR). Next, cells were fixed in 1% PBS-paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 20 min at 4°C, then washed with PBS and harvested by gentle scraping. 1 x10⁴ cells were analyzed by using a FACScan (Becton Dickinson, Le Pont de-Claix, France).

qRT-PCR

Total RNA from Huh7 cells were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instruction. The purity of total RNA was analyzed by

measuring the ratio between 260/280 and 260/230 nm optical density using a Biospec-Nano (Shimadzu, Noisiel, France). Reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA (High Capacity cDNA Synthesis Kit, Applied Biosystem, Thermofisher scientific, Foster City, California, USA). Finally, quantitative PCR were performed (Taqman Universal Master Mix, Applied Biosystem) using the following Taqman primers: *SDC-1* (Hs00896423_m1) ; *SDC-4* (Hs01120909_m1) ; *EXT-1* (Hs00609162_m1) ; *EXT-2* (Hs00181158_m1) ; *NDST-1* (Hs00925442_m1) ; *HSPE* (Hs00180737_m1) ; *SULF-2* (Hs01016480_m1); *β-actin* (Hs01060665_g1) (Thermofisher scientific, , Foster City, California, USA). For a SYBR Green Universal Master Mix, applied Biosystem, the following designed primers purchased from Eurogentec (Angers, France) were used: *β-actin* (forward sequence: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'; Reverse sequence: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'), cyclin D1 (Forward sequence: 5'-ACCTGGATGCTGGAGGTCT-3'; Reverse sequence: 5'-GCTCTTTTTCACGGGCTCCA-3'), *NDST-2* (Forward sequence: 5'-TTCCAGTCTGGGCTGATGTCCCAGC-3'; Reverse sequence: 5'-GTAGATCCCCTGCCTGGCTAAAGG-3'). The quantification levels for each transcript were calculated by the 2-delta method by normalizing to *β-actin*.

GAG extraction and analysis

7.10⁶ Huh7 cells were seeded on a T-75 flask. After 24h of treatment, cells were incubated with 4 mL of Trypsin (Gibco, ThermoFisher Scientific, Illkirch France) for 40 min at 37°C. The trypsinated cells were collected and the flask was rinsed twice with PBS. Trypsinated cells and washes were pooled and centrifuged for 10 min at 3500 rpm. The supernatant was retrieved (fraction 1) and the pellet washed twice with 20 mM phosphate pH 6.5 and centrifuged for 10 min at 3500 rpm. After each centrifugation, the supernatant was collected and pooled with the fraction 1 and the pellet was discarded. The supernatant was applied to an

ion-exchange DEAE-Sephacel column (2 mL) equilibrated in 20 mM phosphate pH 6.5. After washing with 20 mM phosphate, 0.3 M NaCl pH 6.5, GAG chains were eluted with 20 mM phosphate, 1 M NaCl pH 6.5 and freeze-dried. GAG chains were solubilised in distilled water and desalted on a PD-10 column (GE Healthcare), equilibrated in distilled water then freeze-dried. GAGs were then resuspended in 100 mM sodium acetate, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.1 and digested with 10 mU of heparinase I (GrampEnz) overnight at 30°C, then with 10 mU heparinase II and 10 mU heparinase III (GrampEnz) for 24 h at 37°C. Following digestion, disaccharides analysis was performed by reverse-phase ion-pair high-performance liquid chromatography in triplicate as described in (Hijmans et al., 2017).

Cell cycle analysis

1.10⁵ Huh7 cells were seeded in 12-well plates then treated or not in serum free medium. Supernatant and trypsinated cells were centrifuged 5 min at 300 g. The pellet was fixed with pre-cooled 75% ethanol overnight at 4°C. The cells were incubated with RNase-A 30 min at 200 µg/mL and with 10 µg/mL of propidium iode (PI)-PBS, 15 min at room temperature and the cells were analyzed by using a FACScan (Becton Dickinson, Le Pont de-Claix, France) (Sutton et al., 2007a).

Crystal violet staining

1 x10⁴ cells per well were seeded in 96 well cell culture plates in different conditions. After, the cells were fixed with 4% PBS-paraformaldehyde for 15 min, then incubated with 100 µL of violet crystal (Sigma-Aldrich), for 20 min. Cells were rinsed 3 times with PBS and 100 µL of acetic acid (10%) was added. Then the absorbance was measured at 595 nm using a spectrophotometer (Bio-Rad® Model 680. Hercules, CA) (Sutton et al., 2007a).

Statistical Analysis

Statistical differences between two groups were tested using Mann-Whitney test on StatView software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Statistical differences between more than two groups were tested using Anova test on StatView software. GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to construct figures. All results are expressed as mean \pm SEM for four independent experiments. A *p*-value of <0.05 was used as the criterion of statistical significance.

Fundings

This work was supported by Bonus Qualité Recherche and Institut Fédératif de Recherche Biomédicale (IFRB) of the University Sorbonne Paris Nord (France). N. Mouhoubi was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, France.

Author contributions

N.M conducted the experiments; M.N and O.S.C and R.V contributed to the conduction of the experiments. N.M and A.S designed the experiments; A.S conceived the project; N.M, A.S, EG and MN wrote the manuscript; E.G, C.L.M and J.B.F corrected the manuscript. L.M collaborated for the synthesis of biotinylated CCL5. K.B, H.H, C.L.M, O.H, and N.C analyzed the data.

Conflict of interest statement : none

Acknowledgements

We would like to thank the Galilee Doctoral School of University Sorbonne Paris Nord for their support. We also thank the laboratory Structure and Activities of Glycosaminoglycans (SAGAG, Grenoble) for their collaboration.

Abbreviations

CCL5: C-C Motif Chemokine Ligand 5, CCR1: C-C chemokine receptor type 1, CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12, CXCR4: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4, ECM: Extracellular matrix, ERK: Extracellular signal-regulated kinase, EXT: Exostosin, FGF: Fibroblast growth factor, GAG: Glycosaminoglycan, GlcA: glucuronic acid, GlcNAc: N-acetylglucosamine, HBP: Heparin binding protein, HCC: hepatocellular carcinoma, HGF: Hepatocyte growth factor, HPSE: Heparanase, HS: Heparan sulfate, HSPG: Heparan sulfate proteoglycan, IdoA: iduronic acid, JNK: Jun amino-terminal kinases, MMP: matrix metalloproteinase, NDST: N-deacetylase/N-sulfotransferase, OST: O-sulfotransferase, SAPK: Stress-activated protein kinases, SDC: Syndecan, SDF-1: Stromal derived factor-1, SULF: Sulfatase, TNF- α : Tumor necrosis factor- α .

References

- Alhasan, A.A., Spielhofer, J., Kusche-Gullberg, M., Kirby, J.A., and Ali, S. (2014). Role of 6-O-sulfated heparan sulfate in chronic renal fibrosis. *J. Biol. Chem.* *289*, 20295–20306.
- Annaval, T., Wild, R., Créton, Y., Sadir, R., Vivès, R.R., and Lortat-Jacob, H. (2020). Heparan Sulfate Proteoglycans Biosynthesis and Post Synthesis Mechanisms Combine Few Enzymes and Few Core Proteins to Generate Extensive Structural and Functional Diversity. *Molecules* *25*.
- Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T.W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 362–374.
- Buczek-Thomas, J.A., Hsia, E., Rich, C.B., Foster, J.A., and Nugent, M.A. (2008). Inhibition of histone acetyltransferase by glycosaminoglycans. *J. Cell. Biochem.* *105*, 108–120.
- Charles, K.A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T., Schultheis, A., Chakravarty, P., Thompson, R.G., Kollias, G., Smyth, J.F., et al. (2009). The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J. Clin. Invest.* *119*, 3011–3023.
- Charnaux, N., Brule, S., Hamon, M., Chaigneau, T., Saffar, L., Prost, C., Lievre, N., and Gattegno, L. (2005). Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12. *FEBS J.* *272*, 1937–1951.
- Charni, F., Friand, V., Haddad, O., Hlawaty, H., Martin, L., Vassy, R., Oudar, O., Gattegno, L., Charnaux, N., and Sutton, A. (2009). Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1790*, 1314–1326.
- El Masri, R., Seffouh, A., Lortat-Jacob, H., and Vivès, R.R. (2017). The “in and out” of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate. *Glycoconj. J.* *34*, 285–298.
- Fedarko, N.S., Ishihara, M., and Conrad, H.E. (1989). Control of cell division in hepatoma cells by exogenous heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Physiol* *139*, 287–294.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* *127*, 2893–2917.
- Friand, V., Haddad, O., Papy-Garcia, D., Hlawaty, H., Vassy, R., Hamma-Kourbali, Y., Perret, G.-Y., Courty, J., Baleux, F., Oudar, O., et al. (2009). Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology* *19*, 1511–1524.
- Gao, W., Kim, H., and Ho, M. (2015). Human Monoclonal Antibody Targeting the Heparan Sulfate Chains of Glypican-3 Inhibits HGF-Mediated Migration and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS ONE* *10*, e0137664.

- Guillemot, J., Canuel, M., Essalmani, R., Prat, A., and Seidah, N.G. (2013). Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: Proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. *Hepatology* *57*, 2514–2524.
- Guo, M., Zhang, H., Zheng, J., and Liu, Y. (2020). Glypican-3: A New Target for Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *J Cancer* *11*, 2008–2021.
- Hijmans, R.S., Shrestha, P., Sarpong, K.A., Yazdani, S., Masri, R. el, Jong, W.H.A. de, Navis, G., Vivès, R.R., and Born, J. van den (2017). High sodium diet converts renal proteoglycans into pro-inflammatory mediators in rats. *PLOS ONE* *12*, e0178940.
- Holt, C.E., and Dickson, B.J. (2005). Sugar codes for axons? *Neuron* *46*, 169–172.
- Huang, Y.S., Hwang, S.J., Chan, C.Y., Wu, J.C., Chao, Y., Chang, F.Y., and Lee, S.D. (1999). Serum levels of cytokines in hepatitis C-related liver disease: a longitudinal study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* *62*, 327–333.
- Imberty, A., Lortat-Jacob, H., and Pérez, S. (2007). Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr. Res.* *342*, 430–439.
- Ishihara, M., Fedarko, N.S., and Conrad, H.E. (1986). Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes. *J Biol Chem* *261*, 13575–13580.
- Ito, K., Yamaoka, Y., Ota, H., El-Zimaity, H., and Graham, D.Y. (2008). Adherence, Internalization, and Persistence of *Helicobacter pylori* in Hepatocytes. *Dig Dis Sci* *53*, 2541–2549.
- Jang, J.W., Oh, B.S., Kwon, J.H., You, C.R., Chung, K.W., Kay, C.S., and Jung, H.S. (2012). Serum interleukin-6 and C-reactive protein as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma. *Cytokine* *60*, 686–693.
- Jayson, G.C., Lyon, M., Paraskeva, C., Turnbull, J.E., Deakin, J.A., and Gallagher, J.T. (1998). Heparan sulfate undergoes specific structural changes during the progression from human colon adenoma to carcinoma in vitro. *J. Biol. Chem.* *273*, 51–57.
- Knelson, E.H., Nee, J.C., and Blobel, G.C. (2014). Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends Biochem Sci* *39*, 277–288.
- Laguri, C., Arenzana-Seisdedos, F., and Lortat-Jacob, H. (2008). Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydr. Res.* *343*, 2018–2023.
- Lai, J.-P., Thompson, J.R., Sandhu, D.S., and Roberts, L.R. (2008). Heparin-degrading sulfatases in hepatocellular carcinoma: roles in pathogenesis and therapy targets. *Future Oncol* *4*, 803–814.
- Lai, J.-P., Sandhu, D.S., Yu, C., Moser, C.D., Hu, C., Shire, A.M., Aderca, I., Murphy, L.M., Adjei, A.A., Sanderson, S., et al. (2010). Sulfatase 2 protects hepatocellular carcinoma cells against apoptosis induced by the PI3K inhibitor LY294002 and ERK and JNK kinase inhibitors. *Liver International* *30*, 1522–1528.
- Liu, X.-L., Li, F.-Q., Liu, L.-X., Li, B., and Zhou, Z.-P. (2013). TNF- α , HGF and macrophage

in peritumoural liver tissue relate to major risk factors of HCC Recurrence. *Hepatology* 60, 1121–1126.

Mandarini, E., Tollapi, E., Zanchi, M., Depau, L., Pini, A., Brunetti, J., Bracci, L., and Falciani, C. (2020). Endocytosis and Trafficking of Heparan Sulfate Proteoglycans in Triple-Negative Breast Cancer Cells Unraveled with a Polycationic Peptide. *Int J Mol Sci* 21.

Manon-Jensen, T., Itoh, Y., and Couchman, J.R. (2010). Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* 277, 3876–3889.

Michalaki, V., Syrigos, K., Charles, P., and Waxman, J. (2004). Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br. J. Cancer* 90, 2312–2316.

Nagarajan, A., Malvi, P., and Wajapeyee, N. (2018). Heparan Sulfate and Heparan Sulfate Proteoglycans in Cancer Initiation and Progression. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 483.

Nault, J.-C., Guyot, E., Laguillier, C., Chevret, S., Ganne-Carrie, N., N’Kontchou, G., Beaugrand, M., Seror, O., Trinchet, J.-C., Coelho, J., et al. (2013). Serum Proteoglycans as Prognostic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Alcoholic Cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22, 1343–1352.

Ozakyol, A. (2017). Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma (HCC Epidemiology). *J Gastrointest Cancer* 48, 238–240.

Powell, A.K., Fernig, D.G., and Turnbull, J.E. (2002). Fibroblast growth factor receptors 1 and 2 interact differently with heparin/heparan sulfate. Implications for dynamic assembly of a ternary signaling complex. *J. Biol. Chem.* 277, 28554–28563.

Pye, D.A., Vivès, R.R., Hyde, P., and Gallagher, J.T. (2000). Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. *Glycobiology* 10, 1183–1192.

Refolo, M.G., Messa, C., Guerra, V., Carr, B.I., and D’Alessandro, R. (2020). Inflammatory Mechanisms of HCC Development. *Cancers (Basel)* 12.

Regős, E., Karászi, K., Reszegi, A., Kiss, A., Schaff, Z., Baghy, K., and Kovalszky, I. (2020). Syndecan-1 in Liver Diseases. *Pathol. Oncol. Res.* 26, 813–819.

Reine, T.M., Kusche-Gullberg, M., Feta, A., Jenssen, T., and Kolset, S.O. (2012). Heparan sulfate expression is affected by inflammatory stimuli in primary human endothelial cells. *Glycoconj. J.* 29, 67–76.

Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imberty, A., and Lortat-Jacob, H. (2001). Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J. Biol. Chem.* 276, 8288–8296.

Safaiyan, F., Lindahl, U., and Salmivirta, M. (1998). Selective reduction of 6-O-sulfation in heparan sulfate from transformed mammary epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* 252, 576–582.

Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold*

Spring Harb Perspect Biol 3.

Sembajwe, L.F., Katta, K., Grønning, M., and Kusche-Gullberg, M. (2018). The exostosin family of glycosyltransferases: mRNA expression profiles and heparan sulphate structure in human breast carcinoma cell lines. *Biosci Rep* 38.

Shaw, J.P., Johnson, Z., Borlat, F., Zwahlen, C., Kungl, A., Roulin, K., Harrenga, A., Wells, T.N.C., and Proudfoot, A.E.I. (2004). The X-ray structure of RANTES: heparin-derived disaccharides allows the rational design of chemokine inhibitors. *Structure* 12, 2081–2093.

Singal, A.G., Lampertico, P., and Nahon, P. (2020). Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *J. Hepatol.* 72, 250–261.

Singer, M.S., Phillips, J.J., Lemjabbar-Alaoui, H., Wang, Y.Q., Wu, J., Goldman, R., and Rosen, S.D. (2015). SULF2, a heparan sulfate endosulfatase, is present in the blood of healthy individuals and increases in cirrhosis. *Clin. Chim. Acta* 440, 72–78.

Stewart, M.D., and Sanderson, R.D. (2014). Heparan sulfate in the nucleus and its control of cellular functions. *Matrix Biol* 35, 56–59.

Sutton, A., Friand, V., Brulé-Donneger, S., Chaigneau, T., Ziol, M., Sainte-Catherine, O., Poiré, A., Saffar, L., Kraemer, M., Vassy, J., et al. (2007a). Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol. Cancer Res.* 5, 21–33.

Sutton, A., Friand, V., Papy-Garcia, D., Dagouassat, M., Martin, L., Vassy, R., Haddad, O., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Saffar, L., et al. (2007b). Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 6, 2948–2958.

Tátrai, P., Egedi, K., Somorácz, A., van Kuppevelt, T.H., Ten Dam, G., Lyon, M., Deakin, J.A., Kiss, A., Schaff, Z., and Kovalszky, I. (2010). Quantitative and qualitative alterations of heparan sulfate in fibrogenic liver diseases and hepatocellular cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 429–441.

Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., and Rosen, S.D. (2006). HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem.* 7, 2.

Vlodavsky, I., and Friedmann, Y. (2001). Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 108, 341–347.

Wang, L., Brown, J.R., Varki, A., and Esko, J.D. (2002). Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J. Clin. Invest.* 110, 127–136.

Whitelock, J.M., and Iozzo, R.V. (2005). Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity. *Chem. Rev.* 105, 2745–2764.

Xiao, Y., Kleeff, J., Shi, X., Büchler, M.W., and Friess, H. (2003). Heparanase expression in hepatocellular carcinoma and the cirrhotic liver. *Hepatol Res* 26, 192–198.

Yang, Y., Macleod, V., Miao, H.-Q., Theus, A., Zhan, F., Shaughnessy, J.D., Sawyer, J., Li, J.-P., Zcharia, E., Vlodaysky, I., et al. (2007). Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* 282, 13326–13333.

Yu, L.-X., Ling, Y., and Wang, H.-Y. (2018). Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression. *NPJ Precis Oncol* 2, 6.

Zhang, L., David, G., and Esko, J.D. (1995). Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans. *J Biol Chem* 270, 27127–27135.

Zhang, S., Condac, E., Qiu, H., Jiang, J., Gutierrez-Sanchez, G., Bergmann, C., Handel, T., and Wang, L. (2012). Heparin-induced leukocytosis requires 6-O-sulfation and is caused by blockade of selectin- and CXCL12 protein-mediated leukocyte trafficking in mice. *J. Biol. Chem.* 287, 5542–5553.

Zong, F., Fthenou, E., Wolmer, N., Hollósi, P., Kovalszky, I., Szilák, L., Mogler, C., Nilsson, G., Tzanakakis, G., and Dobra, K. (2009). Syndecan-1 and FGF-2, but not FGF receptor-1, share a common transport route and co-localize with heparanase in the nuclei of mesenchymal tumor cells. *PLoS ONE* 4, e7346.

Legendes to Figures

Figure 1. TNF- α induced changes in total heparan sulfate chains quantity.

Cells were treated or not with 5 ng/mL of TNF- α during 24h. **(A)** mRNA level of IL-8 was analyzed by qRT-PCR, using β -actin as endogenous control. **(B)** GAG were extracted as described under Materiel and Methods section. Total HS were quantified after HPLC runs. Error bars represent SEM of triplicate analysis. **(C)** HS chains cell surface expression was quantified by flow cytometry with specific anti-HS antibody and it's isotype as negative control. Four independent experiments were performed. The results are expressed with mean \pm SEM.

Figure 2: TNF- α affect syndecan-1 and syndecan-4 cellular localization.

For each experiment, Huh7 cells were treated or not with 5 ng/mL of TNF- α for 24h. **(A)** mRNA levels of *SDC-1* and *SDC-4* were analyzed by qRT-PCR using β -actin as endogenous control. **(B)** SDC-1 and SDC-4 cell surfce expression was analyzed by flow cytometry using anti-SDC-1 or anti-SDC-4 antibodies, specific isotypes were used as negative controls. **(C)** intracellualr expression of SDC-1 and SDC4 was studied by flow cytometry using anti-SDC-1 or anti-SDC-4 antibodies or their isotypes as negative controls after cell permeabilization. **(D)** SDC1 or SDC4 ectodomains released in conditioned media of Huh7 cells were analyzed by dot-blot and immunolabelling with anti-SDC1 or anti-SDC4 antibodies. **(E)** MMP2 and MMP9 activities (pro-MMP2/pro-MMP9 and active MMP2/MMP9 activities) were determined by gel zymography on conditioned medium of Huh7 cells. Results are expressed with mean \pm SEM. Four independent experiments were performed. * $p < 0,05$ vs UT.

Figure 3 : TNF- α induced SDC-1 and SDC-4 internalization.

For each experiment, Huh7 cells were treated or not with 5 ng/mL of TNF- α for 24h or with different endocytosis inhibitors or both (2.5 μ g/mL of cytochalasin D, 1 μ g/mL of filipin and 80 μ M of dynasore). Cell surface expression of SDC-1 (A), SDC-4 (B) was analysed by flow cytometry using anti-SDC-1 or anti-SDC-4 and their specific isotypes as negative controls. (C) levels of SDC-1 and SDC-4 released in conditioned media of Huh7 cells were analyzed by dot-blot and immunolabelling with anti-SDC-1 or anti-SDC-4 antibodies. Results are expressed as mean \pm SEM. Four independent experiments were performed. * $p < 0,05$ vs UT ; & vs TNF- α ; # vs inhibitor alone.

Figure 4 : TNF- α induced structural HS modifications.

For each experiment, Huh7 cells were treated or not with 5 ng/mL of TNF- α for 24h. Disaccharides composition (A) and sulfation patterns (B) of HS chains were analyzed by RPIP-HPLC on HS purified from cell lysates (in triplicate). (C,D) mRNA levels of GAG biosynthesis and modifying enzymes were analyzed by qRT-PCR using β -actin as endogenous control. Results are expressed with mean \pm SEM. In (A) and (B) Four independent experiments were performed. * $p < 0,05$ vs UT.

Figure 5 : TNF- α increased CXCL12 and CCL5 binding to Huh7 cell membrane.

Huh7 cells were treated or not with 5 ng/mL of TNF- α for 24h. Binding of CXCL12 and CCL5 to cell membrane was analyzed by flow cytometry using streptavidin-Alexa Fluor 488 after incubating cells with biotinylated-CCL5 (40nM) or biotinylated-CXCL12 (125nM). Four independent experiments were performed. * $p < 0,05$ vs UT.

Figure 6 : TNF- α increased Huh7 cell proliferation.

(A). Huh7 cells were treated or not with TNF- α for 8h, 16h and 24h, number of cells was

quantified automatically using Coulter counter. The results are expressed as mean \pm SEM. Four independent experiments were performed. * $p < 0,05$ vs UT. **(B)**. Huh7 cells were serum-deprived for 24h and further treated or not with TNF- α for 24h. Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining and flow cytometry. The results presented here are representative of three independent experiments. **(C)** Huh7 cells were treated or not with TNF- α for 24h, mRNA level of cyclin-D1 was analyzed performing qRT-PCR using *β -actin* as endogenous control.

