Reprogrammation métabolique des carcinomes hépatocellulaires présentant une activation aberrante de la beta-caténine

Nadia Senni

▶ **To cite this version:**

Nadia Senni. Reprogrammation métabolique des carcinomes hépatocellulaires présentant une activation aberrante de la beta-caténine. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS075 . tel-02087293v2

HAL Id: tel-02087293

https://theses.hal.science/tel-02087293v2

Submitted on 2 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2017SACLS075

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°582
CBMS Cancérologie : biologie – médecine - santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Mme Nadia SENNI

Reprogrammation métabolique des carcinomes hépatocellulaires présentant une activation aberrante de la β-caténine

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 4 Avril 2017 :

Composition du Jury :

M. Christian AUCLAIR	Pr., Gustave Roussy	Président
M. Hervé GUILLOU	DR, Toxalim INRA UMR 1331	Rapporteur
M. Laurent LE CAM	DR, IRCM	Rapporteur
Mme. Marie-Christine MULTON	Senior scientific advisor, SANOFI	Examinatrice
M. Bernard FROMENTY	DR, Rennes 1 Inserm U991	Examinateur
Mme. Pascale BOSSARD	CR, Institut Cochin Inserm U1016	Directrice de thèse

A Jamila, Ferhat, Karim, Kamel, Karima, Mehdi et Nadir

Remerciements

Je remercie très sincèrement le professeur Christian Auclair de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je tiens à adresser un merci tout particulier à mes rapporteurs Laurent Le Cam et Hervé Guillou. Je remercie également Bernard Fromenty et Marie-Christine Multon d'avoir accepté d'avoir accepté d'être mes examinateurs.

A Pascale Bossard qui a dirigé cette thèse, un immense merci. Merci de m'avoir transmis tes connaissances. Merci pour toutes tes idées et le million de discussions scientifiques (ou non) que nous avons partagé. Tu as dirigé ce travail magistralement et rien n'aurait été possible sans toi. Merci d'être toujours quelqu'un de compréhensif et d'humain. Merci pour tes encouragements et ta gentillesse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé m'épanouir dans ce projet. MERCI pour tout!

Merci à Christine Perret de m'avoir accueilli dans son équipe il y a déjà 5 ans. Merci de laisser toujours ta porte ouverte et d'être toujours disponible. Un très grand merci pour tes conseils, ton incroyable connaissance scientifique et la bienveillance dont tu as toujours fait preuve.

Merci à Sabine Colnot de m'avoir fait confiance et de m'avoir impliquée dans ses projets. Un très grand merci pour tes encouragements, ton aide et ton soutien dans ma recherche de post-doc, ça a été très important pour moi.

A Béatrice Romagnolo, merci pour toutes les discussions que nous avons partagé. Merci pour tes encouragements et tous tes conseils.

A Hélène Gilgenkrantz merci pour les discussions que nous avons pu partager.

Merci à Catherine Postic pour son aide dans ma recherche de post-doc. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes interrogations avec tant de gentillesse.

Marie, un énorme merci. Merci pour toutes les discussions et les moments de rire. Tu es vraiment quelqu'un de formidable, de gentil et de juste. Tu es brillante, crois en toi ! Je suis heureuse de pouvoir te compter parmi mes amis. Tu vas énormément me manquer.

Coco merci de m'avoir fait autant rire (souvent malgré toi ^^). Merci d'être une personne aussi profondément gentille. J'ai rarement vu une bosseuse pareille, je suis sure que tu pourras parvenir à faire tout ce que tu veux. Je te souhaite très sincèrement le meilleur, tu le mérites.

Mathilde, merci d'être arrivée au labo. Je n'aurais pas pu rêver mieux pour prendre la suite de ce projet. Tu vas t'en sortir comme une chef ! Un immense merci pour ton aide ces derniers mois. Tu es vraiment une fille super et je te souhaite une magnifique thèse.

Shirley et Sara, merci pour votre gentillesse. Je vous souhaite le meilleur pour la fin de thèse.

Un très grand merci à vous toutes, juste parce que venir travailler tous les jours en étant heureuse de retrouver ses ~~collègues~~ amies ce n'est pas donné à tout le monde. On a beau travailler toutes sur des sujets différents, en étant au labo chaque jour avec vous je sais ce que c'est de faire partie d'une équipe. Vous n'imaginez pas à quel point vous allez me manquer.

Merci à John pour toutes ses blagues (rarement) drôles. Les moments que nous avons partagés au labo ont été parmi les meilleurs. Tu es vraiment quelqu'un de bien et j'espère que tu pourras réaliser tous tes projets.

Merci à Angé d'être toujours disponible pour répondre à mes questions et merci pour ta bonne humeur.

Merci à Cécile d'avoir toujours été gentille et bienveillante avec moi. Merci d'avoir un si bon fond.

Merci à Chiara d'avoir partagé tous ces bons moments avec moi. J'espère que tu t'éclates dans ta nouvelle vie Londonienne et que tu viendras me rendre visite dans ma nouvelle vie ☺

Anaïs, petite, merci pour ta joie de vivre et ta bonne humeur. Je te souhaite une belle carrière et de t'épanouir dans tout ce que tu fais.

Robin, merci d'avoir subi toutes mes blagues ^^ je te souhaite de faire une belle thèse et de toujours profiter de la vie comme tu le fais.

Merci à Clotilde pour ton expertise et pour ton aide dans notre projet.

Un très grand merci à Véronique Lenoir pour tous tes petits conseils qui m'auront souvent aidé pendant mes manips.

Merci à Carole, Jacques, Sylvain et Sabine pour leurs conseils et toutes les discussions (souvent drôles) que nous avons partagé.

Mariangela, la ritale, raggio di sole ! Merci d'être toi ! de parler aussi fort, d'être théâtrale et souvent très drôle. Tu es vraiment quelqu'un de bien. Merci d'être mon amie et d'avoir partagé tant de bons moments avec moi. Nos moments de rire vont me manquer.

Merci à Jean-Christophe pour les conversations au milieu du couloir que nous avons souvent eu. Merci pour tes conseils et pour ton écoute.

Aux pro de la prolif :

Merci à Chantal Desdouets d'avoir toujours été gentille avec moi. Merci pour ta spontanéité et ta vitalité. Je n'oublierai jamais les moments passé à Palm Beach Florida avec toi.

Merci à Séverine pour ta douceur et ta gentillesse. Merci d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions « manip ». Merci pour ton immense connaissance scientifique.

Vanessa, merci d'avoir partagé tant de choses avec moi. Merci de toujours comprendre mes blagues (et de bien souvent y rire). J'espère que tu t'épanouiras dans tout ce que tu feras.

Myriam merci d'être une personne aussi gentille et merci pour le sourire que tu affiches toujours. C'est toujours un bonheur de te croiser dans les couloirs et de discuter avec toi.

Merci à Nadia pour ton aide très précieuse et ta gentillesse.

Merci à Jocelyne pour tes conseils et ton humour.

Merci à Jean-Pierre pour les discussions que nous avons partagé au détour des couloirs et pour ta joie de vivre et ton humour.

Sandrine, merci d'être devenue une amie. Je suis vraiment heureuse que tu fasses partie de mes proches. Merci d'être une personne sur qui on peut compter et qui est toujours prête à tendre la main. Je trouve que tu assures vraiment dans ton travail et dans ta vie personnelle. Je te souhaite de faire une très belle thèse et le meilleur pour ta vie personnelle et professionnelle.

Merci à Romain, Mathilde, Manon d'avoir souvent répondu à mes questions. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos thèses.

Merci à l'équipe Maire pour les discussions que nous avons pu partager.

Merci à Floriane pour tous les moments que nous avons passé ensemble à rire et à refaire le monde. J'espère qu'il y aura encore de nombreuses occasions. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Catherine, Yanig, Maryse, Christine et Michèle qui font un travail formidable. Un merci tout particulier à Patoche, tu es une gestionnaire super et une très belle personne. Nos petites discussions au coin de l'imprimante me manqueront.

Merci à Mimi et Nathalie pour leur joie de vivre légendaire. Votre gentillesse me manquera énormément.

Un grand merci aux anciens : Medhi, Tiphaine, Pax, Fred, David, merci d'avoir tous contribué à faire de ces 4 années une expérience inoubliable. Merci pour tous les moments passés ensemble.

Merci à Massiré d'avoir été là quand j'ai commencé au labo. Merci d'être aussi brillant et aussi humble. Je n'oublierai jamais les mois de coloc dans notre bureau à chanter…

Un grand merci à Julien d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes innombrables questions. Tu es vraiment brillant et toujours prêt à aider. Je te souhaite de meilleur pour la suite de ta carrière.

Pauline, Claire, Emilien et Yoann… les amis de mes amis sont mes amis. Merci de m'avoir aussi bien intégrée. Je suis vraiment heureuse de vous connaitre tous et que vous fassiez aujourd'hui partis de mes amis. J'espère qu'on aura encore de nombreuses occasions de tous se retrouver. Vous me manquerez.

Rozenn, ma Roro, merci pour tout. Une des plus belles rencontres que j'ai faites durant mes années à Cochin. Je n'aurais pas imaginé connaitre quelqu'un comme toi. Merci d'être l'une des personnes les plus gentilles et formidables que je connaisse. Merci d'être toujours là pour me soutenir. Merci d'avoir autant ri avec moi. J'espère que quel que soit l'endroit où la vie nous mène on trouvera toujours un moyen de se retrouver. Je te souhaite rien de moins que le meilleur, personne ne le mérite plus que toi. Tu es vraiment incroyable et je sais que tu t'en sortiras dans tout ce que tu feras.

Antoine, merci. Merci de me soutenir et de me supporter, d'être là quand tout va bien et aussi quand tout va mal. Cette thèse m'a apportée énormément de choses et de toutes tu es de loin la meilleure. Quoi qu'il arrive tu me comprends et tu m'encourages. Merci de toujours rire

avec moi et pour tous les incroyables moments que nous avons partagé, je sais qu'il y en aura encore beaucoup. Je ne pensais pas partager autant de choses avec quelqu'un un jour, je me sens extrêmement chanceuse de t'avoir rencontré. Merci de croire en moi et de préparer l'avenir avec moi, merci de me donner de la force et de la motivation. Je crois énormément en toi et je sais que tu t'en sortiras parfaitement dans notre nouvelle vie. Je t'aime.

Merci à mes parents, Jamila et Ferhat, d'avoir toujours cru en moi-même quand moi je doutais. Merci de m'avoir toujours poussée et de m'avoir dit que je pouvais réussir. Merci Karim d'avoir toujours été là pour moi, merci pour toutes les choses que tu m'as apprises et que tu m'as fait découvrir. Je n'aurai jamais pu faire ce chemin si tu n'avais pas été là, je te dois énormément. Merci à Kamel, Karima, Mehdi, Nadir et Lila d'être toujours là quand j'en ai besoin et de me soutenir dans mes projets. Et enfin merci à mon petit Yanis d'être le plus mignon des neveux.

Remerciements 2
Liste des abréviations 11
Liste des figures 14
Avant-propos 17
Introduction 20
I. Le foie 21
A. Organisation hépatique 21
B. Zonation métabolique hépatique 22
a. Métabolisme des carbohydrates 23
b. Zonation du métabolisme glucidique 25
c. Métabolisme des lipides 26
d. Zonation de la lipogenèse 28
e. Zonation métabolique de la β-oxydation et de la cétogenèse 33
f. Le cycle de Krebs 35
II. Le récepteur nucléaire PPARα et le métabolisme hépatique: 38
A. Structure de PPARα 38
B. Ligands PPARα 39
C. Mécanisme d'action de PPARα 40
a. Mécanisme de transactivation 40
b. Mécanisme de transrepression 40
D. Rôles de PPARα dans la physiologie hépatique 41
a. PPARα dans le contrôle de la réponse au jeûne 41
III. La β-caténine 45
A. Structure de la β-caténine 45
B. Rôle de la β-caténine dans les jonctions adhérentes 46
C. Voie de signalisation Wnt/β-caténine 47

D. Rôle physiologique de la β-caténine dans le foie 48
a. La voie Wnt/β-caténine et développement hépatique 49
b. Contrôle du métabolisme hépatique par la β-caténine 49
E. Interractions entre β-caténine et facteurs de transcription 53
a. TCF 53
b. FoxO 54
c. HIF 55
d. HNF4α 56
IV. Le carcinome hépatocellulaire 58
A. Facteurs de risques 58
B. De la cirrhose vers le CHC 60
C. La transformation maligne de l'adénome en CHC 60
D. Classification des CHC 61
E. Le carcinome hépatocellulaire lié à la β-caténine 64
a. Caractéristiques morphologiques des tumeurs *CTNNB1* mutées 64
b. Le modèle Apc^{KO} 65
V. Métabolisme tumoral 67
A. L'effet Warburg 67
B. Reprogrammation métabolique et besoins énergétiques 68
C. La biosynthèse 70
a. Acides nucléiques 70
b. Lipides 71
D. Equilibre oxydo-réducteur 72
E. La reprogrammation métabolique : une caractéristique très hétérogène 75
F. Reprogrammation métabolique et mutations génétiques 76
a. Mutations d'enzymes du métabolisme 77

b. Rôle des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs dans la reprogrammation métabolique 78
G. Métabolisme tumoral et microenvironnement 80
H. Le métabolisme comme outil diagnostique 82
I. Le métabolisme comme cible thérapeutique 85
Objectifs 89
Modèles d'étude 91
A. Modèle d'activation de la β-caténine 92
B. Modèle de CHC sans activation de la β-caténine 93
C. Modèle PPARα KO 94
Résultats 95
Discussion 145
Bibliographie 165
Annexes 191

Liste des abréviations

2-HG : 2-hydroxyglutarate
AA : acide aminé
AANS : acides aminés non-essentiels
AB : acides biliaires
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ACLY: ATP-citrate lyase
ACO : acyl-CoA oxydase
ACS : acyl-CoA synthétase
ACSS : acétyl-CoA synthase
ADN : acide désoxyribonucléique
AF-1 : activation function-1
AF-2 : activation function-2
AFB1 : aflaoxine B1
AG : acide gras
Ahr : aryl hydrocarbon receptor
AP-1 : activator protein
APC : adenomatous polyposis coli
apoB100 : apolipoprotéine B100
APO-CIII : apolipoprotéine CIII
ARN : acide ribonucléique
ASCT2 : amino-acid transporter 2
ATGL : adipose triglyceride lipase
ATP : adénosine triphosphate
BDH : β-hydroxybutyrate déshydrogénase
C/EBPβ : (CCAAT-enhancer-binding protein β
CAR : constitutive androstane receptor
C-AT : carnitine acyl-carnitine translocase
CBP : Creb binding protein
CD36 : cluster of differenciation 36
CHC : carcinome hépatocellulaire
CK1 : casein kinase 1
CoA : coenzyme A
CoASH : coenzyme A
CPT1 : carnitine palmitoyl transférase 1
CPT2 : carnitine palmitoyl transférase 2
CS : citrate synthase
CT : computationized tomography
C-TAD : domaine C-terminal
CTNNB1 : catenin-β1
DAG : diglycérides
DBD : DNA binding domain
DR1 : direct repeat 1
Dvl : dishevelled
ERO : espèces réactives de l'oxygène
F2,6BP : fructose-2,6-bisphosphate
FABP1 : liver fatty acid bonding protein
FAD : flavine adénine dinucleotide
$FADH_2$: flavine adénine dinucléotide réduit
FAS : fatty acid synthase
FATP : fatty acid transport protein
FDG : fuorodéoxyglucose
FH : fumarate hydratase
foxO1 : forkhead box protein 1
FTHA : 14(R,S)-[18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid
Fz : frizzled
G6P : glucose-6-phosphate
G6Pase : glucose-6-phosphatase
G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase
GK : glucokinase
Gls2 : glutaminase 2
GRIP1/TIF2 : glucocorticoid receptor-interacting protein 1/transcriptional mediators/intermediary factor 2
GS : glutamine synthase
GSK3β : glycogen synthase kinase 3β
GTP : guanosine triphosphate
HAT : histone acétyltransférase
HBV : hépatite B
HCV : hépatite C
HIF1α : hypoxia factor 1 α
HMGCS2 : hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase mitochondriale
HNF1α : hepatocyte nuclear factor 1α
HNF4α : hepatocyte nuclear factor 4
HSL : hormone sensitive lipase
IDH : isocitrate déshydrogénase
IL6ST : interleukin 6 signal transducer
JNK : Jun N-terminal kinase
LAT1 : large amino transporter
LBD : ligand binding domain
LCAD : long chain acyl-CoA deshydrogenase
LDH : lactate déshydrogénase

Lef : lymphoid enhancer-binding factor
LGR4/5 : leucine rich repeat containing G-protein coupled receptors 4/5
LPK : liver pyruvate kinase
LPL : liporpotéine lipase
LRP5/6 : low-density lipoprotein recptor-related protein 5/6
LTB4 : leukotriène B4
MCAD : medium chain acyl-CoA deshydrogenase
MCT : monocarboxylate transporters
MLL : mixed lineage leukemia
MMPs : métalloprotéases de la matrice
MODY : mature onset diasbetes of the youth
MTP : microsomal transfert protein
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NAFLD : non alcoolic fatty liver disease
NCoR : nuclear receptor co-repressor
NDBG : nodule dysplasique de bas grade
NDHG : nodule dysplasique de haut grade
NFκB : nuclear factor κ B
NLS : nuclear localization sequence
Nrf2 : nuclear factor E2-related factor 2
N-TAD : domaine N –terminal
PC : péricentral
PC : phosphatitylcholine
PC : pyruvate carboxylase
PDH : pyruvate déshydrogénase
PEP : phosphoenolpyrute
PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase
PET : positron emission tomography
PI3K : phosphoinositide-3-kinase
PKM2 : pyruvate kinase M2
PNPLA3 : patatin like 3
PP : périportal
PPARα : peroxisome proliferator-activated receptor α
PPARβ/δ : peroxisome proliferator-activated receptor β/δ
PPARγ : peroxisome proliferator-activated receptor γ
PPP : voie des pentoses phosphate
PPRE : peroxysome proliferator responsive element
PRPP : 5-phosphoribosyl-α-pyrophosphate
PTEN : phosphatase and tensin homolog
R5P : ribose-5-phosphate
RNF43 : ring finger protein 43
RSPO : R-spondin
RXR : retinoid x receptor
SCAD : short chain acyl-CoA deshydrogenase
SDH : succinate déshydrogénase
STAT3 : signal tranducer and activator of transcription 3
TCA : cycle des acides tricarboxyliques
TCF : transcription factor
TG : triglycéride
TGFβ : transforming growth factor β
TIGAR : TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator
TLE : transducin-like enhancer
VCAD : very long chain acyl-CoA deshydrogenase
VEGF : vascular endothelial growth factor
VLDL : very low density lipoparticules
ZNRF3 : zinc and ring finger protein 3