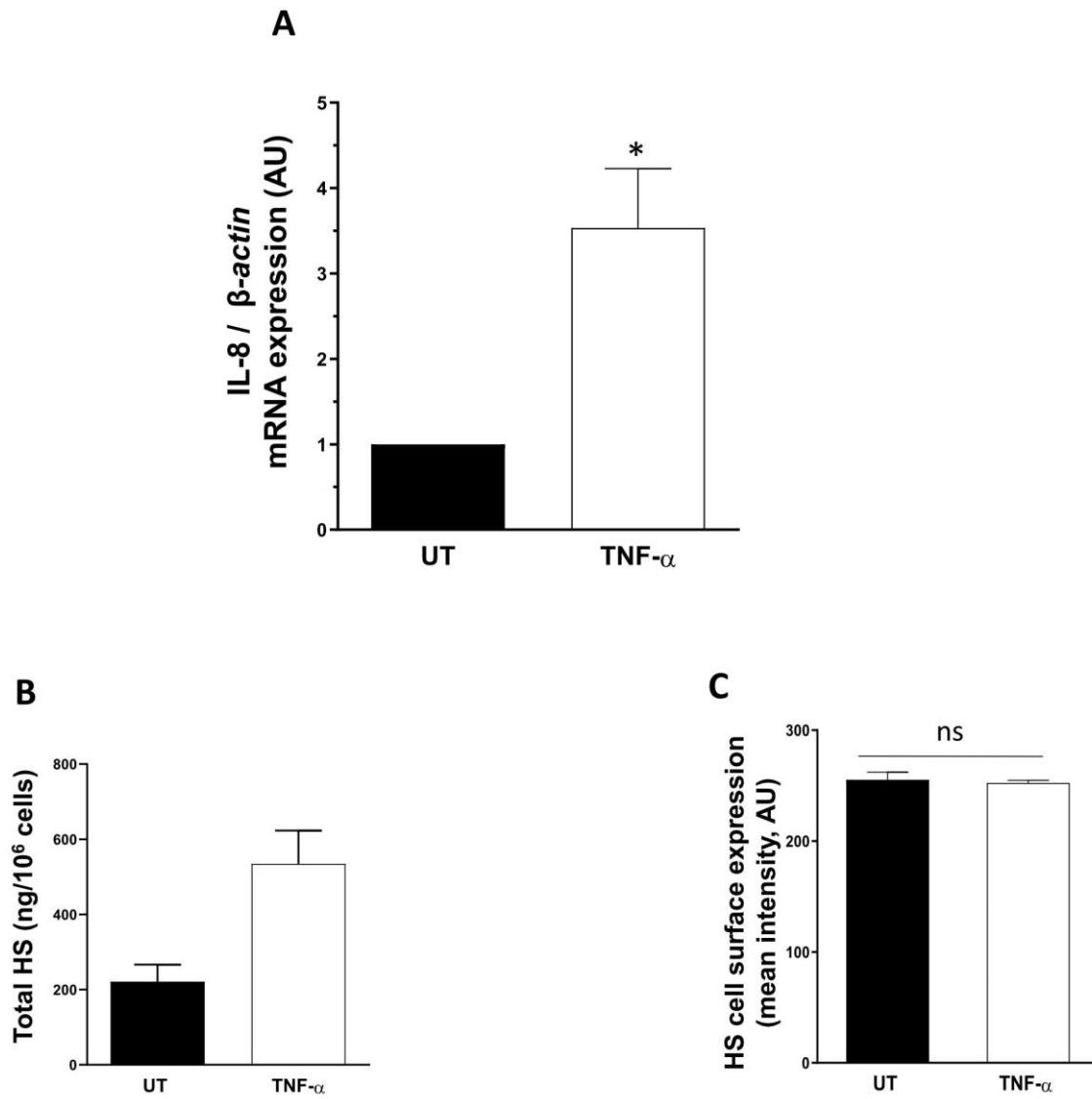


Figure 1

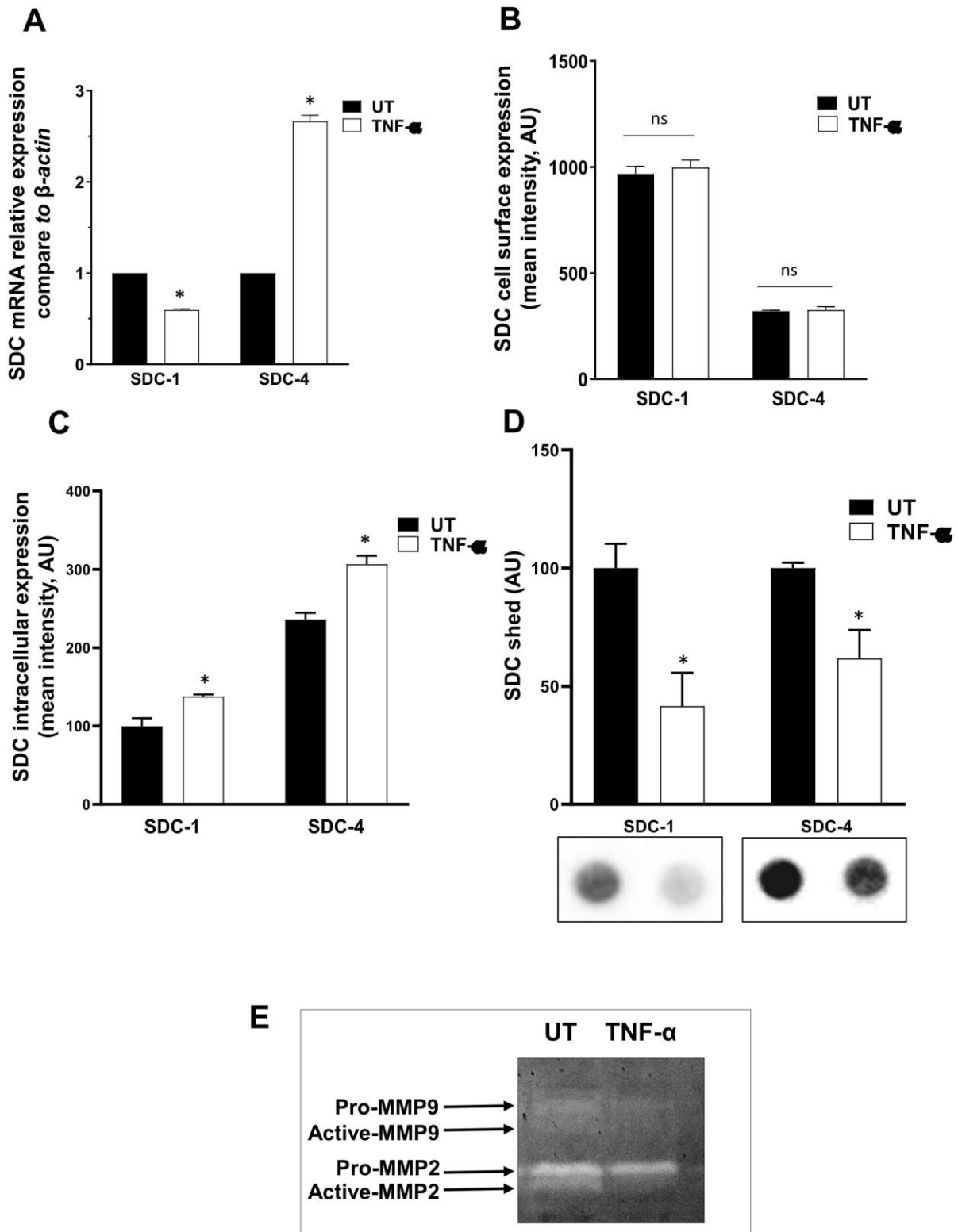


Figure 2

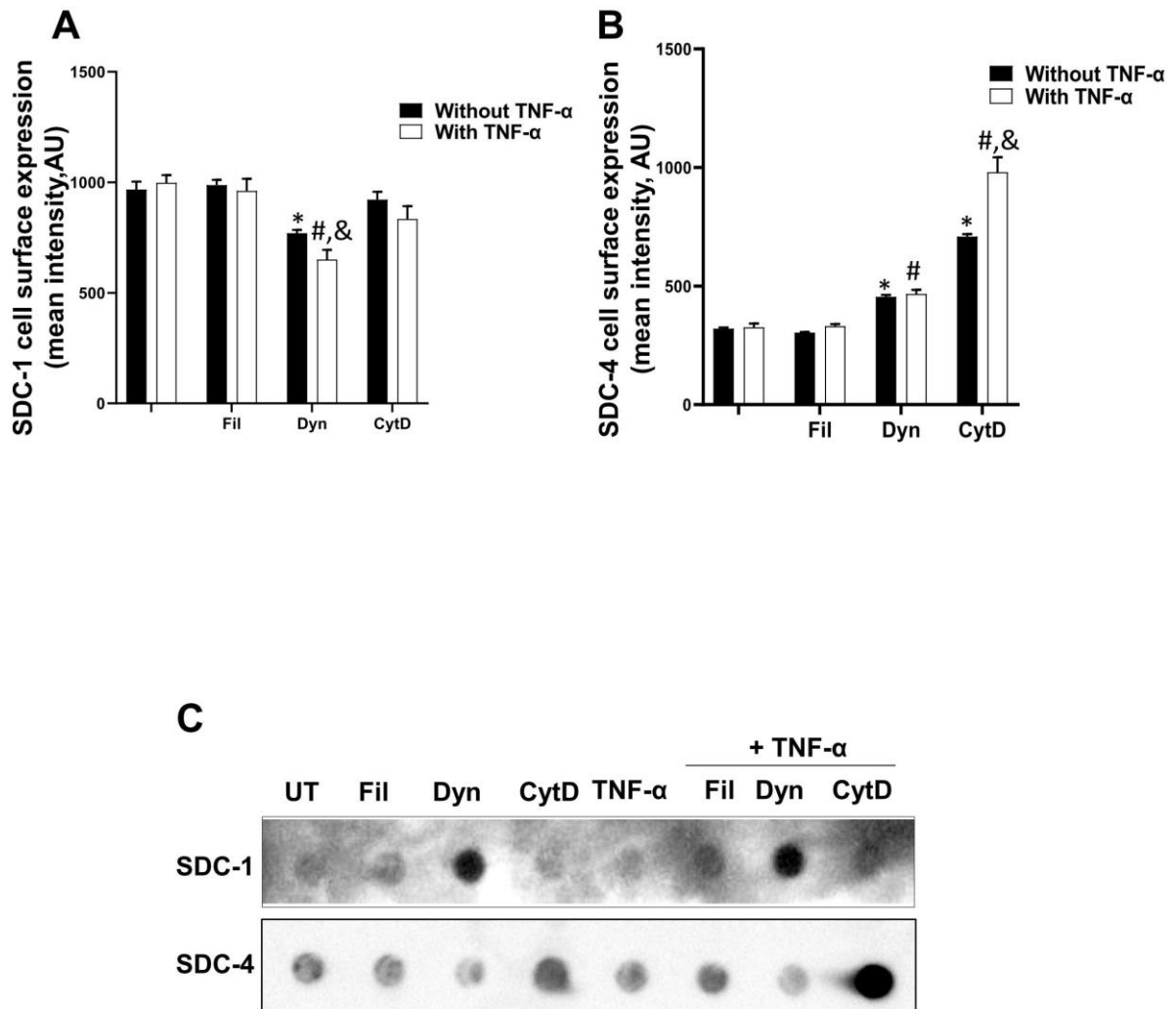


Figure 3

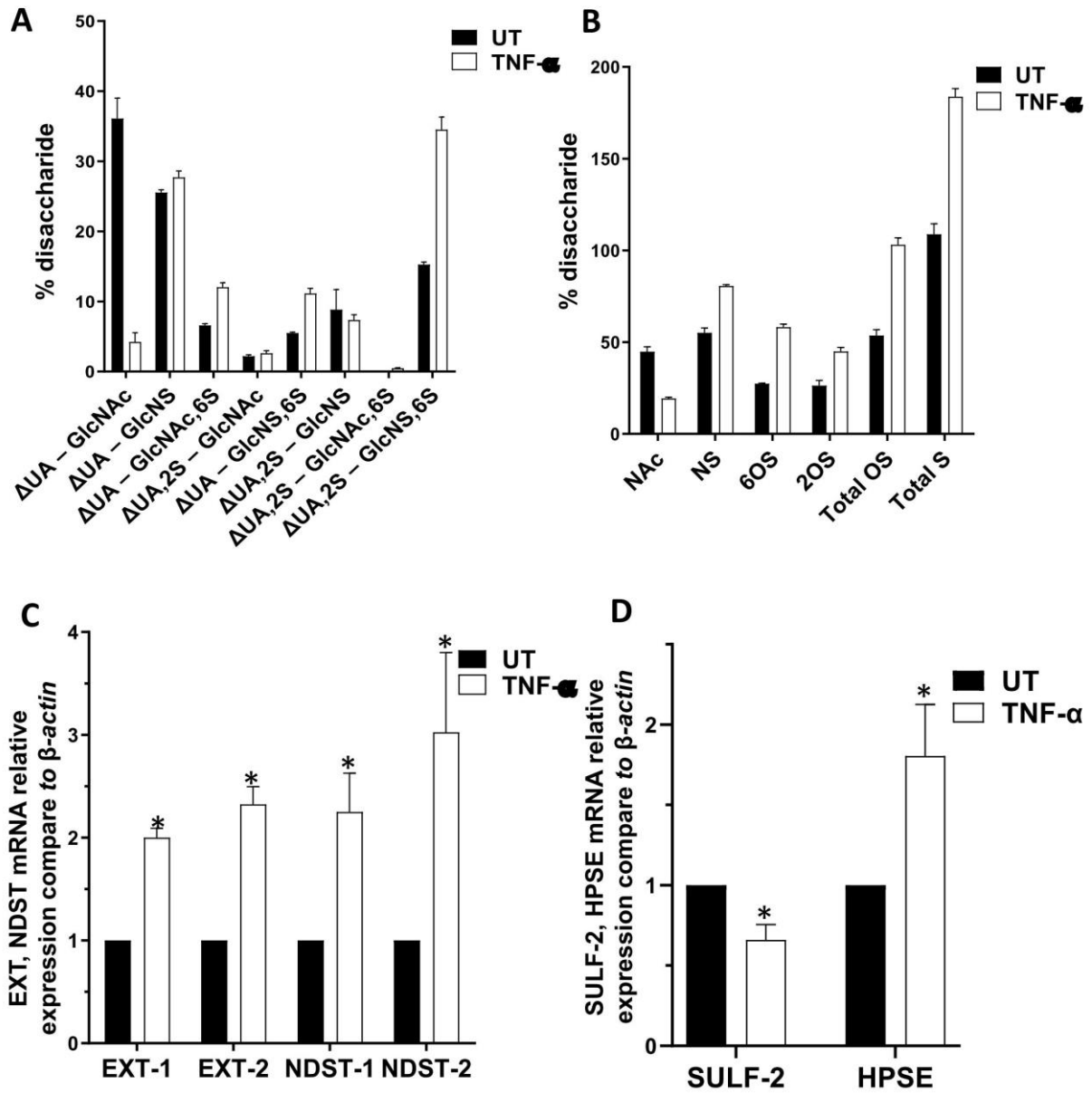


Figure 4

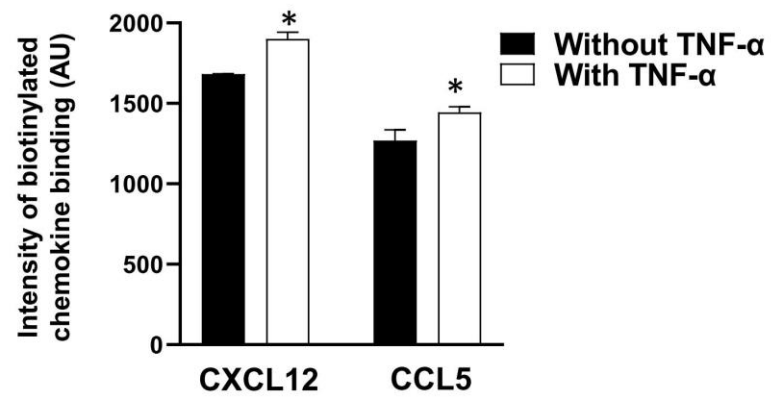


Figure 5

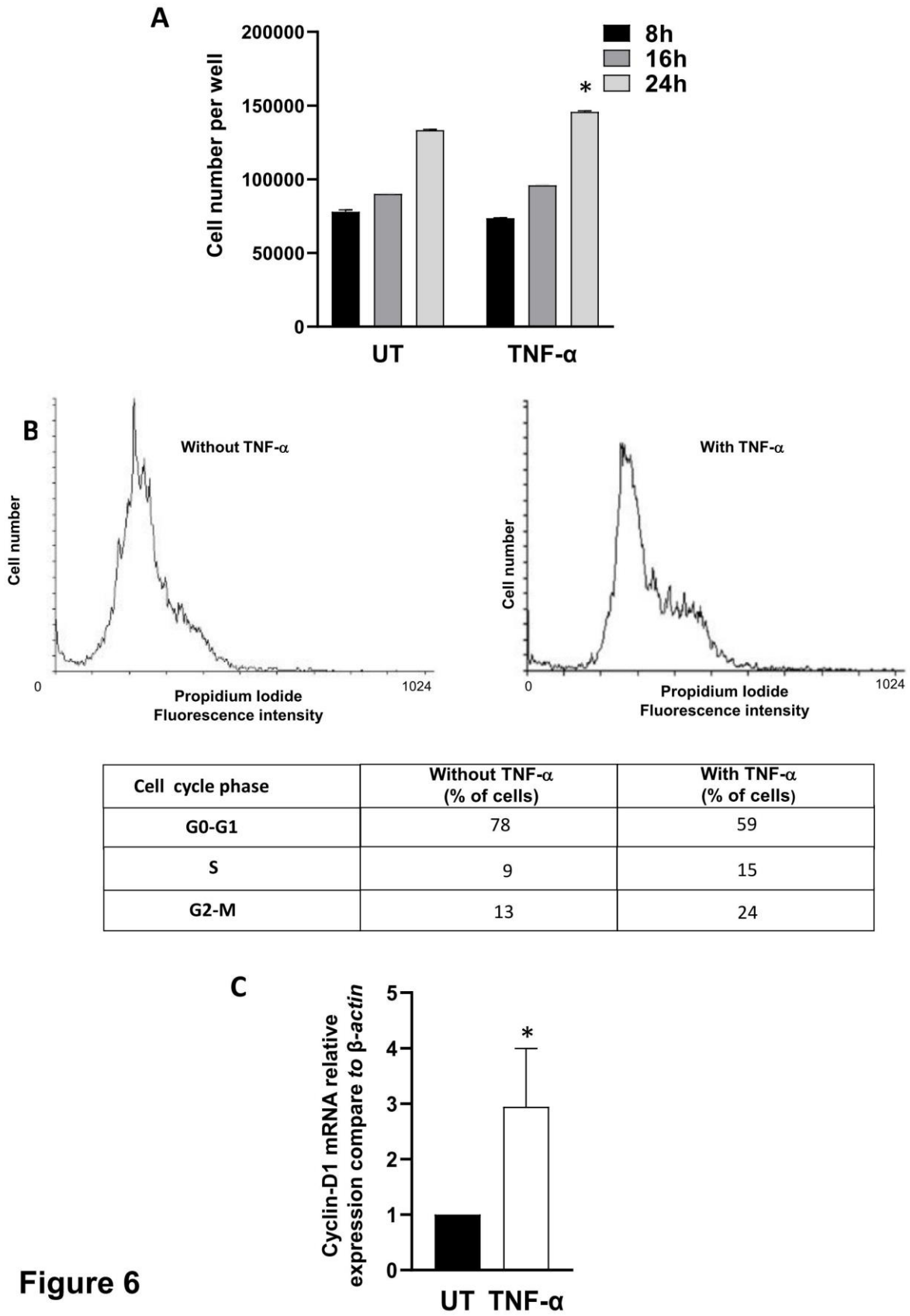


Figure 6

supplementary data

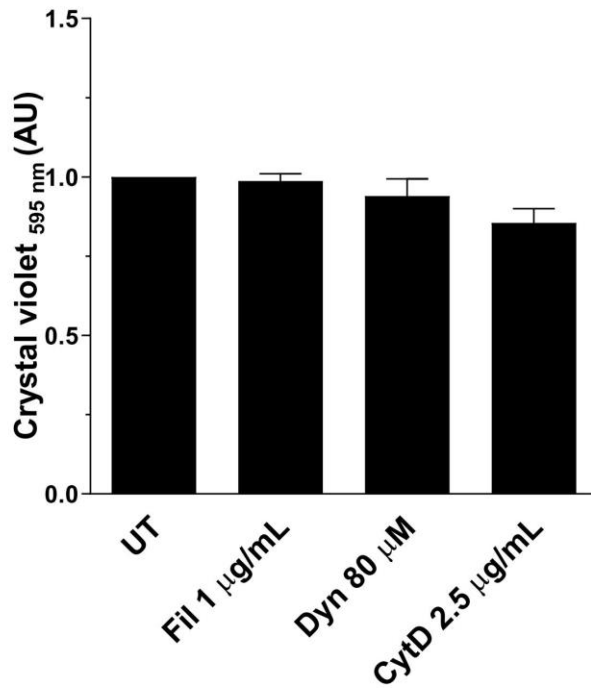


Figure 1.

Cells were treated or not with filipin at 1 µg/mL, dynasore at 80 µM and cytochalasin D during 24h and incubated with crystal violet. Data are expressed as absorbance at 595 nm. The results are expressed with mean ± SEM. Four independent experiments were performed.

III. Article 3 : Genetic polymorphisms in sulfatases and heparanase genes do not influence severe hepatic liver diseases in patients with metabolic syndrome.

GUYOT E^{1,2,*}, MOUHOUBI N^{1*}, BAMBA-FUNCK J^{1,2}, ZIOL M^{3,4,5}, BARGET N³, SIMON C², BESSEAU S⁶, DESPRES S⁶, GANNE N^{5,7}, CHARNAUX N^{1,2}, NAHON P^{5,7,#}, SUTTON A^{1,2,#}. Genetic polymorphisms in sulfatases and heparanase genes do not influence severe hepatic liver diseases in patients with metabolic syndrome.

1. LVTS - Inserm U1148, UFR SMBH, Université Paris XIII (USPN), Bobigny, France
2. Laboratoire de Biochimie, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France
3. Plateforme de Ressources Biologiques, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France
4. Service d'anatomie et cytologie pathologiques, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France
5. Inserm U1162, Université Paris XIII (USPN), Paris, France
6. LIMICS, UFR SMBH, Université Paris XIII (USPN), Bobigny, France
7. Service d'hépatologie, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France

*, #: equal contribution

Keywords: NASH, cirrhosis, hepatocellular carcinoma, genetic, prognosis

Abstract

Background and Aims: Non-alcoholic fatty liver disease is a spectrum of chronic liver disease ranging from simple hepatic steatosis to liver cell injury and inflammation known as non-alcoholic steatohepatitis (NASH) that can lead to cirrhosis. Cirrhosis is considered a precancerous condition that predisposes to the development of HCC. A number of studies including Genome-wide association studies have reported associations between various SNPs and the presence of HCC. Our group has investigated in the last 10 years the influence of SNPs reported as associated with the risk of liver cancer in large prospective cohorts of homogeneous patients undergoing periodical surveillance for HCC. The aim of this study was to assess the influence of single nucleotide polymorphism affecting sulfatase-1 (rs2623047), sulfatase-2 (rs2281279) and HPSE (rs11099592 and rs4693608) in the occurrence of NASH, cirrhosis and hepatocellular carcinoma in a cohort of 273 patients with NAFLD, prospectively followed-up in the hepatology department of Jean Verdier hospital.

Method: Genomic DNA was extracted from each patient's peripheral blood mononuclear cells using a MagNA Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics). All SNP were genotyped by allelic discrimination using fluorogenic probes and appropriate TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City).

Results:

None of the SNP affecting GAG-modifying enzymes SULF-1, SULF-2, HPSE, studied in this work exerts an influence on the development of steatosis, necroinflammatory activity, fibrosis, HCC and death in our cohort, as assessed by chi square and Maentel-Haenszel chi square tests.

Conclusion:

The SNP affecting SULF-1 (rs2623047), SULF-2(rs2281279) and HPSE (rs11099592 and rs4693608) do not seem to constitute useful genetic markers to improve clinical stratification of patients with NAFLD having a high risk to develop severe liver diseases such as cirrhosis or HCC.

DISCUSSION

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente la troisième cause de décès liés au cancer dans le monde (Ozakyol 2017). En France, la consommation chronique d'alcool et les maladies hépatiques qui en résultent sont la cause principale du développement du CHC (70% des cas), suivie par la NASH (Contentin et al. 2017; Singal, Lampertico, et Nahon 2020).

Le diagnostic clinique actuel du CHC repose principalement sur l'imagerie médicale, notamment l'échographie, la tomodensitométrie (CT-scan) et l'IRM (A. Huang et al. 2020). Le CHC de stade précoce est classé comme ayant moins de 4 nodules tumoraux de moins de 3 cm de diamètre. La sensibilité et la spécificité de l'imagerie pour détecter ces nodules tumoraux sont respectivement de 60% et 97% pour l'échographie, de 68% et 93% pour la tomodensitométrie et de 81% et 85% pour l'IRM (Colli et al. 2006; Chia, Wong, et Luk 2019).

La résection, l'ablation et la transplantation du foie sont potentiellement curatives mais nécessitent un diagnostic à un stade suffisamment précoce (A. Huang et al. 2020). Le diagnostic du CHC à un stade avancé, dû notamment à la difficulté de distinguer entre les nodules de régénération et les nodules cancéreux, limite la prise en charge thérapeutique des patients atteints de CHC et contribue à un mauvais pronostic. De plus, le taux de récurrence dans les 5 ans suivant le traitement du CHC précoce par résection chirurgicale ou ablation par radiofréquence est estimé à 70% (Miura et al. 2020). De ce fait, il est important de diagnostiquer le CHC ou la récurrence à un stade précoce et d'identifier les patients présentant un mauvais pronostic afin d'entamer des thérapies ciblées le plus tôt possible.

A l'heure actuelle, l'alpha-foetoprotéine (AFP) est couramment utilisée comme marqueur tumoral combiné à l'imagerie (Chia, Wong, et Luk 2019; Miura et al. 2020). À une valeur seuil (cut-off) de 20 ng/mL dans le sérum, l'AFP présente une sensibilité de 60 à 80% pour le CHC avancé. Toutefois, cette sensibilité tombe à environ 40% pour la détection des petits CHC. L'AFP est parfois élevée chez les patients sans CHC qui souffrent d'une maladie hépatique chronique (Chia, Wong, et Luk 2019; Miura et al. 2020). En effet, une augmentation significative du taux sérique d'AFP (20-200 ng/mL) est détectée chez un nombre considérable de patients atteints d'une maladie hépatique chronique, dont 15 à 58% de

patients atteints d'une hépatite virale chronique et 11 à 47% de patients atteints d'une cirrhose (Capurro et al. 2005; Tangkijvanich et al. 2010; Lou et al. 2017).

Ainsi, il reste important d'identifier des biomarqueurs sériques ayant une sensibilité et une spécificité élevées pour le diagnostic non invasif du CHC précoce, mais aussi pour le suivi de la réponse à la thérapie et la surveillance de la récurrence après un traitement curatif.

Dans ce contexte, le potentiel diagnostique et pronostique de plusieurs HSPG, tels que le SDC-1 et le GPC-3, a été identifié à partir d'études aux niveaux tissulaire et sérique. En utilisant des motifs de sulfatation spécifiques sur leurs chaînes HS comme éléments de reconnaissance, les HSPG participent au niveau extracellulaire à différentes fonctions en tant que sites de séquestration des molécules de signalisation impliquées notamment dans la prolifération cellulaire (par exemple, morphogènes, chimiokines et facteurs de croissance), co-récepteurs permettant la liaison entre ligands et récepteurs protéiques, et en tant que récepteurs impliqués dans l'endocytose de plusieurs ligands (Singer et al. 2015).

Une surexpression du SDC-1 a été retrouvée dans des biopsies hépatiques de patients atteints d'un CHC développé sur cirrhose (Regős et al. 2020). L'expression génique et tissulaire du GPC-3 est beaucoup plus élevée dans les petits CHC que dans la cirrhose (Tangkijvanich et al. 2010). De plus, une méta-analyse de 15 études incluant 2336 cas de CHC, a montré une association entre la surexpression tissulaire du GPC-3, par marquage immunohistochimique sur des biopsies hépatiques, à des caractéristiques histologiques tumorales agressives, à la progression de la tumeur, à des métastases et à une survie globale plus faible (H. Liu et al. 2018). Toutefois, la biopsie hépatique s'inscrit dans une procédure de diagnostic invasif, associée parfois à des complications, telles que des hémorragies intrahépatiques et une dissémination tumorale dans la circulation sanguine périphérique (Louha et al. 1999; EASL 2018b). Ainsi, le développement de nouvelles méthodes de diagnostic basées sur l'utilisation de biomarqueurs sériques associés à l'imagerie, permettrait d'éviter toute complication liée à la biopsie et pourrait être un outil de diagnostic rapide et moins coûteux que la biopsie.

En 2013, notre équipe de recherche a montré que le taux sérique du SDC-1, à une valeur supérieure à 50 ng/mL, est associé à un risque élevé de récurrence tumorale chez les patients atteints de CHC précoce traités par ablation par radiofréquence. De plus, chez les patients atteints d'un CHC avancé, les taux sériques du SDC-1 ont été associés de manière

significative à un mauvais pronostic (Nault et al. 2013). Une autre méta-analyse incluant 19 études a révélé une sensibilité supérieure du taux sérique du GPC-3 pour le diagnostic du CHC (sensibilité de 55 % ; spécificité de 84%) par rapport à l'AFP (sensibilité de 35% ; spécificité de 88%) (Chia, Wong, et Luk 2019). Dans cette méta-analyse, l'étude du pouvoir diagnostique du GPC-3 pour le CHC précoce a révélé une sensibilité de 97% (Chia, Wong, et Luk 2019).

Au niveau extracellulaire, les chaînes HS peuvent subir des modifications structurales par différentes enzymes, dont l'activité et l'expression ont été associées à la progression du cancer. En vertu de la capacité des enzymes SULF-1 et SULF-2 à cliver le groupement 6-O-sulfate donc à modifier la charge globale des chaînes HS, ces enzymes modulent de nombreuses voies de signalisation, telles que la voie Wnt/ β -Caténine (qui joue un rôle central dans la cancérogenèse hépatique), en libérant les ligands séquestrés par les HSPG (Wnt dans ce cas) (R. Pang et al. 2004; Singer et al. 2015). L'expression génique et tissulaire de SULF-1, analysées sur des biopsies, est diminuée dans 75% des cancers de l'ovaire (Narita et al. 2006). De manière similaire, une abolition de l'expression de SULF-1 a été retrouvée dans les lignées de cellules cancéreuses dérivées du CHC (J. Lai et al. 2003). En revanche, SULF-2 est retrouvée surexprimée dans des biopsies de CHC et dans d'autres types de cancer tels que le cancer de l'œsophage et l'adénocarcinome du canal pancréatique (J.-P. Lai et al. 2010; Lui et al. 2012; Alhasan et al. 2016).

L'HPSE est capable de cliver les chaînes HS en fragments d'environ 5-7 kDa, composés de 10 à 20 unités saccharidiques (I. Vlodavsky et Friedmann 2001a; Gingis-Velitski et al. 2004). La libération de ces fragments de chaînes HS liés à des HBP tels que le HGF et le VEGF, favorisent la fixation de ces derniers à leurs récepteurs à la surface cellulaire, activant ainsi des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et l'angiogenèse (Coombe et Gandhi 2019). Une augmentation de l'expression de l'HPSE est retrouvée dans le cancer du poumon non à petites cellules et est en corrélation avec l'apparition de métastases ganglionnaires (Fernandes dos Santos et al. 2014). De manière similaire, une augmentation de l'expression de l'HPSE a été retrouvée dans les lignées de cellules cancéreuses dérivées du CHC (X.-P. Chen et al. 2015).

Ainsi, dans mes travaux de thèse, nous souhaitons évaluer l'association potentielle entre les niveaux circulants du SDC-1, du GPC-3, et des enzymes SULF-1, SULF-2 et HPSE avec l'apparition d'un CHC chez 287 patients atteints de cirrhose alcoolique. Ces patients

étaient suivis pour un dépistage prospectif du CHC puis classés selon l'absence ou la présence d'un CHC précoce ou avancé à la date d'inclusion. Cette même cohorte de patients avait été incluse dans l'étude publiée en 2013 par notre équipe de recherche (Nault et al. 2013).

Seules quelques études ont évalué les taux sériques de l'enzyme SULF-2 dans les maladies hépatiques. Une première étude a observé une augmentation significative du taux sérique de SULF-2 chez des patients atteints de cirrhose, avec cependant de faibles effectifs de patients : n=19 VHC et n=15 liée à l'alcool par rapport aux "sujets sains" (volontaires) (n=37) (Singer et al. 2015). Dans cette étude, utilisant un kit ELISA "maison", Singer et ses collaborateurs ont observé une augmentation d'environ 50% entre les valeurs médianes de SULF-2 sérique dans le groupe de patients cirrhotiques par rapport au groupe de sujets sains (1050 pg/mL vs 703 pg/mL). Parmi les patients atteints de cirrhose, les valeurs médianes de SULF-2 sérique des patients atteints de cirrhose alcoolique (1010 pg/mL) et des patients atteints de cirrhose liée au VHC (1100 pg/mL) présentaient une augmentation similaire par rapport aux sujets sains (Singer et al. 2015).

Notre étude n'inclut pas de sujets sains puisque tous les patients inclus dans notre cohorte d'étude sont cirrhotiques. Les résultats que j'ai obtenus montrent que les niveaux sériques de SULF-2 sont associés au score de Child-Pugh, estimant le degré de sévérité de la cirrhose. Ces résultats ont également montré une augmentation significative du taux de SULF-2 (supérieur à 65 ng/mL) dans le sérum des patients avec un CHC avancé. De manière cohérente avec notre étude, Zaghoul et ses collaborateurs ont observé une augmentation du taux sérique de SULF-2 chez les patients atteints de CHC comparativement aux patients atteints de cirrhose (Zaghloul et al. 2015). Comme les taux sériques de cette enzyme ne sont pas élevés chez les patients atteints de CHC précoce, elle ne semble pas utile à des fins de diagnostic. En effet, le diagnostic du CHC précoce est le paramètre le plus pertinent sur le plan clinique, car jusqu'à présent, seul ce sous-groupe de patients peut bénéficier d'un traitement curatif (A. Huang et al. 2020).

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que l'augmentation du taux sérique de SULF-2 (> 65ng/mL) a une valeur pronostique chez les patients atteints de cirrhose alcoolique, en particulier, une durée de survie plus courte chez les patients atteints de CHC avancé. Les niveaux circulants de SULF-2 sont en effet associés au score de Child-Pugh C et prédisent le risque de décès à court terme. A l'exception de notre étude et à l'heure actuelle, seules les

études portant sur l'expression de SULF-2 par immunohistochimie ont révélé une valeur pronostique de cette enzyme dans le CHC et dans d'autres types de cancer tels que le cancer de l'œsophage et l'adénocarcinome du canal pancréatique (J.-P. Lai et al. 2010; Lui et al. 2012; Alhasan et al. 2016).

Alhasan et ses collaborateurs ont évalué la valeur pronostique de SULF-2 dans une cohorte de 93 patients ayant subi une résection d'adénocarcinome du canal pancréatique et ont observé une augmentation de l'expression de SULF-2, par immunohistochimie, au niveau des biopsies. Ainsi, dans cette étude SULF-2 a été proposé comme un biomarqueur de mauvais pronostic, lié au stade de la tumeur, à l'invasion vasculaire et à la diminution de la survie globale (Alhasan et al. 2016).

Dans notre étude, nos résultats semblent caractériser le taux sérique de SULF-2 plutôt comme un marqueur de sévérité des lésions hépatiques que comme un marqueur de CHC. Dans le but de connaître l'origine tissulaire et cellulaire de l'enzyme SULF-2 retrouvée dans le sérum, il serait intéressant de corrélérer le taux sérique de cette enzyme à son expression tissulaire dans le foie par immunohistochimie dans des biopsies hépatiques.

Les fonctions de SULF-2 en tant qu'enzyme de modification des chaînes HS et la présence des HSPG au niveau de la membrane cellulaire sont très liées. Une étude a montré que la surexpression de SULF-2 par des outils moléculaires (vecteurs plasmidiques) à la fois *in vitro* sur une lignée cellulaire d'hépatome humain (Hep3B) et *in vivo* en utilisant un modèle de xénogreffe, induit une augmentation de l'expression du GPC-3 (J.-P. Lai et al. 2008).

Dans notre étude, nous avons observé une modeste corrélation positive entre les taux sériques de SULF-2, GPC-3 et SDC-1. L'étude de la valeur pronostique du taux sérique de SULF-2 en association avec le taux sérique du SDC-1 et du GPC-3 a montré que la combinaison des valeurs sériques supérieures à la médiane de ces trois biomarqueurs (SULF2 >65,2 ng/mL, GPC-3 >2,5 ng/mL et SDC-1 >50 ng/mL) était associée à un fort risque de décès chez les patients atteints de CHC avancé. De plus, les niveaux sériques de SULF-2 semblent rester discriminants si l'on prend en compte séparément les sous-groupes de patients ayant un taux sérique élevé de GPC-3 ($p=0,0699$) ou de SDC-1 ($p=0,0414$), ce qui confirme que SULF-2, en combinaison avec le GPC-3 et le SDC-1, possède une valeur pronostique supplémentaire en tant que biomarqueur dans le CHC avancé.

La valeur diagnostique et pronostique des enzymes SULF-1 et HPSE doit être étudiée en parallèle dans le CHC. Malheureusement, durant ma thèse, je n'ai pas pu valider l'utilisation des kits ELISA (anti-HPSE LS-F21251 et anti-SULF-1 LS-F8340, LS-Bio), en raison de la non proportionnalité de la gamme d'étalonnage et l'utilisation des kits (anti-SULF-1 SEH108Hu et anti-HPSE SEA711Hu (Clone-Cloud Corp)) en raison de la non linéarité des dilutions de sérum. A ce jour, aucune étude incluant le dosage de l'enzyme SULF-1 au niveau sérique n'a été publiée. Nous avons également essayé de mettre au point le dosage de l'activité enzymatique de l'HPSE dans le sérum des patients avec le kit "heparan degrading enzyme assay" (MK412, TAKARA Bio). Ce kit est basé sur la propriété des chaînes HS biotinylées à se lier au FGF fixé à une surface (plaque 96 puits). Lorsque les chaînes HS sont dégradées par l'HPSE, elles perdent la capacité de liaison au FGF. Ainsi, l'activité enzymatique de l'HPSE est quantifiée, de manière indirecte, en comparant la quantité de chaînes HS, non clivées, liées au FGF par rapport à un échantillon contrôle sans HPSE. La détection se fait par une méthode colorimétrique utilisant la biotine des chaînes HS comme substrat. Malheureusement, l'activité de l'HPSE n'a pas été détectée dans le sérum des patients.

De nombreuses études ont montré qu'en plus de la modification de l'expression des HSPG, la composition disaccharidique des chaînes HS est très dynamiques et varie considérablement selon le type cellulaire exprimant ces chaînes HS et les conditions physiopathologiques. Ceci est particulièrement bien démontré pour les disaccharides 6-O-sulfatés qui subissent des changements structurels significatifs dans des processus physiologiques tels que le vieillissement, ainsi que dans des pathologies telles que le cancer.

Par exemple, il a été montré que le vieillissement était associé à des changements dans l'expression et la structure des chaînes HS du myocarde chez le rat. En effet la quantification et l'analyse disaccharidique des chaînes HS extraites à partir du ventricule gauche de rats de 4 et 24 mois a montré que la quantité des chaînes HS augmente avec le vieillissement, passant de 406 ng/mg de tissu à 4 mois à 534 ng/mg à 24 mois. Parmi les disaccharides monosulfatés, une diminution significative des disaccharide N-sulfatés [Δ UA-GlcNS] et 2-Osulfatés [Δ UA(2S)-GlcNAc] a été observée. En revanche, ils observent une augmentation importante des disaccharides 6-O-sulfatés [Δ UA-GlcNAc(6S)] (Huynh et al. 2012).

Pour ce qui est des études sur le cancer, il a par exemple été montré avec une analyse structurale des chaînes HS dans une lignée d'adénome du côlon humain que la progression de l'adénome vers le carcinome (induite chimiquement *in vitro*) est associée à une diminution des unités saccharidiques 2-O-sulfatées de 33% [Δ UA(2S)-GlcNAc] et N-sulfatées de 20% [Δ UA(2S)-GlcNS] et une augmentation des unités saccharidiques 6-O-sulfatées de 24% (Jayson et al. 1998).

Ces modifications structurelles modulent les propriétés de liaison des chaînes HS avec de nombreux ligands (HBP), ayant ainsi de grandes conséquences sur l'évolution des pathologies (El Masri et al. 2020).

Le microenvironnement inflammatoire joue un rôle essentiel dans la prolifération et l'invasion tumorale de divers cancers, dont le CHC, et est associé à un mauvais pronostic (Michalaki et al. 2004; Charles et al. 2009; Jang et al. 2012). Parmi les facteurs sécrétés par les cellules associées à ce microenvironnement, le TNF- α a été identifié comme un médiateur clé de l'inflammation régulant le microenvironnement tumoral et donc, la progression tumorale (Brenner, Blaser, et Mak 2015). Il a été montré que le TNF- α est surexprimé dans le CHC par rapport au foie sain et il est élevé dans le sérum des patients atteints de CHC (Y. S. Huang et al. 1999 ; X.-L. Liu et al. 2013). A ce jour, l'impact d'un environnement inflammatoire sur les caractéristiques aux plans qualitatif et quantitatif des chaînes HS dans le CHC n'est pas connu. Ainsi, nous avons étudié dans un modèle d'hépatome humain (Huh7) les effets du TNF- α sur l'expression des enzymes de biosynthèse et de modification des chaînes HS et leurs conséquences sur les caractéristiques de ces chaînes HS.

Nos résultats montrent que le TNF- α est associé à une augmentation de la quantité totale des chaînes HS de près d'un facteur 3, passant de 130,31 à 381,24 ng/million de cellules dans les cellules Huh7, mais n'a aucun effet sur l'expression des chaînes HS membranaires mises en évidence par un anticorps anti-HS (clone 10E4), spécifique du groupement NS sur les chaînes HS. Parallèlement, le TNF- α n'a aucun effet sur l'expression membranaire du SDC-1 et du SDC-4 (HSPG majeurs de notre modèle cellulaire). En revanche, on observe une augmentation des niveaux protéiques intracellulaires du SDC-1 et SDC-4 qui est associée à une diminution du clivage « shedding » de l'ectodomaine de ces deux HSPG due à une régulation négative de l'activité de la MMP-2 et MMP-9 associée à ce traitement par le TNF- α . Nous avons ensuite émis l'hypothèse que l'augmentation du SDC-1 et du SDC-4 au niveau

intracellulaire est due à leur endocytose, ce qui pourrait suggérer que l'augmentation de la quantité des chaînes HS est plutôt intracellulaire. Ainsi, pour confirmer cette hypothèse, les cellules Huh7 ont été traitées au TNF- α avec ou sans inhibiteurs d'endocytose, à savoir le dynasore, un inhibiteur de la dynamine essentielle à l'endocytose médiée par la clathrine, la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, qui bloque à la fois la phagocytose et la macropinocytose dépendantes de l'actine, et la filipine, un inhibiteur de l'endocytose médiée par les cavéoles.

Nos résultats montrent que le TNF- α induit l'internalisation du SDC-1 par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine et l'internalisation du SDC-4 totalement par macropinocytose dépendante de l'actine comparativement aux cellules non traitées où l'internalisation du SDC-4 est médiée partiellement par une voie d'endocytose dépendante de la clathrine et principalement par macropinocytose dépendante de l'actine.

Il semblerait que le processus d'endocytose des HSPG dépend davantage du ligand extracellulaire qui s'y fixe que du type d'HSPG, ce qui explique pourquoi l'endocytose des HSPG n'est pas confinée à une seule voie (Mandarini et al. 2020). En effet, il a été montré que la fixation du FGF-2 aux chaînes HS du SDC-4 permet la formation d'un complexe ternaire SDC-4/FGF/FGFR qui peut être internalisé par macropinocytose (voie majoritaire) et par endocytose clathrine-dépendante (voie minoritaire). L'internalisation de ce complexe ternaire est à l'origine de l'activation de la voie de signalisation MAPK dépendante du FGFR depuis l'endosome (Elfenbein et al. 2012; Elfenbein et Simons 2013). Le SDC-4 a également été impliqué dans la régulation de l'internalisation de l'intégrine- β 1 par une voie d'endocytose médiée par la clathrine et les cavéoles dans le contexte de la cicatrisation (Elfenbein et Simons 2013). Il est donc probable que le SDC-4 puisse affecter plusieurs voies d'endocytose, en fonction du signal en amont c'est-à-dire du type de HBP se liant aux chaînes HS du SDC-4 (Elfenbein et Simons 2013). Zong et ses collaborateurs ont montré que le SDC-1 et le FGF-2 sont colocalisés avec l'HPSE dans le noyau des cellules tumorales mésenchymateuses, pouvant jouer un rôle dans la prolifération et l'invasion tumorale (Zong et al. 2009). Il reste tout de même important d'identifier le rôle du SDC-1 et du SDC-4 au niveau intracellulaire (après internalisation) dans notre modèle cellulaire Huh7.

Dans notre étude, l'analyse de la composition saccharidique des chaînes HS par La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à de la fluorescence,

une méthode quantitative hautement sensible et précise, a révélé que le TNF- α affecte la structure des chaînes HS dans les cellules Huh7. En effet, on retrouve une diminution de 8,5 fois du pourcentage des disaccharides non sulfatés N-acétylés [Δ UA-GlcNAc] et une très légère augmentation du pourcentage des disaccharides monosulfatés [Δ UA-GlcNS] de 2%, avec une augmentation plus marquée de 1,8 fois des [Δ UA-GlcNAc(6S)], une augmentation de 2 fois des disaccharides disulfatés [Δ UA-GlcNS(6S)], avec une apparition minimale des disaccharides [Δ UA(2S)-GlcNAc(6S)] (absents dans les cellules non traitées) et enfin une augmentation de 2,3 fois des disaccharides trisulfatés [Δ UA(2S)-GlcNAc(6S)]. Ces disaccharides trisulfatés se trouvent essentiellement dans les domaines hautement sulfatés (domaines S) des chaînes HS et sont très abondants dans l'héparine (Uchimura et al. 2006).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'augmentation de la quantité totale des chaînes HS s'accompagne de changements structurels impliquant une augmentation de la 6-O-sulfatation (~30%), de la N-sulfatation (~25%) et de la 2-O-sulfatation (~18%), avec une sulfatation globale de ces chaînes plus élevée d'environ 75%. En accord avec nos résultats, il a été décrit précédemment une augmentation des motifs saccharidiques sulfatés (N-, 3-O-, 2-O- et 6-O-sulfatés) sur les chaînes HS dans les biopsies de CHC (mis en évidence par anticorps) (Tátrai et al. 2010). Cependant, dans 5 biopsies de CHC sur 7, une modeste diminution de la 6-O-sulfatation des chaînes HS, comparativement aux biopsies de foie sain, a été mise en évidence par HPLC (Tátrai et al. 2010).

Les SULFs catalysent la 6-O-désulfatation des chaînes HS avec une forte préférence pour les disaccharides trisulfatés [Δ UA(2S)-GlcNS(6S)] (Uchimura et al. 2006). De manière intéressante, l'analyse de l'expression génique de *SULF-2* a montré que le TNF- α induit une diminution de l'expression de l'enzyme en ARNm de 17%, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la 6-O-sulfatation des chaînes HS dans les cellules Huh7. Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre au point l'étude de l'expression protéique de l'enzyme SULF-2 par western blot avec les différents anticorps anti-SULF-2 commercialisés (Anticorps anti-SULF-2 (clone 8G1, MABC-586) Merck Millipore, anticorps anti-SULF-2 (clone G-4, sc-271772) Santa Cruz Biotechnology et anticorps anti-SULF-2 (ab232835) Abcam). Le manque de spécificité des anticorps induit un marquage semblable à une coloration des protéines au rouge Ponceau.

En ce qui concerne l'expression génique de *SULF-1*, Lai et ses collaborateurs ont montré que son expression est abolie dans les lignées d'hépatome humain Huh7, HepG2 et Hep3B (J. P. Lai et al. 2008). Ce résultat a été confirmé par qRT-PCR dans notre modèle cellulaire Huh7 où on ne retrouve aucune amplification génique de *SULF-1*.

La 3-O-sulfatation est la dernière étape dans la maturation des chaînes HS au cours de leur biosynthèse. Elle est relativement rare et représente généralement moins de 1 % du total des unités disaccharidiques (Mochizuki et al. 2020). Tátrai et ses collaborateurs ont mis en évidence, par immunomarquage, une augmentation de l'épitope 3-O-sulfaté sur les biopsies de CHC (Tátrai et al. 2010). Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de motifs saccharidiques 3-O-sulfatés sur les disaccharides analysés par HPLC car les standards 3-O-sulfatés ne sont pas commercialisés. De plus, lors de la préparation des échantillons à analyser par HPLC, l'utilisation d'un mélange de trois lyases (héparinase, héparitinase I et héparitinase II) permet la digestion des chaînes HS presque entièrement en disaccharides, à l'exception de liaison glucosaminidique adjacente aux unités [GlcA-GlcNS(3S) ± (6S)]. Les motifs saccharidiques 3-O-sulfatés résistent à la digestion et donnent des tétrasaccharides insaturés (Mochizuki et al. 2020). Seule l'enzyme HPSE clive la liaison glucuronidique des unités [GlcA-GlcNS(3S) ± (6S)] dans l'extrémité réductrice de la chaîne HS et libère les monosaccharides GlcNS(3S) ± (6S). Le GlcA non sulfaté est un résidu essentiel dans la réaction de clivage (Mochizuki et al. 2020). Dans notre modèle cellulaire, le TNF- α induit une augmentation de l'expression génique de l'*HPSE* de 1,9 fois. De manière similaire, une augmentation de l'ARNm de l'*HPSE* d'un facteur 2 a été retrouvée dans les biopsies de CHC comparativement au foie sain (Tátrai et al. 2010).

Enfin, en ce qui concerne l'élongation des chaînes HS qui est une étape importante de la biosynthèse des HSPG avec notamment l'intervention des enzymes EXT1 et EXT2. Cette dernière est régulée par plusieurs mécanismes, y compris des changements dans les niveaux d'expression des gènes (Annaval et al. 2020). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que les modifications des chaînes d'HS induites par le TNF- α pouvaient être liées à l'effet de la cytokine sur l'expression génique des enzymes impliquées dans la biosynthèse et la modification des HS. Notre étude a démontré que le TNF- α induit une augmentation de l'expression génique des enzymes *EXT-1*, *EXT-2*, *NDST-1* et *NDST-2*, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la quantité de chaînes HS dans les cellules Huh7 traitées par le TNF- α . Il serait intéressant d'étudier l'expression génique des enzymes O-sulfotransférases

impliquées dans la O-sulfatation des chaînes HS au cours de leur biosynthèse. Ce travail sera poursuivi en collaboration avec l'équipe du Pr Fabrice Allain à Lille.

Dans la continuité de ce travail, il serait utile de compléter notre étude par la mise en évidence de la localisation plus précise des chaînes HS au niveau cellulaire par immunocytochimie. Pour cela, nous pourrions utiliser des anticorps ciblant différents groupements sulfate (N-, 3-O-, 2-O- et 6-O-sulfate). Pour cela, il serait judicieux d'initier une collaboration avec l'équipe du Pr Toin H. van Kuppervelt (Nijmegen, Pays-Bas) qui a développé l'anticorps HS3A8 (ciblant les groupements N-, 2-O et 6-O-sulfate), l'anticorps HS4C3 (ciblant, en plus des autres groupements, le groupement 3-O-sulfate) et l'anticorps contrôle MPB49. Il serait également intéressant de faire mise au point d'extraction et de dosage des chaînes HS membranaires, intracellulaires et matricielles (par fractionnement) et d'étudier leur structure par HPLC qui est une méthode plus précise que l'utilisation des anticorps ciblant les différents groupements sulfate. Par la suite, il serait envisageable d'étudier l'affinité de liaison des chaînes HS aux HBP, telles que les chimiokines CXCL12 et CCL5, par résonance plasmonique de surface (SPR, Biacore). En effet, les études précédentes de notre laboratoire ont montré que les chimiokines CXCL12 et CCL5 exerçaient des effets biologiques pro-tumoraux dans un modèle de cellules d'hépatome humain (Sutton, Friand, Brulé-Donneger, et al. 2007; Sutton, Friand, Papy-Garcia, et al. 2007). Nous avons effectué cette expérience de Biacore sur les GAGs totaux extraits à partir des cellules Huh7 traitées ou non au TNF- α par dialyse, une méthode d'extraction décrite par Barbosa et ses collaborateurs (Barbosa et al. 2003). Malheureusement, la fixation des GAGs à la chimiokine CXCL12 (nécessitant la présence de groupements 6-O-sulfate au niveau des unités saccharidiques des chaînes HS) n'est pas reproductible en raison de la présence de Na⁺ (issu du NaCl, indispensable à l'extraction) associé aux GAGs. L'extraction des GAG par dialyse ne garantit pas un degré de pureté élevé comparativement aux colonnes de chromatographies échangeuses d'anions (utilisées pour l'HPLC). Nous envisageons donc de renouveler cette expérience d'extraction de GAG à partir de cellules d'hépatome humain traitées ou non avec du TNF- α par chromatographie échangeuse d'anions puis de mesurer leurs affinités pour les chimiokines par SPR.

Sur le plan clinique, l'étude de la quantité des chaînes HS et leur structure disaccharidique sur des biopsies de foie à différents stades de la maladie hépatique et pour différentes étiologies pourrait aider à mettre en évidence le rôle fonctionnel des chaînes HS

dans le développement et la progression du CHC en prenant en compte l'étiologie, car les mécanismes moléculaires des lésions hépatiques déclenchant les maladies hépatiques chroniques ne sont pas les mêmes. Il reste tout aussi important d'associer ces données à l'expression tissulaire et aux concentrations sériques des HSPG et des enzymes de modifications des chaînes HS.

A terme, ce projet pourrait déboucher sur le développement de thérapies innovantes, basées sur l'utilisation de mimétiques de GAG de synthèse, désignés avec des longueurs et des motifs de sulfatation variables en fonction du stade et de l'étiologie de la maladie hépatique à traiter, ciblant les enzymes de modification des chaînes HS ou les HBP qui jouent un rôle clé dans les processus tumoraux.

Pour conclure :

Sur le plan fondamental, ces travaux de thèse mettent en évidence que le TNF- α est impliqué dans la régulation de l'expression des enzymes de biosynthèse et de modification des chaînes HS dans un modèle d'hépatome humain Huh7, ayant pour conséquence une modification structurale des chaînes HS, une augmentation de la quantité des chaînes HS intracellulaires qui serait associée à une internalisation du SDC-1 et du SDC-4, dont le rôle, lié aux mécanismes de cancérogenèse hépatique, reste à déterminer au niveau cellulaire.

Sur le plan bioclinique, l'étude du potentiel diagnostique et pronostique de l'enzyme SULF-2 dans le sérum des patients atteints de cirrhose alcoolique avec ou sans CHC, a montré que l'augmentation du taux sérique de SULF-2 a une valeur pronostique chez les patients atteints de cirrhose alcoolique, en particulier, une durée de survie plus courte chez les patients atteints de CHC avancé. Ainsi, notre étude a permis de caractériser le taux sérique de SULF-2 plutôt comme un marqueur de sévérité des lésions hépatiques que comme un marqueur de CHC.

Ainsi, ces travaux de thèse permettent d'ouvrir des perspectives sur l'utilisation des HSPG et des enzymes de modifications des chaînes HS, en association avec les facteurs de risque génétiques, comme des outils de diagnostic et de pronostic du CHC et comme cibles thérapeutiques dans le traitement du CHC.

REFERENCES

- Abd El-Kader, Shehab M, et Eman M Salah El-Den Ashmawy. 2015. « Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management ». *World Journal of Hepatology* 7 (6): 846-58. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i6.846>.
- Addolorato, Giovanni, Ludovico Abenavoli, Marcello Dallio, Alessandro Federico, Giacomo Germani, Stefano Gitto, Gioacchino Leandro, Carmelina Loguercio, Fabio Marra, et Elisa Stasi. 2020. « Alcohol Associated Liver Disease 2020: A Clinical Practice Guideline by the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) ». *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 52 (4): 374-91. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.12.008>.
- Ai, Xingbin, Anh-Tri Do, Olga Lozynska, Marion Kusche-Gullberg, Ulf Lindahl, et Charles P. Emerson. 2003. « QSulf1 Remodels the 6-O Sulfation States of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans to Promote Wnt Signaling ». *The Journal of Cell Biology* 162 (2): 341-51. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212083>.
- Alexander, Caroline M., Frieda Reichsman, Michael T. Hinkes, John Lincecum, Klaus A. Becker, Susan Cumberledge, et Merton Bernfield. 2000. « Syndecan-1 Is Required for Wnt-1-Induced Mammary Tumorigenesis in Mice ». *Nature Genetics* 25 (3): 329-32. <https://doi.org/10.1038/77108>.
- Alhasan, Sari F, Beate Haugk, Laura F Ogle, Gary S Beale, Anna Long, Alastair D Burt, Dina Tiniakos, et al. 2016. « Sulfatase-2: a prognostic biomarker and candidate therapeutic target in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma ». *British Journal of Cancer* 115 (7): 797-804. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.264>.
- Almpanis, Zannis, Maria Demonakou, et Dina Tiniakos. 2016. « Evaluation of Liver Fibrosis: “Something Old, Something New...” ». *Annals of Gastroenterology* 29 (4): 445-53. <https://doi.org/10.20524/aog.2016.0046>.
- Annaval, Thibault, Rebekka Wild, Yoann Créton, Rabia Sadir, Romain R. Vivès, et Hugues Lortat-Jacob. 2020. « Heparan Sulfate Proteoglycans Biosynthesis and Post Synthesis Mechanisms Combine Few Enzymes and Few Core Proteins to Generate Extensive Structural and Functional Diversity ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184215>.
- Asselah, T., I. Bièche, A. Sabbagh, P. Bedossa, R. Moreau, D. Valla, M. Vidaud, et P. Marcellin. 2009. « Gene Expression and Hepatitis C Virus Infection ». *Gut* 58 (6): 846-58. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.166348>.
- Ayuso, Carmen, Jordi Rimola, Ramón Vilana, Marta Burrel, Anna Darnell, Ángeles García-Criado, Luis Bianchi, et al. 2018. « Diagnosis and Staging of Hepatocellular Carcinoma (HCC): Current Guidelines ». *European Journal of Radiology* 101 (avril): 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.01.025>.
- Barbosa, Isabelle, Stéphanie Garcia, Véronique Barbier-Chassefière, Jean-Pierre Caruelle, Isabelle Martelly, et Dulce Papy-García. 2003. « Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies ». *Glycobiology* 13 (9): 647-53. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg082>.