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentatif du lobule hépatique 23
Figure 2 : Schéma général du métabolisme du glucose dans le foie 25
Figure 3 : schéma représentatif simplifié de la synthèse d'acides gras à partir du glucose 28
Figure 4 : Schéma représentatif de la navette carnitine 31
Figure 5 : Schéma de l'oxydation des acides gras 32
Figure 6 : Schéma de la cétogenèse 33
Figure 7 : Schéma représentatif de la zonation métabolique hépatique 35
Figure 8: Schéma représentatif du cycle de Krebs 36
Figure 9 : schéma simplifié du transport des électrons au travers de la chaine respiratoire 37
Figure 10 : Schéma représentatif de la structure de PPARα 39
Figure 11 : Schéma simplifié de la transactivation et de la transrepression induite par PPARα 41
Figure 12 : Rôle de PPARα dans le métabolisme lipidique hépatique 44
Figure 13 : Les différents rôles de PPARα dans le foie 44
Figure 14 : schéma représentatif de la structure de la β-caténine 46
Figure 15 : Schéma représentatif des jonctions adhérentes 46
Figure 16 : Schéma représentatif de la voie Wnt/β-caténine 48
Figure 17 : Schéma récapitulatif des différentes fonctions de la β-caténine 53
Figure 18 : Schéma simplifié des interactions entre la β-caténine et les facteurs de transcription 56
Figure 19 : Schéma représentatif des interactions entre la β-caténine, TCF et HNF4 dans les hépatocytes péricentraux et périportaux 57
Figure 20 : mécanismes de la transformation maligne des cellules en CHC 61
Figure 21 : Schéma récapitulatif de la classification moléculaire des CHC 63
Figure 22 : Caractéristiques phénotypiques des CHC 65
Figure 23 : Schéma représentatif de l'effet Warbug 68
Figure 24 : Utilisation du glucose et de la glutamine par les cellules tumorales 70
Figure 25 : Mécanismes de contrôle de l'état rédox dans les cellules tumorales 74
Figure 26 : Schéma récapitulatif des voies métaboliques principalement altérées par la reprogrammation métabolique des cancers « Warburgiens » 74
Figure 27 : Les enzymes du métabolisme en tant qu'oncogènes 78
Figure 28 : Régulation du métabolisme par les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur 80
Figure 29 : Schéma représentatif du « reverse Warburg » 82
Figure 30 : Stratégie thérapeutique et métabolisme des cellules cancéreuses 88

Figure 31 : Modèle prétumoral d'activation de la β-caténine 92
Figure 32 : Modèle de CHC β-caténine activée 93

Avant-propos

La reprogrammation métabolique est une des caractéristiques tumorales décrites par Hanahan et Weinberg en 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011). Les cellules tumorales modifient leur métabolisme afin de subvenir à leur besoin en énergie et en macromolécules tout en maintenant un statut rédox compatible avec leur survie. L'effet Warburg, décrit pour la première fois dans les années 1920, est le phénotype métabolique le plus généralement décrit dans les tumeurs (Warburg, 1925). Il s'agit d'une dépendance énergétique des cellules à la glycolyse même en présence d'oxygène et souvent au détriment de l'utilisation des phosphorylations oxydatives. Les cellules produisent alors de très grandes quantités de lactate. Bien souvent dans ces conditions, les cellules développent une dépendance à la glutamine qui est utilisée alors dans le but de resynthétiser les intermédiaires du cycle de Krebs (DeBerardinis et al., 2007). Cependant, de nombreuses études ont aujourd'hui démontré qu'il n'existe pas un métabolisme unique que l'on puisse généraliser à toutes les tumeurs. En effet, la reprogrammation métabolique est une caractéristique hétérogène dictée par les mutations géniques et l'environnement tumoral propre à chaque tumeur (Gentric et al., 2016; Tarrado-Castellarnau et al., 2016; Yuneva et al., 2012). Ainsi, cette caractéristique constitue une cible thérapeutique intéressante cependant elle nécessite une bonne connaissance du métabolisme inhérent à chaque tumeur.

Le carcinome hépatocellulaire ou CHC est le cancer primitif du foie le plus répandu et constitue la 2ème cause de mort par cancer dans le monde (Torre et al., 2015). Son incidence est en constante augmentation et il existe aujourd'hui peu de moyens efficaces de lutter contre cette pathologie.

Dans la classification des CHC, environ 30% sont porteurs d'une mutation activatrice du gène *CTNNB1* codant pour la β-caténine (Zucman-Rossi et al., 2015). Cette protéine est un régulateur majeur de la zonation métabolique hépatique physiologique et elle gouverne un programme génique métabolique dans le foie (Benhamouche et al., 2006a; Chafey et al., 2009; Gougelet et al., 2014). Cependant, son activation aberrante entraine l'apparition de CHC. Il a été observé que ces CHC présentaient un phénotype particulier puisqu'ils sont souvent cholestatiques (ils présentent une accumulation de bile) et ne sont jamais stéatosiques (ils ne présentent jamais d'accumulation de lipides) contrairement aux autres CHC (Audard et al., 2007). D'autre part, il a été montré que les foies et CHC activés pour la β-caténine étaient négatifs en PET-scan fluorodéoxyglucose (PET-Scan FDG), une méthode d'imagerie permettant de détecter les zones présentant une forte utilisation du glucose (Chafey et al., 2009). Ces données indiquent que ces CHC auraient un métabolisme particulier.

Le but de mon travail de thèse a été d'élucider la reprogrammation métabolique propre aux CHC liés à l'activation de la β-caténine et de déterminer la source de leur énergie et de leurs constituants.

Dans la suite du manuscrit vous trouverez une introduction bibliographique découpée en cinq chapitres : I) Le foie, II) Le récepteur nucléaire PPARα et le métabolisme hépatique, III) La β-caténine, IV) Le carcinome hépatocellulaire, V) Métabolisme tumoral.
Les résultats seront résumés en français puis présentés, ainsi que le matériel et méthodes, sous forme d'article en anglais. Les résultats seront ensuite discutés et mis en perspectives. Enfin en annexes, vous trouverez deux articles auxquels j'ai participé. Le premier, « Choline addiction enables non-invasive imaging of β-catenin-mutated hepatocellular carcinomas, in which it constitutes a therapeutic target », est un travail mené par Sabine Colnot sur le métabolisme de la choline dans les CHC activés pour la β-caténine. Cette étude démontre que la modification de ce métabolisme permet de déterminer l'activation de la β-caténine dans les CHC de manière non-invasive. Le deuxième, « Axin1 liver-specific deletion induces hepatocellular carcinoma in mice without β-catenin activation » est un travail menée par Christine Perret et Hélène Gilgenkrantz. Cette étude met en évidence l'absence d'activation de la β-caténine dans les CHC induits par l'invalidation de l'Axin1, un acteur de la signalisation Wnt/βcaténine, dans des modèles murins.

Introduction

I. Le foie

A. Organisation hépatique

Le foie est l'organe interne le plus volumineux de l'organisme et assure des fonctions de synthèse et de stockage, mais aussi des fonctions de détoxification et d'épuration essentielles à la vie. Dès 1833, Kiernan décrit l'organisation spatiale des cellules du foie, appelé lobule hépatique, qui constitue son unité fonctionnelle. Ce lobule, de forme hexagonale, s'organise autour d'une veine centrolobulaire à partir de laquelle les travées hépatocytaires s'étendent jusqu'aux espaces portes (ou triades portales) situés à chaque sommet du lobule. Ces espaces portes sont constitués d'un canal biliaire, d'une veinule hépatique et d'une artère hépatique permettant ainsi une double irrigation du foie (Fig.1). En effet, 75% de l'apport sanguin hépatique provient de la veine porte qui achemine un sang pauvre en oxygène mais riche en nutriments, hormones, facteurs de croissance et toxines provenant de l'intestin. Le sang arrivant par l'artère hépatique représente, quant à lui, 25% de l'apport sanguin et est enrichi en oxygène. Au sein du lobule, le long des travées hépatocytaires, la circulation sanguine s'effectue, depuis les triades portales vers la veine centrolobulaire, à travers les capillaires sinusoïdes. Ces capillaires sont séparés des hépatocytes par l'espace de Disse et ont une paroi constituée de cellules endothéliales, dites fenestrées, qui possèdent des pores transcytoplasmiques permettant de faciliter les échanges bidirectionnels entre le pôle basolatéral des hépatocytes et le sang. A l'opposé, les pôles apicaux d'hépatocytes adjacents forment les canalicules biliaires qui transportent la bile synthétisée dans le cytoplasme des hépatocytes vers les canaux biliaires. Ainsi le sens de circulation de la bile est opposé au sens de circulation du sang dans le lobule hépatique. Le foie est composé de différents types cellulaires qui s'organisent dans le lobule et fonctionnent conjointement pour assurer toutes les fonctions hépatiques (Kmieć, 2001) (Fig.1).

Les **cholangiocytes**, cellules formant les canaux biliaires, représentent moins de 1% des cellules du foie. Au-delà de permettre le transport de la bile vers l'intestin, ils modulent également sa composition.

Les **cellules endothéliales**, décrites précédemment, forment la paroi des sinusoïdes et permettent l'apport d'un sang filtré aux hépatocytes.

Les **cellules de Kupffer** sont les macrophages résidents du foie. Ils sont localisés à l'intérieur des sinusoïdes et participent à l'élimination des cellules apoptotiques et des pathogènes, ainsi qu'au recrutement d'autres cellules immunitaires.

Les **cellules étoilées** ou **cellules de Ito**, sont situées dans l'espace de Disse et jouent un rôle majeur dans le stockage des vitamines A et D. Il a été montré qu'en cas de lésions hépatiques, ces cellules sortaient de quiescence, prolifèraient et acquéraient un phénotype myofibroblastique, soulignant leur rôle dans la mise en place de la fibrose hépatique (Bansal, 2016).

Enfin, les **hépatocytes** sont les cellules majoritaires du foie et représentent à eux seuls 80 % de la masse hépatique (60 % en volume). Ces cellules parenchymateuses organisées en travées remplissent la majorité des fonctions hépatiques.

B. Zonation métabolique hépatique

Histologiquement, le tissue hépatique apparait homogène. Cependant d'un point de vue fonctionnel, il est hétérogène. En effet, dans les années 70 apparait le concept de zonation métabolique hépatique: en fonction de la position des hépatocytes le long de l'axe porto-central, ils possèdent des capacités métaboliques différentes. Cette découverte d'abord décrite pour le métabolisme glucidique (Katz et al., 1977) s'est ensuite étendue au métabolisme des acides aminés, de l'ammoniaque, du cholestérol, des xénobiotiques, mais également à la synthèse des protéines plasmatiques (Cheng et al., 1993; Häussinger et al., 1992). Généralement, dans la littérature, trois zones sont décrites le long de l'axe porto-central au sein du lobule: la zone périportale (PP) comprenant les hépatocytes adjacents aux espaces portes, la zone péricentrale (PC) (autrement appelée périveineuse) qui regroupe les hépatocytes s'étendant autour des veines centrales, et la zone intermédiaire située entre les zones PP et PC. Les gradients d'oxygène, d'hormones mais également les morphogènes participent à la mise en place de la zonation métabolique. Elle s'exerce selon deux modes au sein du lobule: lorsque la zonation n'est pas modifiée par le statut nutritionnel ou hormonal, elle est dite stable. L'expression de la glutamine synthase (GS) parfaitement restreinte à une couronne d'hépatocytes située autour de la veine centrolobulaire est un exemple typique de ce mode de zonation. En revanche, lorsque la zone d'expression et/ou d'activité des enzymes varie en fonction des changements hormonaux et nutritionnels, comme c'est le cas pour la majorité des enzymes, la zonation est dite, cette fois, dynamique. De façon intéressante, elle

apparaît comme un moyen de maintenir l'homéostasie de l'organisme. En effet, des voies métaboliques opposées ont lieu dans des compartiments différents, afin de limiter les cycles futiles et une perte d'énergie, au contraire de voies métaboliques complémentaires, comme la lipogenèse et la voie des pentoses phosphate (produisant le NADPH nécessaire à la lipogenèse) qui elles vont être associées spatialement.

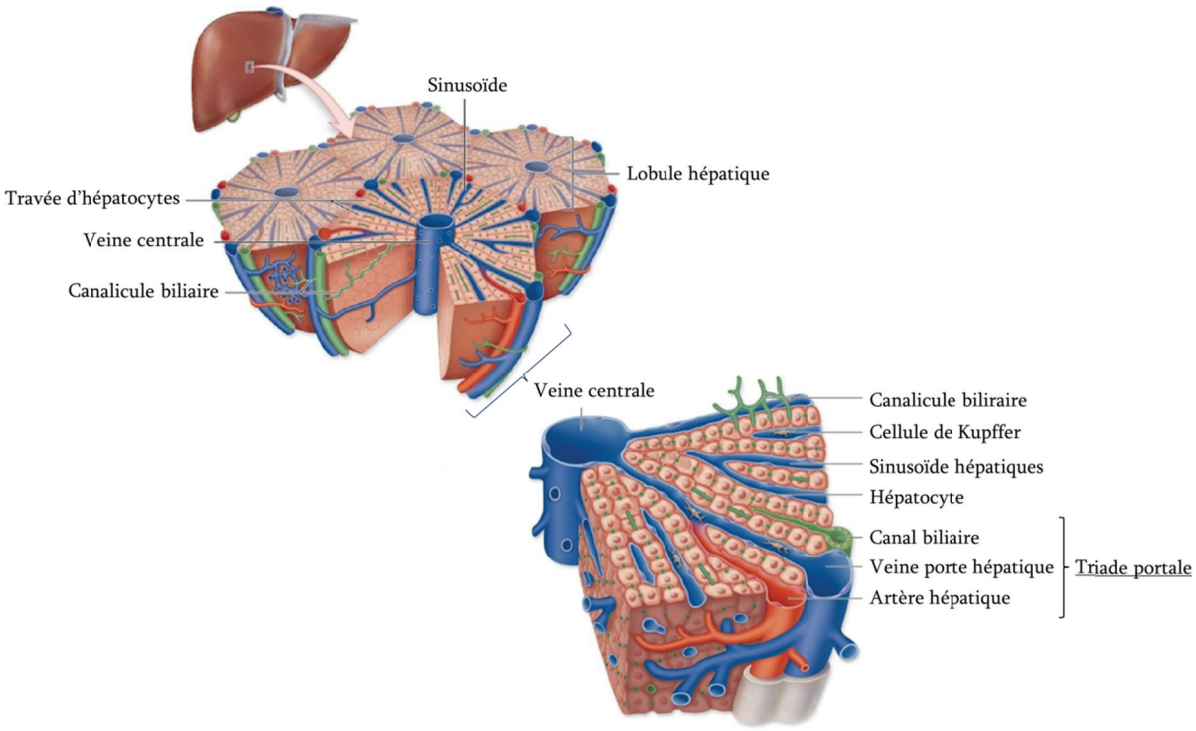


Figure 1 : Schéma représentatif du lobule hépatique
(adapté de Stenvall et al., 2014)

a. Métabolisme des carbohydrates

En période post-prandiale, un sang riche en glucose arrive de l'intestin au foie *via* la veine porte. Le glucose est alors transporté dans les hépatocytes, majoritairement *via* le transporteur GLUT-2, où il est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (GK). Le G6P peut alors poursuivre dans la voie de la glycolyse dont la dernière étape, catalysée par la liver pyruvate kinase (LPK, isoforme hépatique de la pyruvate kinase), permet la synthèse de pyruvate ; dans la voie de la glyconéogenèse permettant la synthèse du glycogène ; et dans la voie des pentoses phosphate (pour revue Adeva-Andany et al., 2016). Dans un premier temps, le glucose est principalement utilisé pour la synthèse du glycogène, puis au fur et à mesure de l'augmentation des stocks de glycogène, pour la synthèse de lactate et de pyruvate puis des précurseurs de la lipogenèse (Fig.2).

En condition physiologique aérobie, le pyruvate produit par la **glycolyse** est transformé en acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) par le complexe enzymatique de la pyruvate déshydrogénase (PDH) dans la mitochondrie, pour entrer ensuite dans le cycle de Krebs. Les étapes successives du cycle de Krebs permettent de produire les équivalents réduits (NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) et $FADH_2$ (flavine adénine dinucléotide réduit)) nécessaires au fonctionnement de la chaine respiratoire qui permettra la production d'adénosine triphosphate (ATP). En situation hypoxique, la glycolyse est le principal mécanisme permettant de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Ainsi, lorsque le foie est rendu hypoxique, l'activité de la chaine respiratoire est diminuée et la glycolyse anaérobique est augmentée. Le pyruvate produit est alors majoritairement réorienté vers la synthèse de lactate *via* la lactate deshydrogenase (LDH).

Le G6P formé par la glucokinase peut également s'engager dans la **voie des pentoses phosphate** (PPP) conduisant à la formation de ribose-5-phosphate, précurseur des nucléotides, des acides nucléiques et de certains coenzymes. La PPP permet la synthèse de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) essentiel au fonctionnement de certaines voies métaboliques comme la lipogenèse, la synthèse de cholestérol et la production de glutathion réduit. En revanche, une concentration élevée de NADPH inhibe la PPP et une forte charge énergétique ralentit la glycolyse. Ainsi, l'engagement du G6P dans la glycolyse ou dans la PPP dépend des besoins cellulaires en énergie et en NADPH. En situation post-absorptive, pour maintenir l'homéostasie glucidique, le glycogène stocké dans les hépatocytes est d'abord hydrolysé afin de libérer du glucose qui sera alors exporté vers les tissus périphériques. Puis au cours d'un jeûne prolongé, à mesure que les stocks de glycogène diminuent, la voie de la néoglucogenèse est mise en place. Elle permet de re-synthétiser du glucose à partir de différents substrats comme le lactate, le pyruvate, le glycérol ou encore les acides aminés glucoformateurs. Au-delà de son rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique, le glucose joue également un rôle dans la biosynthèse de constituants cellulaires et de macromolécules. Comme décrit plus haut, il participe à l'élaboration de constituants de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et des acides ribonucléiques (ARN) *via* la PPP, mais il est également un substrat pour la synthèse des acides aminés non-essentiels (AANS). La sérine, la glycine et la cystéine sont directement dérivés de la glycolyse. Les autres AANS dérivent d'intermédiaires du cycle de Krebs, potentiellement produits suite à la synthèse de pyruvate *via* la glycolyse. C'est le cas, par exemple, de la glutamine, du glutamate et de l'arginine qui sont produits à partir de l'α-cétoglutarate.