- Barbujani, G., A. Magagni, E. Minch, et L. L. Cavalli-Sforza. 1997. « An Apportionment of Human DNA Diversity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9): 4516-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4516>.
- Bedossa, P., et T. Poynard. 1996. « An Algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 24 (2): 289-93. <https://doi.org/10.1002/hep.510240201>.
- Bellin, Robert, Ishan Capila, John Lincecum, Pyong Woo Park, Ofer Reizes, et Merton R. Bernfield. 2002. « Unlocking the Secrets of Syndecans: Transgenic Organisms as a Potential Key ». *Glycoconjugate Journal* 19 (4): 295-304. <https://doi.org/10.1023/A:1025352501148>.
- Bezakova, Gabriela, et Markus A. Ruegg. 2003. « New Insights into the Roles of Agrin ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (4): 295-309. <https://doi.org/10.1038/nrm1074>.
- Bierbaum, S. 2017. « 2.8 Artificial Extracellular Matrices to Functionalize Biomaterial Surfaces ». In . <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10206-1>.
- Binch, Abbie L. A., Irving M. Shapiro, et Makarand V. Risbud. 2016. « Syndecan-4 in Intervertebral Disc and Cartilage: Saint or Synner? ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 52-54 (juillet): 355-62. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.005>.
- Bosse, Kristopher R., Pichai Raman, Zhongyu Zhu, Maria Lane, Daniel Martinez, Sabine Heitzeneder, Komal S. Rathi, et al. 2017. « Identification of GPC2 as an Oncoprotein and Candidate Immunotherapeutic Target in High-Risk Neuroblastoma ». *Cancer Cell* 32 (3): 295-309.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.003>.
- Bradbury, Michael W., et Paul D. Berk. 2004. « Lipid Metabolism in Hepatic Steatosis ». *Clinics in Liver Disease* 8 (3): 639-71, xi. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.04.005>.
- Brenner, Dirk, Heiko Blaser, et Tak W. Mak. 2015. « Regulation of Tumour Necrosis Factor Signalling: Live or Let Die ». *Nature Reviews. Immunology* 15 (6): 362-74. <https://doi.org/10.1038/nri3834>.
- Bril, Fernando, Michael J. McPhaul, Michael P. Caulfield, Jean-Marie Castille, Thierry Poynard, Consuelo Soldevila-Pico, Virginia C. Clark, Roberto J. Firpi-Morell, Jinping Lai, et Kenneth Cusi. 2019. « Performance of the SteatoTest, ActiTest, NashTest and FibroTest in a Multiethnic Cohort of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus ». *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 67 (2): 303-11. <https://doi.org/10.1136/jim-2018-000864>.
- Brunt, Elizabeth M., Vincent W.-S. Wong, Valerio Nobili, Christopher P. Day, Silvia Sookoian, Jacquelyn J. Maher, Elisabetta Bugianesi, Claude B. Sirlin, Brent A. Neuschwander-Tetri, et Mary E. Rinella. 2015. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Nature Reviews. Disease Primers* 1 (décembre): 15080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.80>.
- Burgess, Robert W., William C. Skarnes, et Joshua R. Sanes. 2000. « Agrin Isoforms with Distinct Amino Termini Differential Expression, Localization, and Function ». *Journal of Cell Biology* 151 (1): 41-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.1.41>.
- Busse, Marta, Almir Feta, Jenny Presto, Maria Wilén, Mona Grønning, Lena Kjellén, et Marion Kusche-Gullberg. 2007. « Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to Heparan Sulfate Chain Elongation ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (45): 32802-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703560200>.

- Buzzetti, Elena, Massimo Pinzani, et Emmanuel A. Tsochatzis. 2016. « The Multiple-Hit Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 65 (8): 1038-48. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.
- Caddeo, Andrea, Oveis Jamialahmadi, Giovanni Solinas, Arturo Pujia, Rosellina Margherita Mancina, Piero Pingitore, et Stefano Romeo. 2019. « MBOAT7 Is Anchored to Endomembranes by Six Transmembrane Domains ». *Journal of Structural Biology* 206 (3): 349-60. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.04.006>.
- Cadier, Benjamin, Julie Bulsei, Pierre Nahon, Olivier Seror, Alexis Laurent, Isabelle Rosa, Richard Layese, et al. 2017. « Early Detection and Curative Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Cost-Effectiveness Analysis in France and in the United States ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 65 (4): 1237-48. <https://doi.org/10.1002/hep.28961>.
- Calderaro, Julien, Léa Meunier, Cong Trung Nguyen, Marouane Boubaya, Stefano Caruso, Alain Luciani, Giuliana Amadeo, et al. 2019. « ESM1 as a Marker of Macrotrabecular-Massive Hepatocellular Carcinoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25 (19): 5859-65. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0859>.
- Capurro, Mariana I., Yun-Yan Xiang, Corrinne Lobe, et Jorge Filmus. 2005. « Glypican-3 Promotes the Growth of Hepatocellular Carcinoma by Stimulating Canonical Wnt Signaling ». *Cancer Research* 65 (14): 6245-54. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4244>.
- Cassinelli, Giuliana, Laura Dal Bo, Enrica Favini, Denis Cominetti, Sabina Pozzi, Monica Tortoreto, Michelandrea De Cesare, et al. 2018. « Supersulfated Low-Molecular Weight Heparin Synergizes with IGF1R/IR Inhibitor to Suppress Synovial Sarcoma Growth and Metastases ». *Cancer Letters* 415: 187-97. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.009>.
- Chakravarthy, Manu V., et Brent A. Neuschwander-Tetri. 2020. « The Metabolic Basis of Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Endocrinology, Diabetes & Metabolism* 3 (4): e00112. <https://doi.org/10.1002/edm2.112>.
- Chami, M., D. Gozuacik, K. Saigo, T. Capiod, P. Falson, H. Lecoeur, T. Urashima, et al. 2000. « Hepatitis B Virus-Related Insertional Mutagenesis Implicates SERCA1 Gene in the Control of Apoptosis ». *Oncogene* 19 (25): 2877-86. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203605>.
- Charles, Kellie A., Hagen Kulbe, Robin Soper, Monica Escorcio-Correia, Toby Lawrence, Anne Schultheis, Probir Chakravarty, et al. 2009. « The Tumor-Promoting Actions of TNF-Alpha Involve TNFR1 and IL-17 in Ovarian Cancer in Mice and Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (10): 3011-23. <https://doi.org/10.1172/JCI39065>.
- Charnaux, Nathalie, Séverine Brule, Morgan Hamon, Thomas Chaigneau, Line Saffar, Catherine Prost, Nicole Lievre, et Liliane Gattegno. 2005. « Syndecan-4 Is a Signaling Molecule for Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/ CXCL12 ». *The FEBS Journal* 272 (8): 1937-51. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04624.x>.
- Charni, Faten, Veronique Friand, Oualid Haddad, Hanna Hlawaty, Loïc Martin, Roger Vassy, Olivier Oudar, Liliane Gattegno, Nathalie Charnaux, et Angela Sutton. 2009. « Syndecan-1 and Syndecan-4 Are Involved in RANTES/CCL5-Induced Migration and Invasion of Human Hepatoma Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1790 (10): 1314-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.015>.

- Chen, Keyang, Ming-Lin Liu, Lana Schaffer, Mingzhen Li, Guenther Boden, Xiangdong Wu, et Kevin Jon Williams. 2010. « Type 2 Diabetes in Mice Induces Hepatic Overexpression of Sulfatase 2, a Novel Factor That Suppresses Uptake of Remnant Lipoproteins ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (6): 1957-67. <https://doi.org/10.1002/hep.23916>.
- Chen, Xiao-Peng, Jun-Sheng Luo, Ye Tian, Chen-Lin Nie, Wei Cui, et Wei-Dong Zhang. 2015. « Downregulation of Heparanase Expression Results in Suppression of Invasion, Migration, and Adhesion Abilities of Hepatocellular Carcinoma Cells ». *BioMed Research International* 2015: 241983. <https://doi.org/10.1155/2015/241983>.
- Chia, Tiong Sun, Kwong Fai Wong, et John M. Luk. 2019. « Molecular Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: Trends in Biomarkers Combination to Enhance Early Cancer Detection ». *Hepatoma Research* 5 (mars). <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2018.112>.
- Chung, Heesung, Hinke A. B. Multhaupt, Eok-Soo Oh, et John R. Couchman. 2016. « Minireview: Syndecans and Their Crucial Roles during Tissue Regeneration ». *FEBS Letters* 590 (15): 2408-17. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12280>.
- Colli, Agostino, Mirella Fraquelli, Giovanni Casazza, Sara Massironi, Alice Colucci, Dario Conte, et Piergiorgio Duca. 2006. « Accuracy of Ultrasonography, Spiral CT, Magnetic Resonance, and Alpha-Fetoprotein in Diagnosing Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review ». *The American Journal of Gastroenterology* 101 (3): 513-23. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00467.x>.
- Coombe, Deirdre R., et Neha S. Gandhi. 2019. « Heparanase: A Challenging Cancer Drug Target ». *Frontiers in Oncology* 9: 1316. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01316>.
- Costentin, Charlotte, Nathalie Ganne-Carrié, Benoit Rousseau, René Gérolami, et Jean-Claude Barbare. 2017. « [Care pathway of patients with hepatocellular carcinoma in France: State of play in 2017] ». *Bulletin Du Cancer* 104 (9): 752-61. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.06.008>.
- Cotter, Thomas G., et Mary Rinella. 2020. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease ». *Gastroenterology*, Nonalcoholic Fatty Liver Disease in 2020, 158 (7): 1851-64. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>.
- Delehedde, Maryse, Lucie Devenyns, Claude-Alain Maurage, et Romain R. Vivès. 2013. « Endocan in Cancers: A Lesson from a Circulating Dermatan Sulfate Proteoglycan ». *International Journal of Cell Biology* 2013 (mars): e705027. <https://doi.org/10.1155/2013/705027>.
- Derksen, P. W. B., D. J. J. de Gorter, H. P. Meijer, R. J. Bende, M. van Dijk, H. M. Lokhorst, A. C. Bloem, M. Spaargaren, et S. T. Pals. 2003. « The Hepatocyte Growth Factor/Met Pathway Controls Proliferation and Apoptosis in Multiple Myeloma ». *Leukemia* 17 (4): 764-74. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402875>.
- Diez-Roux, Graciana, et Andrea Ballabio. 2005. « Sulfatases and Human Disease ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6: 355-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162334>.
- Dowman, J. K., J. W. Tomlinson, et P. N. Newsome. 2010. « Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *QJM: An International Journal of Medicine* 103 (2): 71-83. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcp158>.
- Dudhia, J. 2005. « Aggrecan, Aging and Assembly in Articular Cartilage ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 62 (19): 2241-56. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5217-x>.

- Echtermeyer, F., M. Streit, S. Wilcox-Adelman, S. Saoncella, F. Denhez, M. Detmar, et P. Goetinck. 2001. « Delayed Wound Repair and Impaired Angiogenesis in Mice Lacking Syndecan-4 ». *The Journal of Clinical Investigation* 107 (2): R9-14. <https://doi.org/10.1172/JCI10559>.
- Edwards, Iris J. 2012. « Proteoglycans in Prostate Cancer ». *Nature Reviews. Urology* 9 (4): 196-206. <https://doi.org/10.1038/nruro.2012.19>.
- El Masri, Rana, Yoann Crétinon, Evelyne Gout, et Romain R. Vivès. 2020a. « HS and Inflammation: A Potential Playground for the Sulfs? » *Frontiers in Immunology* 11: 570. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00570>.
- El Masri, Rana, Amal Seffouh, Hugues Lortat-Jacob, et Romain R. Vivès. 2017a. « The “in and out” of Glucosamine 6-O-Sulfation: The 6th Sense of Heparan Sulfate ». *Glycoconjugate Journal* 34 (3): 285-98. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9736-5>.
- Elfenbein, Arye, Anthony Lanahan, Theresa X. Zhou, Alisa Yamasaki, Eugene Tkachenko, Michiyuki Matsuda, et Michael Simons. 2012. « Syndecan 4 Regulates FGFR1 Signaling in Endothelial Cells by Directing Macropinocytosis ». *Science signaling* 5 (223). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002495>.
- Elfenbein, Arye, et Michael Simons. 2013. « Syndecan-4 signaling at a glance ». *Journal of Cell Science* 126 (17): 3799-3804. <https://doi.org/10.1242/jcs.124636>.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu et European Association for the Study of the Liver. 2018a. « EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Hepatology* 69 (1): 182-236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>.
- . 2018b. « EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Alcohol-Related Liver Disease ». *Journal of Hepatology* 69 (1): 154-81. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.018>.
- Fernandes dos Santos, Teresa Cristina, Angélica Maciel Gomes, Marcos Eduardo Machado Paschoal, Mariana Paranhos Stelling, Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek, Alyson do Rosário Junior, Paulo Marcos Valiante, et al. 2014. « Heparanase Expression and Localization in Different Types of Human Lung Cancer ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (8): 2599-2608. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.010>.
- Ferrante, Nicole D., Anjana Pillai, et Amit G. Singal. 2020. « Update on the Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma ». *Gastroenterology & Hepatology* 16 (10): 506.
- Filmus, Jorge, et Mariana Capurro. 2014. « The Role of Glypicans in Hedgehog Signaling ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 35 (avril): 248-52. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.12.007>.
- Filmus, Jorge, Mariana Capurro, et Jonathan Rast. 2008. « Glypicans ». *Genome Biology* 9 (5): 224. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-224>.
- Fitzgerald, M. L., Z. Wang, P. W. Park, G. Murphy, et M. Bernfield. 2000. « Shedding of Syndecan-1 and -4 Ectodomains Is Regulated by Multiple Signaling Pathways and Mediated by a TIMP-3-Sensitive Metalloproteinase ». *The Journal of Cell Biology* 148 (4): 811-24. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.811>.
- Foley, Erin M., Philip L. S. M. Gordts, Kristin I. Stanford, Jon C. Gonzales, Roger Lawrence, Nicole Stoddard, et Jeffrey D. Esko. 2013. « Hepatic Remnant Lipoprotein Clearance by Heparan

- Sulfate Proteoglycans and Low-Density Lipoprotein Receptors Depend on Dietary Conditions in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (9): 2065-74. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301637>.
- Fransson, Lars-Åke. 2003. « Glypicans ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (2): 125-29. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00095-X).
- Friand, Veronique, Oualid Haddad, Dulce Papy-Garcia, Hanna Hlawaty, Roger Vassy, Yamina Hamma-Kourbali, Gerard-Yves Perret, et al. 2009. « Glycosaminoglycan Mimetics Inhibit SDF-1/CXCL12-Mediated Migration and Invasion of Human Hepatoma Cells ». *Glycobiology* 19 (12): 1511-24. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp130>.
- Friedman, Scott L., Brent A. Neuschwander-Tetri, Mary Rinella, et Arun J. Sanyal. 2018. « Mechanisms of NAFLD Development and Therapeutic Strategies ». *Nature Medicine* 24 (7): 908-22. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.
- Fries, Erik, et Anna M Blom. 2000. « Bikunin — Not Just a Plasma Proteinase Inhibitor ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32 (2): 125-37. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00125-9).
- Gallagher, John. 2015. « Fell-Muir Lecture: Heparan Sulphate and the Art of Cell Regulation: A Polymer Chain Conducts the Protein Orchestra ». *International Journal of Experimental Pathology* 96 (4): 203-31. <https://doi.org/10.1111/iep.12135>.
- Ganne-Carrié, Nathalie, et Pierre Nahon. 2019. « Hepatocellular Carcinoma in the Setting of Alcohol-Related Liver Disease ». *Journal of Hepatology, Current Trends in Alcohol-Related Liver Disease*, 70 (2): 284-93. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.008>.
- Gellert-Kristensen, Helene, Børge Grønne Nordestgaard, Anne Tybjaerg-Hansen, et Stefan Stender. 2020. « High Risk of Fatty Liver Disease Amplifies the Alanine Transaminase-Lowering Effect of a HSD17B13 Variant ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 71 (1): 56-66. <https://doi.org/10.1002/hep.30799>.
- Gingis-Velitski, Svetlana, Anna Zetser, Moshe Y. Flugelman, Israel Vlodavsky, et Neta Ilan. 2004. « Heparanase Induces Endothelial Cell Migration via Protein Kinase B/Akt Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (22): 23536-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400554200>.
- Goldshmidt, Orit, Eyal Zcharia, Rinat Abramovitch, Shula Metzger, Helena Aingorn, Yael Friedmann, Volker Schirmacher, Eduardo Mitrani, et Israel Vlodavsky. 2002. « Cell Surface Expression and Secretion of Heparanase Markedly Promote Tumor Angiogenesis and Metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15): 10031-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.152070599>.
- Gonzales, Jon C., Philip L. S. M. Gordts, Erin M. Foley, et Jeffrey D. Esko. 2013. « Apolipoproteins E and AV Mediate Lipoprotein Clearance by Hepatic Proteoglycans ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (6): 2742-51. <https://doi.org/10.1172/JCI67398>.
- Grgurevic, Ivica, Kristian Podrug, Ivana Mikolasevic, Michal Kukla, Anita Madir, et Emmanuel A. Tsochatzis. 2020. « Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Clinical Practice and an Individualized Approach ». *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2020: 9181368. <https://doi.org/10.1155/2020/9181368>.
- Grobe, Kay, Johan Ledin, Maria Ringvall, Katarina Holmborn, Erik Forsberg, Jeffrey D Esko, et Lena Kjellén. 2002. « Heparan Sulfate and Development: Differential Roles of the N-

- Acetylglucosamine N-Deacetylase/N-Sulfotransferase Isozymes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Developmental Glycobiology, 1573 (3): 209-15.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00386-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00386-0).
- Guo, Meng, Hailing Zhang, Jianming Zheng, et Yangfang Liu. 2020a. « Glypican-3: A New Target for Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Cancer* 11 (8): 2008-21.
- Guyot, Erwan, Angela Sutton, Pierre Rufat, Christelle Laguillier, Abdellah Mansouri, Richard Moreau, Nathalie Ganne-Carrié, et al. 2013. « PNPLA3 Rs738409, Hepatocellular Carcinoma Occurrence and Risk Model Prediction in Patients with Cirrhosis ». *Journal of Hepatology* 58 (2): 312-18. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.09.036>.
- Han, Chan H., Yu-Jing Huang, Karen H. Lu, Zhensheng Liu, Gordon B. Mills, Qingyi Wei, et Li-E. Wang. 2011. « Polymorphisms in the SULF1 Gene Are Associated with Early Age of Onset and Survival of Ovarian Cancer ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 30 (janvier): 5. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-5>.
- Haouari, Walid, Johanne Dubail, Samra Lounis-Ouaras, Pierre Prada, Rizk Bennani, Charles Roseau, Céline Huber, et al. 2020. « Serum Bikunin Isoforms in Congenital Disorders of Glycosylation and Linkeropathies ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 43 (6): 1349-59. <https://doi.org/10.1002/jimd.12291>.
- Hartke, Justin, Matthew Johnson, et Marwan Ghabril. 2017. « The Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma ». *Seminars in Diagnostic Pathology* 34 (2): 153-59. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2016.12.011>.
- Hassing, H. Carlijne, Hans Mooij, Shuling Guo, Brett P. Monia, Keyang Chen, Wim Kulik, Geesje M. Dallinga-Thie, Max Nieuwdorp, Erik S. G. Stroes, et Kevin Jon Williams. 2012. « Inhibition of Hepatic Sulfatase-2 in Vivo: A Novel Strategy to Correct Diabetic Dyslipidemia ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (6): 1746-53. <https://doi.org/10.1002/hep.25580>.
- Helsley, Robert N., Venkateshwari Varadharajan, Amanda L. Brown, Anthony D. Gromovsky, Rebecca C. Schugar, Iyappan Ramachandiran, Kevin Fung, et al. 2019. « Obesity-Linked Suppression of Membrane-Bound O-Acyltransferase 7 (MBOAT7) Drives Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *ELife* 8 (octobre). <https://doi.org/10.7554/eLife.49882>.
- Hodoğlugil, Uğur, David W. Williamson, Yi Yu, Lindsay A. Farrer, et Robert W. Mahley. 2011. « Glucuronic Acid Epimerase Is Associated with Plasma Triglyceride and High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Turks ». *Annals of Human Genetics* 75 (3): 398-417. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2011.00644.x>.
- Holst, Charles R., Hani Bou-Reslan, Bryan B. Gore, Karen Wong, Deanna Grant, Sreedevi Chalasani, Richard A. Carano, et al. 2007. « Secreted Sulfatases Sulf1 and Sulf2 Have Overlapping yet Essential Roles in Mouse Neonatal Survival ». *PloS One* 2 (6): e575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000575>.
- Horváth, Zsolt, Andrea Reszegi, László Szilák, Titanilla Dankó, Ilona Kovalszky, et Kornélia Baghy. 2019. « Tumor-Specific Inhibitory Action of Decorin on Different Hepatoma Cell Lines ». *Cellular Signalling* 62 (octobre): 109354. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109354>.
- Hu, Wenwei, Zhaohui Feng, Jamie Eveleigh, Ganesh Iyer, Jishen Pan, Shantu Amin, Fung-Lung Chung, et Moon-shong Tang. 2002. « The Major Lipid Peroxidation Product, Trans- 4-Hydroxy-2-Nonenal, Preferentially Forms DNA Adducts at Codon 249 of Human P53 Gene, a Unique

- Mutational Hotspot in Hepatocellular Carcinoma ». *Carcinogenesis* 23 (11): 1781-89.
<https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1781>.
- Huang, Ao, Xin-Rong Yang, Wen-Yuan Chung, Ashley R. Dennison, et Jian Zhou. 2020.
« Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 146. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00264-x>.
- Huang, Tao, Yang Shu, et Yu-Dong Cai. 2015. « Genetic Differences among Ethnic Groups ». *BMC Genomics* 16 (décembre): 1093. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2328-0>.
- Huang, Y. S., S. J. Hwang, C. Y. Chan, J. C. Wu, Y. Chao, F. Y. Chang, et S. D. Lee. 1999.
« Serum Levels of Cytokines in Hepatitis C-Related Liver Disease: A Longitudinal Study ». *Zhonghua Yi Xue Za Zhi = Chinese Medical Journal; Free China Ed* 62 (6): 327-33.
- Huang, Yongcheng, Jonathan C. Cohen, et Helen H. Hobbs. 2011. « Expression and Characterization of a PNPLA3 Protein Isoform (I148M) Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (43): 37085-93.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290114>.
- Huynh, Minh Bao, Christophe Morin, Gilles Carpentier, Stephanie Garcia-Filipe, Sofia Talhas-Perret, Véronique Barbier-Chassefière, Toin H. van Kuppevelt, Isabelle Martelly, Patricia Albanese, et Dulce Papy-Garcia. 2012. « Age-Related Changes in Rat Myocardium Involve Altered Capacities of Glycosaminoglycans to Potentiate Growth Factor Functions and Heparan Sulfate-Altered Sulfation ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11363-73.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.335901>.
- Imberty, Anne, Hugues Lortat-Jacob, et Serge Pérez. 2007. « Structural View of Glycosaminoglycan-Protein Interactions ». *Carbohydrate Research* 342 (3-4): 430-39.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.12.019>.
- Jang, Jeong Won, Byong Sun Oh, Jung Hyun Kwon, Chan Ran You, Kyu Won Chung, Chul Seung Kay, et Hyun Suk Jung. 2012. « Serum Interleukin-6 and C-Reactive Protein as a Prognostic Indicator in Hepatocellular Carcinoma ». *Cytokine* 60 (3): 686-93.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.07.017>.
- Jayson, G. C., M. Lyon, C. Paraskeva, J. E. Turnbull, J. A. Deakin, et J. T. Gallagher. 1998.
« Heparan Sulfate Undergoes Specific Structural Changes during the Progression from Human Colon Adenoma to Carcinoma in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1): 51-57.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.51>.
- Joensuu, Heikki, Anu Anttonen, Minna Eriksson, Riitta Mäkitaro, Henrik Alftan, Vuokko Kinnula, et Sirpa Leppä. 2002. « Soluble Syndecan-1 and Serum Basic Fibroblast Growth Factor Are New Prognostic Factors in Lung Cancer ». *Cancer Research* 62 (18): 5210-17.
- Kaksonen, Marko, Ivan Pavlov, Vootele Võikar, Sari E. Lauri, Anni Hienola, Ruusu Riekkö, Merja Lakso, Tomi Taira, et Heikki Rauvala. 2002. « Syndecan-3-Deficient Mice Exhibit Enhanced LTP and Impaired Hippocampus-Dependent Memory ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 21 (1): 158-72. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1167>.
- Kanda, Tatsuo, Taichiro Goto, Yosuke Hirotsu, Ryota Masuzaki, Mitsuhiko Moriyama, et Masao Omata. 2020. « Molecular Mechanisms: Connections between Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041525>.

- Kanwal, Fasiha, et Amit G. Singal. 2019. « Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: Current Best Practice and Future Direction ». *Gastroenterology* 157 (1): 54-64. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.02.049>.
- Kaur, Sukhneeraj P., et Brian S. Cummings. 2019. « Role of Glypicans in Regulation of the Tumor Microenvironment and Cancer Progression ». *Biochemical Pharmacology* 168: 108-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.020>.
- Khurana, Ashwani, Peng Liu, Pasquale Mellone, Laura Lorenzon, Bruno Vincenzi, Kaustubh Datta, Bo Yang, et al. 2011. « HSulf-1 Modulates FGF2- and Hypoxia-Mediated Migration and Invasion of Breast Cancer Cells ». *Cancer Research* 71 (6): 2152-61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3059>.
- Kiani, Chris, Liwen Chen, Yao Jiong Wu, Albert J. Yee, et Burton B. Yang. 2002. « Structure and Function of Aggrecan ». *Cell Research* 12 (1): 19-32. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290106>.
- Kim, Sewoon, et Sunjoo Jeong. 2019. « Mutation Hotspots in the β -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases ». *Molecules and Cells* 42 (1): 8-16. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0436>.
- Kim, Tae-Hyung, So Yeon Kim, An Tang, et Jeong Min Lee. 2019. « Comparison of International Guidelines for Noninvasive Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Update ». *Clinical and Molecular Hepatology* 25 (3): 245-63. <https://doi.org/10.3350/cmh.2018.0090>.
- Kleeff, J., T. Ishiwata, A. Kumbasar, H. Friess, M. W. Büchler, A. D. Lander, et M. Korc. 1998. « The Cell-Surface Heparan Sulfate Proteoglycan Glypican-1 Regulates Growth Factor Action in Pancreatic Carcinoma Cells and Is Overexpressed in Human Pancreatic Cancer ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (9): 1662-73. <https://doi.org/10.1172/JCI4105>.
- Kolset, S. O., et H. Tveit. 2008. « Serglycin--Structure and Biology ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (7-8): 1073-85. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7455-6>.
- Kono, H., I. Rusyn, M. Yin, E. Gäbele, S. Yamashina, A. Dikalova, M. B. Kadiiska, et al. 2000. « NADPH Oxidase-Derived Free Radicals Are Key Oxidants in Alcohol-Induced Liver Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 106 (7): 867-72. <https://doi.org/10.1172/JCI9020>.
- Kudchadkar, Ragini, Rene Gonzalez, et Karl D. Lewis. 2008. « PI-88: A Novel Inhibitor of Angiogenesis ». *Expert Opinion on Investigational Drugs* 17 (11): 1769-76. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.11.1769>.
- Laguri, Cédric, Fernando Arenzana-Seisdedos, et Hugues Lortat-Jacob. 2008. « Relationships between Glycosaminoglycan and Receptor Binding Sites in Chemokines—the CXCL12 Example ». *Carbohydrate Research*, Selected papers from the 14th European Carbohydrate Symposium, Lübeck, Germany, Sept. 2007, 343 (12): 2018-23. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.047>.
- Lai, J P, J R Thompson, D S Sandhu, et L R Roberts. 2008. « Heparin-degrading sulfatases in hepatocellular carcinoma: roles in pathogenesis and therapy targets. » *Future Oncol.* <https://doi.org/10.2217/14796694.4.6.803>.
- Lai, Jinping, Jeremy Chien, Julie Staub, Rajeswari Avula, Eddie L. Greene, Tori A. Matthews, David I. Smith, Scott H. Kaufmann, Lewis R. Roberts, et Viji Shridhar. 2003. « Loss of HSulf-1 up-Regulates Heparin-Binding Growth Factor Signaling in Cancer ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 23107-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302203200>.

- Lai, Jin-Ping, Abdul M. Oseini, Catherine D. Moser, Chunrong Yu, Sherine F. Elswa, Chunling Hu, Ikuo Nakamura, et al. 2010. « The Oncogenic Effect of Sulfatase 2 in Human Hepatocellular Carcinoma Is Mediated in Part by Glypican 3–Dependent Wnt Activation ». *Hepatology* 52 (5): 1680-89. <https://doi.org/10.1002/hep.23848>.
- Lai, Jin-Ping, Dalbir S. Sandhu, Chunrong Yu, Tao Han, Catherine D. Moser, Kenard K. Jackson, Ruben Bonilla Guerrero, et al. 2008. « Sulfatase 2 Up-Regulates Glypican 3, Promotes Fibroblast Growth Factor Signaling, and Decreases Survival in Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (4): 1211-22. <https://doi.org/10.1002/hep.22202>.
- Lamanna, William C., Rebecca J. Baldwin, Michael Padva, Ina Kalus, Gerdy Ten Dam, Toin H. van Kuppevelt, John T. Gallagher, Kurt von Figura, Thomas Dierks, et Catherine L. R. Merry. 2006. « Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatases: Discrete in Vivo Activities and Functional Co-Operativity ». *The Biochemical Journal* 400 (1): 63-73. <https://doi.org/10.1042/BJ20060848>.
- Lee, Mi Nam, Eun Young Jung, Hyun Jin Kwun, Hong Ki Jun, Dae-Yeul Yu, Yung Hyun Choi, et Kyung Lib Jang. 2002. « Hepatitis C Virus Core Protein Represses the P21 Promoter through Inhibition of a TGF-Beta Pathway ». *The Journal of General Virology* 83 (Pt 9): 2145-51. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-9-2145>.
- Li, Yong, Changye Sun, Edwin A. Yates, Chao Jiang, Mark C. Wilkinson, et David G. Fernig. 2016. « Heparin Binding Preference and Structures in the Fibroblast Growth Factor Family Parallel Their Evolutionary Diversification ». *Open Biology* 6 (3). <https://doi.org/10.1098/rsob.150275>.
- Liu, Chun-Jen, Juliana Chang, Po-Huang Lee, Deng-Yn Lin, Cheng-Chung Wu, Long-Bin Jeng, Yih-Jyh Lin, et al. 2014. « Adjuvant Heparanase Inhibitor PI-88 Therapy for Hepatocellular Carcinoma Recurrence ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (32): 11384-93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11384>.
- Liu, Hong, Chunmei Yang, Wenzhu Lu, et Yong Zeng. 2018. « Prognostic Significance of Glypican-3 Expression in Hepatocellular Carcinoma: A Meta-Analysis ». *Medicine* 97 (4): e9702. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009702>.
- Liu, Xiao-Long, Fu-Qiang Li, Li-Xin Liu, Bo Li, et Zhi-Peng Zhou. 2013. « TNF- α , HGF and Macrophage in Peritumoural Liver Tissue Relate to Major Risk Factors of HCC Recurrence ». *Hepato-Gastroenterology* 60 (125): 1121-26. <https://doi.org/10.5754/hge12982>.
- Llovet, Josep M., Josep Fuster, Jordi Bruix, et Barcelona-Clínic Liver Cancer Group. 2004. « The Barcelona Approach: Diagnosis, Staging, and Treatment of Hepatocellular Carcinoma ». *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 10 (2 Suppl 1): S115-120. <https://doi.org/10.1002/lt.20034>.
- Lonardo, Amedeo, Simona Leoni, Khalid A. Alswat, et Yasser Fouad. 2020. « History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165888>.
- Lortat-Jacob, Hugues, Aurélien Grosdidier, et Anne Imberty. 2002. « Structural Diversity of Heparan Sulfate Binding Domains in Chemokines ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3): 1229-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.032497699>.

- Lou, Jiatao, LingFei Zhang, Shaogang Lv, Chenzi Zhang, et Shuai Jiang. 2017. « Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma ». *Biomarkers in Cancer* 9: 1-9.
<https://doi.org/10.1177/1179299X16684640>.
- Lui, Natalie Shaubie, Annemieke van Zante, Steven D Rosen, David M Jablons, et Hassan Lemjabbar-Alaoui. 2012. « SULF2 expression by immunohistochemistry and overall survival in oesophageal cancer: a cohort study ». *BMJ Open* 2 (6). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001624>.
- Maillard, Loïc, Naoaki Saito, Hanna Hlawaty, Véronique Friand, Nadine Suffee, Fanny Chmilewsky, Oualid Haddad, et al. 2014. « RANTES/CCL5 Mediated-Biological Effects Depend on the Syndecan-4/PKC α Signaling Pathway ». *Biology Open* 3 (10): 995-1004.
<https://doi.org/10.1242/bio.20148227>.
- Malavaki, Christina, Shuji Mizumoto, Nikos Karamanos, et Kazuyuki Sugahara. 2008. « Recent Advances in the Structural Study of Functional Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate in Health and Disease ». *Connective Tissue Research* 49 (3): 133-39.
<https://doi.org/10.1080/03008200802148546>.
- Malhi, Harmeet, et Gregory J. Gores. 2008. « Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Seminars in Liver Disease* 28 (4): 360-69.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1091980>.
- Mandarini, Elisabetta, Eva Tollapi, Marta Zanchi, Lorenzo Depau, Alessandro Pini, Jlenia Brunetti, Luisa Bracci, et Chiara Falciani. 2020. « Endocytosis and Trafficking of Heparan Sulfate Proteoglycans in Triple-Negative Breast Cancer Cells Unraveled with a Polycationic Peptide ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21).
<https://doi.org/10.3390/ijms21218282>.
- Mandrekar, Pranoti, et Gyongyi Szabo. 2009. « Signalling Pathways in Alcohol-Induced Liver Inflammation ». *Journal of Hepatology* 50 (6): 1258-66.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.007>.
- Manon-Jensen, Tina, Yoshifumi Itoh, et John R. Couchman. 2010a. « Proteoglycans in Health and Disease: The Multiple Roles of Syndecan Shedding ». *The FEBS Journal* 277 (19): 3876-89.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07798.x>.
- Manon-Jensen, Tina, Hinke A. B. Mulhaupt, et John R. Couchman. 2013. « Mapping of Matrix Metalloproteinase Cleavage Sites on Syndecan-1 and Syndecan-4 Ectodomains ». *The FEBS Journal* 280 (10): 2320-31. <https://doi.org/10.1111/febs.12174>.
- Matikainen, Niina, Maria Antonella Burza, Stefano Romeo, Antti Hakkarainen, Martin Adiels, Lasse Folkersen, Per Eriksson, et al. 2013. « Genetic Variation in SULF2 Is Associated with Postprandial Clearance of Triglyceride-Rich Remnant Particles and Triglyceride Levels in Healthy Subjects ». *PLoS ONE* 8 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079473>.
- Matsuda, K., H. Maruyama, F. Guo, J. Kleeff, J. Itakura, Y. Matsumoto, A. D. Lander, et M. Korc. 2001. « Glypican-1 Is Overexpressed in Human Breast Cancer and Modulates the Mitogenic Effects of Multiple Heparin-Binding Growth Factors in Breast Cancer Cells ». *Cancer Research* 61 (14): 5562-69.
- McCormick, Craig, Gillian Duncan, K. Tina Goutsos, et Frank Tufaro. 2000. « The Putative Tumor Suppressors EXT1 and EXT2 Form a Stable Complex That Accumulates in the Golgi

- Apparatus and Catalyzes the Synthesis of Heparan Sulfate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2): 668-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.668>.
- Metzemaekers, Mieke, Jo Van Damme, Anneleen Mortier, et Paul Proost. 2016. « Regulation of Chemokine Activity – A Focus on the Role of Dipeptidyl Peptidase IV/CD26 ». *Frontiers in Immunology* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00483>.
- Michalaki, V., K. Syrigos, P. Charles, et J. Waxman. 2004. « Serum Levels of IL-6 and TNF-Alpha Correlate with Clinicopathological Features and Patient Survival in Patients with Prostate Cancer ». *British Journal of Cancer* 90 (12): 2312-16. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601814>.
- Miura, Masahiro, Norihiro Fujinami, Yasuhiro Shimizu, Shoichi Mizuno, Keigo Saito, Toshihiro Suzuki, Masaru Konishi, et al. 2020. « Usefulness of Plasma Full-Length Glypican-3 as a Predictive Marker of Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Radial Surgery ». *Oncology Letters* 19 (4): 2657-66. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11371>.
- Mochizuki, Hideo, Hideyuki Futatsumori, Eriko Suzuki, et Koji Kimata. 2020. « A Quantitative Method to Detect Non-Antithrombin-Binding 3-O-Sulfated Units in Heparan Sulfate ». *The Journal of Biological Chemistry* 296 (décembre): 100115. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015864>.
- Morimoto-Tomita, Megumi, Kenji Uchimura, Annette Bistrup, David H. Lum, Mikala Egeblad, Nancy Boudreau, Zena Werb, et Steven D. Rosen. 2005. « Sulf-2, a Proangiogenic Heparan Sulfate Endosulfatase, Is Upregulated in Breast Cancer ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 7 (11): 1001-10. <https://doi.org/10.1593/neo.05496>.
- Moriya, K., H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, S. Kimura, T. Miyamura, et K. Koike. 1998. « The Core Protein of Hepatitis C Virus Induces Hepatocellular Carcinoma in Transgenic Mice ». *Nature Medicine* 4 (9): 1065-67. <https://doi.org/10.1038/2053>.
- Morra, Rachel, Mona Munteanu, Françoise Imbert-Bismut, Djamila Messous, Vlad Ratziu, et Thierry Poinard. 2007. « FibroMAX: Towards a New Universal Biomarker of Liver Disease? ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 7 (5): 481-90. <https://doi.org/10.1586/14737159.7.5.481>.
- Multhaupt, H. a. B., A. Yoneda, J. R. Whiteford, E.-S. Oh, W. Lee, et J. R. Couchman. 2009. « Syndecan Signaling: When, Where and Why? ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 60 Suppl 4 (octobre): 31-38.
- Multhaupt, Hinke A. B., et John R. Couchman. 2012. « Heparan Sulfate Biosynthesis: Methods for Investigation of the Heparanosome ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 60 (12): 908-15. <https://doi.org/10.1369/0022155412460056>.
- Muthiah, Mark D., et Arun J. Sanyal. 2020. « Current Management of Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 40 Suppl 1 (février): 89-95. <https://doi.org/10.1111/liv.14355>.
- Naggi, A., G. Torri, B. Casu, J. Pangrazzi, M. Abbadini, M. Zametta, M. B. Donati, J. Lansen, et J. P. Maffrand. 1987. « “Supersulfated” Heparin Fragments, a New Type of Low-Molecular Weight Heparin. Physico-Chemical and Pharmacological Properties ». *Biochemical Pharmacology* 36 (12): 1895-1900. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90485-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90485-0).

- Narita, Keishi, Julie Staub, Jeremy Chien, Kristy Meyer, Maret Bauer, Andreas Friedl, Sundaram Ramakrishnan, et Viji Shridhar. 2006. « HSulf-1 Inhibits Angiogenesis and Tumorigenesis in Vivo ». *Cancer Research* 66 (12): 6025-32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3582>.
- Nault, Jean-Charles, Erwan Guyot, Christelle Laguillier, Sylvie Chevret, Nathalie Ganne-Carrie, Gisèle N’Kontchou, Michel Beaugrand, et al. 2013. « Serum Proteoglycans as Prognostic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Alcoholic Cirrhosis ». *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 22 (8): 1343-52. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0179>.
- Nikitovic, D., A. Zafiroopoulos, P. Katonis, A. Tsatsakis, A. D. Theocharis, N. K. Karamanos, et G. N. Tzanakakis. 2006. « Transforming Growth Factor- β as a Key Molecule Triggering the Expression of Versican Isoforms v0 and v1, Hyaluronan Synthase-2 and Synthesis of Hyaluronan in Malignant Osteosarcoma Cells ». *IUBMB Life* 58 (1): 47-53. <https://doi.org/10.1080/15216540500531713>.
- Nugent, Matthew A., Kimberly Forsten-Williams, Morris J. Karnovsky, et Elazer R. Edelman. 2005. « Chapter 19 - Mechanisms of Cell Growth Regulation by Heparin and Heparan Sulfate ». In *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*, édité par Hari G. Garg, Robert J. Linhardt, et Charles A. Hales, 533-70. Amsterdam: Elsevier Science. <https://doi.org/10.1016/B978-008044859-6/50020-4>.
- Okina, E., T. Manon-Jensen, J. R. Whiteford, et J. R. Couchman. 2009. « Syndecan Proteoglycan Contributions to Cytoskeletal Organization and Contractility ». *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 19 (4): 479-89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.00941.x>.
- Okolicsanyi, Rachel K., Marion Faure, Jose M. E. Jacinto, Diego Chacon-Cortes, Suzanne Chambers, Philippa H. Youl, Larisa M. Haupt, et Lyn R. Griffiths. 2014. « Association of the SNP Rs2623047 in the HSPG Modification Enzyme SULF1 with an Australian Caucasian Breast Cancer Cohort ». *Gene* 547 (1): 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.009>.
- Ostrovsky, O., M. Korostishevsky, I. Levite, M. Leiba, H. Galski, I. Vlodaysky, et A. Nagler. 2007. « Association of Heparanase Gene (HPSE) Single Nucleotide Polymorphisms with Hematological Malignancies ». *Leukemia* 21 (11): 2296-2303. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404821>.
- Ostrovsky, Olga, Ania Hava Grushchenko-Polaq, Katia Beider, Margarita Mayorov, Jonathan Canaani, Avichai Shimoni, Israel Vlodaysky, et Arnon Nagler. 2018. « Identification of Strong Intron Enhancer in the Heparanase Gene: Effect of Functional Rs4693608 Variant on HPSE Enhancer Activity in Hematological and Solid Malignancies ». *Oncogenesis* 7 (6): 51. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0060-8>.
- Ostrovsky, Olga, Michael Korostishevsky, Itay Shafat, Margarita Mayorov, Neta Ilan, Israel Vlodaysky, et Arnon Nagler. 2009. « Inverse Correlation between HPSE Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Heparanase Expression: Possibility of Multiple Levels of Heparanase Regulation ». *Journal of Leukocyte Biology* 86 (2): 445-55. <https://doi.org/10.1189/jlb.1208735>.
- Ozakyol, Aysegul. 2017. « Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma (HCC Epidemiology) ». *Journal of Gastrointestinal Cancer* 48 (3): 238-40. <https://doi.org/10.1007/s12029-017-9959-0>.

- Ozturk, Arinc, Ramin Mohammadi, Theodore T. Pierce, Sagar Kamarthi, Manish Dhyani, Joseph R. Grajo, Kathleen E. Corey, et al. 2020. « Diagnostic Accuracy of Shear Wave Elastography as a Non-Invasive Biomarker of High-Risk Non-Alcoholic Steatohepatitis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Ultrasound in Medicine & Biology* 46 (4): 972-80. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.12.020>.
- Pang, Roberta, Terence K. W. Lee, Ronnie T. P. Poon, Sheung T. Fan, Kam B. Wong, Yok-Lam Kwong, et Eric Tse. 2007. « Pin1 Interacts with a Specific Serine-Proline Motif of Hepatitis B Virus X-Protein to Enhance Hepatocarcinogenesis ». *Gastroenterology* 132 (3): 1088-1103. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.030>.
- Pang, Roberta W. C., Jae Won Joh, Philip J. Johnson, Morito Monden, Timothy M. Pawlik, et Ronnie T. P. Poon. 2008. « Biology of Hepatocellular Carcinoma ». *Annals of Surgical Oncology* 15 (4): 962-71. <https://doi.org/10.1245/s10434-007-9730-z>.
- Pang, Roberta, John Yuen, Man Fung Yuen, Ching Lung Lai, Terence K. W. Lee, Kwan Man, Ronnie T. P. Poon, et al. 2004. « PIN1 Overexpression and Beta-Catenin Gene Mutations Are Distinct Oncogenic Events in Human Hepatocellular Carcinoma ». *Oncogene* 23 (23): 4182-86. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207493>.
- Parish, C. R., C. Freeman, K. J. Brown, D. J. Francis, et W. B. Cowden. 1999. « Identification of Sulfated Oligosaccharide-Based Inhibitors of Tumor Growth and Metastasis Using Novel in Vitro Assays for Angiogenesis and Heparanase Activity ». *Cancer Research* 59 (14): 3433-41.
- Parish, C. R., C. Freeman, et M. D. Hulett. 2001. « Heparanase: A Key Enzyme Involved in Cell Invasion ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1471 (3): M99-108. [https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(01\)00017-8](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(01)00017-8).
- Pejler, Gunnar, Magnus Abrink, et Sara Wernersson. 2009. « Serglycin Proteoglycan: Regulating the Storage and Activities of Hematopoietic Proteases ». *BioFactors (Oxford, England)* 35 (1): 61-68. <https://doi.org/10.1002/biof.11>.
- Piñero, Federico, Melisa Dirchwolf, et Mário G. Pessôa. 2020. « Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment ». *Cells* 9 (6). <https://doi.org/10.3390/cells9061370>.
- Pinhal, Maria A. S., Brian Smith, Sara Olson, Jun-ichi Aikawa, Koji Kimata, et Jeffrey D. Esko. 2001. « Enzyme Interactions in Heparan Sulfate Biosynthesis: Uronosyl 5-Epimerase and 2-O-Sulfotransferase Interact in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (23): 12984-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.241175798>.
- Poulain, Fabienne E., et H. Joseph Yost. 2015. « Heparan Sulfate Proteoglycans: A Sugar Code for Vertebrate Development? ». *Development* 142 (20): 3456-67. <https://doi.org/10.1242/dev.098178>.
- Powell, Andrew K., David G. Fernig, et Jeremy E. Turnbull. 2002. « Fibroblast Growth Factor Receptors 1 and 2 Interact Differently with Heparin/Heparan Sulfate. Implications for Dynamic Assembly of a Ternary Signaling Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (32): 28554-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111754200>.
- Presta, Marco, Paola Chiodelli, Arianna Giacomini, Marco Rusnati, et Roberto Ronca. 2017. « Fibroblast Growth Factors (FGFs) in Cancer: FGF Traps as a New Therapeutic Approach ». *Pharmacology & Therapeutics* 179 (novembre): 171-87. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.013>.

- Pugia, Michael J., Roland Valdes, et Saeed A. Jortani. 2007. « Bikunin (Urinary Trypsin Inhibitor): Structure, Biological Relevance, And Measurement ». In *Advances in Clinical Chemistry*, 44:223-45. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(07\)44007-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(07)44007-0).
- Purushothaman, Anurag, Ligong Chen, Yang Yang, et Ralph D. Sanderson. 2008. « Heparanase Stimulation of Protease Expression Implicates It as a Master Regulator of the Aggressive Tumor Phenotype in Myeloma ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (47): 32628-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806266200>.
- Pye, D. A., R. R. Vivès, P. Hyde, et J. T. Gallagher. 2000a. « Regulation of FGF-1 Mitogenic Activity by Heparan Sulfate Oligosaccharides Is Dependent on Specific Structural Features: Differential Requirements for the Modulation of FGF-1 and FGF-2 ». *Glycobiology* 10 (11): 1183-92. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.11.1183>.
- Reddy, Janardan K., et M. Sambasiva Rao. 2006. « Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty Liver Disease and Fatty Acid Oxidation ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (5): G852-858. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00521.2005>.
- Regós, Eszter, Katalin Karászi, Andrea Reszegi, András Kiss, Zsuzsa Schaff, Kornélia Baghy, et Ilona Kovalszky. 2020. « Syndecan-1 in Liver Diseases ». *Pathology Oncology Research: POR* 26 (2): 813-19. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00617-0>.
- Ren, Zemin, Harmen van Andel, Wim de Lau, Robin B. Hartholt, Madelon M. Maurice, Hans Clevers, Marie José Kersten, Marcel Spaargaren, et Steven T. Pals. 2018. « Syndecan-1 Promotes Wnt/ β -Catenin Signaling in Multiple Myeloma by Presenting Wnts and R-Spondins ». *Blood* 131 (9): 982-94. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-797050>.
- Reuter, Miriam S., Luciana Musante, Hao Hu, Stefan Diederich, Heinrich Sticht, Arif B. Ekici, Steffen Uebe, et al. 2014. « NDST1 Missense Mutations in Autosomal Recessive Intellectual Disability ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 164A (11): 2753-63. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36723>.
- Ricciardelli, Carmela, John H. Brooks, Supaporn Suwivat, Andrew J. Sakko, Keiko Mayne, Wendy A. Raymond, Ram Seshadri, Richard G. LeBaron, et David J. Horsfall. 2002. « Regulation of Stromal Versican Expression by Breast Cancer Cells and Importance to Relapse-Free Survival in Patients with Node-Negative Primary Breast Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8 (4): 1054-60.
- Ricciardelli, Carmela, Andrew J. Sakko, Miranda P. Ween, Darryl L. Russell, et David J. Horsfall. 2009. « The Biological Role and Regulation of Versican Levels in Cancer ». *Cancer and Metastasis Reviews* 28 (1): 233. <https://doi.org/10.1007/s10555-009-9182-y>.
- Roehlen, Natascha, Emilie Crouchet, et Thomas F. Baumert. 2020. « Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives ». *Cells* 9 (4). <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
- Ruan, Weiwei, Li Cao, Zhonghua Chen, Mingxiang Kong, et Qing Bi. 2018. « Novel exostosin-2 mutation identified in a Chinese family with hereditary multiple osteochondroma ». *Oncology Letters* 15 (4): 4383-89. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7838>.
- Sadir, R., F. Baleux, A. Grosdidier, A. Imberty, et H. Lortat-Jacob. 2001a. « Characterization of the Stromal Cell-Derived Factor-1 α -Heparin Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (11): 8288-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008110200>.

- Saffioti, Francesca, et Massimo Pinzani. 2016. « Development and Regression of Cirrhosis ». *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 34 (4): 374-81. <https://doi.org/10.1159/000444550>.
- Sarrazin, Stephane, William C. Lamanna, et Jeffrey D. Esko. 2011. « Heparan Sulfate Proteoglycans ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>.
- Sarrazin, Stéphane, Malcolm Lyon, Jon A. Deakin, Marco Guerrini, Philippe Lassalle, Maryse Delehedde, et Hugues Lortat-Jacob. 2010. « Characterization and Binding Activity of the Chondroitin/Dermatan Sulfate Chain from Endocan, a Soluble Endothelial Proteoglycan ». *Glycobiology* 20 (11): 1380-88. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq100>.
- Sarsour, Ehab H., Maneesh G. Kumar, Leena Chaudhuri, Amanda L. Kalen, et Prabhat C. Goswami. 2009. « Redox Control of the Cell Cycle in Health and Disease ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (12): 2985-3011. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2513>.
- Saunders, S., S. Paine-Saunders, et A. D. Lander. 1997. « Expression of the Cell Surface Proteoglycan Glypican-5 Is Developmentally Regulated in Kidney, Limb, and Brain ». *Developmental Biology* 190 (1): 78-93. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8690>.
- Scherpereel, Arnaud, Thibaut Gentina, Bogdan Grigoriu, Stéphanie Sénéchal, Anne Janin, Anne Tsicopoulos, François Plénat, David Béchar, André-Bernard Tonnel, et Philippe Lassalle. 2003. « Overexpression of Endocan Induces Tumor Formation ». *Cancer Research* 63 (18): 6084-89.
- Seitz, Helmut K., et Felix Stickel. 2007. « Molecular Mechanisms of Alcohol-Mediated Carcinogenesis ». *Nature Reviews. Cancer* 7 (8): 599-612. <https://doi.org/10.1038/nrc2191>.
- Sharma, Ashish, et Shivaraj Nagalli. 2020. *Chronic Liver Disease. StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554597/>.
- Sharma, Bashar, et Savio John. 2020. *Hepatic Cirrhosis. StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482419/>.
- Shaw, Jeffrey P., Zoë Johnson, Frédéric Borlat, Catherine Zwahlen, Andreas Kungl, Karen Roulin, Axel Harrenga, Timothy N. C. Wells, et Amanda E. I. Proudfoot. 2004. « The X-Ray Structure of RANTES: Heparin-Derived Disaccharides Allows the Rational Design of Chemokine Inhibitors ». *Structure (London, England: 1993)* 12 (11): 2081-93. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.08.014>.
- Singal, Amit G., Pietro Lampertico, et Pierre Nahon. 2020. « Epidemiology and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: New Trends ». *Journal of Hepatology* 72 (2): 250-61. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.025>.
- Singer, Mark S., Joanna J. Phillips, Hassan Lemjabbar-Alaoui, Yang Qing Wang, Jing Wu, Radoslav Goldman, et Steven D. Rosen. 2015. « SULF2, a Heparan Sulfate Endosulfatase, Is Present in the Blood of Healthy Individuals and Increases in Cirrhosis ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 440 (février): 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.038>.
- Slevin, Mark, Jurek Krupinski, John Gaffney, Sabine Matou, David West, Horace Delisser, Rashmin C. Savani, et Shant Kumar. 2007. « Hyaluronan-Mediated Angiogenesis in Vascular Disease: Uncovering RHAMM and CD44 Receptor Signaling Pathways ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 26 (1): 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.08.261>.