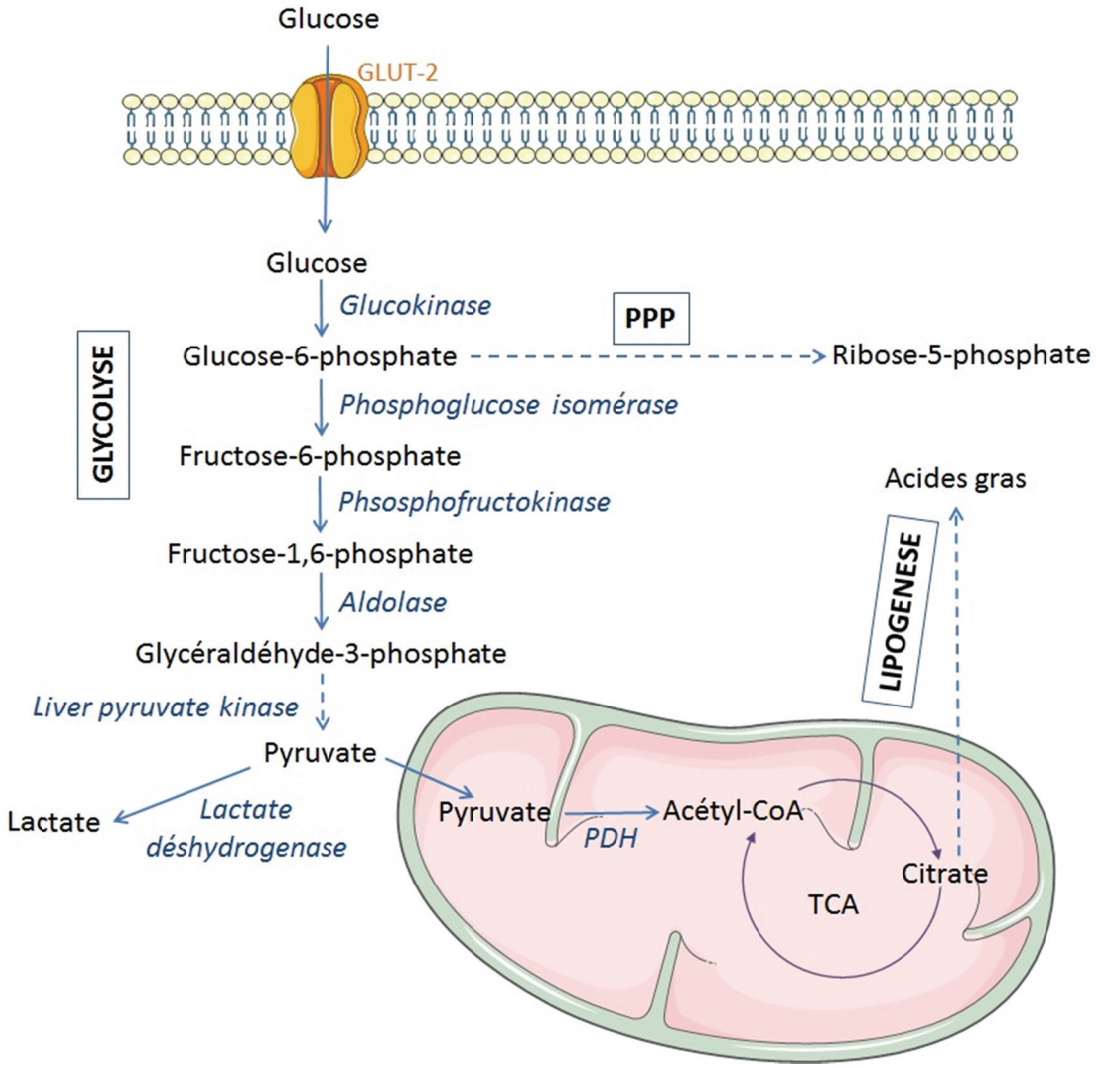


Figure 2 : Schéma général du métabolisme du glucose dans le foie
PPP = Voie des pentoses phosphate, TCA = Cycle des acides tricarboxyliques, PDH : pyruvate déshydrogénase

b. Zonation du métabolisme glucidique

Des études ont permis de montrer que ces voies de catabolisme et d'anabolisme du glucose étaient localisées dans des zones différentes du lobule. En effet, à l'état nourri le glucose semble majoritairement capté par les hépatocytes péricentraux, où la synthèse du glycogène et la glycolyse sont plus importantes. A jeun, les substrats glucoformateurs circulants, comme le lactate, sont captés par les hépatocytes périportaux afin d'être utilisés pour la néoglucogenèse.

Cette zonation du métabolisme du glucose est principalement due aux différences d'expression des enzymes de ces voies le long de l'axe porto-central. En effet la GK et la LPK, deux enzymes clefs de la glycolyse sont exprimées très majoritairement dans la zone PC (Trus et al., 1980; Zierz et al., 1983). A l'inverse, la phosphoenolpyruvate carboxykinase

(PEPCK), enzyme limitante de la néoglucogenèse, est majoritairement exprimée dans les hépatocytes périportaux (Jungermann and Katz, 1989). Dans les années 80, des expériences de perfusion hépatique rétrograde, dans lesquelles le flux sanguin est inversé dans le lobule hépatique, sont menées. Il est ainsi mis en évidence que l'inversion du flux sanguin inverse la zonation du métabolisme glucidique. Ainsi, la glycolyse devient périportale et la néoglucogenèse péricentrale démontrant que la zonation du métabolisme glucidique est dynamique (Matsumura and Thurman, 1984; Matsumura et al., 1984). D'autre part, des hépatocytes cultivés dans des concentrations périportales d'oxygène expriment fortement la PEPCK et faiblement la GK alors que le profil d'expression est inversé dans des concentrations péricentrales d'oxygène (Wölfle and Jungermann, 1985). Ainsi, les gradients hormonaux et d'oxygène sont responsables de la zonation hépatique du métabolisme hépatique (Fig.7). De plus, il est intéressant de noter que la synthèse d'ATP à partir de la glycolyse ne nécessite pas de fortes concentrations en oxygène, il ne semble donc pas illogique que cette voie soit plus active dans la zone péricentrale où la concentration en oxygène est deux fois moins importante que dans la zone périportale.

c. Métabolisme des lipides

Lipogenèse hépatique

Le foie est également capable de synthétiser *de novo* des acides gras. En effet, au-delà de son rôle dans la synthèse d'ATP et de lactate, le glucose peut également servir de substrat à la **lipogenèse**, qui est majoritairement assurée par le foie chez l'Homme. A l'état nourri, le pyruvate, produit par la glycolyse, est transformé en acétyl-CoA dans la mitochondrie, où il sera combiné à l'oxaloacétate dans le cycle de Krebs afin de produire du citrate. Ce citrate est exporté dans le cytoplasme où l'ATP-citrate lyase (ACLY) permet de le redissocier en acétyl-CoA et oxaloacétate. L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) transforme alors l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (Fig.3).

Des travaux menés au début des années 80 ont montré qu'il existait deux isoformes d'ACC (Bianchi et al., 1990). L'ACC1 et l'ACC2 produisent toutes deux du malonyl-CoA mais sont localisées respectivement dans le cytoplasme et au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. De par leur localisation, ces deux isoformes assurent des fonctions différentes. Des expériences menées sur des modèles d'invalidation ont montré un rôle spécifique de l'ACC1 dans la lipogenèse. L'ACC2 joue un rôle important dans la régulation de l'oxydation des acides gras *via* une inhibition allostérique de la carnitine palmitoyl

transférase 1 (CPT1), enzyme clef de l'entrée des acides gras à chaine longue dans la mitochondrie, par le malonyl-CoA (Abu-Elheiga et al., 2001; Choi et al., 2007; Mao et al., 2006; McGarry et al., 1978). Le malonyl-Coa produit par l'ACC1 est pris en charge par la fatty acid synthase (FAS) qui condense ce malonyl-CoA et l'acétyl-CoA conduisant à la production de palmitate, un acide gras (AG) à 16 carbones. La FAS utilise le NADPH, provenant principalement de la voie des pentoses phosphate, comme cofacteur. Le palmitate formé par la FAS est ensuite pris en charge par différentes élongases et désaturases afin de produire des AG de longueurs et de natures différentes. Le palmitate pris en charge par les enzymes de la famille des fatty acyl-CoA elongases donne naissance aux AG à longue ou très longue chaine (> 16 carbones) qui pourront eux-même être utilisés par des désaturases pour engendrer des AG mono ou polyinsaturés. Les acides gras formés peuvent alors être estérifiés en glycérolipides par leur estérification avec le glycérol qui seront soit stockés sous formes de triglycérides dans des gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes, soit sécrétés sous forme de lipoparticules à très faible densité, les very low density lipoparticules (VLDL).

Les diglycérides (DAG) formés à partir de l'oxydation des AG peuvent engendrer des triglycérides comme nous venons de le voir mais également des phospholipides. Différentes réactions enzymatiques spécifiques permettent l'ajout d'un alcool et d'un groupement phosphate au DAG donnant naissance aux phospholipides. L'alcool détermine la nature du phospholipide et les réactions aboutissant à sa formation. La phosphocholine et la phosphoétanolamine représentent plus de 50% des phospholipides totaux dans les cellules eukaryotes. Ils jouent un rôle important dans la structure et la fonction des membranes cellulaires.

Les triglycérides néosyntéthisés à l'état post-absortif peuvent être stockés transitoirement dans des goutelettes lipidiques cytoplasmiques ou incorporés dans des VLDL qui seront exportées. Localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique, la microsomal transfert protein (MTP) assure le transport et l'assemblage des triglycérides, des esters de cholestérol et des phospholipides avec l'apolipoprotéine B100 (apoB100), nouvellement synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique, permettant la formation des VLDL. Il est intéressant de noter que l'association entre le domaine intra-microsomal de l'apoB100 et les différents constituants lipidiques des VLDL se fait parallèlement à la traduction de la protéine.

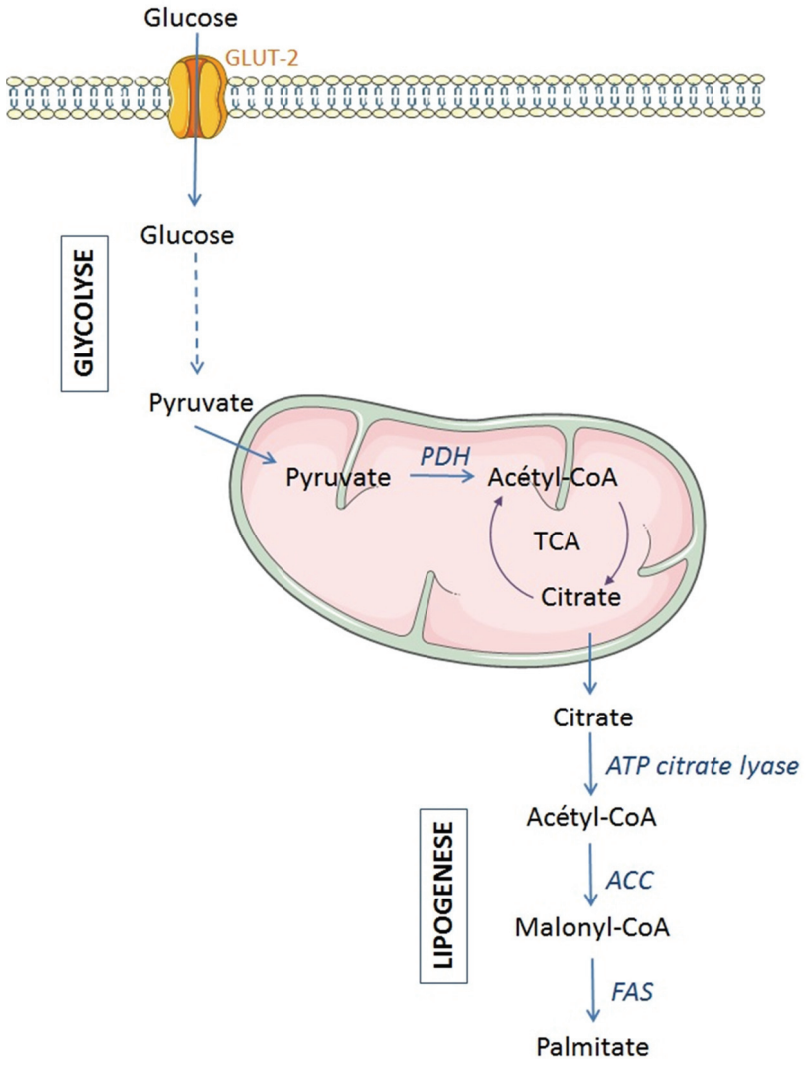


Figure 3 : schéma représentatif simplifié de la synthèse d'acides gras à partir du glucose
PDH : pyruvate déshydrogénase, TCA = Cycle des acides tricarboxyliques, ACC = Acétyl-CoA carboxylase, FAS = Fatty acid synthase

d. Zonation de la lipogenèse

Les études menées sur la zonation de la synthèse *de novo* d'acides gras montrent des résultats contradictoires qui semblent être dues à la diversité des méthodes utilisées. Des expériences de microdissections et de perfusions à la digitonin/collagénase réalisées sur des rats à l'état nourri ont mis en évidence une activité plus importante de l'ACLY, l'ACC et la FAS dans les hépatocytes péricentraux, qui serait cohérente avec l'activité glycolytique, produisant le substrat de la lipogenèse, plus importante dans cette zone (Guzmán and Castro, 1989; Katz et al., 1989, 1983a, 1983b) (Fig.7). Il s'agit là d'une vue de la zonation de la lipogenèse généralement admise. Cependant d'autres études utilisant, cette fois, la technique du « dual digitonin pulse » ont montré une activité de ces enzymes plus importante dans la

zone PP (Evans et al., 1989, 1990). D'autre part, le gradient hormonal le long de l'axe porto-central joue également un rôle dans cette zonation, ainsi la localisation de la lipogenèse varie en fonction de l'état nutritionnel. En effet, il semblerait qu'à l'état de jeûne, la diminution de la lipogenèse soit principalement péricentrale entrainant une disparition de sa zonation (Katz et al., 1983a; Quistorff et al., 1986). A l'état renourri, l'activité des enzymes lipogéniques augmente en zone périveineuse et rétablit la zonation de ce métabolisme (Evans et al., 1990; Katz et al., 1989). Evans *et al.* avancent également l'idée d'un contrôle de la zonation de l'activité des enzymes par d'autres facteurs, telle que la phosphorylation de l'ACC (Evans et al., 1990).

Captage des acides gras circulants

Au cours du jeûne, la lipolyse du tissu adipeux entraine la libération dans la circulation d'acides gras non estérifiés complexés à l'albumine qui vont être captés par le foie. Plusieurs protéines semblent être impliquées dans le transport membranaire des acides gras comme le cluster of differenciation 36 (CD36) et la fatty acid transport protein (FATP) qui facilitent le captage des acides gras à chaînes longues et très longues. Les acides gras à chaines plus courtes provenant principalement de l'alimentation traversent la membrane plasmique par diffusion passive. Dans le cytoplasme des hépatocytes, les acides gras sont liés à une protéine, la liver fatty acid binding protein (L-FABP ou FABP1) qui permet leur transport et participe à leur stockage intracellulaire. Il est également supposé que la FABP1 protègerait la cellule contre la cytotoxicité des acides gras libres.

Activation des acides gras libres

Dans la cellule, avant d'être catabolisés, les acides gras sont activés en acyl-CoA. Ces réactions sont catalysées par des acyl-CoA synthétase (ACS) spécifiques de la longueur de la chaîne carbonée.

β-oxydation des acides gras

En situation de jeûne ou lorsque la disponibilité en glucose est faible, le foie utilise les acides gras comme source principale d'énergie. Ces acides gras proviennent de la lipolyse du tissu adipeux et de l'hydrolyse des triglycérides stockés dans les gouttelettes lipidiques intra-hépatocytaires.

La **β-oxydation** utilise les acides gras afin de produire de l'acétyl-CoA qui sera utilisé dans le cycle de Krebs, afin d'alimenter la chaîne respiratoire et donc de produire de l'ATP, et dans la voie de la cétogenèse pour synthétiser des corps cétoniques. Elle a lieu dans différents

organites cellulaires. La β-oxydation des acides gras à chaîne longue (>12 carbones mais <20 carbones), moyenne et courte se déroule dans la mitochondrie et est la plus importante quantitativement. Dans les peroxysomes, les acides gras à chaîne très longue (>20 carbones) et ramifiée sont partiellement oxydés par l'acyl-CoA oxydase (ACO) puis une fois leur chaîne raccourcie, la β-oxydation se poursuit dans la mitochondrie. Il existe également une ω-oxydation, mineure dans le foie, qui a lieu dans le réticulum endoplasmique. Les acides gras à chaîne courte et moyenne peuvent traverser la membrane mitochondriale alors que les acides gras à chaîne longue doivent subir une modification enzymatique. En effet, ils doivent être transformés en acyl-carnitine, étape qui est assurée par la CPT1-A (isoforme hépatique de la CPT1), enzyme située sur la membrane externe de la mitochondrie (Fig.4). La transformation catalysée par CPT1 constitue une étape limitante de l'engagement des acides gras dans la β-oxydation. Comme décrit précédemment (cf. Introduction, chapitre IB), CPT1 est inhibée par le malonyl-CoA produit lors de la lipogenèse (McGarry and Foster, 1979). En 2009, Akkaoui *et al.* développent une CPT1 insensible au malonyl-CoA. Ils montrent que dans ces conditions, en situation lipogénique, la CPT1 insensible au malonyl-CoA reste active et permet de maintenir une β-oxydation active. Ils mettent ainsi en évidence l'intérêt de l'interaction malonyl-CoA/CPT1 dans la préservation de l'énergie en empêchant l'oxydation des AG néosynthétisés et la génération d'un cycle futile (Akkaoui et al., 2009; McGarry et al., 1978). La carnitine palmitoyl-transférase 2 (CPT2) hydrolyse ensuite les dérivés acyl-carnitines et libère les acyl-CoA dans la matrice mitochondriale. La β-oxydation se compose ensuite d'une succession de 4 réactions enzymatiques se répétant *n* fois, permettant de raccourcir l'acyl-CoA de 2 carbones et de libérer un acétyl-CoA à chaque cycle. La première étape est catalysée par des acyl-CoA déshydrogénases spécifiques de la longueur de la chaîne carbonnée des acides gras (short chain-, medium chain-, long chain- et very long chain acyl-CoA déshydrogénase, respectivement SCAD, MCAD, LCAD et VCAD). L'énoyl-CoA produit au cours de cette étape est ensuite pris en charge par la protéine mitochondriale trifonctionnelle qui est composée de trois enzymes catalysant les 3 étapes suivantes de la β-oxydation: la 2-énoylCoA hydratase également appelée crotonase, la 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase et la 3-kéto-acylCoA thiolase. Au cours de ces 4 réactions, du $FADH_2$ et du NADH sont libérés (Fig.5). De plus, l'acétyl-CoA produit par la β-oxydation est utilisé dans le cycle de Krebs et permet de produire des équivalents réduits alimentant les complexes de la chaîne respiratoire. La β-oxydation conduit ainsi à la production d'ATP permettant notamment de fournir l'énergie nécessaire à la néoglucogenèse. Ainsi, une inhibition de la β-

oxydation conduit à des hypoglycémies graves résultant d'un défaut de production hépatique de glucose (Reddy and Hashimoto, 2001).

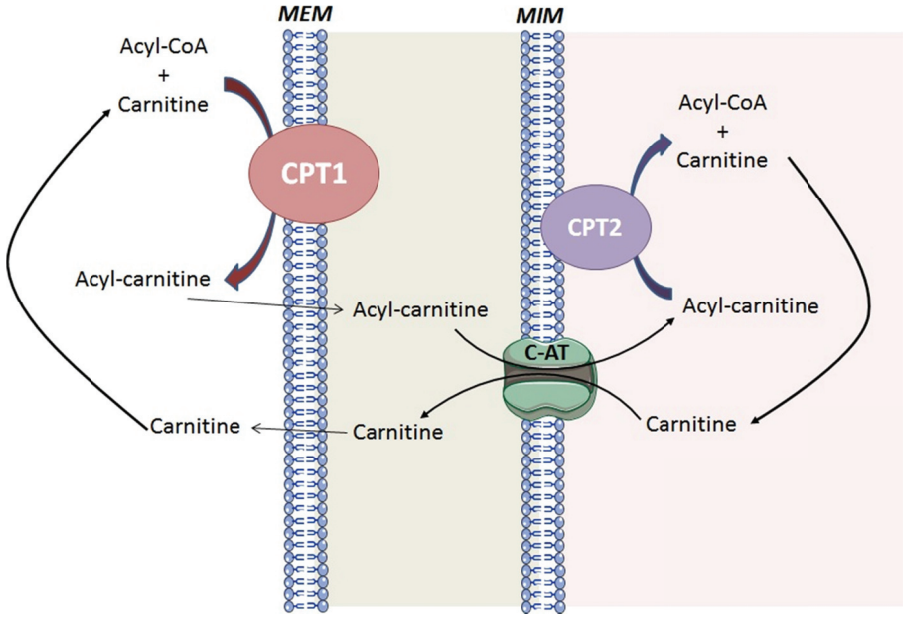


Figure 4 : Schéma représentatif de la navette carnitine

L'entrée des acides gras dans la mitochondrie est dépendante de l'activité de la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT1). Les acides gras à chaine longue ne pouvant pas traverser la mitochondrie, CPT1 les transforme en acyl-carnitine. Dans l'espace intermembranaire, la cartnitine-acylcarnitine translocase (C-AT) facilite leur passage dans la matrice mitochondriale. La carnitine palmitoyl transférase 2 (CPT2) libère alors les acyl-CoA et la carnitine. (Membrane externe mitochondriale (MEM), membrane interne mitochondriale (MIM))

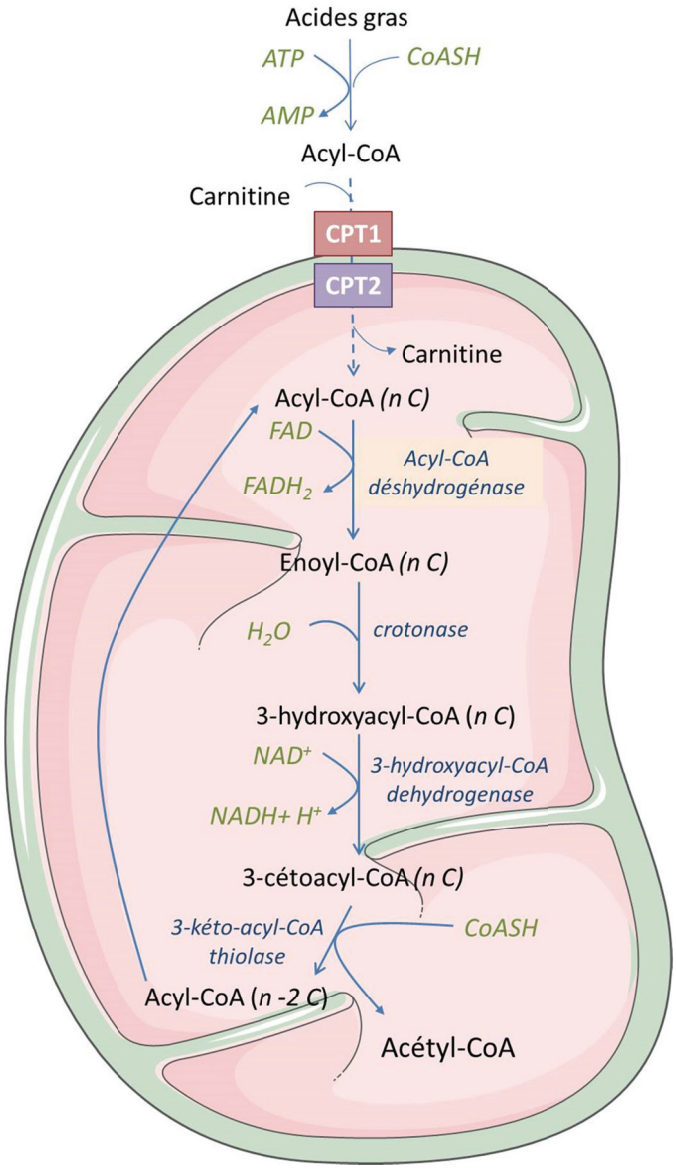


Figure 5 : Schéma de l'oxydation des acides gras

Dans la mitochondrie, les acyl-CoA sont pris en charge successivement par 4 enzymes permettant de générer un $FADH_2$, un NADH et un acétyl-CoA. L'acyl-CoA libéré est plus court de 2 carbones et est réutilisé dans un nouveau cycle de β-oxydation. (CoASH = Coenzyme A)

La cétogenèse

Dans le foie, l'acétyl-CoA produit est également utilisé dans la voie de synthèse des corps cétoniques appelée **cétogenèse** (Fig.6). Les corps cétoniques (β-hydroxybutyrate, acétoacétate et acétone) produits et libérés dans la circulation seront utilisés notamment comme substrats énergétiques par des organes gluco-dépendants (comme le cerveau par exemple). Quatre enzymes catalysent les étapes de la cétogenèse : l'acétoacétyl-CoA thiolase, l'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase mitochondriale (HMGCS2), l'hydroxyméthylglutaryl-CoA lyase et la β-hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH). La réaction catalysée par l'HMGCS2 constitue l'étape limitante de cette voie et l'expression de cette enzyme est

augmentée au cours du jeûne. L'acétyl-CoA produit par la β-oxydation est en partie utilisé par le cycle de Krebs. Cependant, la vitesse du cycle étant limitée, celui-ci ne peut pas prendre en charge tout l'acétyl-CoA produit par l'oxydation des acides gras. Cet acétyl-CoA exerce un effet inhibiteur sur la β-oxydation. Son utilisation dans la synthèse des corps cétoniques permet à la fois de lever l'inhibition et de libérer des Coenzymes A qui peuvent être ensuite réutilisés.

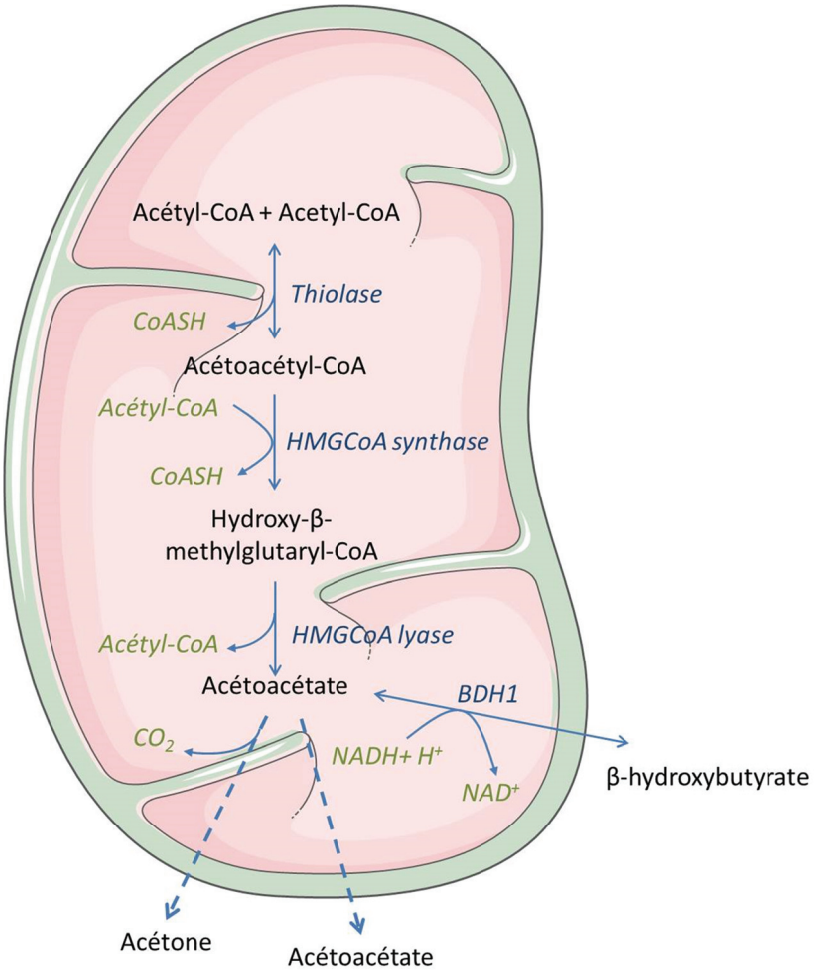


Figure 6 : Schéma de la cétogenèse

Dans le foie, les acétyl-CoA libérés par la β-oxydation mitochondriale sont pris en charge par les enzymes de la cétogenèse. Les différentes réactions successives condensent deux acétyl-CoA pour générer les corps cétoniques (acétoacétate, β-hydroxybutyrate, acétone) et libérer du CoA et du NAD+. (CoAH = Coenzyme A)

e. Zonation métabolique de la β-oxydation et de la cétogenèse

Du fait que la β-oxydation soit un processus nécessitant de l'oxygène, il est généralement admis qu'elle a principalement lieu dans la zone périportale du lobule hépatique où la concentration en oxygène est plus forte. C'est également dans cette zone que le volume mitochondrial serait le plus important (Loud, 1968). De plus, la néoglucogenèse est

principalement périportale et utilise l'énergie produite par la β-oxydation, il semble donc logique que celle-ci se déroule dans la même zone (Fig.7). Cette hypothèse est appuyée par les travaux de différentes équipes montrant dans des foies de rats nourris une augmentation de l'activité de CPT1 dans la zone périportale (Guzmán and Castro, 1989; Tosh et al., 1988). Cependant, cette zonation de l'oxydation des acides gras apparaît comme flexible en fonction du statut énergétique et varie entre les mâles et les femelles.

La vision commune d'une β-oxydation périportale implique une cétogenèse plus importante dans cette zone. L'HMGCS2 est exprimée de façon homogène au sein du lobule cependant il a été montré que son activité prédominait dans la zone PP (Guzmán et al., 1995; Royo et al., 1995). De plus, Tosh *et al.* ont mis en évidence une concentration plus importante en corps cétoniques dans cette zone (Tosh et al., 1988). D'autres études ont montré que l'acétoacétate était produit en zone PP mais que l'enzyme permettant sa conversion en β-hydroxybutyrate, la BDH, était plus exprimée et plus active dans la zone PC (Jungermann and Katz, 1989; Teutsch et al., 1992). Burns *et al.* proposent que l'acétoacétate produit en zone périportale soit pris en charge et transformé en β-hydroxybutyrate dans la zone PC (Burns et al., 1999). Cette transformation utilisant du NADH, ainsi, ce mécanisme pourrait permettre d'éviter l'accumulation de NADH dans la zone péricentrale, où il y a moins d'oxygène, et donc de maintenir le statut rédox.

Il apparaît donc que la zonation de certaines voies métaboliques (principalement impliquant les lipides) est peu stricte et présente une certaine plasticité en fonction des conditions et des signaux extérieurs.

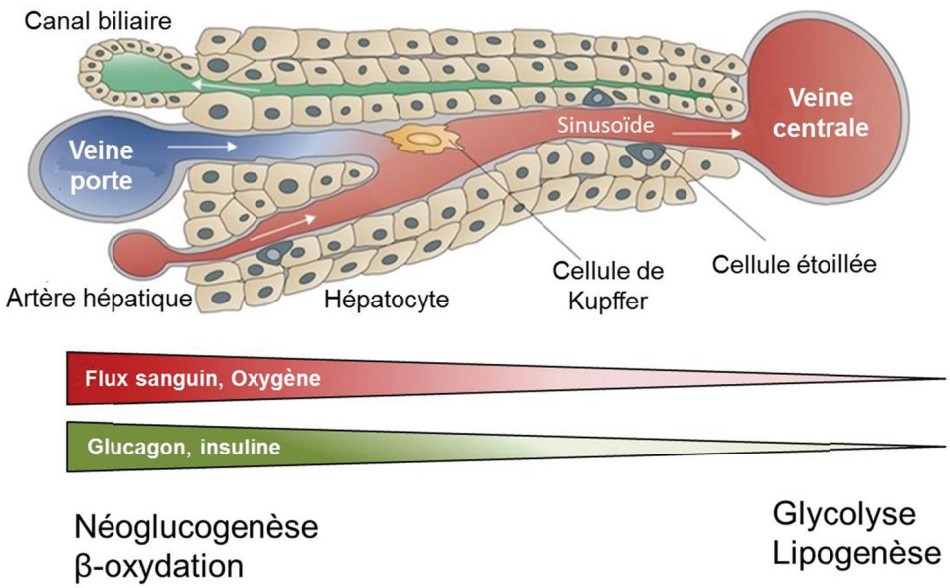


Figure 7 : Schéma représentatif de la zonation métabolique hépatique

La veine porte et l'artère hépatique acheminent dans les sinusoïdes un sang riche en oxygène et en hormones. Les gradients créés ainsi que les morphogènes participent à la mise en place de la zonation du métabolisme hépatique (adapté de Birchmeier, 2016).

f. Le cycle de Krebs

L'acétyl-CoA produit par les différentes voies métaboliques (β-oxydation, glycolyse) est utilisé comme substrat dans le **cycle de Krebs**, également appelé cycle des acides tricarboxyliques (TCA). Il est composé de 8 réactions successives se déroulant dans la matrice mitochondriale et permet de produire des équivalents réduits ($NADH+H^+$ et $FADH_2$) qui seront utilisés par la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP. Le déroulement du cycle de Krebs est le suivant (Fig.8) :

1- La citrate synthase (CS) permet la condensation de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate pour produire du citrate.
2- L'aconitase catalyse la formation du citrate en isocitrate.
3- L'isocitrate déshydrogénase (IDH) transforme l'isocitrate en α-cétoglutarate, et permet la production de $NADH+H^+$ et la libération d'un CO_2
4- Le complexe de l'α-cétoglutarate déshydrogénase catalyse la transformation de l'α-cétoglutarate en succinyl-CoA au cours de laquelle du $NADH+H^+$ est produit et un CO_2 libéré.
5- Le succinyl-CoA est alors transformé en succinate par la succinyl-CoA thiokinase. Un guanosine triphosphate (GTP) est produit au cours de cette étape.

6- Le fumarate est alors produit à partir du succinate par la succinate déshydrogénase (SDH). Cette réaction aboutit à la formation de $FADH_2$.
7- La fumarase transforme ensuite le fumarate en malate
8- Et enfin, la malate déshydrogénase permet de régénérer de l'oxaloacétate et de produire du $NADH+H^+$.

Le cycle de Krebs permet donc de produire à partir d'un acétyl-CoA : trois $NADH+H^+$, un $FADH_2$, deux CO_2 et un GTP. L'IDH est la principale enzyme régulatrice du cycle de Krebs, elle est en effet inhibée par le $NADH+H^+$ et l'ATP. De plus, le cycle de Krebs ne peut fonctionner que si la chaîne respiratoire dispose d'une quantité d'oxygène suffisante pour fonctionner et réoxyder le $NADH+H^+$. Au-delà de son rôle dans la production d'énergie, le cycle de Krebs est une plateforme métabolique intervenant également dans la synthèse de diverses molécules dont par exemple les acides aminés *via* notamment la production de glutamine.

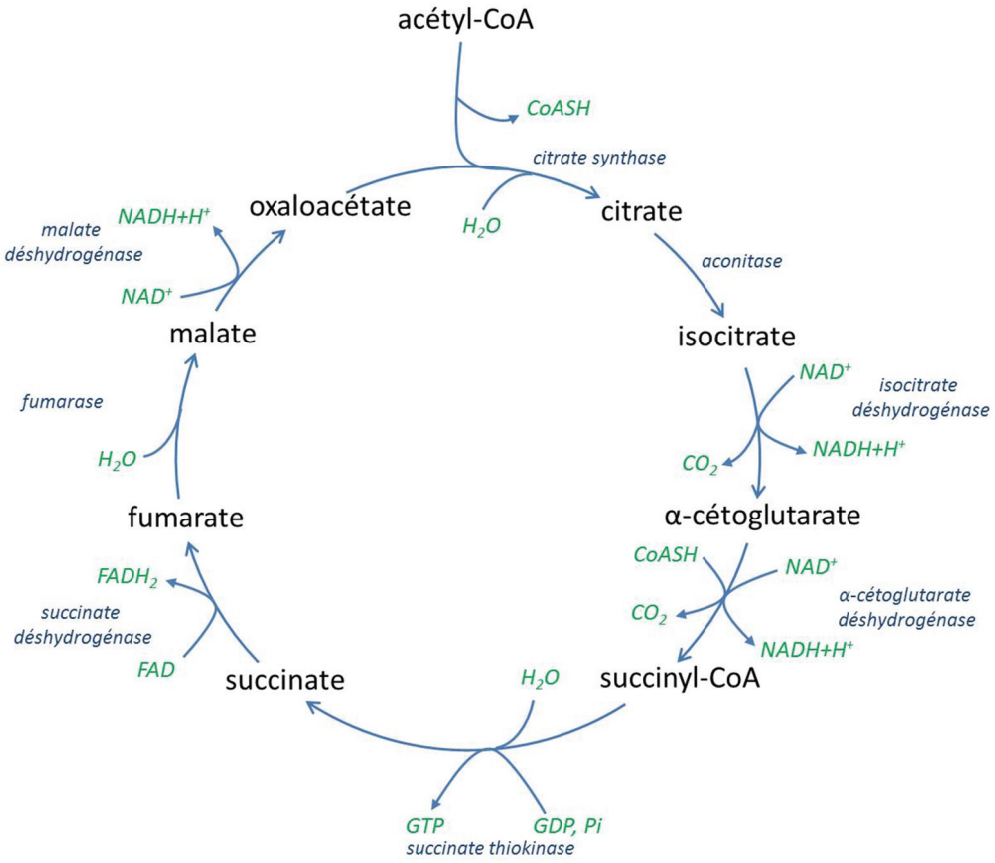


Figure 8: Schéma représentatif du cycle de Krebs
Dans la mitochondrie, l'acétyl-CoA produit par la glycolyse et l'oxydation des acides gras entre dans le cycle de Krebs. Les différentes réactions générant les intermédiaires du cycle permettent de produire des équivalents réduits (NADH et $FADH_2$) qui alimenteront les complexes de la chaine respiratoire. (CoASH = Coenzyme A)

Dans la mitochondrie, les coenzymes NADH+H^+ et FADH2 produits par la glycolyse, la β-oxydation et le cycle de Krebs, permettent d'alimenter la **chaîne respiratoire** (Fig.9). Les enzymes impliquées dans ce processus sont localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Le NADH+H^+ et le $FADH_2$ sont réoxydés et transfèrent leurs électrons aux complexes I et II de la chaîne respiratoire. Le flux d'électrons migrant le long de cette chaîne entraine l'export de protons par les complexes I, III et IV dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, créant ainsi un gradient électrochimique entre la matrice et l'espace inter-membranaire mitochondrial. Ce gradient entraine la formation d'ATP au niveau de l'ATP synthase (complexe V de la chaîne respiratoire).

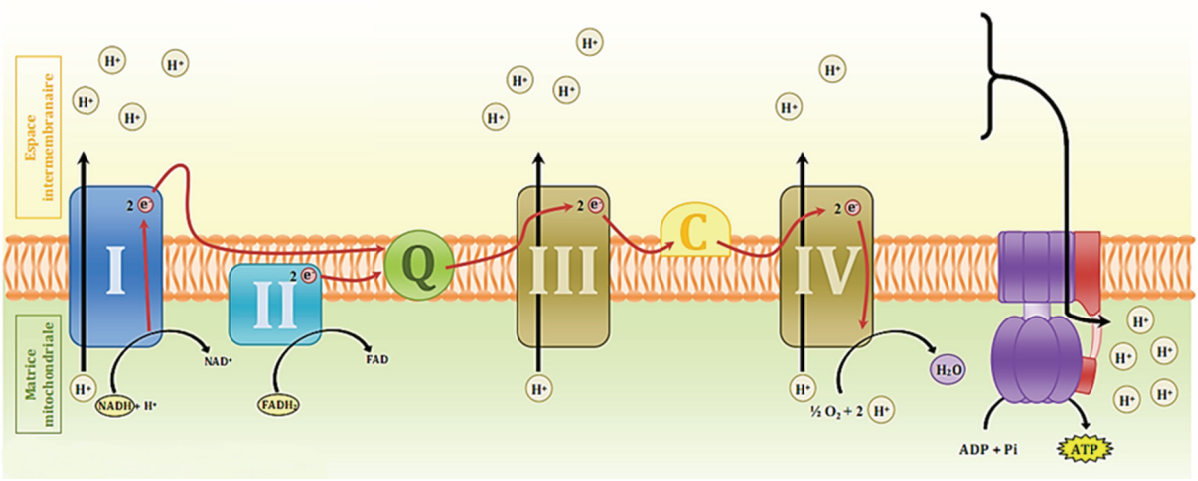


Figure 9 : schéma simplifié du transport des électrons au travers de la chaine respiratoire
Les équivalents réduits produits par le cycle de Krebs alimentent les complexes de la chaine respiratoire. L'oxydation de ces coenzymes est pour la mitochondrie la source directe d'énergie pour la phosphorylation de l'ADP. (d'après Matthieu Simon, cours-pharmacie.com).