- Stauffer, Jimmy K., Anthony J. Scarzello, Qun Jiang, et Robert H. Wiltrot. 2012. « Chronic Inflammation, Immune Escape, and Oncogenesis in the Liver: A Unique Neighborhood for Novel Intersections ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (4): 1567-74. <https://doi.org/10.1002/hep.25674>.
- Steiner, Jennifer L., et Charles H. Lang. 2017. « Alcohol, Adipose Tissue and Lipid Dysregulation ». *Biomolecules* 7 (1). <https://doi.org/10.3390/biom7010016>.
- Stepp, Mary Ann, Heather E. Gibson, Purvi H. Gala, Drina D. Sta Iglesia, Ahdeah Pajooresh-Ganji, Sonali Pal-Ghosh, Marcus Brown, et al. 2002. « Defects in Keratinocyte Activation during Wound Healing in the Syndecan-1-Deficient Mouse ». *Journal of Cell Science* 115 (23): 4517-31. <https://doi.org/10.1242/jcs.00128>.
- Strader, April D., Ofer Reizes, Stephen C. Woods, Stephen C. Benoit, et Randy J. Seeley. 2004. « Mice Lacking the *Syndecan-3* Gene Are Resistant to Diet-Induced Obesity ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (9): 1354-60. <https://doi.org/10.1172/JCI20631>.
- Sutton, Angela, Veronique Friand, Severine Brulé-Donneger, Thomas Chaigneau, Marianne Ziol, Odile Sainte-Catherine, Aurelie Poiré, et al. 2007. « Stromal Cell-Derived Factor-1/Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12 Stimulates Human Hepatoma Cell Growth, Migration, and Invasion ». *Molecular Cancer Research: MCR* 5 (1): 21-33. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0103>.
- Sutton, Angela, Veronique Friand, Dulce Papy-Garcia, Maylis Dagouassat, Loïc Martin, Roger Vassy, Oualid Haddad, et al. 2007. « Glycosaminoglycans and Their Synthetic Mimetics Inhibit RANTES-Induced Migration and Invasion of Human Hepatoma Cells ». *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (11): 2948-58. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0114>.
- Takahashi, Rieko, Kazuaki Negishi, Atai Watanabe, Masashi Arai, Fumio Naganuma, Yoshiaki Ohyama, et Masahiko Kurabayashi. 2011. « Serum Syndecan-4 Is a Novel Biomarker for Patients with Chronic Heart Failure ». *Journal of Cardiology* 57 (3): 325-32. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2011.01.012>.
- Tangkijvanich, Pisit, Theerawut Chanmee, Sanpoj Komtong, Varocha Mahachai, Naruemon Wisedopas, Peraphan Pothacharoen, et Prachya Kongtawelert. 2010. « Diagnostic Role of Serum Glypican-3 in Differentiating Hepatocellular Carcinoma from Non-Malignant Chronic Liver Disease and Other Liver Cancers ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25 (1): 129-37. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.05988.x>.
- Tátrai, Péter, Krisztina Egedi, Aron Somorácz, Toin H. van Kuppevelt, Gerdy Ten Dam, Malcolm Lyon, Jon A. Deakin, András Kiss, Zsuzsa Schaff, et Iona Kovalszky. 2010. « Quantitative and Qualitative Alterations of Heparan Sulfate in Fibrogenic Liver Diseases and Hepatocellular Cancer ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 58 (5): 429-41. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955161>.
- Teng, Yvonne Hui-Fang, Rafael S. Aquino, et Pyong Woo Park. 2012. « Molecular functions of syndecan-1 in disease ». *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 31 (1): 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.10.001>.
- Teschke, Rolf. 2018. « Alcoholic Steatohepatitis (ASH) and Alcoholic Hepatitis (AH): Cascade of Events, Clinical Aspects, and Pharmacotherapy Options ». *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 19 (8): 779-93. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1465929>.

- Thangapandi, Veera Raghavan, Oskar Knittelfelder, Mario Brosch, Eleonora Patsenker, Olga Vvedenskaya, Stephan Buch, Sebastian Hinz, et al. 2020. « Loss of Hepatic Mboat7 Leads to Liver Fibrosis ». *Gut*, juin. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-320853>.
- Toosi, Ali Erfani Karimzadeh. 2015. « Liver Fibrosis: Causes and Methods of Assessment, A Review ». *Romanian Journal of Internal Medicine = Revue Roumaine De Medecine Interne* 53 (4): 304-14. <https://doi.org/10.1515/rjim-2015-0039>.
- Tsanou, E., E. Ioachim, E. Briasoulis, A. Charchanti, K. Damala, V. Karavasilis, N. Pavlidis, et N. J. Agnantis. 2004. « Clinicopathological Study of the Expression of Syndecan-1 in Invasive Breast Carcinomas. Correlation with Extracellular Matrix Components ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 23 (4): 641-50.
- Uchimura, Kenji, Megumi Morimoto-Tomita, Annette Bistrup, Jessica Li, Malcolm Lyon, John Gallagher, Zena Werb, et Steven D. Rosen. 2006. « HSulf-2, an Extracellular Endoglucosamine-6-Sulfatase, Selectively Mobilizes Heparin-Bound Growth Factors and Chemokines: Effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1 ». *BMC Biochemistry* 7 (janvier): 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-7-2>.
- Vivès, Romain R., Amal Seffouh, et Hugues Lortat-Jacob. 2014a. « Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer ». *Frontiers in Oncology* 3 (janvier): 331. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00331>.
- Vlodavsky, I., et Y. Friedmann. 2001a. « Molecular Properties and Involvement of Heparanase in Cancer Metastasis and Angiogenesis ». *The Journal of Clinical Investigation* 108 (3): 341-47. <https://doi.org/10.1172/JCI13662>.
- Vlodavsky, Israel, Preeti Singh, Ilanit Boyango, Lilach Gutter-Kapon, Michael Elkin, Ralph D. Sanderson, et Neta Ilan. 2016. « Heparanase: From Basic Research to Therapeutic Applications in Cancer and Inflammation ». *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 29: 54-75. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.10.001>.
- Vreys, Veronique, et Guido David. 2007. « Mammalian Heparanase: What Is the Message? ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11 (3): 427-52. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00039.x>.
- Wight, Thomas N. 2002. « Versican: A Versatile Extracellular Matrix Proteoglycan in Cell Biology ». *Current Opinion in Cell Biology* 14 (5): 617-23. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00375-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00375-7).
- Wilcox-Adelman, Sarah A., Fabienne Denhez, et Paul F. Goetinck. 2002. « Syndecan-4 Modulates Focal Adhesion Kinase Phosphorylation ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 32970-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201283200>.
- Winter, P. C., M. F. McMullin, et M. A. Catherwood. 2008. « Lack of Association of the Heparanase Gene Single-Nucleotide Polymorphism Arg307Lys with Acute Lymphoblastic Leukaemia in Patients from Northern Ireland ». *Leukemia* 22 (8): 1629-31; discussion 1631-1633. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.36>.
- Xian, Xiaojie, Sandeep Gopal, et John R. Couchman. 2009. « Syndecans as Receptors and Organizers of the Extracellular Matrix ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 31. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0829-3>.

- Yamada, Shuhei, Marta Busse, Momoyo Ueno, Olivia G. Kelly, William C. Skarnes, Kazuyuki Sugahara, et Marion Kusche-Gullberg. 2004. « Embryonic Fibroblasts with a Gene Trap Mutation in Ext1 Produce Short Heparan Sulfate Chains ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (31): 32134-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312624200>.
- Younossi, Zobair M., Rohit Loomba, Quentin M. Anstee, Mary E. Rinella, Elisabetta Bugianesi, Giulio Marchesini, Brent A. Neuschwander-Tetri, et al. 2018. « Diagnostic Modalities for Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Associated Fibrosis ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 68 (1): 349-60. <https://doi.org/10.1002/hep.29721>.
- Yue, Zhenyu, Yongxi Song, Zhenning Wang, Yang Luo, Li Jiang, Lili Xing, Huimian Xu, et Xue Zhang. 2010. « Association of Heparanase Gene (HPSE-1) Single Nucleotide Polymorphisms with Gastric Cancer ». *Journal of Surgical Oncology* 102 (1): 68-72. <https://doi.org/10.1002/jso.21584>.
- Zaghloul, Randa A., Mamdouh M. El-Shishtawy, Khaled H. Abd El Galil, Mohamed A. Ebrahim, AbdelHamid A. Metwaly, et Mohammed M. Al-Gayyar. 2015. « Evaluation of Antiglypican-3 Therapy as a Promising Target for Amelioration of Hepatic Tissue Damage in Hepatocellular Carcinoma ». *European Journal of Pharmacology* 746 (janvier): 353-62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.11.008>.
- Zeharia, Eyal, Juan Jia, Xiao Zhang, Lea Baraz, Ulf Lindahl, Tamar Peretz, Israel Vlodavsky, et Jin-Ping Li. 2009. « Newly Generated Heparanase Knock-out Mice Unravel Co-Regulation of Heparanase and Matrix Metalloproteinases ». *PLoS One* 4 (4): e5181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005181>.
- Zhang, Siyuan, Eduard Condac, Hong Qiu, Junlin Jiang, Gerardo Gutierrez-Sanchez, Carl Bergmann, Tracy Handel, et Lianchun Wang. 2012. « Heparin-Induced Leukocytosis Requires 6-O-Sulfation and Is Caused by Blockade of Selectin- and CXCL12 Protein-Mediated Leukocyte Trafficking in Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (8): 5542-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314716>.
- Zhang, Wen, Yan Ge, Qian Cheng, Qi Zhang, Lin Fang, et Junnian Zheng. 2018. « Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment ». *Oncotarget* 9 (4): 5480-91. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23869>.
- Zong, Fang, Eleni Fthenou, Nina Wolmer, Péter Hollósi, Ilona Kovalszky, László Szilák, Carolin Mogler, Gustav Nilsson, Georgios Tzanakakis, et Katalin Dobra. 2009. « Syndecan-1 and FGF-2, but Not FGF Receptor-1, Share a Common Transport Route and Co-Localize with Heparanase in the Nuclei of Mesenchymal Tumor Cells ». *PLoS One* 4 (10): e7346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007346>.

ANNEXES

Author Query Form

WILEY

Journal: JCMM

Article: 16460

Dear Author,

During the copyediting of your manuscript, the following queries arose.

Please refer to the query reference callout numbers in the page proofs and respond.

Please remember illegible or unclear comments and corrections may delay publication.

Many thanks for your assistance.

AUTHOR: Please note that missing content in references have been updated where we have been able to match the missing elements without ambiguity against a standard citation database, to meet the reference style requirements of the journal. It is your responsibility to check and ensure that all listed references are complete and accurate.

Query reference	Query	Remarks
1	AUTHOR: Please confirm that given names (blue) and surnames/family names (vermilion) have been identified correctly.	
2	AUTHOR: The ORCID ID for Bassand seems to be invalid. Please check and supply the correct ORCID ID for this author.	
3	AUTHOR: Given names and surnames/family names has been changed according to meta data. Check and confirm whether we have done it correctly.	
4	AUTHOR: Please check that authors and their affiliations are correct.	
5	AUTHOR: Check and confirm the hierarchy of the heading levels.	
6	AUTHOR: Please check whether the usage of the term 'Archimede' is correct here and in other instances.	
7	AUTHOR: Please check the edits made in the 'Author contributions' section.	
8	AUTHOR: Please provide the article title for reference [25].	
9	AUTHOR: Please provide the volume number for reference [39].	

Funding Info Query Form

Please confirm that the funding sponsor list below was correctly extracted from your article: that it includes all funders and that the text has been matched to the correct FundRef Registry organization names. If a name was not found in the FundRef registry, it may not be the canonical name form, it may be a program name rather than an organization name, or it may be an organization not yet included in FundRef Registry. If you know of another name form or a parent organization name for a "not found" item on this list below, please share that information.

FundRef name	FundRef Organization Name
Ecole doctoral Galilée	
Université Sorbonne Paris Nord	

miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis

Kévin Bassand¹ | Laurent Metzinger² | Meriem Naïm¹ | Nesrine Mouhoubi¹ |
Oualid Haddad¹ | Vincent Assoun¹ | Naïma Zaïdi¹ | Odile Sainte-Catherine¹ |
Amena Butt¹ | Erwan Guyot^{1,3} | Olivier Oudar¹ | Christelle Laguillier-Morizot^{1,3} |
Angela Sutton^{1,3} | Nathalie Charneau^{1,3} | Valérie Metzinger-Le Meuth¹ | Hanna Hlawaty^{1, 2}

¹Laboratory for Vascular Translational Sciences, INSERM U1148, Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

²UR-UPJV 4666 HEMATIM, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Université de Picardie Jules Verne, CHU-Amiens-Picardie, Amiens, France

³Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bondy, France

Correspondence

Kévin Bassand and Hanna Hlawaty, 74 rue Marcel Cachin, UFR SMBH, INSERM U1148, Bureau 224, 93000 Bobigny, France.
Emails: bassand.k@gmail.com (KB); hanna.hlawaty@univ-paris13.fr (HH)

Funding information

The authors thank the Ecole doctorale Galilée and the Université Sorbonne Paris Nord for their support. This work was also supported by BQR (Bonus Qualité Recherche) grant of Commission Recherche du CAC from Université Sorbonne Paris Nord.

Abstract

Atherosclerosis, in the ultimate stage of cardiovascular diseases, causes an obstruction of vessels leading to ischemia and finally to necrosis. To restore vascularization and tissue regeneration, stimulation of angiogenesis is necessary. Chemokines and microRNAs (miR) were studied as pro-angiogenic agents. We analysed the miR-126/CXCL12 axis and compared impacts of both miR-126-3p and miR-126-5p strands effects in CXCL12-induced angiogenesis. Indeed, the two strands of miR-126 were previously shown to be active but were never compared together in the same experimental conditions regarding their differential functions in angiogenesis. In this study, we analysed the 2D-angiogenesis and the migration assays in HUVEC in vitro and in rat's aortic rings ex vivo, both transfected with premiR-126-3p/-5p or anti-miR-126-3p/-5p strands and stimulated with CXCL12. First, we showed that CXCL12 had pro-angiogenic effects in vitro and ex vivo associated with overexpression of miR-126-3p in HUVEC and rat's aortas. Second, we showed that 2D-angiogenesis and migration induced by CXCL12 was abolished in vitro and ex vivo after miR-126-3p inhibition. Finally, we observed that SPRED-1 (one of miR-126-3p targets) was inhibited after CXCL12 treatment in HUVEC leading to improvement of CXCL12 pro-angiogenic potential in vitro. Our results proved for the first time: 1-the role of CXCL12 in modulation of miR-126 expression; 2-the involvement of miR-126 in CXCL12 pro-angiogenic effects; 3-the involvement of SPRED-1 in angiogenesis induced by miR-126/CXCL12 axis.

KEYWORDS

angiogenesis, chemokine CXCL12, endothelial cells, miR-126

Metzinger and Naïm these authors have contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

	
Journal Name	JCMM
Manuscript No.	16460
WILEY	
Dispatch: 9-3-2021	
No. of pages: 13	
CE: Viswanathan	
PE: Megala R.	

1 | INTRODUCTION

Atherosclerosis is a vascular pathology leading to the partial or the total obstruction of the blood vessels and flow perturbation, the decrease in oxygen and nutrients leading to ischemia, cell death and finally to the tissue necrosis. To prevent the necrosis and induce tissue regeneration, angiogenesis needs to be initiated. This physiological process, which involves endothelial cells (EC) response to several stimuli, consists of cell proliferation, migration and cell-to-cell interactions to form functional vessels. In an ischemic tissue, the oxygen decrease allows the synthesis of pro-angiogenic factors secreted by adjacent EC in order to stimulate angiogenesis. Among these factors, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A and Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 bind to their tyrosine kinase receptors to induce intracellular signalling pathways involved in angiogenesis.¹ The chemokines are the small soluble proteins belonging to the family of chemoattractant cytokines that are secreted in ischemic areas.^{2,3} Interestingly, we and others have already shown that chemokines can also be involved in angiogenesis.^{4,5} CXCL12 (SDF-1 α) presence in the ischemic tissue allows for the recruitment of endothelial progenitor cells leading to local reendothelialization.⁶ In addition, CXCL12 stimulates angiogenesis by binding to their specific seven transmembrane domains receptors coupled to G proteins, such as CXCR4 or CXCR7. This binding induces the intracellular signalling pathways involved in angiogenesis such as the MAPK Erk1/2.⁷ This phenomenon can also be stimulated by modulation of microRNA (miRs) expression.⁸ miRs are small, single-stranded, non-coding RNAs involved in the regulation of gene expression. By binding to their specific targeted mRNAs, they can induce their total degradation or repress their protein translation.⁹ Over the last few years, miRs have been extensively studied in the context of angiogenic processes. Indeed, three classes of miRs could be dissociated: pro-angiogenic miRs, anti-angiogenic miRs and miRs with a dual role.¹⁰ Among them, miR-126, strongly expressed in EC, has been found to be implicated in angiogenesis.^{11,12} miR strand selection determines which one of the two strands (-5p or -3p) becomes the active strand, and this varies according to cell type and disease state.¹³ Interestingly, it was previously shown that both strands of miR can be functional and have different targets.¹⁴⁻¹⁶ In some miR species, including miR-126, both the passenger strand (miR-126-5p) and guide strand (miR-126-3p) have been shown to improve the biological effects, complicating the interpretation of their action.¹⁶ The pro-angiogenic role of miR-126-3p has been extensively studied. Indeed, it is implicated in the Erk1/2 signalling pathway induced by VEGF-A through a repression of the protein SPRED-1¹⁷ whose role is to inhibit the expression of the small protein G Ras.¹⁸ Although mainly degraded, miR-126-5p has also demonstrated its pro-angiogenic role *in vitro*, but also *in vivo* by reduction of intimal hyperplasia and by stimulation of EC proliferation.¹⁹ In EC, the link between miR-126-3p and chemokine CXCL12 has been already demonstrated.²⁰ Indeed,

we have previously shown that overexpression of miR-126 led to an increase of CXCR4 protein expression, a CXCL12's receptor.²¹ Finally, overexpression of miR-126 caused an increase of CXCL12 synthesis by EC.²⁰

The originality and interest of our study was to compare in the same experimental conditions the effect of both miR-126-3p and -5p strands in two *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis models. Also, our aim was to determine whether the modulation of their expression (miR-126-3p and -5p) is involved in the vascular tube formation induced by CXCL12.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture

Human umbilical vascular Endothelial Cells: HUVEC (ATCC[®] CRL-1730TM) were cultured in Endothelial Cell basal medium 2 (ECBM2, ref C22211, Promocell) and supplemented with 12% of Foetal Bovine Serum (to induce cell division every 16 hours), 5 ng/mL Epidermal Growth Factor, 0.2 μ g/mL hydrocortisone, 0.5 ng/mL VEGF, 10 ng/mL bFGF, 20 ng/mL Insulin like Growth Factor, 1 μ g/mL ascorbic acid and 100 Units/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin. The cells were cultured in an incubator at 37°C under a controlled atmosphere of 5% CO₂.

The HuH7 human hepatoma cell line was grown in Dulbecco's minimal essential medium supplemented with glucose (1 g/L), 10% of Foetal Bovine Serum, streptomycin (100 UI/mL) and penicillin (100 UI/mL) (Invitrogen). Cells were grown at 37°C in disposable plastic flasks, in a humidified 5% CO₂. The medium was replaced twice weekly, and cells were trypsinized and diluted every 3 days at a ratio of 1:3.

2.2 | Animal model

Aortas from euthanized Sprague-Dawley rats (Janvier Labs) were harvested. Animals were anesthetized by intraperitoneal pentobarbital injection (60 mg/kg) and sacrificed by abdominal artery section. Experimental protocol was realized in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care. Experiments were performed in Université Sorbonne Paris Nord (Bobigny, FRANCE, agreement number A 9300801). Tissues were recovered from euthanized animals obtained from the laboratory of Prof. Carole PLANES (INSERM U1272, Université Sorbonne Paris Nord), whose research protocol was approved by the institutional reviewing with animal experimentation and accorded with animal welfare guidelines (Ministère Français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Paris, FRANCE) (CEEA - 005; Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin; C2EA-06, authorization C9300801, authorization APAFIS #8150, approved on august 2017, the 8th).

2.3 | Western blot

For the analysis of SPRED-1 protein expression, 20 µg of total proteins were loaded on a 7% poly-acrylamide gel and then transferred to a nitrocellulose membrane (ref 10600001, GE Healthcare). The membranes were saturated twice 1-hour with baths containing TBS/T (TBS, 0.1% Tween 20) and 5% milk. An anti-SPRED-1 (E-5) antibody (sc-393198, Santa Cruz) was added diluted to 1/500e in TBS/T and 5% milk overnight. The detection was made by incubation with a secondary goat anti-mouse antibody diluted to 1/2000e (ref P044701, DAKO) for 1 hour and then by adding the ECL solution (Pierce® ECL Western Blotting Substrate #32106) and digital reading using Chemidoc apparatus and the Image Lab 4.2 software (Bio-Rad).

2.4 | Transfection

HUVEC were transfected with premiR-126-3p (Assay ID PM2841, Fisher Scientific), premiR-126-5p (Assay ID PM10401, Fisher Scientific), anti-miR-126-3p (Assay ID AM10401, Fisher Scientific), anti-miR-126-5p (Assay ID AM12841, Fisher Scientific) or scramble negative control (SCL) at the concentration of 20 nmol/L in the presence of INTERFERin transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus) and incubated for 24 hours at 37°C with 5% CO₂. Cells were then harvested for further analysis.

2.5 | qRT-PCR

Total RNAs from transfected or not transfected HUVEC were isolated using the RNeasy® Plus minikit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The purity of total RNAs was analysed by measuring the 260/280 and 260/230 nm optical density ratios. Reverse Transcription was performed using 1 µg of total RNA using High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's instructions. For reverse transcription of miR-126-3p, miR-126-5p or U6 small nuclear RNA (used as an endogenous control for miR expression), specific RT primers were added to the master mix. Finally, PCR reactions were performed with Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystem) using the following Taqman primers: miR-126-3p (Hsa-miR-126-3p-Assay ID 002228, Fisher Scientific), miR-126-5p (Hsa-miR-126-5p-Assay ID 000451, Fisher Scientific), U6 (U6snRNA-Assay ID 001973, Fisher Scientific).

2.6 | Aortic ring assay

To study the role of miR-126 and CXCL12 in ex vivo angiogenesis, aortas were collected from 5 weeks old Sprague-Dawley rats, fragmented into 1 mm rings and put on a layer of Matrigel (ref.354248, Corning) and then cultured in complete ECBM2 medium containing 2% of FBS (ref.C22211, Promocell) for 48 hours. These rings were

transfected or not by premiR-126 or anti-miR-126 (20 nmol/L) for respectively the miR-126-3p or miR-126-5p species for 48 hours and stimulated or not by CXCL12 at 6 nmol/L (ref.350-NS-050, R&D system) for 96 hours (2 × 48 hours). Finally, the aortic rings were fixed with 4% Paraformaldehyde and photographed under phase contrast microscope to quantify the total coverage area (in mm²), the quantity of meshes (N) and finally the maximum distance of migration (in mm).

2.7 | 2D-angiogenesis

To study the role of miR-126 and CXCL12 in vascular tube formation in vitro, HUVEC were transfected for 18 hours by premiRs-126 or anti-miRs-126 (20 nmol/L) for respectively the miR-126-3p or miR-126-5p strands. The cells were removed using PBS/EDTA (10mM) and 7000 cells were deposited on a thin layer of Matrigel (ref. 354248, Corning) pre-casted in 96-well plates and incubated for 6 hours at 37°C, 5% CO₂, stimulated or not by CXCL12 at 6 nmol/L. The results present quantification of the number of meshes carried out under a phase contrast microscope by mapping over an entire well using the Archimede and Histolab software. The representation of the whole well was done using the reconstitution of the different fields. The fields were analysed with the Cartograph module of the Archimede^(TM) software. The multifocus module allowed us to acquire images on different focus planes in order to obtain the clear image of the whole well. The number of meshes represented by closed areas surrounded by segments and associated junctions formed by HUVECs was quantified by manual tracing using the Histolab^(TM) software.

2.8 | Migration assay

HUVEC migration was studied using a modified Boyden Chamber. First, the upper chamber was precoated with fibronectin (100 µg/mL) overnight at 4°C. After removing the excess of fibronectin, chambers were saturated with DMEM containing 0.1% BSA for 30 minutes at 37°C, 5% CO₂. Then, 5.10⁴ HUVEC transfected or not were deposited on the upper chamber containing 500 µL of complete ECBM2 medium supplemented with 12% of FBS. Migration was stimulated by adding 1 mL of complete medium with or without CXCL12 at 6 nmol/L during 24 hours. At the end of the experiment, cells were fixed using 4% of paraformaldehyde, coloured using haematoxylin-Hemalum and quantification of migrated cells was performed under phase contrast microscope.

2.9 | Luciferase assay

To study the effect of CXCL12 on egfl7-miR-126 promoter activity, Huh7 cells were cotransfected with plasmid pGL3Basic-miR-126-EGFL7-Promoter (Addgene) and control pGL4.73 [hRLuc/SV40]

(Promega) for 24 hours. Then, the cells were stimulated or not by CXCL12 for 24 hours at 6 nmol/L. Detection of luminescence was performed using Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega) following the manufacturer's instructions.

2.10 | Statistical analysis

All the results are presented with mean \pm SEM. For statistical analysis, non-parametric tests were performed using GraphPad Prism software. Independent sample t tests (Mann and Whitney) were applied to compare two groups when the data followed a normal distribution and one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare among several groups. $P < .05$ indicated statistically significant differences.