II. Le récepteur nucléaire PPARα et le métabolisme hépatique

Le peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα ou NR1C1) est un récepteur nucléaire appartenant à la sous famille des peroxisome proliferator-activated receptors qui comprend deux autres membres : PPARγ et PPARβ/δ. Les trois récepteurs contrôlent des fonctions biologiques et ont des spécificités tissulaires différentes, mais sont cependant tous capables de moduler l'homéostasie lipidique (Braissant et al., 1996; Wahli and Michalik, 2012).

PPARα est exprimé majoritairement dans les tissus ayant une forte capacité à oxyder les acides gras, comme le foie, le tissu adipeux brun, les reins, le cœur et le muscle squelettique. Son expression a également été détectée dans l'intestin grêle, les muscles lisses, l'endothélium vasculaire et des cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages et les lymphocytes (Jones et al., 2002). Son rôle sur l'homéostasie métabolique est relativement bien conservé entre les différents types cellulaires (Bünger et al., 2007; Georgiadi et al., 2012). Nous nous intéresserons ici aux rôles de PPARα dans le foie (pour revues voir Kersten, 2014; Pawlak et al., 2015).

A. Structure de PPARα

PPARα possède une structure canonique de récepteur nucléaire (Fig.10). Il est composé de 6 domaines qui permettent le contrôle de l'expression de ses gènes cibles en intégrant les signaux intracellulaires. L'extrémité N-terminale constitue une région hautement variable où se trouve le domaine A/B. Ce domaine contient la région AF-1 (Activation function-1) qui permet la transactivation indépendante du ligand. Il a été mis en évidence que cette région donnait à chaque isotype PPAR sa spécificité d'activation des gènes cibles (Hummasti and Tontonoz, 2006). Le domaine A/B est connecté au domaine C, très conservé et composé de deux doigts de zinc. Il constitue le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour « DNA binding domain ») et permet donc la liaison de PPARα à son élément de réponse, le peroxysome proliferator responsive element (PPRE), sur ses gènes cibles. La région charnière, domaine D, est moins conservée et contient en particulier le signal d'adressage nucléaire (NLS pour « nuclear localization sequence »). De l'intégrité de cette région dépend

aussi l'interaction de PPARα avec ses co-répresseurs comme le nuclear receptor co-repressor (NCoR) (Dowell et al., 1999). La région charnière lie le DBD au domaine E qui est situé dans la région C-terminale et constitue le domaine de liaison au ligand (LBD pour « Ligand binding domain »). Le LBD contient la région AF-2 (Activation funtion-2) qui permet la transactivation dépendante du ligand. En absence de ligand, son activité est réprimée. Lors de la liaison du ligand, la région AF-2 subit un changement conformationnel permettant la liaison de PPARα à ses co-activateurs et son activité au niveau de ses gènes cibles (Xu et al., 2001). Enfin à l'extrémité C-terminale, se trouve le domaine F dont la fonction exacte n'est pas connue.

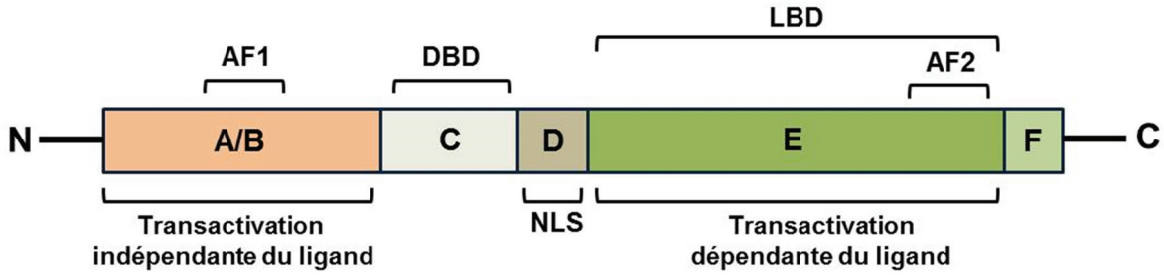


Figure 10 : Schéma représentatif de la structure de PPARα
PPARα est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroides et thyroidiennes partageant une structure commune basée sur un domaine de liaison à l'ADN à doigts de zinc et un domaine de liaison au ligand de nature hydrophobe.

B. Ligands PPARα

Les données de cristallographie obtenues pour le LBD de PPARα ont montré que sa poche de liaison au ligand était large lui permettant de lier potentiellement une grande variété de ligands (Gampe et al., 2000). De plus, elle est plus lipophilique que celle des autres PPARs, pouvant donc accueillir des acides gras plus longs. Plusieurs d'entre eux ont été identifiés, parmi lesquels des acides gras présentant des degrés d'insaturation divers tels que les acides arachidoniques (C20, 4 insaturations), oléiques (C18, 1 insaturation), linoléiques (C18, 2 insaturations) et palmitiques (C16, saturé). Les dérivés eicosanoïdes, comme le leukotriène B4 (LTB4), provenant de la voie de dégradation de l'acide arachidonique sont également des ligands endogènes (Kliewer et al., 1997). Dans la recherche de l'origine du ligand physiologique de PPARα, il a été observé que la délétion de la fatty acid synthase (FAS), associée à un régime appauvri en acides gras, entrainait des hypoglycémies et le développement d'une stéatose chez la souris, mais ce phénotype était inversé lorsque les souris étaient nourries avec un régime gras ou avec un agoniste synthétique de PPARα. Ainsi, il apparaît que les produits de la lipogenèse dépendante de la FAS soient des activateurs de

PPARα (Chakravarthy et al., 2005). L'adipose triglyceride lipase (ATGL) est une enzyme aussi exprimée dans les hépatocytes qui permet l'hydrolyse des triglycérides intracellulaires. De façon intéressante, il a été montré que sa surexpression entrainait une activation de PPARα et une induction de ses gènes cibles et son invalidation, une diminution (Sapiro et al., 2009). De plus, cette enzyme participe également, avec l'hormone sensitive lipase (HSL) à la lipolyse du tissu adipeux. La surexpression de ces deux enzymes dans des souris permet l'augmentation de l'oxydation des acides gras médiée par PPARα (Reid et al., 2008). Il apparaît donc que les ligands endogènes de PPARα soient des dérivés d'acides gras formés lors de la lipolyse, la lipogenèse ou lors du catabolisme des acides gras.

C. Mécanisme d'action de PPARα

a. Mécanisme de transactivation

PPARα s'hétérodimérise avec le retinoid x receptor (RXR). Les hétérodimères PPAR-RXR sont dits permissifs, c'est-à-dire qu'ils peuvent être activés par un ligand spécifique de RXR ou de PPARα (DiRenzo et al., 1997). Ils sont alors capables de reconnaître et de se lier à une séquence d'ADN particulière, le PPRE, et d'activer les gènes cibles de PPARα (Fig.11). Le PPRE constitue un motif direct repeat 1 (DR1) qui est reconnu par le DBD de PPARα (Tugwood et al., 1992). PPARα recrute différents co-activateurs pour former un complexe transcriptionnel actif (Surapureddi et al., 2002). Certains d'entre eux possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT), comme les membres de la famille CBP/p300, capables de décondenser la chromatine et de permettre la transcription des gènes cibles.

b. Mécanisme de transrepression

PPARα est également capable de bloquer certaines voies de signalisation pro-inflammatoires *via* des interactions protéine-protéine indépendantes de sa liaison au PPRE. Parmi les voies touchées par l'activité trans-repressive de PPARα, on peut citer les voies AP-1 (activator protein 1), C/EBPβ (CCAAT-enhancer-binding protein β) et NFκB (nuclear factor-κ B). PPARα titre le co-activateur GRIP1/TIF2 (glucocorticoid receptor-interacting protein 1/ transcriptional mediators/intermediary factor 2) et inhibe ainsi l'activité de C/EBPβ (Gervois et al., 2001). D'autre part, PPARα empêche l'expression de certaines cytokines induites par l'interleukine 6 en interagissant directement avec la sous-unité p65 de NFκB et avec le complexe AP-1 *via* la partie N-terminale de c-Jun. Ces liaisons entrainent ainsi la formation de complexes transcriptionnels inactifs (Delerive et al., 1999) (Fig.11). De plus,

PPARα peut également avoir une action trans-répressive dépendante de sa liaison au PPRE. Il a été montré que PPARα lié à son PPRE était capable d'interagir physiquement avec p65 et de bloquer sa liaison au promoteur du complément C3 (Mogilenko et al., 2013).

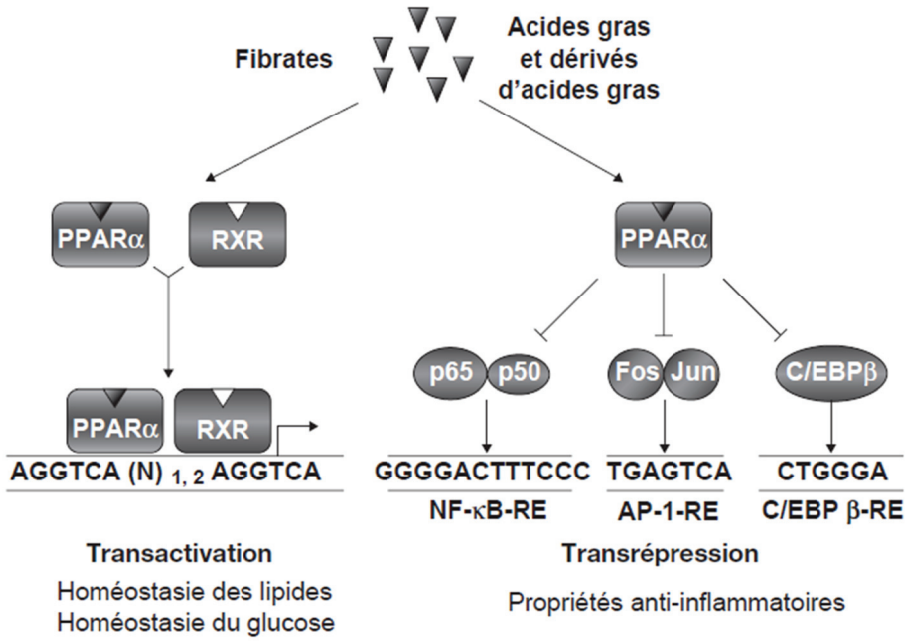


Figure 11 : Schéma simplifié de la transactivation et de la transrepression induite par PPARα
(Duval et al., 2004)

D. Rôles de PPARα dans la physiologie hépatique

Au cours du jeûne, une réponse adaptative se met en place afin de maintenir l'homéostasie énergétique de l'organisme. Il y a alors un changement dans l'utilisation des sources énergétiques et les acides gras issus de la lipolyse du tissu adipeux sont exploités. Il a été largement montré que PPARα était un régulateur majeur du métabolisme au cours du jeûne. Comme nous allons le voir, il régule le métabolisme des acides gras et le métabolisme du glucose. Il joue également un rôle dans la réponse inflammatoire. Nous nous focaliserons ici sur son rôle dans la réponse adaptative au jeûne.

a. PPARα dans le contrôle de la réponse au jeûne

PPARα est activé et induit au cours du jeûne. Différentes études ont permis de mettre en évidence son rôle dans l'homéostasie lipidique (Fig.12). Pour la première fois en 1992, un

lien est établi entre PPARα et l'oxydation des acides gras : Dreyer *et al.* montrent que l'acyl-coenzyme A oxidase peroxisomale (ACO), enzyme majeure de la β-oxydation dans les peroxisomes, est une cible positive directe de PPARα (Dreyer et al., 1992). Le développement des modèles de délétion génique de PPARα et l'utilisation d'agonistes ont aidé à la découverte de nombreuses autres cibles. Les souris délétées pour PPARα de façon constitutive dans tout l'organisme possèdent un phénotype particulier. Elles présentent lors du jeûne une hypoglycémie, une hypothermie, ainsi qu'une hypocétonémie, un taux élevé d'acides gras libres circulants et développent à long terme une stéatose hépatique. L'analyse de ce phénotype a mis en évidence l'importance de PPARα dans le captage des AG et leur catabolisme (Kersten et al., 1999; Leone et al., 1999). Ainsi, il a été montré que PPARα contrôlait presque toutes les étapes du catabolisme des acides gras dans le foie.

Lors du jeûne, les acides gras libérés par la lipolyse du tissu adipeux sont captés par les hépatocytes. Le transport transmembranaire de ces AG est assuré notamment par la fatty acid transport protein (FATP). Il a été mis en évidence que PPARα était capable de réguler le transport des AG à travers la membrane plasmique des hépatocytes *via* l'induction directe de la FATP (Frohnert et al., 1999; Martin et al., 1997). Dans le cytoplasme, après activation en acyl-CoA par les acyl-CoA synthase (ACS), les acyls sont pris en charge par une protéine permettant leur circulation, la fatty acid binding protein 1 (FABP1, isoforme spécifique du foie). Il a été montré que PPARα contrôlait positivement l'expression de FABP1 (Wolfrum et al., 2001). Dans le cas des acides gras à chaîne longue, le transport au travers des membranes mitochondriales est assuré par deux enzymes : CPT1 et CPT2, qui semblent toutes deux sous le contrôle de PPARα. Il est apparu que l'utilisation d'un agoniste de PPARα était capable d'induire l'expression de CPT1. En revanche, les souris PPARα KO ne présentent pas de défaut d'expression de l'enzyme suggérant un mécanisme de régulation indépendant de PPARα (Louet et al., 2001). De façon intéressante, au-delà de contrôler l'expression de CPT1, PPARα serait également capable de réguler son activité. En effet, il induit la malonyl-CoA décarboxylase, enzyme responsable de la transformation du malonyl-CoA en acétyl-CoA. Il permettrait ainsi de diminuer le niveau de malonyl-CoA et donc de lever l'inhibition qu'il exerce sur CPT1(Campbell et al., 2002; Lee et al., 2004). Il contrôle ensuite la première étape de la β-oxydation mitochondriale et plusieurs enzymes impliquées dans la β-oxydation péroxisomale comme l'ACO ou l'enzyme bifonctionnelle.

Au cours du jeûne, la cétogenèse est mise en place pour d'une part, prendre en charge l'excédent d'acétyl-CoA produit par l'oxydation des AG et d'autre part, fournir des substrats

énergétiques alternatifs aux organes glucodépendants comme le cerveau. Lorsque PPARα est délété, il a été observé une diminution drastique des corps cétoniques circulants, traduisant une cétogenèse fortement réduite (Fig.12). Il a été mis en évidence que l'HMGCS2, enzyme clef de la synthèse des corps cétoniques, était une cible directement induite par PPARα (Rodríguez et al., 1994). Il est intéressant de noter que l'HMGCS2 est capable d'agir comme un co-activateur de PPARα pour induire sa propre expression (Meertens et al., 1998). La diminution de l'oxydation des acides gras et de la cétogenèse pourrait en partie expliquer l'hypoglycémie observée dans les souris PPARα KO : d'une part, la production hépatique de glucose diminue, et d'autre part, les tissus périphériques augmentent leur utilisation en glucose en absence d'autres substrats énergétiques. Jusque très récemment, seul le modèle d'invalidation totale de PPARα avait été décrit, mais en 2016, Montagner *et al.* ont développé un modèle murin d'invalidation hépatospécifique de PPARα ($PPAR\alpha^{hep}$ KO) (Montagner et al., 2016). Ces souris, de même que les PPARα KO, présentent un important défaut du catabolisme des acides gras et de la cétogenèse et développent une stéatose hépatique. Ils mettent ainsi en évidence le rôle majeur du PPARα hépatocytaire dans l'homéostasie lipidique de tout l'organisme. Cependant, l'hypoglycémie observée dans les $PPAR\alpha^{hep}$ KO est moins importante que dans les PPARα KO mettant en évidence un rôle du PPARα extrahépatique dans l'homéostasie glucidique.

PPARα est également capable de réguler le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. D'une part, en entrainant l'induction du catabolisme oxydatif des AG, il diminue la disponibilité de ces AG pour la formation de particules riches en triglycérides comme les lipoprotéines de très basse densité (VLDL pour Very Low Density Lipoprotein). D'autre part, il exerce un contrôle direct et indirect sur la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme plasmatique responsable de l'hydrolyse des triglycérides circulants. A la fois chez l'Homme et la souris, PPARα contrôle directement l'expression de cette enzyme en se liant au PPRE situé sur le promoteur de son gène (Schoonjans et al., 1996). PPARα permet également l'augmentation de l'activité de la LPL en contrôlant négativement l'expression et la sécrétion d'un inhibiteur de cette enzyme, l'apolipoprotéine CIII (APO-CIII) (Hertz et al., 1995). Ainsi l'induction de PPARα permet à la fois de diminuer la production de particules riches en TG (VLDL) mais aussi de diminuer le taux plasmatique de ces TG en augmentant leur captage.

De par ses fonctions physiologiques (Fig.13), PPARα est apparu rapidement comme une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des désordres métaboliques, tels que des hyperlipidémies, conduisant au développement de différents agonistes synthétiques. Les

fibrates font partis de ces ligands synthétiques largement prescrits utilisés dans le traitement des hypertriglycéridémies. Récemment, le développement et l'utilisation de molécules agonistes à la fois de PPARα et de PPARβ/δ ont ouvert la voie à un nouveau potentiel thérapeutique dans le traitement des stéatoses hépatiques non alcooliques (NAFLD pour « non alcoolic fatty liver disease ») (Cariou and Staels, 2014; Hanf et al., 2014). En effet, l'activation de PPARα permet d'améliorer la stéatose hépatique en augmentant la β-oxydation et l'activation de PPARβ/δ induit une diminution de la néoglucogenèse post-prandiale et améliore la sensibilité à l'insuline hépatique (Souza-Mello, 2015).