3 | RESULTS

3.1 | CXCL12-induced miR-126 expression in vitro and ex vivo

We and others showed that miR-126-3p regulates CXCL12 expression. Knowing that miR-126 is encoded by the *egfl7* gene, and in order to study a potential reverse effect of CXCL12 on miR-126 expression, we first decided to study the *egfl7* promoter activity. The results showed (Figure 1A) that there was a significant increase of 2.35 ± 0.35 -fold of promoter activity after stimulation by CXCL12 as compared to untreated cells. To confirm this result, we decided to analyse the miR-126-3p expression in HUVEC and in rat aortas ex vivo after CXCL12 (6 nmol/L) stimulation for 24 hours. The results showed that there was a significant increase of miR-126-3p level up

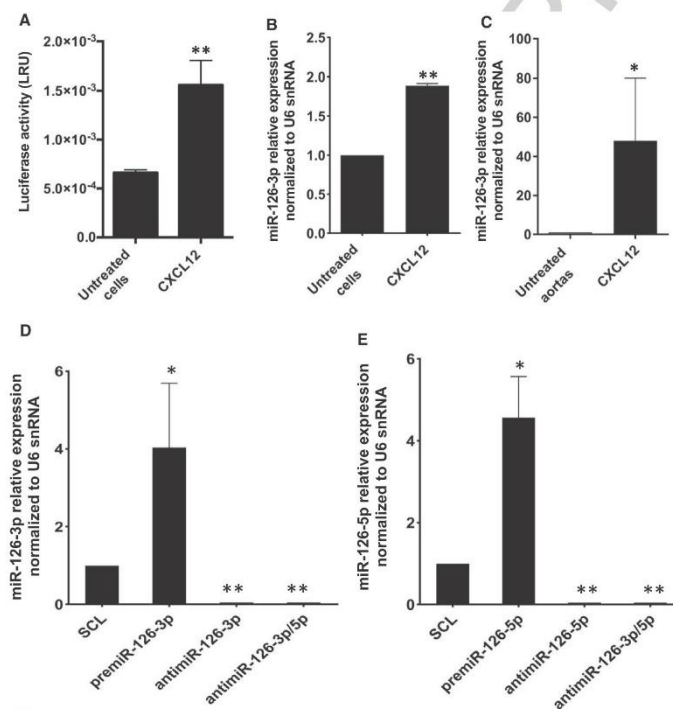
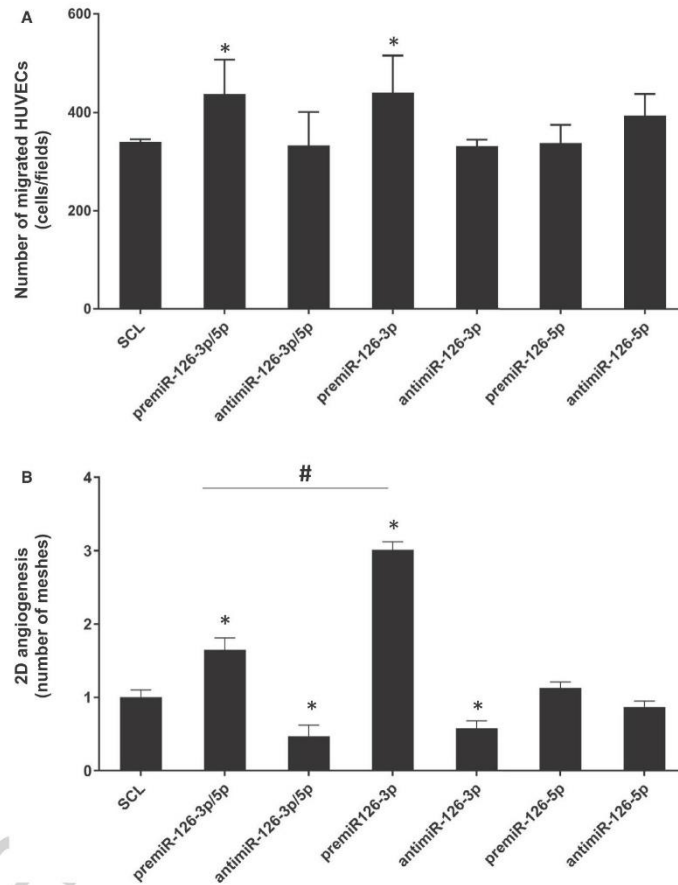


FIGURE 1 CXCL12-induced miR-126-3p endogenous expression in vitro and ex vivo. A, To study the effect of CXCL12 on *egfl7*-miR-126 promoter activity, Huh7 were co-transfected with plasmid pGL3Basic-miR-126-EGFL7-Promoter (Addgene) and control pGL4.73 [hRLuc/SV40] (Promega) for 24 h. Then the cells were stimulated or not stimulated by CXCL12 for 24 h at 6 nmol.L⁻¹. Detection of luminescence was performed using Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega). To study the effect of CXCL12 on miR-126 expression level, HUVEC (B) or rat aortas (C) were stimulated or not stimulated by CXCL12 for 24 h at 6 nmol.L⁻¹. After total RNA extraction, miR-126 level expression was analysed using qRT-PCR with U6 snRNA as endogenous control. The results are expressed as mean \pm SEM. Three independent experiments were performed for in vitro experiments and six for ex vivo experiments. ** $P < .01$ vs Untreated cells; * $P < .05$ vs Untreated aortas. To analyse the up and down regulation of miR-126-3p and miR-126-5p, HUVEC were transfected with 20 nmol.L⁻¹ of premiR-126-3p, premiR-126-5p or inhibitors for 24 h. After total RNA extraction, miR-126-3p (D) and miR-126-5p (E) expression levels were analysed performing qRT-PCR using U6 snRNA as endogenous control. The results are expressed with mean \pm SEM. Three independent experiments were performed. ** $P < .01$ vs SCL; * $P < .05$ vs SCL

FIGURE 2 Effect of miR-126-3p and miR-126-5p on HUVEC migration and vascular tubes formation. The miR-126 was up- or down-regulated by transfecting HUVEC with 20 nmol.L⁻¹ of premiR-126 or inhibitors for 24 h. A, Migration assay was performed using Boyden chamber. 5.10⁴ transfected cells were seeded on the upper compartment during 24 h; the number of migrated cells was determined using phase contrast microscope. B, Vascular tubes formation in 2D on Matrigel. 7500 transfected cells were deposited on the top of Matrigel and the tubular formation was studied after 6 h of incubation. The quantity of meshes was determined using phase contrast microscope and Archimede and Histolab software. For each assay, three independent experiments were performed. *P <.05 vs SCL; #P <.01 premiR-126-3p/5p vs premiR-126-3p



to $88 \pm 5\%$ when HUVEC were stimulated with CXCL12 as compared to untreated cells (Figure 1B). In addition, in our ex vivo model, there was a significant increase up to 48 ± 32 -fold after CXCL12 stimulation as compared to untreated aortas (Figure 1C).

Then, we studied the implications of both strands of miR-126 (miR-126-5p and miR-126-3p) in angiogenesis processes induced by CXCL12. First, we set up the conditions needed to up-regulate (premiR) and down-regulate (antimiR) both miRs strands in HUVEC. The results showed that there was a significant increase of miR-126-3p level up to 4 ± 1.2 -fold after premiR-126-3p transfection as compared to scramble negative control (SCL) (Figure 1D).

Moreover there was an abolition of miR-126-3p level after antimiR-126-3p transfection. The transfection with both antimiR-126-3p and antimiR-126-5p (antimiR-3p/5p) induced the same results. In parallel, there was a significant increase of miR-126-5p level up to 4.6 ± 0.8 -fold after premiR-126-5p transfection as compared to SCL. In addition, miR-126-5p expression was also extinguished after antimiR-126-5p or both antimiR-126-3p/5p transfection

(Figure 1E). To control the cell viability after the transfection with all miRs, the MTT tests were performed. The results showed (Data not shown) that there was no toxicity after any miRs transfection as compared to SCL control.

Our results demonstrated that CXCL12 enhanced miR-126 expression and we validated the up- and down-regulation of the various miRs species.

The second step of this work was to study the role of these miRs on HUVEC migration and two-dimensional (2D) angiogenesis test.

3.2 | miR-126-3p increased HUVEC migration and 2D-angiogenesis in vitro

Our results showed that there was a significant increase of HUVEC migration up to $29.4 \pm 16\%$ and up to $28.5 \pm 15\%$ after premiR-126-3p alone or both premiR-126-3p and premiR-5p (premiR-126-3p/5p) transfection respectively (Figure 2A) as compared to SCL.

1 However, there was no effect on cell migration after premiR-126-5p
2 alone, anti-miR-126-3p alone or both anti-miR-126-3p/5p transfection
3 as compared to SCL.

4 Then, we studied the effect of the various miRs treatments on 2D-
5 angiogenesis by analysing the number of meshes formed by HUVEC
6 on Matrigel layer. The most striking result was a significant increase
7 of the number of meshes up to 3 ± 0.1 fold after premiR-126-3p
8 transfection as compared to SCL (Figure 2B). In contrast, there was
9 no significant effect after transfection of premiR-126-5p only. The
10 transfection of both premiR-126-3p/5p gave an intermediary result
11 with a significant increase of the number of meshes up to $65 \pm 16\%$.
12 However, this result was significantly lower than with transfection of
13 premiR-126-3p only, suggesting an inhibitory effect of miR-126-5p
14 on miR-126-3p pro-angiogenic action. In the case of the inhibitory
15 treatments, there was a significant decrease of 2D-angiogenesis up
16 to $42 \pm 10\%$ after transfection of anti-miR-126-3p only as compared
17 to SCL. Interestingly, the transfection with both anti-miR-126-3p/5p
18 led to a significant decrease of $53 \pm 15\%$ as compared to SCL. In con-
19 trast, there wasn't any effect on 2D-angiogenesis after transfection
20 of anti-miR-126-5p only.

Taken together, our data suggest that miR-126-3p/5p and miR-
126-3p act as positive regulators of HUVEC migration and vascular
tubes formation but miR-126-5p did not seem to have any effect on
this physiological process.

3.3 | miR-126-3p was implicated in CXCL12-induced HUVEC migration

The next step of our study was to analyse the impact of miR-126
deregulation on HUVEC migration induced by CXCL12. Our results
indicated (Figure 3A) a significant increase of HUVEC migration
up to $24 \pm 16\%$ when the cells were stimulated by CXCL12 as compared
to SCL. Moreover there was a significant decrease of HUVEC migra-
tion up to $22 \pm 8\%$ after anti-miR-126-3p transfection and CXCL12
stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. In ad-
dition, the results showed that there was a significant increase of
cell migration up to $25 \pm 7\%$ after premiR-126-5p transfection and
CXCL12 stimulation as compared to the transfection with premiR-
126-5p only. In contrast, there was no effect on HUVEC migration

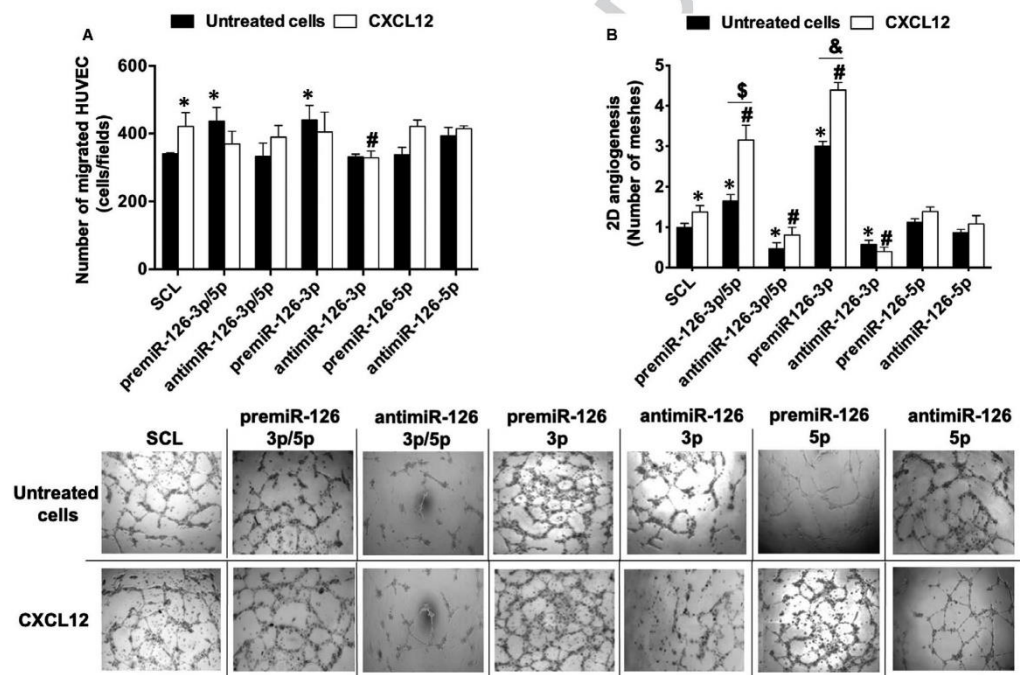


FIGURE 3 Effect of miR-126 on CXCL12-induced migration and vascular tubes formation in vitro. For migration assay (A), 5.10^4
transfected HUVEC were deposited on the upper chamber of Boyden chamber and migration was stimulated by adding CXCL12 in the
bottom chamber at 6 nmol.L^{-1} for 24 h. Quantification of migrated cells was performed using phase contrast microscope. For vascular tubes
formation in vitro (B), 7500 transfected HUVEC were deposited on Matrigel surface and stimulated during 6 h with CXCL12 at 6 nmol.L^{-1} ;
quantification of the number of meshes was performed using phase contrast microscope and Archimede and Histolab software. The results
are expressed with mean \pm SEM. Three independent experiments were performed for each assay. * $P < .05$ vs SCL; # $P < .05$ vs SCL + CXCL12;
\$ $P < .05$ premiR-126-3p/5p vs premiR-126-3p/5p + CXCL12; & $P < .05$ premiR-126-3p vs premiR-126-3p + CXCL12

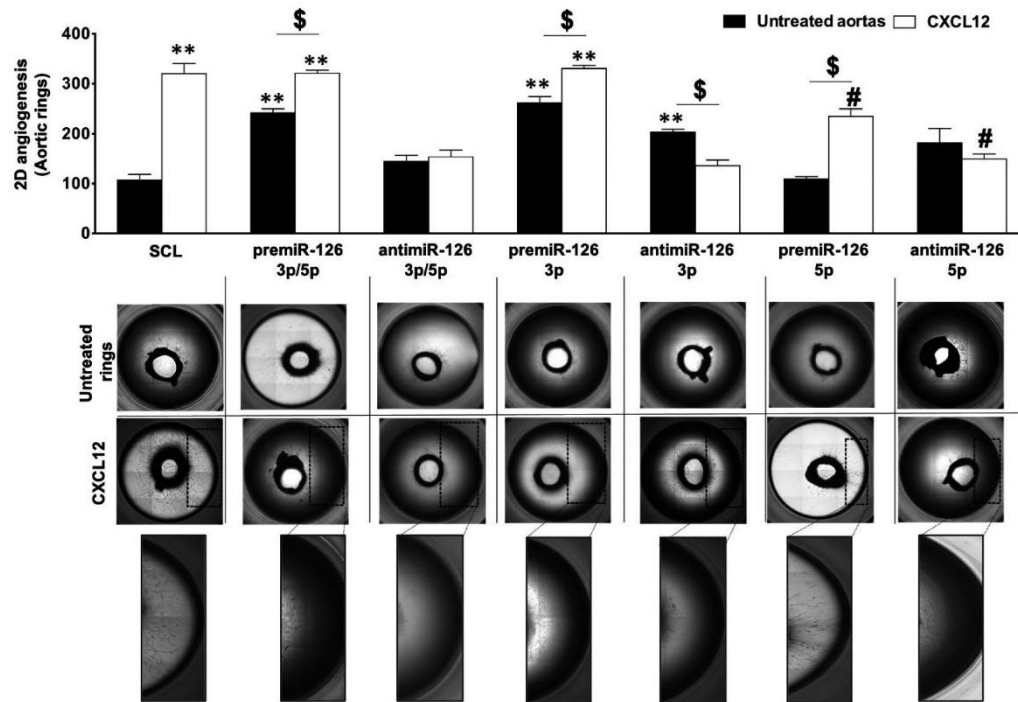


FIGURE 4 Effect of miR-126 on CXCL12-induced vascular tubes formation ex vivo. To analyse the implication of miR-126 on CXCL12-induced angiogenesis ex vivo, the aortic rings from Sprague-Dawley Rats were transfected and stimulated with CXCL12 at 6 nmol/L for 5 d. Quantification of the number of meshes was performed using phase contrast microscope and Archimede and Histolab software. The results are expressed with mean \pm SEM. Five independent experiments were performed for each assay. * $P < .05$ vs SCL + CXCL12; ** $P < .05$ vs SCL; $^{\#}P < .05$

after anti-miR-126-5p, premiR-126-3p or anti-miR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation.

Our data suggest that miR-126-3p but not miR-126-5p was necessary in CXCL12-induced HUVEC migration.

3.4 | miR-126-3p was required for CXCL12-induced 2D-angiogenesis in vitro

The results showed (Figure 3B) that there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to $38 \pm 16\%$ after CXCL12 stimulation as compared to SCL. In addition, there was a significant increase up to 2.3 ± 0.3 -fold of 2D-angiogenesis after HUVEC premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. Interestingly, there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to $91 \pm 23\%$ after premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to transfection with premiR-126-3p/5p only. Moreover there was a significant decrease in 2D-angiogenesis up to $42 \pm 14\%$ after anti-miR-126-3p/5p

transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only or to transfection with anti-miR-126-3p/5p only.

Then, we studied the role of miR-126-3p and miR-126-5p separately in HUVEC 2D-angiogenesis. Our results showed (Figure 3B) that there was a significant increase of this effect up to 3.2 ± 0.2 -fold after premiR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. We also demonstrated a significant increase of $46 \pm 6\%$ as compared to transfection with premiR-126-3p only (Figure 3B). Interestingly, the results showed that there was a significant decrease in 2D-angiogenesis up to $71 \pm 8\%$ after anti-miR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. There were no significant changes as compared to transfection with anti-miR-126-3p only. However, there were no significant changes in 2D-angiogenesis after modulation of miR-126-5p expression.

Taken together, our results suggest that miR-126-3p/5p, miR-126-3p but not miR-126-5p are necessary in CXCL12-induced HUVEC 2D-angiogenesis. Moreover miR-126-3p/5p and miR-126-3p potentiated CXCL12-induced angiogenesis in vitro.

3.5 | miR-126 was implicated in CXCL12-induced angiogenesis in an ex vivo rat aorta model

Herein, we investigated the miR-126 involvement in CXCL12-induced ex vivo angiogenesis by analysing the number of meshes formed on Matrigel layer. For this, the rat aortic rings were placed on Matrigel, transfected by miRs and then stimulated by CXCL12.

First, we performed the analysis of CXCL12 and miRs separately on ex vivo angiogenesis. Our results showed (Figure 4) that there was a significant increase of angiogenesis up to 3 ± 0.3 -fold after CXCL12 stimulation (Figure 4). Moreover without CXCL12 stimulation, there was a significant increase in ex vivo angiogenesis up to 2.3 ± 0.1 -fold and $40 \pm 10\%$ after premiR-126-3p/5p or anti-miR-126-3p/5p transfection respectively. Then, we compared the effects of miR-126-3p and miR-126-5p strands separately. The results showed a significant increase of angiogenesis up to 2.4 ± 0.2 -fold or $90 \pm 10\%$ or $70 \pm 40\%$ after premiR-126-3p or anti-miR-126-3p or anti-miR-126-5p transfection, respectively. There were no significant changes after premiR-126-5p transfection.

Second, we analysed the effect of CXCL12's angiogenesis stimulation after ex vivo miRs- transfection of aortas ring. Our results indicated a significant increase of angiogenesis up to $33 \pm 4\%$ after premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to premiR-126-3p/5p alone. However, there were no significant changes after premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. Interestingly, the results showed that there was a significant decrease of angiogenesis up to $52 \pm 6\%$ after anti-miR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. In addition, there were no significant differences after anti-miR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to anti-miR-126-3p/5p alone.

Finally, we studied the implication of miR-126 on ex vivo angiogenesis using separately the miR-126-3p and miR-126-5p strands. For the -3p strand, the results showed that there was a significant increase of ex vivo angiogenesis up to $26 \pm 4\%$ after premiR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to premiR-126-3p alone. However, there were no significant changes between aortas transfected with premiR-126-3p and stimulated with CXCL12 as compared to CXCL12 alone. Interestingly, the results showed that there was a significant decrease of angiogenesis up to $57.5 \pm 5\%$ after anti-miR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. In addition, there was a significant decrease up to $33 \pm 8\%$ after anti-miR-126-3p transfection and stimulation by CXCL12 as compared to anti-miR-126-3p alone.

Furthermore, for the -5p strand, the results showed that there was a significant decrease of angiogenesis up to $26 \pm 6\%$ after premiR-126-5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. Interestingly, there was a significant increase up to 2.2 ± 0.2 -fold after premiR-126-5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to premiR-126-5p alone. Finally, the results showed that there was a significant decrease in angiogenesis up to $53 \pm 4\%$ after anti-miR-126-5p transfection and CXCL12 stimulation

as compared to CXCL12 alone. However, there were no significant changes between aortas transfected with anti-miR-126-5p and stimulated with CXCL12 with those transfected only with anti-miR-126-5p.

Our result suggests that miR-126-3p/5p and miR-126-3p but not miR-126-5p were necessary for CXCL12-induced angiogenesis ex vivo. In contrast, modulation (up or downregulation) of miR-126-5p seems to alter CXCL12 angiogenic properties ex vivo.

3.6 | SPRED-1 inhibition induced 2D-angiogenesis in vitro

Since the -5p species had no significant effects in our previous models, we decided to focus on the -3p species for the rest of the study. To determine the essential role of miR-126-3p in CXCL12-induced angiogenesis, we focused on SPRED-1 expression, since SPRED-1 is a known target of miR-126-3p. First, we confirmed that there was a significant decrease of SPRED-1 protein level after premiR-126-3p transfection in HUVEC (Figure 5A). We hypothesized that its downregulation is necessary for CXCL12-induced angiogenesis. To study this, we decided to analyse 2D-angiogenesis in HUVEC in the presence of siRNA-SPRED-1 after CXCL12 stimulation. We validated the siRNA-SPRED-1 efficiency showing the abolition of SPRED-1 mRNA expression compared to SCL (Figure 5B). Second, we analysed 2D-angiogenesis in HUVEC after siRNA-SPRED-1 transfection. The results showed that there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to $50 \pm 15\%$ after siRNA-SPRED-1 transfection as compared to HUVEC transfected with SCL (Figure 5C).

Finally, our results suggest that SPRED-1 is a negative regulator of HUVEC's 2D-angiogenesis.

3.7 | CXCL12 decreased SPRED-1 expression leading to increase of 2D-angiogenesis

In the last part of this study, we wanted to know if downregulation of SPRED-1 by miR-126-3p is implicated in CXCL12-dependent angiogenesis.

Since we proved that CXCL12 increased miR-126-3p level in HUVEC, we hypothesized that CXCL12 can modulate the SPRED-1 expression. For the first time, the results showed that CXCL12 triggered a significant decrease of SPRED-1 protein level at 24 hours of treatment (Figure 6A).

Interestingly, the results showed that siRNA-SPRED-1 transfection and CXCL12 stimulation led to a significant increase of 2D-angiogenesis up to $59 \pm 9\%$ as compared to CXCL12 alone (Figure 6B, white arrows).

Then, we compared the effect of both siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p co-transfection on HUVEC 2D-angiogenesis with transfection of siRNA-SPRED-1 only. The results showed that there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to 2.6 ± 0.1 -fold after siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p co-transfection as compared to transfection with anti-miR-126-3p

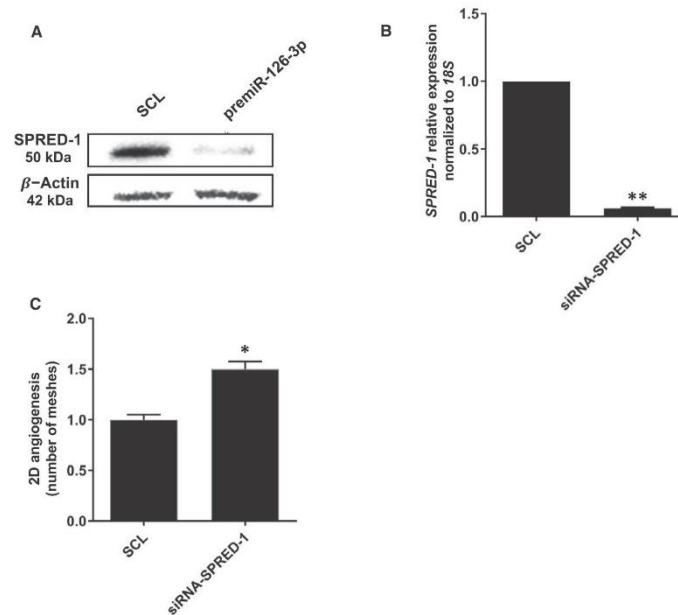


FIGURE 5 SPRED-1 is implicated in CXCL12/miR-126-induced vascular tubes formation. A, To determine the effect of miR-126-3p on SPRED-1 expression, HUVEC were transfected with pre-miR-126-3p for 24 h. Total proteins were extracted, and Western blot analysis was performed. B, The inhibition of SPRED-1 mRNA was checked by qRT-PCR and using 18S rRNA as endogenous control (C). To analyse the implication of SPRED-1 on CXCL12 induced vascular tubes formation *in vitro*, HUVEC were transfected with siRNA-SPRED-1 at 25 nmol.L⁻¹ during 24 h. 7000 HUVECs were seeded on Matrigel and stimulated by CXCL12 at 6 nmol.L⁻¹ for 6 h. Vascular tubes formation was observed and the quantity of meshes was determined using phase contrast microscope and Archimede and Histolab software. Data were presented as the mean \pm SEM of three and four independent experiments. ** $P < .01$ vs Untreated cells; * $P < .05$ vs Untreated aortas

only (Figure 6C, black arrows). Interestingly, CXCL12 addition had no pro-angiogenic effect on co-transfected HUVEC (siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p).

Overall, these results demonstrated that inhibition of SPRED-1 potentializes CXCL12 pro-angiogenic effect. Moreover miR-126-3p was crucial for CXCL12-induced angiogenesis.

Taken together our results showed that, in the absence of both SPRED-1 (siRNA-SPRED-1) and miR-126-3p (anti-miR-126-3p), CXCL12 alone had no pro-angiogenic effect on EC.

In conclusion, these results suggested that the pro-angiogenic effect of CXCL12 was dependent on miR-126-3p and an alternative signalling pathway parallel to SPRED-1. Despite the potentiating effect of the absence of SPRED-1, the presence of miR-126-3p was essential for the pro-angiogenic effect of CXCL12.