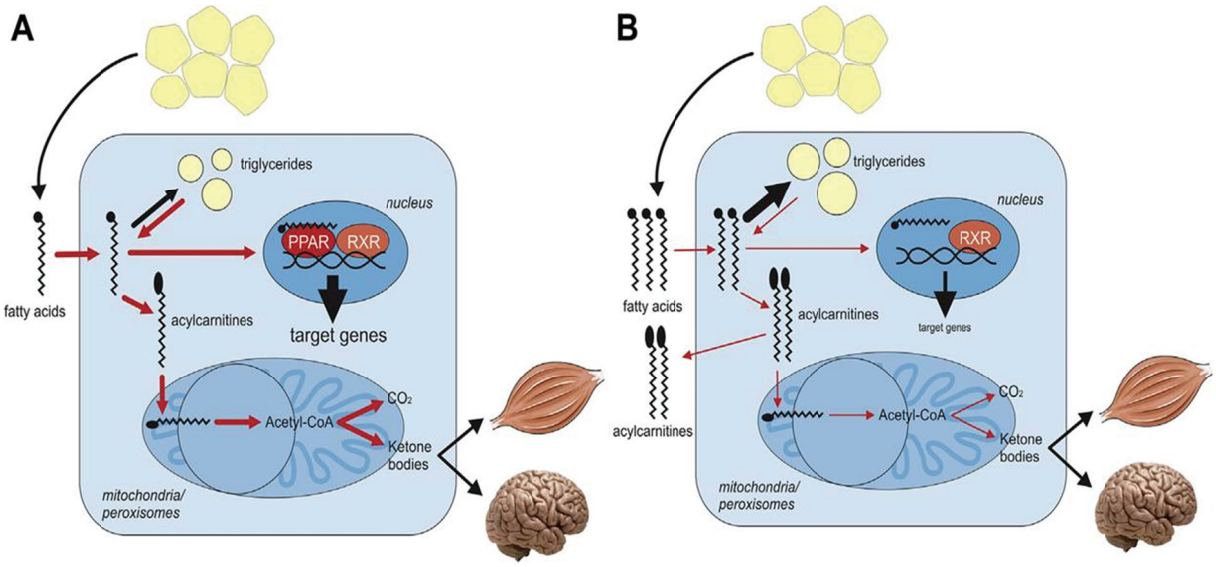


Figure 12 : Rôle de PPARα dans le métabolisme lipidique hépatique

Les acides gras libérés par le tissu adipeux et captés par le foie sont convertis en triglycérides ou oxydés dans la mitochondrie. Les étapes et voies sous le contrôle transcriptionnel de PPARα sont en rouge. A) Situation normale dans une souris à jeûn. B) Conséquences de la délétion de PPARα sur ces voies métaboliques dans une souris à jeun (Kersten, 2014).

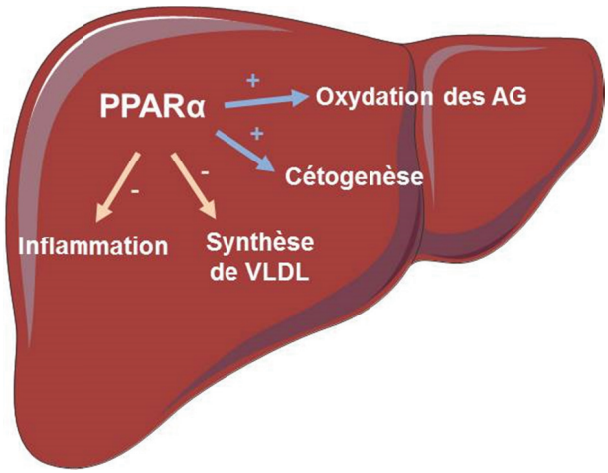


Figure 13 : Les différents rôles de PPARα dans le foie

III. La β-caténine

La β-caténine est une protéine jouant un rôle majeur dans le développement et l'homéostasie de l'organisme. Cette protéine, très conservée, appartient à la famille des protéines à domaine Armadillo. Elle a été identifiée pour la première fois à la fin des années 1980 pour son rôle structurel au niveau des jonctions adhérentes en formant des complexes avec la E-cadhérine et l'α-caténine (Ozawa et al., 1989) et pour son rôle d'effecteur nucléaire *via* la signalisation Wnt canonique (Riggleman et al., 1990).

A. Structure de la β-caténine

La β-caténine est une protéine de 92 kDa composée de 3 domaines (Fig.14). Les domaines N- et C-terminaux entourent un domaine central composé de 12 répétitions Armadillo (R1 à R12). Les deux domaines terminaux ont une structure relativement flexible contrairement au domaine central dont la structure est plus rigide. Le domaine N-terminal, domaine régulateur, contient les sites de phosphorylation de la casein kinase 1α (CK1α) et de la glycogene synthase kinase 3β (GSK3β). Le domaine central, formant une super-hélice α, constitue une plateforme de liaison pour les partenaires de la β-caténine. Ils peuvent être membranaires (E-cadhérine..), cytoplasmiques (adenomatous polyposis coli (APC), AXIN…) ou nucléaires (transcription factor (TCF)) (Huber et al., 1997). L'analyse structurelle a montré que les sites de liaison des différents partenaires se chevauchaient au sein du domaine central. Ainsi, ils ne peuvent pas simultanément lier la β-caténine. D'autres part, les domaines terminaux semblent également jouer un rôle dans la spécificité de liaison de ses partenaires (Solanas et al., 2004). Il apparaît que la compétition existant entre les différents partenaires pour la liaison de la β-caténine est importante dans la régulation de la signalisation Wnt canonique.

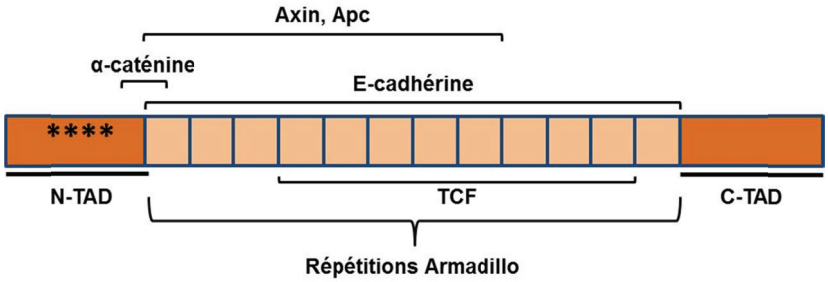


Figure 14 : schéma représentatif de la structure de la β-caténine

La β-caténine possède un domaine central composé de 12 répétitions armadillo entouré d'un domaine N-terminal (N-TAD), portant les différents sites de phosphorylation de la protéine, et d'un domain C-terminal (C-TAD).

B. Rôle de la β-caténine dans les jonctions adhérentes

En absence de signal Wnt, la majeure partie de la β-caténine se localise à la membrane, au niveau des jonctions adhérentes. La E-cadhérine est une molécule clef de ces jonctions. Lorsqu'elle est synthétisée, elle s'associe dans le réticulum endoplasmique à la β-caténine. Elles rejoignent alors ensemble la membrane plasmique et constituent les jonctions adhérentes (Fig.15). En se liant à l'α-caténine, la β-caténine constitue un pont entre la E-cadhérine et le cytosquelette d'actine. La liaison de la β-caténine au domaine cytoplasmique de la E-cadhérine protège un motif d'ubiquitinylation sur cette dernière. Ainsi, lorsque la liaison est empêchée ou rompue, la E-cadhérine est ubiquitinylée et envoyée à la dégradation protéasomale (Hinck et al., 1994). De même, la liaison de la E-cadhérine stabilise la β-caténine et l'empêche d'être prise en charge par son complexe de dégradation (Huber and Weis, 2001).

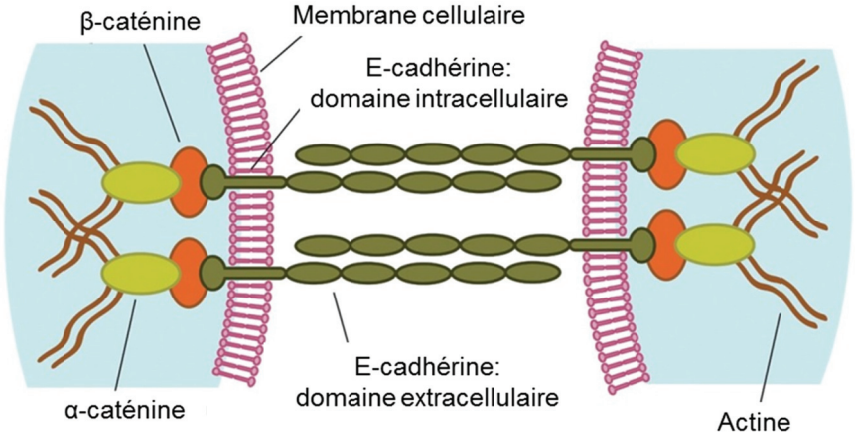


Figure 15 : Schéma représentatif des jonctions adhérentes

Au niveau des membranes cellulaires, la β-caténine se lie au domaine intracellulaire de la E-cadhérine et à l'α-caténine. La β-caténine et l'α-caténine permettent defaire le lien entre la E-cadhérine et le cytosquelette d'actine. Ce complexe membranaire constitue les jonctions adhérentes (adapté de Perry et al., 2010).

C. Voie de signalisation Wnt/β-caténine

Il existe une voie Wnt dite canonique et des voies non canoniques. Contrairement à la voie canonique, les voies non canoniques n'impliquent pas la β-caténine. Elles consistent en deux voies indépendantes, la voie Wnt/Jun N-terminal kinase (JNK) et la voie Wnt/calcium. Ces voies sont par exemple impliquées dans la polarité planaire cellulaire, jouant ainsi un rôle important au cours de l'embryogenèse, comme dans la progression des cellules pendant la gastrulation et le développement et la différenciation cardiaque (Komiya and Habas, 2008). Seule la voie canonique sera abordée dans ce chapitre.

En absence de ligand Wnt et en situation physiologique, la durée de vie de la β-caténine libre dans le cytoplasme est courte. Elle est en effet sans cesse envoyée à la dégradation protéasomale sous l'action d'un complexe protéique. Dans le cytoplasme, deux protéines d'échafaudage, l'AXIN 1 et APC se lient à la β-caténine libre et permettent sa phosphorylation. Dans un premier temps, le résidu Sérine en position 45 est phosphorylé par la caséine kinase 1 (CK1). Puis dans un second temps, GSK3β phosphoryle les résidus Thréonine en position 41 et Sérine en positions 37 et 33. La β-caténine liée à APC quitte alors le complexe de dégradation et est reconnue au niveau de ses résidus Ser37 et Ser33 phosphorylés par un complexe E3 ubiquitin ligase. L'ubiquitinylation de la β-caténine conduit à sa dégradation protéasomale (Fig.16A). Les protéines du complexe de dégradation sont importantes dans la régulation de l'activité de la β-caténine. Notamment, il a été montré que l'AXIN 1 jouait un rôle important dans l'activité de la GSK3β sur la β-caténine (Dajani et al., 2003). De plus, APC détient un rôle important dans l'établissement du complexe de dégradation et la stabilisation de la phosphorylation de la β-caténine. Si lors de sa libération du complexe de dégradation la β-caténine phosphorylée n'est pas liée à APC, elle est immédiatement déphosphorylée et n'est pas dégradée dans le protéasome.

La liaison d'un ligand Wnt à son récepteur Frizzled (Fz) et son co-récepteur Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) induit une série d'évènements moléculaires conduisant à l'inactivation du complexe de dégradation et à l'activation de la voie de signalisation Wnt dite canonique. Suite à la liaison du ligand Wnt, Fz recrute la protéine cytoplasmique Dishevelled (Dvl) au niveau du complexe récepteur. Cela entraine la formation d'agrégats de LRP5/6 à la membrane et la phosphorylation de leur domaine intracellulaire par CK1 (Bilic et al., 2007). Cette phosphorylation entraine l'activation de LRP5/6 et permet le recrutement de l'AXIN1-GSK3β, ce qui entraine la déstabilisation du

complexe de dégradation. La β-caténine s'accumule alors dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau où elle s'associe au facteur de transcription T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding factor (TCF/Lef) pour induire son programme génique (Fig.16B). Ces gènes cibles sont impliqués dans divers processus physiologiques ou pathologiques lorsque la voie est dérégulée. Ce chapitre abordera les rôles de la β-caténine dans les processus physiologiques. Son rôle dans le carcinome hépatocellulaire sera développé dans le chapitre suivant.

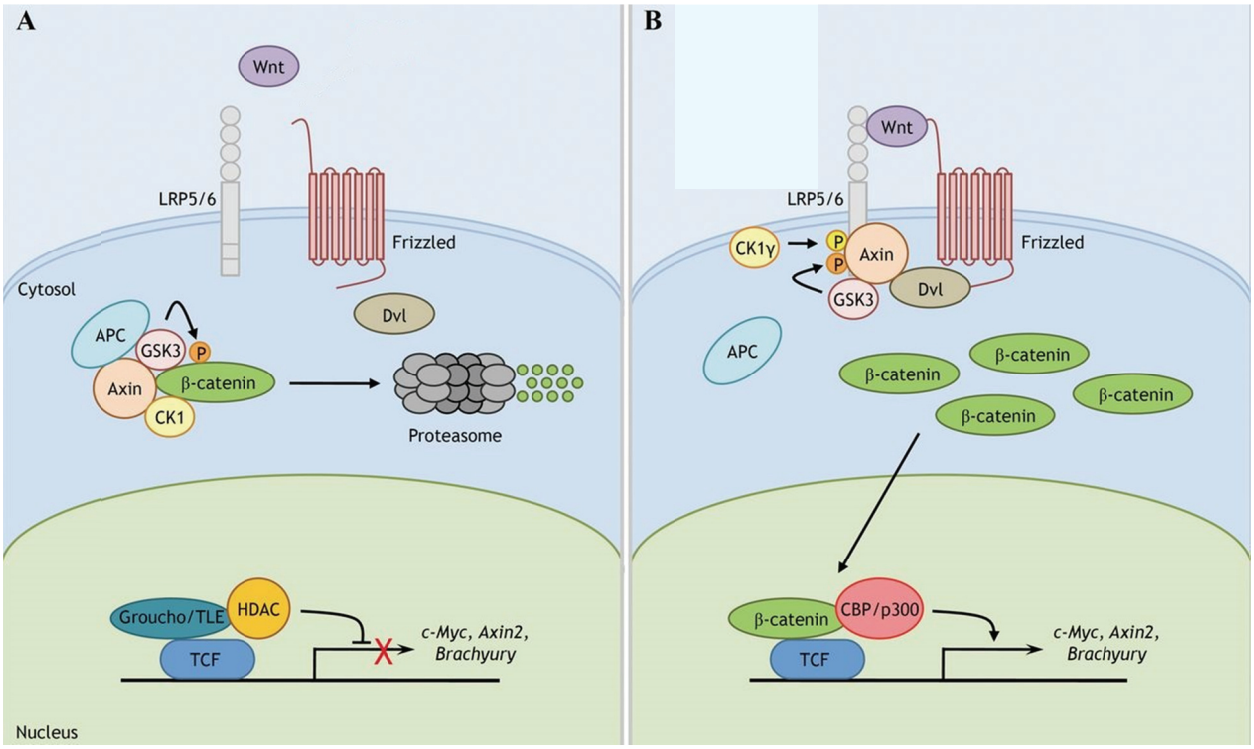


Figure 16 : Schéma représentatif de la voie Wnt/β-caténine

(A) En situation physiologique et en absence de signal Wnt, la β-caténine est séquestrée par un complexe protéique, contenant notamment la protéine APC, et est envoyée à la dégradation protéasomale. **(B)** Sous l'effet d'un signal Wnt, la β-caténine est libérée du complexe de dégradation et est transloquée dans le noyau. Elle s'associe alors au facteur TCF/Lef au niveau de ses gènes cibles pour induire un programme génique spécifique**.** (schéma dans Kim et al., Feb 15).

D. Rôle physiologique de la β-caténine dans le foie

La découverte de la présence de mutations fréquentes de la β-caténine dans le carcinome hépatocellulaire a permis de faire le lien entre la voie de signalisation Wnt/β-caténine et l'homéostasie hépatique chez l'adulte (de La Coste et al., 1998). Le développement de modèles d'activation et de délétion de la β-caténine et les études menées par la suite ont permis d'apporter de nombreuses informations sur les rôles de cette voie de signalisation, notamment son implication dans la physiologie et le développement hépatique. Comme nous le verrons plus en détails, la β-caténine est un régulateur majeur du métabolisme hépatique et

des mutations sur son gène ou sur les effecteurs de la voie Wnt/β-caténine sont associés au développement de pathologies, notamment de carcinomes hépatocellulaires.

a. La voie Wnt/β-caténine et développement hépatique

Au cours de la vie embryonnaire, le développement hépatique est un processus en plusieurs étapes. L'implication de la β-caténine dans la formation du bourgeon hépatique à partir de l'endoderme ventral antérieur est encore sujette à débat puisque selon les modèles étudiés, elle a été montrée comme inhibitrice ou nécessaire à la formation de ce bourgeon hépatique (McLin et al., 2007; Ober et al., 2006). En revanche, l'implication de cette voie dans les phases plus tardives de la différenciation hépatocytaire est beaucoup plus claire. Pendant une fenêtre de temps restreinte, pendant la mi-gestation, la voie Wnt/β-caténine permet la différenciation des hépatoblastes immatures et leur engagement dans la lignée biliaire, tout en restreignant la différenciation hépatocytaire de ces hépatoblastes (Decaens et al., 2008). Après la naissance, le foie continue à croitre durant la courte période de l'allaitement, et il a été montré que la β-caténine stimulait cette croissance et la prolifération hépatocytaire (Apte et al., 2007). Elle exerce par ailleurs un contrôle sur le cycle cellulaire dans le foie tout au long de la vie. Finalement, la voie de signalisation Wnt/β-caténine déterminera également la zonation fonctionnelle finale des lobules du foie adulte (Benhamouche et al., 2006b).

b. Contrôle du métabolisme hépatique par la β-caténine

Les études menées sur différents modèles d'activation ou d'inhibition de la voie Wnt/β-caténine ont permis de révéler son rôle majeur dans le contrôle du métabolisme hépatique. Dans le foie adulte, il a été mis en évidence que la β-caténine activée était localisée uniquement dans la zone péricentrale. Au contraire, l'expression de son régulateur négatif Apc est périportale. Ces observations ont suggéré l'idée de l'implication de la voie Wnt/β-caténine dans la zonation métabolique hépatique. Les travaux menés dans l'équipe par Benhamouche *et al.* ont alors montré que la délétion de la protéine Apc (souris Apc^{KOliv}) entrainait l'apparition d'un foie présentant un phénotype entièrement péricentral, c'est-à-dire exprimant un programme génique normalement retrouvé dans la zone péricentrale (Benhamouche et al., 2006b). Au contraire, les modèles de délétion de la β-caténine ou exprimant un inhibiteur des Wnt (Dickkopf-related protein 1) développent un foie entièrement périportal (Cavard et al., 2008; Sekine et al., 2006), révélant ainsi le rôle essentiel de cette voie dans le contrôle de la zonation métabolique hépatique. Cependant, jusque très

récemment, les mécanismes en amont de la voie Wnt/β-caténine, régulant la zonation spatiotemporelle de son activité, n'étaient pas identifiés. Des hypothèses avaient cependant été émises sur une possible zonation des ligands Wnt conduisant à un gradient d'activation de la β-caténine (Benhamouche et al., 2006b; Wang et al., 2015). En 2016, une étude démontre le rôle primordial du module RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 (R-spondin-leucine rich repeat-containing G-protein coupled receptors 4/5-zinc and ring finger protein 3/ring finger protein 43) dans le contrôle de la zonation hépatique (Planas-Paz et al., 2016). La liaison de RSPO aux récepteurs LGR4/5 potentialise les effets des Wnt sur leur récepteur Frizzled (Carmon et al., 2011; de Lau et al., 2011). La signalisation induite par ce complexe peut être supprimée par deux protéines transmembranaires à activité E3 ubiquitin ligase : ZNRF3 et RNF43. Ces protéines induisent la dégradation de Frizzled, favorisant ainsi le renouvellement des récepteurs aux Wnt (Hao et al., 2012; Koo et al., 2012). Il a été montré que Rspo3 était exprimée uniquement dans les cellules endothéliales de la veine centrolobulaire (Rocha et al., 2015). De plus, le travail mené par Planas-Paz *et al.*montre que la voie de signalisation Wnt/β-caténine peut être activée dans tous les hépatocytes du lobule suite à l'injection de RSPO ou à la délétion de ZNRF3/RNF43. Il semblerait donc que les ligands Wnt et leurs récepteurs ne soient pas zonés. Les auteurs mettent également en évidence que le module RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 ne potentialise pas seulement les effets de la signalisation Wnt, mais est également essentiel à son activité. L'ensemble de leurs données suggérant un rôle des protéines RSPO dans la restriction locale de la signalisation Wnt.

Il est apparu que la β-caténine contrôlait le **métabolisme de l'ammoniaque et de l'urée** en régulant positivement l'expression de la GS, de Glt1 (transporteur du glutamate), RhBg : (transporteur de l'ammoniaque) ou négativement la Glutaminase 2, l'Arginase1 et la carbamoyl phosphate synthetase 1, protéines impliquées dans ces voies métaboliques. Ainsi, les souris Apc^{KOliv} présentent une surexpression de la GS qui s'étend à tout le foie et un défaut de détoxification de l'ammoniaque. Ce défaut de détoxification conduit au décès des souris environ 14 jours après l'invalidation d'Apc, vraisemblablement suite au développement d'une encéphalopathie hépatique (Benhamouche et al., 2006b; Gougelet et al., 2014).

Il a également été mis en évidence un contrôle du **métabolisme des xénobiotiques** par la β-caténine, notamment *via* la régulation de l'expression d'enzymes importantes de cette voie comme celles du cytochrome P450 ou des récepteurs nucléaires aryl hydrocarbon receptor (Ahr) et constitutive androstane receptor (CAR) impliqués dans l'activation d'enzymes de détoxification des xénobiotiques (Braeuning et al., 2009; Gougelet et al., 2014).

En 2007, l'étude menée par Audard *et al.* met en évidence un très probable lien entre la voie Wnt/β-caténine et le **métabolisme biliaire**. Ils montrent que la cholestase, c'est-à-dire l'accumulation intra-hépatique de bile, est une caractéristique des carcinomes hépatocellulaires présentant une activation de la β-caténine (Audard et al., 2007). Les auteurs suggèrent que la β-caténine jouerait plutôt un rôle sur la synthèse et/ou le transport des acides biliaires. Gougelet *et al.* en 2014 montrent l'implication de la voie Wnt/β-caténine dans le contrôle du métabolisme biliaire. Ils mettent en évidence la présence d'une cholestase dans le modèle d'activation de la β-caténine (Apc^{KOliv}) et révèlent un contrôle direct et indirect de la β-caténine sur les enzymes du métabolisme biliaire comme le cytochrome P450 ou CAR (Beilke et al., 2009; Gougelet et al., 2014). Une étude très récente utilisant des modèles murins exprimant de façon stable la β-caténine dans les hépatocytes confirme ces résultats. Lemberger *et al.* montrent que l'activation continue de la β-caténine dans les hépatocytes entraine une augmentation des niveaux sériques et hépatiques d'acides biliaires (AB) et l'apparition d'une cholestase. Comme dans l'étude précédente, ils mettent en évidence une induction de certaines enzymes du cytochrome P450, impliquées dans la synthèse des AB, comme la Cyp7a1. La cholestase observée est ici la conséquence de l'augmentation *de novo* de la production d'AB et non d'un défaut architectural, confirmant l'hypothèse émise dès 2007 par Audard *et al.* Plusieurs années auparavant une étude menée sur le modèle murin β-caténine KO montrait également le développement d'une cholestase dans les foies de ces souris (Yeh et al., 2010). Ce résultat pourrait sembler contradictoire avec les travaux décrits précédemment. Cependant, l'étude de Yeh *et al.,* dans les souris β-caténine KO, montre une diminution des enzymes de la synthèse d'AB et une diminution du flux biliaire lorsque la β-caténine est délétée. Contrairement à ce qui est observé dans les modèles d'activation de la β-caténine, la cholestase décrite est ici due à des anomalies au niveau des canaux biliaires et donc à un défaut d'excrétion de la bile. L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de la signalisation Wnt/β-caténine dans le maintien et la régulation de l'homéostasie biliaire.

La voie Wnt/β-caténine est également impliquée dans le **métabolisme des acides gras**. Une étude métabolomique réalisée sur les foies de souris Apc^{KOliv} montre une diminution globale du stock lipidique intracellulaire avec en particulier une diminution du contenu en acides gras à chaine longue intrahépatique (supérieure à 16 carbones). Gougelet *et al.* en 2014 expliquent en partie ce phénotype en montrant que la β-caténine exerce un contrôle négatif sur la lipogenèse en réprimant les enzymes clefs de cette voie comme l'ACLY (Chafey et al., 2009; Gougelet et al., 2014).

D'autre part, des équipes indépendantes ont montré que la délétion de la β-caténine dans le foie entrainait un défaut dans **l'oxydation des acides gras** et la **production de corps cétoniques**. Elles ont également mis en évidence son importance dans la production d'ATP et le maintien de l'homéostasie mitochondriale (Behari et al., 2014; Lehwald et al., 2012). Ce rôle avait déjà été démontré part une équipe en 2010 dans des cellules musculaires, où la β-caténine module vraisemblablement la mitochondriogenèse et la respiration cellulaire (Yoon et al., 2010). Il est intéressant de noter que l'oxydation des acides gras et la cétogenèse sont considérées comme principalement périportales et donc à l'opposé de la zone d'activité de la β-caténine. Elle semble cependant jouer un rôle dans la mise en place de ces voies et leur régulation.

Le rôle de la β-caténine dans le **métabolisme glucidique** semble moins évident. Les expériences réalisées dans notre équipe sur le modèle Apc^{KOliv} ont montré une augmentation hépatique de l'enzyme responsable de la synthèse du lactate, la LDH. L'expression de cette enzyme est souvent augmentée dans les cancers associés à un effet Warburg. Cette observation a mené l'équipe à faire l'hypothèse d'un métabolisme « Warburgien » induit par l'activation de la β-caténine. Comme nous le verrons plus tard, l'effet Warburg consiste notamment en une glycolyse aérobie accrue. Le PET-Scan (ou tomographie par émission de positon) fluorodéoxyglucose (PET-scan FDG) est une méthode d'imagerie basée sur cette observation, il permet de détecter un flux entrant accru de glucose dans les cellules. Or, les foies des souris Apc^{KOliv} sont apparus négatifs en PET-scan FDG, suggérant une entrée normale du glucose. De façon cohérente, l'expression des transporteurs du glucose, GLUT1 et glut2 au même titre que l'expression de la glucokinase (hexokinase IV) ou des hexokinase I et III, n'est pas non plus modifiée dans ces souris (Chafey et al., 2009).

Dans le cas de la **néoglucogenèse**, des études menées par des équipes indépendantes aux mêmes périodes montrent des résultats apparemment contradictoires. En effet, les travaux de notre équipe ont montré que les souris Apc^{KOliv} étaient hypoglycémiques au cours du jeûne long suggérant un défaut de néoglucogenèse. La PEPCK, enzyme limitante de la néoglucogenèse, est apparue comme une cible réprimée par β-caténine/TCF (Benhamouche et al., 2006b; Chafey et al., 2009). Pourtant, l'équipe de H.Clevers a montré avec des expériences de perte ou gain de fonction hépatospécifiques de l'effecteur TCF/Lef, que la perte de TCF conduisait à des hypoglycémies et le gain de fonction des hyperglycémies (Boj et al., 2012). En 2011, Liu *et al.* publient une étude sur des modèles murins injectés avec un adenovirus codant soit la recombinase Cre, soit la β-caténine, permettant une perte ou un gain

de fonction de celle-ci. Ils montrent que la β-caténine est capable d'induire l'expression de la PEPCK et de la glucose-6-phosphatase (G6Pase), deux enzymes unidirectionnelles importantes de la néoglucogenèse. Ils montrent alors que cette induction est dépendante de la Forkhead box protein 1 (foxO1). En effet, en absence de foxO1 les cibles néoglucogéniques ne sont pas induites. Et inversement, la délétion de la β-caténine empêche l'action transactivatrice de foxO1 sur ces gènes cibles. Ils démontrent que l'interaction entre la β-caténine et foxO1 jouerait un rôle majeur dans la réponse au jeûne (Liu et al., 2011). Ainsi, les effets de la β-caténine sur la néoglucogenèse semblent complexes et dépendants du facteur de transcription auquel elle est associée. Le mécanisme entrainant la liaison préférentielle de l'une ou l'autre de ces protéines semble dépendant du contexte et n'est pas encore élucidé.

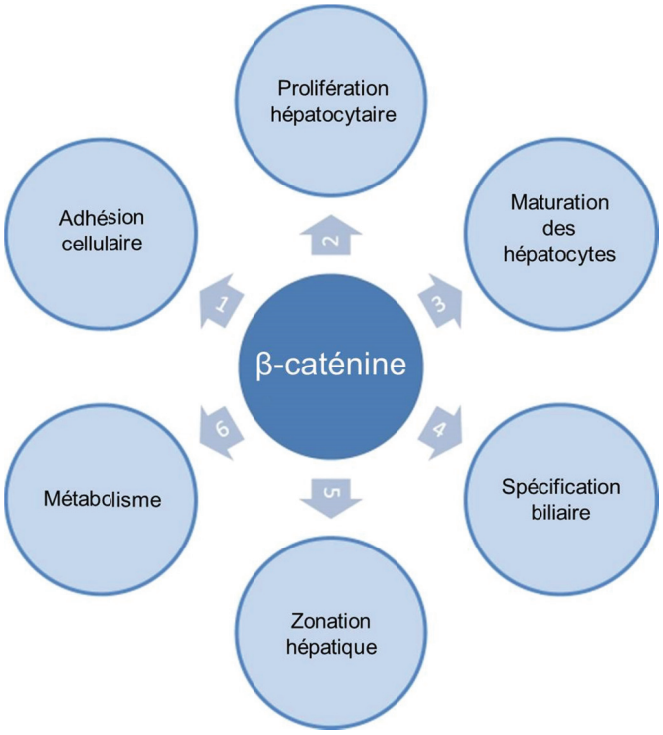


Figure 17 : Schéma récapitulatif des différentes fonctions de la β-caténine
(adapté de Heindryckx et al., 2009)

E. Interractions entre β-caténine et facteurs de transcription

a. TCF

Il existe quatre isoformes de TCF chez les vertébrés, l'isoforme majoritaire dans le foie étant TCF4. Ils peuvent tous se lier à la β-caténine, la plupart d'entre eux sont des co-activateurs de celle-ci, mais il a été montré que certains membres de cette famille pouvaient

également agir comme des co-represseurs de la voie Wnt/β-caténine (pour revue voir Cadigan and Waterman, 2012).

En absence de β-caténine, TCF/Lef forme un complexe avec la protéine Groucho/Transducin-like enhancer (TLE) et agit comme un répresseur transcriptionnel. Groucho induit le recrutement d'histones déacétylases entrainant une condensation locale de la chromatine la rendant ainsi inaccessible pour la machinerie transcriptionnelle. Il est généralement admis que la liaison de la β-caténine aux protéines TCF/Lef déplace Groucho/TLE faisant alors de TCF un activateur transcriptionnel des gènes cibles de la voie. Différents co-activateurs, comme BCL9, pygopus ou CBP (Creb binding protein) sont recrutés au niveau de la β-caténine afin de former un complexe d'activation permettant la transcription des gènes cibles de la β-caténine (Fig.16 et Fig.18). Un certain nombre de partenaires nucléaires de la β-caténine a été identifié, mais TCF semble être le principal et le mieux caractérisé. Ensemble, la β-caténine et TCF contrôlent la majorité des effets de la signalisation Wnt/β-caténine.

b. FoxO

Les membres de la famille des foxO sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de différents processus tels que l'apoptose, la prolifération ou encore le stress oxydant (Tran et al., 2003). Comme mentionné, la β-caténine est capable de se lier aux protéines foxO notamment en condition de stress oxydant et d'induire ses gènes cibles (Essers et al., 2005). De plus, TCF et foxO seraient en compétition pour lier la β-caténine, ainsi, lorsque la transcription des gènes cibles de β-caténine/foxO est activée, celle de β-caténine/TCF est inactivée (Hoogeboom et al., 2008) (Fig.18). D'autre part, l'activité et la localisation subcellulaire de foxO1 varie en fonction du niveau d'insuline : l'insuline entraine la phosphorylation et l'expulsion de foxO1 du noyau. Il a alors été montré qu'au cours d'un jeûne prolongé, lorsque le niveau d'insuline est faible, la β-caténine est capable d'induire la néoglucogenèse dépendante de foxO notamment en augmentant la localisation nucléaire de celui-ci. Ce résultat est opposé aux observations faites dans les modèles murins d'activation de la β-caténine montrant une régulation négative de la néoglucogenèse par la β-caténine (Chafey et al., 2009; Liu et al., 2011). Une autre étude montre que l'invalidation de TCF4 induit une augmentation de la liaison de la β-caténine à foxO et la mise en place d'un programme néoglucogénique (Ip et al., 2015). Le mécanisme privilégiant l'interaction entre la β-caténine et FoxO plutôt qu'avec TCF reste encore à élucider.

c. HIF

Il a été montré qu'en condition hypoxique dans des cellules de cancer du côlon, la β-caténine était capable d'interagir avec l'hypoxia factor 1α (HIFα). HIF1α est un régulateur clef de l'hypoxie. Cette hypoxie le stabilise et permet sa translocation nucléaire où il s'associe avec HIF1β pour induire l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse et le métabolisme. En situation hypoxique, la formation du complexe entre TCF et la β-caténine est inhibée alors que la formation du complexe entre HIF1α et la β-caténine est induite (Fig.18). Le programme génique mis en place alors contrôle l'adaptation et la survie à l'hypoxie (Kaidi et al., 2007). Plus tard, dans des modèles d'ischémie/reperfusion hépatique cette fois, il a été montré qu'en situation hypoxique, l'inhibition de la β-caténine entrainait des dommages tissulaires. Au contraire, l'augmentation de l'activité de celle-ci protège les cellules, montrant encore le rôle de la β-caténine dans la survie à l'hypoxie. Celle-ci entraine la liaison préférentielle de la β-caténine avec HIF1α plutôt qu'avec TCF, induisant l'expression de cibles telles que l'érythropoïétine ou le vascular endothelial growth factor (VEGF) (Lehwald et al., 2011).

La β-caténine est également capable d'interagir avec HIF2α. Au contraire de HIF1α, HIF2α stabilise le complexe formé par TCF et la β-caténine pour faciliter la transcription des gènes cibles et induire notamment la prolifération cellulaire (Choi et al., 2010). Les effets opposés de HIF1α et HIF2α permettraient ainsi aux tumeurs de maintenir un équilibre entre leur prolifération et leur survie.

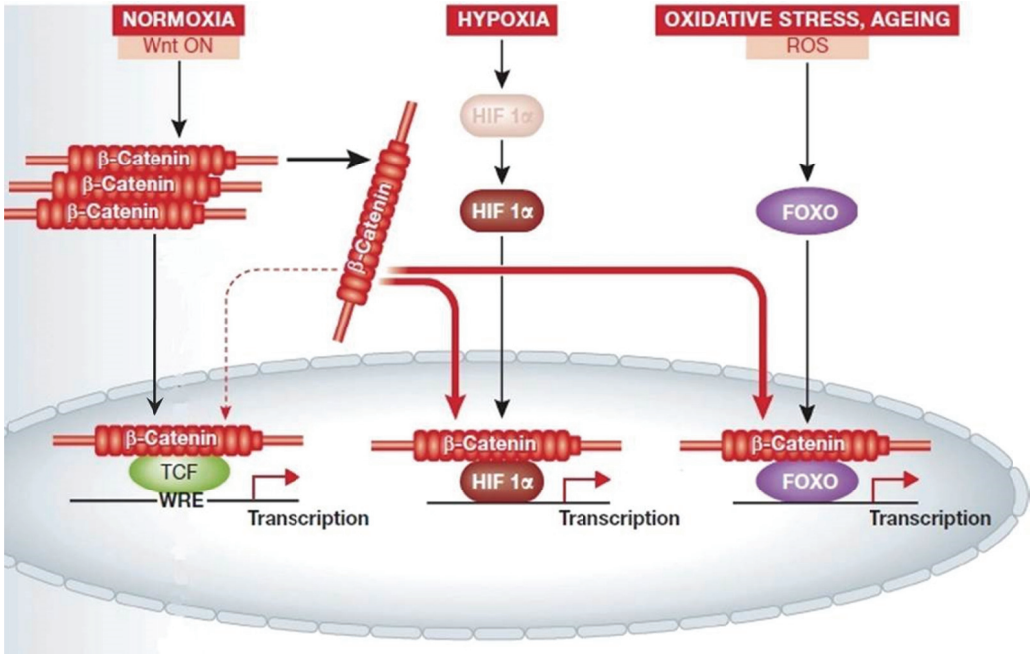


Figure 18 : Schéma simplifié des interactions entre la β-caténine et les facteurs de transcription
(adapté de Valenta et al., 2012)

d. HNF4α

L'Hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) est un facteur de transcription impliqué notamment dans le contrôle de la différenciation hépatocytaire, la prolifération et l'homéostasie lipidique. Il a été identifié comme un transactivateur de gènes periportaux et répresseurs de gènes péricentraux tels que la GS. Ainsi les souris invalidées pour HNF4α dans le foie présentent une zonation métabolique perturbée (Stanulović et al., 2007). Des expériences menées *in vivo* et *in vitro* sur l'intestin ont montré qu'HNF4α était capable d'interférer avec la voie Wnt/β-caténine (Cattin et al., 2009). La même année, une autre équipe met en évidence l'interaction entre le facteur de transcription et cette voie dans le foie, et montre que le dialogue entre ces deux acteurs semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la zonation hépatique sans pour autant apporter plus d'éléments mécanistiques (Colletti et al., 2009). Plus tard, Gougelet, Torre *et al.* ont montré qu'HNF4α était capable de se lier directement à la β-caténine et à TCF4, indépendamment de leur liaison à l'ADN. De plus, TCF4 et HNF4α seraient capables de se fixer à leurs éléments de réponse respectifs sur leurs gènes cibles. Ainsi HNF4α réprime la transcription dépendante de la β-caténine, et inversement celle-ci inhibe la transcription des gènes cibles d'HNF4α (Gougelet et al., 2014) (Fig.19).

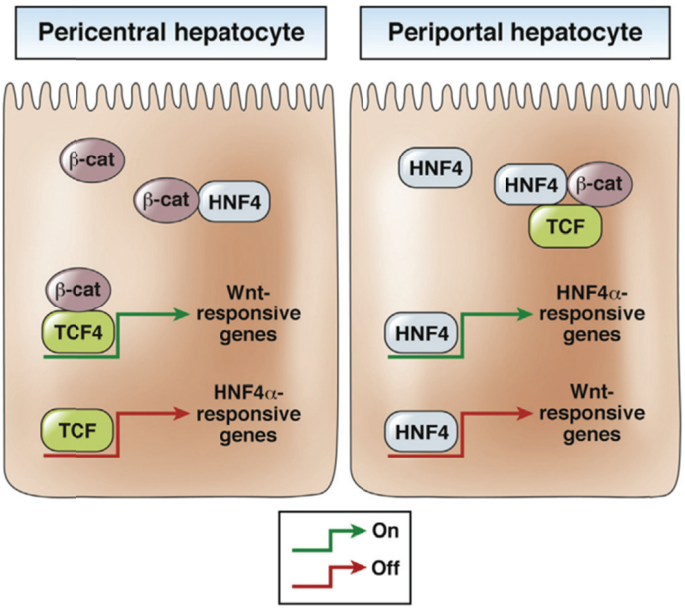


Figure 19 : Schéma représentatif des interactions entre la β-caténine, TCF et HNF4 dans les hépatocytes péricentraux et périportaux
(Monga, 2015)

L'ensemble de ces données indiquent que la β-caténine est capable de se lier à différents facteurs de transcription et que ces liaisons modulent l'activité génique de la β-caténine mais aussi l'expression des cibles de ses différents partenaires.