4 | DISCUSSION

Angiogenesis is a physiological process, necessary for cardiovascular disorders regeneration, particularly after ischemic injuries. In this context, the pro-angiogenic factors such as chemokines and miRs can be implicated to stimulate angiogenesis.²² In this study,

we decided to focus on CXCL12 and its effect on EC through miRs modulation. Among miRs, miR-126, strongly expressed by EC, has been identified as a pro-angiogenic factor, which acts by decreasing SPRED-1 level and stimulating the Erk1/2 signalling pathway.¹⁷ Like most miRs, miR-126 is produced from a double stranded duplex precursor that imbeds miR-126-3p and miR-126-5p complementary strands.²³ Depending on the tissue or cell type, the guide and passenger strands of a miR can act in synergy or as antagonists to regulate various biological processes.¹³ For example, although they have different mRNA targets, miR-30-3p and miR-30-5p or miR-145-3p and miR-145-5p act in synergy in the tumour progression of glioma or bladder tumour cells.^{24,25} Conversely, depending on their rate and location, miR-155-3p and miR-155-5p may act together or against each other in dendritic and astrocytic cells.^{26,27} Therefore, depending on the tissue environment and pathophysiological conditions, the two strands (-3p or -5p) of the same miR may have different roles and this requires studying them simultaneously in order to know the involvement of each strands in a pathophysiological process. This is why we wanted to study the role of both strands (miR-126-3p and miR-126-5p) in angiogenesis. These roles have never been compared at the same time and in the same experimental conditions in this physiological process.

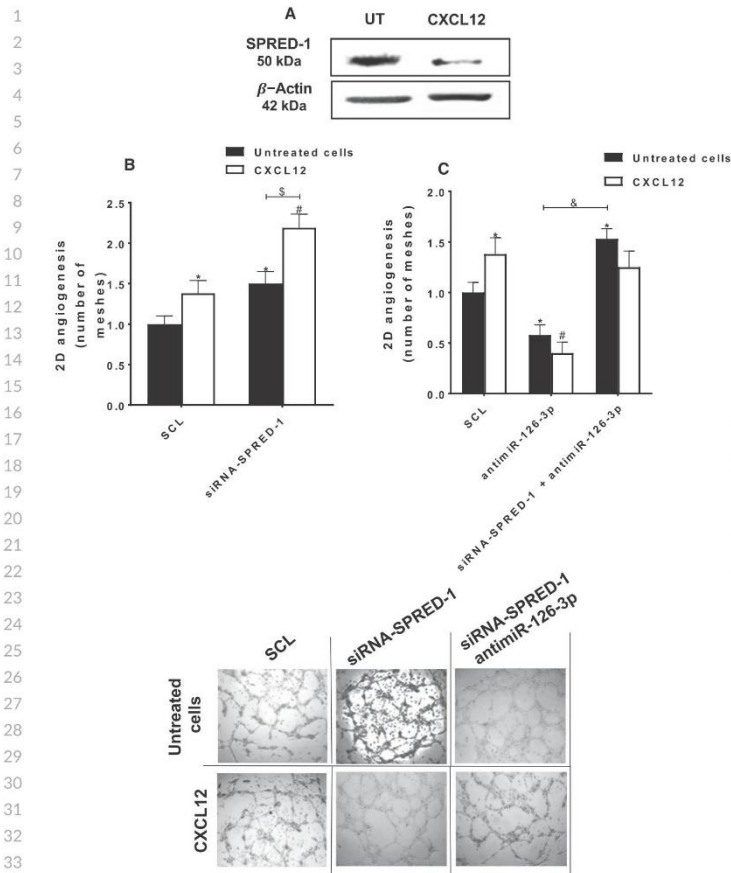


FIGURE 6 miR-126-3p is implicated in the pro-angiogenic effect of SPRED-1 abolition. A, To analyse the effect of CXCL12 on SPRED-1 expression, the HUVEC were stimulated or not with CXCL12 (6 nmol.L⁻¹) for 24 h. Total proteins were extracted, and western blot analysis was performed. B, To analyse the implication of SPRED-1 in CXCL12-induced angiogenesis, HUVEC were transfected with siRNA-SPRED-1 (25 nmol.L⁻¹), deposited on Matrigel and stimulated with CXCL12 (6 nmol.L⁻¹) for 6 h. C, To analyse the implication of miR-126-3p in the pro-angiogenic effect of the abolition of SPRED-1, HUVEC and were co-transfected with siRNA-SPRED-1 (25 nmol.L⁻¹) and anti-miR-126-3p (20 nmol.L⁻¹). After co-transfection, HUVEC were deposited on Matrigel and stimulated by CXCL12 (6 nmol.L⁻¹) for 6 h. For all analysis of vascular tubes formation and meshes quantification, the phase contrast microscope and the Archimede and the Histolab software were used. The results are expressed as mean ± SEM of three independent experiments. *P < .05 vs SCL; #P < .01 vs SCL + CXCL12; §P < .05 siRNA-SPRED-1 vs siRNA-SPRED-1 + CXCL12; ¶P < .05 anti-miR-126-3p vs anti-miR-126-3p + siRNA-SPRED-1. Magnification: x40

Recently, it has been shown that the pro-angiogenic process is controlled by chemokines through miRs regulation in chondrosarcoma and osteosarcoma cells.²⁸⁻³¹ However, there is no data indicating how chemokines impact miR regulation in the EC biological response and their impact on chemokine-induced angiogenesis.

The aim of our work was to compare, in parallel, the effect of separate and combined miR-126-3p and miR-126-5p action on EC migration and on vascular tubes formation (2D-angiogenesis) induced by CXCL12 and mediated by EC.

Our results showed for the first time that CXCL12 increased miR-126-3p expression, in both HUVEC in vitro and rat aortas ex vivo models and that this effect was associated with activation of *egfl7*-miR-126 promoter. Knowing that miR-126-3p is encoded by the 7th intron of the *egfl7* gene, we wished to demonstrate an increase of the promoter transcriptional activity using a plasmid reporter strategy associated with luciferase. Since the HUVEC lipofection leads to very low transfection efficiency and based on previous reports^{17,32-35} we chose the human hepatocyte-derived carcinoma cell line Huh7 to

study this promoter activity. Although they represent a different cell model, it has been shown that the Huh7 cells present the CXCL12 specific receptors on their surface and, CXCL12 induce the similar signalling pathways (MAPK Erk1/2 and PI3K/Akt) that we found in HUVEC.³⁶ In this context, we demonstrated that CXCL12 stimulation was associated with the activation of *egfl7*-miR-126 promoter. Since *Ets1/2* is known as a specific transcription factor for *egfl7*,³⁷ we could hypothesize that CXCL12 induced *egfl7* transcriptional activity through an increase of *Ets1/2* (Figure S1). The *egfl7* transcription start site contains 2 *Ets* binding sites that bind *Ets1/2* transcription factor.¹⁷ Mutation of the *Ets* binding element decreases promoter transactivation and decreases miR-126 expression.³⁷ It has been previously shown that different growth factors and chemokines activate the *Ets* transcription factor, for example: CXCL12-induced colorectal cancer cells migration via upregulation of *Ets1*.³⁸ Based on these studies and in light of our results we hypothesize that CXCL12 enhances the miR-126 promoter activity by the upregulation of the *Ets* transcription factor responsible of miR-126 expression.

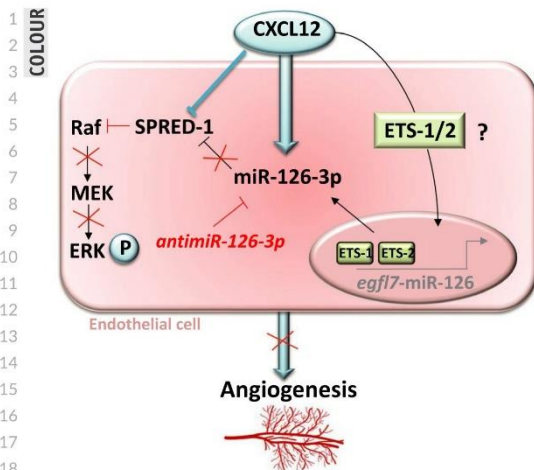


FIGURE 7 CXCL12 induces angiogenesis through miR-126-3p/SPRED-1 stimulation. Our results showed for the first time that CXCL12 enhance miR-126-3p expression and its inhibition leads to a decrease of angiogenesis induced by CXCL12 in vitro. Moreover CXCL12 induced a decrease in SPRED-1 (miR-126-3p known target) and this downregulation improves CXCL12-induced angiogenesis in vitro. In this context, we hypothesized that CXCL12 induced miR-126-3p expression through the expression of Ets1/2 transcription factor complex

Regarding angiogenesis stimulation, according to the literature, CXCL12 and miR-126-3p had pro-angiogenic effect on both migration and 2D-angiogenesis in vitro and ex vivo^{39,40} models. However, in our experimental conditions the miR-126-5p did not seem to have any detectable effect on this process.

Our results and others¹⁷ suggest that miR-126-3p had a strong pro-angiogenic potential. Our model showed that miR-126-5p alone had no effect on 2D-angiogenesis. However, its over-expression (after premiR-126-3p/5p co-transfection) reduced the pro-angiogenic effect of miR-126-3p in HUVEC. In contrast, Zhou et al,⁴¹ found in retinal EC, that silencing the miR-126-3p repressed angiogenesis, while the over-expression of miR-126-5p increased angiogenesis.⁴¹

We believe that this discrepancy was due to the differences between the experimental models and experimental conditions (cells types, presence of growth factors, and time of vascular tubes formation).

We further demonstrated that miR-126-3p is crucial for CXCL12-induced migration and 2D-angiogenesis in both in vitro and ex vivo models. Indeed, we showed that in absence of miR-126-3p (after anti-miR-126-3p transfection) there was an abolition of CXCL12 pro-angiogenic properties. These data suggest that the presence of miR-126-3p is essential to stimulate the pro-angiogenic pathways induced by CXCL12. However, we observed conflicting results in our 2D-angiogenesis ex vivo model. Indeed, in the absence of CXCL12 stimulation, we observed that the inhibition of miR-126-3p leads to an increase of 2D-angiogenesis ex vivo. Interestingly, we and others

have previously shown that the absence of miR-126-3p leads to CXCL12 synthesis and secretion in HUVEC culture medium.^{21,42}

In addition, since in our ex vivo experimental condition the miR transfection was done into the whole aorta, not only the EC but also the smooth muscle cells (SMC) and the fibroblasts could be transfected. In this context, it has been demonstrated by Jansen et al,⁴³ that inhibition of miR-126-3p in SMC leads to an increase of its proliferation. Furthermore, it has been shown that the absence of miR-126-3p can lead to VEGF-A synthesis.⁴⁴

Since CXCL12 and anti-miR-126-3p have been previously shown to enhance VEGF-A expression⁴⁴⁻⁴⁶ and both of them can stimulate PKC/Erk1/2 pro-angiogenic pathways through the stimulation of Raf protein,⁴⁷⁻⁴⁹ we hypothesize that anti-miR-126-3p could have pro-angiogenic action in our long-term ex vivo tissue culture model. In addition, since in ex vivo experiments the rat aortas were kept in ex vivo tissue culture for 9 days, we hypothesized that after anti-miR-126 transfection there was an increase of SMC proliferation associated with VEGF synthesis, which could explain the pro-angiogenic effect in the absence of CXCL12. However, in the presence of CXCL12 we showed that miR-126-3p was crucial for the chemokine pro-angiogenic effects.

Then, we hypothesized that SPRED-1 (a miR-126-3p known target)¹⁷ could be implicated in CXCL12-induced angiogenesis. To prove this, we showed for the first time that CXCL12 inhibited SPRED-1 expression in HUVEC.

Interestingly, our results showed that, the knock-down of SPRED-1 expression led to the stimulation of 2D-angiogenesis in HUVEC associated with an increase in CXCL12-induced angiogenesis. These data suggest a relationship between SPRED-1 and CXCL12. Knowing that, we hypothesized that inhibition of SPRED-1 could abolish the anti-angiogenic effect induced by the absence of miR-126-3p and restored with CXCL12 pro-angiogenic function. We demonstrated, in accordance with Wang et al,¹⁷ that the knock-down of SPRED-1 expression blocked the action of anti-miR-126-3p leading to inhibition of the anti-miR-126-3p-based decrease of angiogenesis. However, in the presence of CXCL12, although inhibition of SPRED-1 abolished the anti-miR-126-3p-based decrease of angiogenesis, this effect was not sufficient to recover an equivalent level to that which was observed after the transfection of siRNA-SPRED-1 only.

As demonstrated by Ho et al,⁵⁰ in order to show the CXCL12 pro-angiogenic effects, this process requires the joint activation of the Erk1/2 and PI3K/Akt signalling pathways. Furthermore, in EC, SPRED-1 acts as a negative regulator of the Erk1/2 signalling pathway. Under our experimental conditions, although the Erk1/2 pathway can be unblocked by the SPRED-1 inhibition, it has been demonstrated by Fish et al,¹¹ that miR-126-3p inhibition leads to the PI3K/Akt-pathway inactivation through the PI3KR2 modulation (Figure S2). Thus, in our model, when SPRED-1 and miR-126-3p were inhibited (after co-transfection with siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p), the Erk1/2 pathway could be activated while the PI3K/Akt channel remains inactivated. Therefore, the inhibition of SPRED-1 (after siRNA-SPRED-1 transfection) was not sufficient to restore the CXCL12 pro-angiogenic effects in anti-miR-126-transfected HUVEC.

1 Taken together, under these conditions, it is clear that miR-
2 126-3p plays a key role in CXCL12-induced activation of both Erk1/2
3 and PI3K/Akt pro-angiogenic pathways (Figure 7).

5 | CONCLUSION

8 In conclusion, in this study we focused on two pro-angiogenic factors,
9 the miR-126 and chemokine CXCL12, showing that the miR-126/
10 CXCL12 axis was implicated in endothelial cell migration and vascular
11 tubes formation. In this context, we demonstrated that: (a) CXCL12
12 modulated the miR-126-3p expression in vitro in HUVEC model, as
13 well as ex vivo in rat aortas model; (b) miR-126 was necessary for the
14 pro-angiogenic effect induced by CXCL12; (c) SPRED-1 was impli-
15 cated in CXCL12-induced angiogenesis; (d) miR-126-3p enhanced cell
16 migration and vascular tubes formation, in HUVEC, however, the miR-
17 126-5p had no effect on both processes.

19 ACKNOWLEDGEMENTS

20 The authors thank the INSERM U1272 laboratory of Professor
21 Carole PLANES for giving us access to their animals in order to allow
22 us to carry out our experiments.

24 CONFLICT OF INTEREST

25 The author declares that there is no conflict of interest.

27 AUTHOR CONTRIBUTIONS

28 **Kévin BASSAND**: Conceptualization (lead); Formal analysis (lead);
29 Funding acquisition (equal); Investigation (lead); Methodology (lead);
30 Project administration (lead); Supervision (equal); Validation (lead);
31 Visualization (lead); Writing-original draft (lead); Writing-review
32 & editing (lead). **Laurent Metzinger**: Conceptualization (equal);
33 Methodology (equal); Writing-original draft (equal). **Meriem NAIM**:
34 Writing-original draft (supporting); Writing-review & editing (equal).
35 **Nesrine MOUHOUBI**: Conceptualization (supporting). **Oualid**
36 **Haddad**: Conceptualization (supporting); Investigation (supporting);
37 Methodology (supporting); Resources (supporting). **Vincent ASSOUN**:
38 Investigation (supporting). **Naima ZAID**: Resources (supporting).
39 **Odile SAINTE-CATHERINE**: Investigation (supporting); Resources
40 (supporting). **Amena BUTT**: Conceptualization (supporting);
41 Resources (supporting). **Erwan GUYOT**: Conceptualization (support-
42 ing); Funding acquisition (equal). **Olivier OUDAR**: Conceptualization
43 (supporting). **Christelle Laguillier**: Conceptualization (supporting);
44 Funding acquisition (equal). **Angela SUTTON**: Conceptualization (sup-
45 porting); Funding acquisition (equal); Writing-original draft (support-
46 ing); Writing-review & editing (supporting). **Nathalie CHARNAUX**:
47 Conceptualization (supporting). **Valérie METZINGER-LE MEUTH**:
48 Conceptualization (equal); Methodology (equal); Writing-original draft
49 (equal). **Hanna HLAWATY**: Conceptualization (lead); Formal analysis
50 (lead); Funding acquisition (lead); Methodology (lead); Project admin-
51 istration (lead); Resources (equal); Supervision (lead); Validation (lead);
52 Visualization (lead); Writing-original draft (lead); Writing-review & ed-
53 iting (lead).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings of this study could be obtained from
the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Kévin Bassand  <https://orcid.org/0000-0002-7789-5004>

REFERENCES

1. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn*. 2001;220(1):1-17.
2. Zhang Y, Zhang H, Lin S, et al. SDF-1/CXCR7 chemokine signalling is induced in the peri-infarct regions in patients with ischemic stroke. *Aging Dis*. 2018;9(2):287-295.
3. Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, et al. Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *J Leukoc Biol*. 1999;65(6):744-749.
4. Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, et al. RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis*. 2012;15(4):727-744.
5. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):755-762.
6. Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J. SDF-1 α involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(4):218-227.
7. Ho TK, Tsui J, Xu S, Leoni P, Abraham DJ, Baker DM. Angiogenic effects of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) variants in vitro and the in vivo expressions of CXCL12 variants and CXCR4 in human critical leg ischemia. *J Vasc Surg*. 2010;51(3):689-699.
8. Welten SMJ, Goossens EAC, Quax PHA, Nossent AY. The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2016;110(1):6-22.
9. Bartel DP, Chen C-Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004;5(5):396-400.
10. Sun L-L, Li W-D, Lei F-R, Li X-Q. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *J Cell Mol Med*. 2018;22(10):4568-4587.
11. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008;15(2):272-284.
12. Wang X, Lian Y, Wen X, et al. Expression of miR-126 and its potential function in coronary artery disease. *Afri Heal Sci*. 2017;17(2):474-480.
13. Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*. 2014;42(4):1135-1140.
14. Poissonnier L, Villain G, Soncin F, Mattot V. MiR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration. *Cardiovasc Res*. 2014;102(3):436-447.
15. Zhou Q, Anderson C, Hanus J, et al. Strand and cell type-specific function of microRNA-126 in. *Angiogenesis*. 2016;24(10):1823-1835.
16. Villain G, Poissonnier L, Noueihed B, et al. miR-126-5p promotes retinal endothelial cell survival through SetD5 regulation in neurons. *Development*. 2018;145(1):dev156232.
17. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15(2):261-271.
18. Quintanar-Audelo M, Yusoff P, Sinniah S, Chandramouli S, Guy GR. Sprouty-related Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1-domain-containing protein (SPRED1), a tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (SHP2) substrate in the ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(26):23102-23112.

19. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat Med*. 2014;20(4):368-376.
20. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100):ra81.
21. Mondadori dos Santos A, Metzinger L, Haddad O, et al. miR-126 is involved in vascular remodeling under laminar shear stress. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-11.
22. Staszek T, Zapala B, Polus A, et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Pol Arch Med Wewn*. 2011;121(10):361-367.
23. Metzinger-Le Meuth V, Burtsey S, Maitrias P, Massy ZA, Metzinger L. microRNAs in the pathophysiology of CKD-MBD: biomarkers and innovative drugs. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(1):337-345.
24. Jiang L, Lin C, Song L, et al. MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- κ B/ κ B α negative feedback loop. *J Clin Invest*. 2012;122(1):33-47.
25. Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, et al. Xxx. *Oncotarget*. 2016;7(19):28460-28487.
26. Zhou H, Huang X, Cui H, et al. miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2010;116(26):5885-5894.
27. Tarassishin L, Loudig O, Bauman A, Shafit-Zagardo B, Suh H-S, Lee SC. Interferon regulatory factor 3 inhibits astrocyte inflammatory gene expression through suppression of the proinflammatory miR-155 and miR-155*. *Glia*. 2011;59(12):1911-1922.
28. Liu GT, Huang YL, Tzeng HE, Tsai CH, Wang SW, Tang CH. CCL5 promotes vascular endothelial growth factor expression and induces angiogenesis by down-regulating miR-199a in human chondrosarcoma cells. *Cancer Lett*. 2015;357(2):476-487.
29. Liu G-T, Chen H-T, Tsou H-K, et al. CCL5 promotes VEGF-dependent angiogenesis by down-regulating miR-200b through PI3K/Akt signaling pathway in human. *Oncotarget*. 2014;5(21):10718-10731.
30. Wang L-H, Lin C-Y, Liu S-C, et al. CCL5 promotes VEGF-C production and induces lymphangiogenesis by suppressing miR-507 in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(24):36896-36908.
31. Liao Y-Y, Tsai H-C, Chou P-Y, et al. CCL3 promotes angiogenesis by dysregulation of miR-374b/ VEGF-A axis in human osteosarcoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(4):4310-4325.
32. Zhou S, Liang P, Zhang P, Zhang M, Huang X. The long noncoding RNA PDK1-AS/miR-125b-5p/VEGFA axis modulates human dermal microvascular endothelial cell and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis after thermal injury. *J Cell Physiol*. 2020;236(4):3129-3142.
33. Pang J, Ye L, Chen Q, Wang J, Yang X, He W, Hao L. The effect of MicroRNA-101 on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells during hypoxia and in mice with myocardial infarction. *Biomed Res Int*. 2020;2020:5426971.
34. Anene C, Graham AM, Boyne J, Roberts W. Platelet microparticle delivered microRNA-Let-7a promotes the angiogenic switch. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(8):2633-2643.
35. Soufi-Zomorrod M, Hajifathali A, Kouhkan F, Mehdizadeh M, Rad SM, Soleimani M. MicroRNAs modulating angiogenesis: miR-129-1 and miR-133 act as angiomiR in HUVECs. *Tumour Biol*. 2016;37(7):9527-9534.
36. Sutton A, Friand V, Brulé-Donneger S, et al. Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C Motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res*. 2007;5(1):21-33.
37. Harris Ta, Yamakuchi M, Kondo M, Oettgen P, Lowenstein CJ. Ets-1 and Ets-2 regulate the expression of miR-126 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(10):1990-1997.
38. Li P, Wei J, Li X, et al. 17 β -Estradiol enhances vascular endothelial Ets-1/miR-126-3p expression: the possible mechanism for attenuation of atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):594-603.
39. Wang Y, Huang J, Li Y, Yang G. Roles of chemokine CXCL12 and its receptors in ischemic. *Stroke*. 2012;166-172.
40. Qu Q, Bing W, Meng X, et al. Upregulation of miR-126-3p promotes human saphenous vein endothelial cell proliferation in vitro and prevents vein graft neointimal formation ex vivo and in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(63):106790-106806.
41. Zhou Q, Anderson C, Hanus J, et al. Strand and cell type-specific function of microRNA-126 in angiogenesis. *Mol Ther*. 2016;24(10):1823-1835.
42. Van Solingen C, De Boer HC, Bijkerk R, et al. MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1+/Lin- progenitor cells in ischaemia. *Cardiovasc Res*. 2011;92(3):449-455.
43. Jansen F, Stumpf T, Proebsting S, et al. Inter-cellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;104:43-52.
44. Ye P, Liu J, He F, Xu W, Yao K. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci*. 2013;11(1):17-23.
45. Ge HY, Han ZJ, Tian P, et al. VEGFA expression is inhibited by arsenic trioxide in HUVECs through the upregulation of Ets-2 and miRNA-126. *PLoS One*. 2015;10(8):1-18.
46. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells in vivo neovascularization induced by. *Stromal-Derived*. 1999;154(4):1125-1135.
47. Valdés G, Erics R, Chacón C, Corthorn J. Angiogenic, hyperpermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;6:1-11.
48. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. OTT-36109-emerging-targets-in-cancer-management-role-of-the-cxcl12-cx. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1347-1361.
49. Moghaddam AB, Namvar F, Moniri M, Tahir PM, Azizi S, Mohamad R. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: a review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*. 2015;20(9):16540-16565.
50. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as potential target of therapeutic angiogenesis in critical leg ischaemia. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:1-7.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Bassand K, Metzinger L, Naim M, et al. miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2021;00:1-13. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16460>

Approche glycobiologique du carcinome hépatocellulaire : études biocliniques et cellulaires.

Résumé :

Des chimiokines et des facteurs de croissance nommés " Heparin Binding Proteins " (HBP) dont l'activité biologique est associée à leur liaison aux chaînes héparane sulfate (HS), dépendantes des caractéristiques structurales de ces dernières, sont impliquées dans la carcinogenèse hépatique. Mes travaux de thèse se sont focalisés sur différents aspects de la biologie des chaînes HS et ses liens potentiels avec le carcinome hépatocellulaire (CHC). Un microenvironnement inflammatoire est associé au développement du CHC en particulier avec l'action du Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α). A ce jour, l'impact d'un environnement inflammatoire sur les caractéristiques aux plans qualitatif et quantitatif des chaînes HS dans le CHC n'est pas connu. J'ai étudié dans un modèle d'hépatome humain (Huh7) les effets du TNF- α sur les caractéristiques de ces chaînes HS et l'expression des enzymes de biosynthèse et de modification des chaînes HS, mettant en évidence les effets potentiels d'un environnement inflammatoire sur la composante glycanique dans ce modèle. Par ailleurs, les enzymes modifiant les chaînes HS pourraient être utiles en tant que biomarqueur dans le CHC. Mes travaux ont permis de mettre en évidence le potentiel intérêt de la concentration sérique de SULF-2 en particulier pour sa valeur pronostique dans le CHC avancé dans une cohorte de patients atteints de cirrhose alcoolique. Enfin, avec ce travail, nous avons recherché l'existence d'associations entre des variants des gènes codant pour SULF-1, SULF-2 et HPSE et l'évolution de la maladie et son pronostic dans une cohorte de patients atteints de NASH. L'ensemble de ce projet consolide les données montrant que les chaînes HS, et les enzymes les modifiant, possèdent un rôle clé dans les processus tumoraux hépatiques et pourrait déboucher sur des applications cliniques avec l'identification de biomarqueurs et l'établissement de nouvelles pistes thérapeutiques.

Mots clés : Carcinome hépatocellulaire, TNF- α , héparane sulfate, sulfatases, héparanase, polymorphismes génétiques.

Abstract :

Chemokines and growth factors called "Heparin Binding Proteins" (HBP) whose biological activity is associated with their binding to heparan sulfate (HS) chains, depending on their structural characteristics, are involved in liver carcinogenesis. My thesis work focused on different aspects of the biology of HS chains and their potential links with hepatocellular carcinoma (HCC). An inflammatory microenvironment is associated with the development of HCC in particular with the action of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α). To date, the impact of an inflammatory environment on the qualitative and quantitative characteristics of HS chains in HCC is not known. I studied in a human hepatoma model (Huh7) the effects of TNF- α on the characteristics of these HS chains and the expression of HS chain biosynthesis and modification enzymes, highlighting the potential effects of an inflammatory environment on the glycan component in this model. In addition, various elements suggest that some HSPGs such as HS chain modifying enzymes could be useful as biomarkers in HCC. My work has highlighted the potential interest of serum SULF-2 concentration in particular for its prognostic value in advanced HCC in a cohort of patients with alcoholic cirrhosis. Finally, with this work, we investigated the existence of associations between gene variants encoding SULF-1, SULF-2 and HPSE and disease progression and prognosis in a cohort of patients with NASH. This project consolidates the data showing that HS chains, and enzymes modifying them, have a key role in liver tumor processes and could lead to clinical applications with the identification of biomarkers and the establishment of new therapeutic targets.

Keywords: hepatocellular carcinoma, TNF- α , heparan sulfate, sulfatases, heparanase, genetic polymorphisms.