IV. Le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer primitif du foie le plus répandu et la 2ème cause de mortalité liée au cancer dans le monde (Torre et al., 2015). L'émergence du CHC est la résultante d'une combinaison d'altérations génétiques, épigénétiques, transcriptomiques et métaboliques lui conférant une signature unique (Zucman-Rossi et al., 2015). Les traitements contre le CHC sont aujourd'hui très limités. Cependant les outils « nouvelle génération » ont permis d'approfondir les connaissances sur cette pathologie hétérogène ouvrant la voie au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées.

A. Facteurs de risques

Les hépatites virales et la consommation abusive d'alcool sont les facteurs de risques les plus importants pour le développement du CHC.

L'infection chronique par le virus de l'**hépatite B** (HBV) a été montrée comme pro-carcinogène. Environ 10 à 25% des patients atteints de l'hépatite B développeront un CHC au cours de leur vie et contrairement aux autres hépatites, ce CHC pourra se développer sur fond cirrhotique comme non cirrhotique. Le CHC résultant de l'infection par HBV peut être la conséquence de l'activation des protéines virales pro-oncogènes, comme HBx, capables notamment d'altérer l'expression de gènes régulant la prolifération ou d'inactiver le gène suppresseur de tumeur *TP53*. Il peut également être la conséquence de l'insertion de l'ADN viral dans les séquences de gènes dont les mutations entrainent la carcinogenèse comme *TERT* (telomerase reverse trascriptase, codant pour la télomérase) ou *CCNE1* (codant pour la cycline E, protéine du cycle cellulaire) (Neuveut et al., 2010; Sung et al., 2012).

L'infection par le virus de l'**hépatite C (HCV)** est également un facteur de risque du CHC. En effet, 80% des patients atteints de l'hépatite C développeront une hépatite chronique qui évoluera vers la cirrhose pour 20% d'entre eux. Dans le cas de l'hépatite C, contrairement à l'HBV, l'émergence du CHC se fait presque exclusivement dans un contexte de cirrhose.

En Europe, près de la moitié des CHC est liée à la **consommation abusive d'alcool**. Des études menées aux Etats-Unis ont également montré que l'alcoolisme chronique augmente de 2 à 4 fois le risque de développer un CHC. L'exposition chronique à l'alcool entraine le développement d'une fibrose, puis d'une cirrhose, qui pourra alors évoluer vers le

CHC. D'autre part, la consommation excessive d'alcool agit également comme facteur aggravant d'hépatopathies chroniques telles que l'infection par HCV.

La **NAFLD** (Non Alcoolic Fatty Liver Disease) ou stéatose hépatique non alcoolique, est une manifestation hépatique du syndrome métabolique. Sa prévalence, déjà importante (30% aux Etats-Unis), tendra à augmenter au cours des prochaines années avec l'augmentation de l'incidence de l'obésité, du diabète, des dyslipidémies et des troubles associés au syndrome métabolique (Rinella, 2015). Elle regroupe différentes pathologies hépatiques allant de la simple stéatose réversible au CHC. Le risque d'évolution de la stéatose vers la cirrhose oscille entre 4 et 20% en fonction des patients et de leurs lésions hépatiques, et pourra évoluer vers l'émergence d'un CHC. Cependant, le CHC résultant d'une NAFLD peut également se développer sur foie non cirrhotique (Piscaglia et al., 2016). Bien qu'il reste encore beaucoup à étudier sur le CHC lié à la NAFLD, différents mécanismes impliqués dans l'émergence de ce cancer ont été élucidés. On peut par exemple citer l'inflammation hépatique chronique associée à la stéatose (Scalera and Tarantino, 2014; Tanaka et al., 1997), une dérégulation du système dommage/réparation hépatique (Bohinc and Diehl, 2012) ou encore des polymorphismes du gène *PNPLA3* (patatin like 3), codant pour une triglycéride lipase, l'adiponutrine, ces polymorphismes sont associés à des risques accrus de stéatoses hépatiques et une incidence plus élevée de CHC (Romeo et al., 2008; Wong et al., 2016).

Parmi les autres facteurs de risques, on trouve également l'exposition à **l'aflatoxine B1** (AFB1), une mycotoxine pouvant contaminer la nourriture en Asie et en Afrique. L'intoxication à l'AFB1 entraine notamment des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* et son pouvoir oncogénique est renforcé par l'infection simultanée à l'HBV. L'exposition à l'**acide aristolochique**, présent dans la médecine traditionnelle chinoise, ou encore le **tabac** sont aussi des facteurs de risques. On peut également citer les maladies génétiques comme par exemple l'**hémochromatose** ou la déficience en **α-antitrypsine,** qui entrainent le développement d'une cirrhose puis d'un CHC, ou encore les diabètes de type **MODY** (Mature Onset Diabetes of the Youth) qui promeuvent l'émergence d'adénomes pouvant évoluer vers le CHC sans apparition d'une cirrhose (Dragani, 2010; Willson et al., 2013).

B. De la cirrhose vers le CHC

L'évolution de la cirrhose en CHC est un processus long, en plusieurs étapes, et définie par une séquence de lésions précises: la cirrhose évolue vers le nodule dysplasique de bas grade (NDBG), puis vers le nodule dysplasique de haut grade (NDHG), duquel émerge le CHC précoce, qui évolue en CHC et enfin en CHC avancé. La réactivation des télomérases est retrouvée dans plus de 90% des CHC. Il a été montré que cette réactivation était nécessaire au développement du CHC sur fond cirrhotique (Farazi et al., 2003). Ainsi, les NDBG et NDHG porteurs de mutations dans le promoteur de *TERT*, induisant la réactivation des télomérases, sont à plus fort risque de transformation maligne mais ils nécessitent cependant des mutations supplémentaires dans d'autres gènes. Les télomères et télomérases semblent donc jouer un rôle important dans l'initiation tumorale liée à la cirrhose (Hartmann et al., 2011; Satyanarayana et al., 2004).

C. La transformation maligne de l'adénome en CHC

L'adénome hépatocellulaire (AHC) est défini comme une prolifération monoclonale d'hépatocytes bien différenciés. Ils se développent le plus souvent dans les foies de femmes jeunes utilisant la contraception orale et peuvent parfois évoluer vers le CHC. Les AHC sont classés en fonction des mutations qu'ils arborent parmi lesquelles on peut citer des mutations d'*HNF1α* (*Hepatocyte nuclear factor 1α*), de *CTNNB1* (*catenin-β1*), ou de gènes de l'inflammation comme l'*IL6ST* (*Interleukin 6 signal transducer*) ou *STAT3* (*signal transducer and activator of transcription 3*) par exemple. Les AHC présentant des mutations activatrices situées au niveau de l'exon 3 du gène *CTNNB1* codant pour la β-caténine ont le plus fort risque d'évolution vers le CHC. Les mutations au niveau du promoteur de *TERT* sont également retrouvées dans ces CHC. Cependant, la séquence d'évènements ici est différente de ce qui est retrouvé dans le CHC sous fond cirrhotique, où la mutation du promoteur de *TERT* est un évènement précoce. Dans le cas de la transformation maligne de l'AHC, la mutation de *CTNNB1* présente dans les hépatocytes sains est associée au développement d'une tumeur bénigne à haut risque d'évolution maligne et la mutation de *TERT* n'interviendra que plus tard (Nault et al., 2013) (Fig.20).

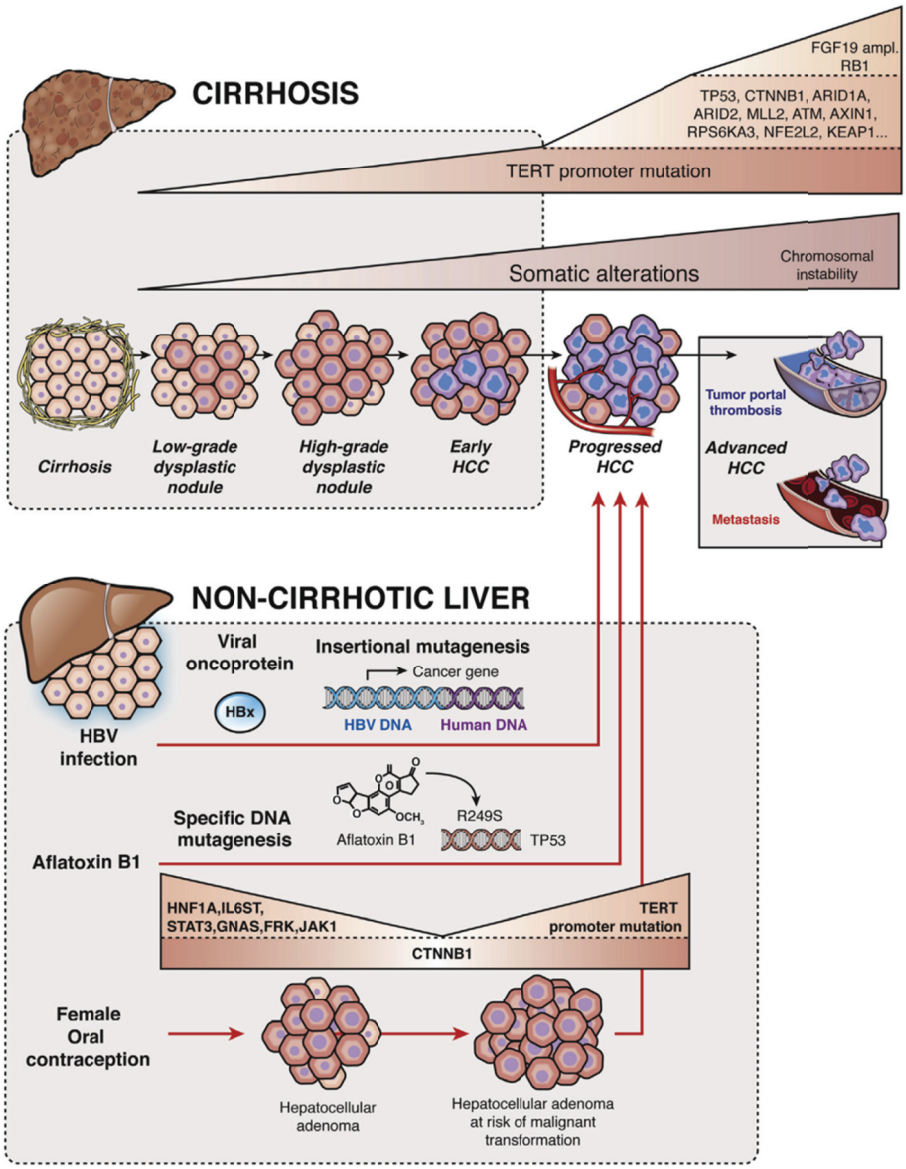


Figure 20 : mécanismes de la transformation maligne des cellules en CHC
(Zucman-Rossi et al., 2015)

D. Classification des CHC

Les outils de séquençage « nouvelle génération » ont permis d'identifier les voies majoritairement touchées par des mutations dans les CHC (Schulze et al., 2015) :

La réactivation des télomérases est retrouvée dans 90% des cas. Les télomères sont des séquences répétées d'ADN situées aux extrémités chromosomiques permettant leur protection. Ils sont raccourcis à chaque division cellulaire conduisant à plus long terme à l'entrée en sénescence des cellules. Les télomérases sont les enzymes permettant le maintien de ces télomères et elles ne sont normalement pas actives dans les hépatocytes matures

quiescents. Leur réactivation anormale est le plus souvent liée à des mutations dans le promoteur du gène *TERT* (60%). Ces dernières sont souvent associées aux mutations du gène *CTNNB1,* codant la β-caténine, suggérant une coopération entre la voie de la β-caténine et le maintien des télomères dans la tumorigenèse hépatique (Nault et al., 2013).

La voie Wnt/β-caténine : Les mutations au niveau de différents acteurs de cette voie sont fréquentes et concernent 20 à 40% des CHC. Ce sous-groupe de CHC sera abordé plus en détails dans la suite du manuscrit.

La voie p53 : La voie p53 est impliquée notamment dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. Cette voie est altérée dans près de la moitié des CHC avec des mutations fréquentes de *TP53* (12 à 48%) (Guichard et al., 2012), le gène suppresseur de tumeur le plus souvent muté dans le cancer.

Les facteurs épigénétiques : les mutations au niveau des modulateurs épigénétiques ont été identifiées récemment dans les CHC, elles concernent des gains de fonction des remodeleurs chromatiniens *ARID1A* (4 à 17%) (Guichard et al., 2012) et *ARID2* (3 à 18%) (Li et al., 2011) mais également des altérations de gènes de la famille des *MLL* (mixed lineage leukemia) responsables de la méthylation des histones.

La voie du stress oxydant : elle est aussi touchée dans 5 à 15% des CHC *via* l'activation de Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2)ou l'inactivation de Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), protégeant ainsi les cellules tumorales contre de potentiels dégats oxydatifs (DeNicola et al., 2011; Sporn and Liby, 2012).

Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPkinase : sont activées dans 5 à 10% des CHC (Sawey et al., 2011).

Des études menées sur de larges cohortes de patients ont permis de classer ces CHC suivant leurs caractéristiques mutationnelles et/ou phénotypiques (Fig.21). Il existe plusieurs classifications établies par des équipes différentes à des époques proches. Boyault *et al.* classent les CHC selon 6 groupes, allant de G1 à G6, en corrélant l'expression des gènes au sein des tumeurs avec leur génotype et leur phénotype. Ainsi, les groupes G1 à G3, dans lesquels on retrouve les mutations de *TP53* (G2 et G3) et d'*AXIN1* (G1), regroupent des tumeurs chromosomiquement instables et liées à l'infection par HBV (G1 et G2). Alors que les tumeurs mutées pour *CTNNB1* sont présentes dans les groupes G5 et G6, qui constituent avec le groupe G4, un ensemble de tumeurs chromosomiquement stables (Boyault et al., 2007). Plus tard, Hoshida *et al*. proposent une classification différente dans laquelle 3 groupes, S1, S2 et S3, sont décrits. Brièvement, les groupes S1 et S2 sont notamment associés respectivement à des mutations de *TGFβ* (transforming growth factor β) et d'*AKT*: ils sont

prolifératifs et de mauvais pronostic. Au contraire, le groupe S3 est associé à des tumeurs présentant des mutations activatrices de *CTNNB1*, bien différenciées et peu prolifératives (Hoshida et al., 2009). Il est à noter que l'origine des patients constituant les cohortes de ces différentes études n'est pas la même. En effet, dans l'étude de Boyault *et al*., les patients sont majoritairement Français et HBV ou HCV positifs alors que la cohorte étudiée par Hoshida *et al,.*couvre un large territoire géographique et regroupe les étiologies majeures du CHC. On constate qu'il existe des différences entre ces classifications, qui pourraient être expliquées par les différences d'étiologies entre les cohortes. Cependant, certaines observations sont récurrentes entre les différentes études et ainsi, les CHC peuvent globalement être rangés dans deux catégories : la première regroupe des tumeurs prolifératives, très vascularisées et de mauvais pronostic. La seconde est constituée de tumeurs principalement mutées pour *CTNNB1*, peu prolifératives et relativement bien différenciées (Zucman-Rossi et al., 2015) (Fig. 21).

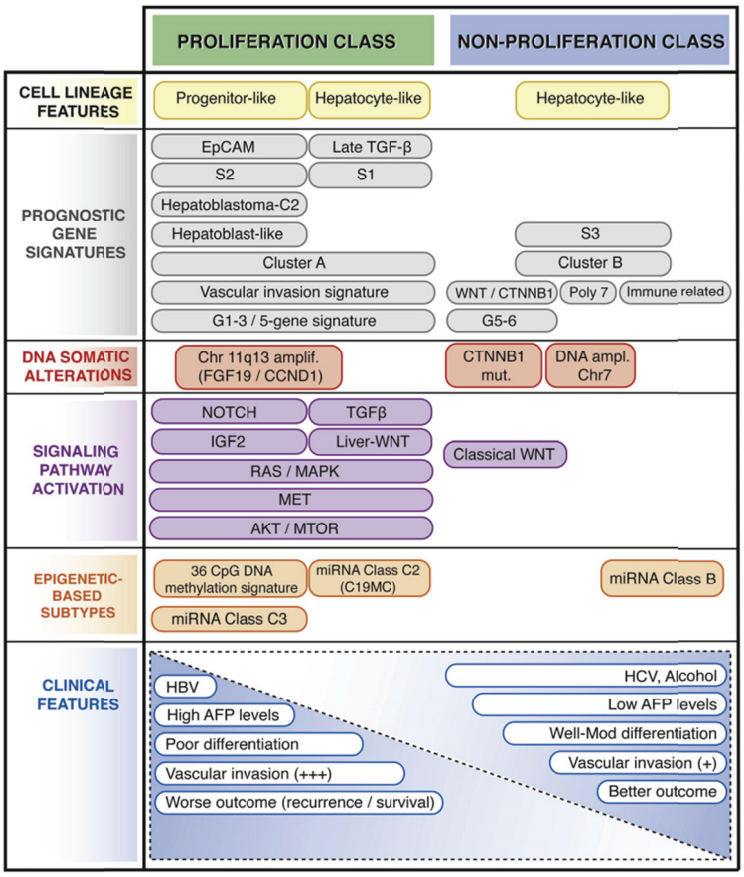


Figure 21 : Schéma récapitulatif de la classification moléculaire des CHC

Les principales classes de CHC (proliférative et non-proliférative) sont représentées en fonction de leur profil d'expression d'ARN messagers. D'autres caractéristiques moléculaires, telles que la structure ADN, les voies dérégulées et les différences épigénétiques, ont été ajoutées. (Zucman-Rossi et al., 2015)

E. Le carcinome hépatocellulaire lié à la β-caténine

La voie Wnt/β-caténine est donc une voie très fréquemment touchée dans le CHC. Différents acteurs de la voie peuvent être mutés. Dans environ 10 à 35% des cas, il s'agit de mutations **gain de fonction du gène *CTNNB1*** codant la β-caténine. Ces mutations, identifiées pour la première fois en 1998 (de La Coste et al., 1998), sont situées au niveau de l'exon 3 et empêche la phosphorylation, permettant donc la stabilisation, de la β-caténine qui s'accumule et est transloquée dans le noyau. Il a été mis en évidence que les mutations de *CTNNB1* étaient fortement corrélées avec l'expression de la glutamine synthase (GS), faisant de cette enzyme un bon marqueur histochimique des tumeurs présentant une activation de la β-caténine (Audard et al., 2007; Zucman-Rossi et al., 2007).

Il existe également des mutations **perte de fonction de l'*AXIN1*** qui représentent 5 à 15% des CHC (Satoh et al., 2000). L'AXIN 1 fait partie du complexe de dégradation de la β-caténine et constituerait donc un répresseur de la voie. Cependant, contrairement à ce qui était attendu, l'étude comparative de CHC a mis en évidence des différences d'expression des gènes cibles de la β-caténine entre les tumeurs *CTNNB1* mutées et les tumeurs *AXIN1* mutées. On observe notamment une absence d'induction de la GS dans les tumeurs *AXIN1* mutées (Zucman-Rossi et al., 2007). De plus, les différentes classifications transcriptomiques établies pour les CHC confirment ces différences phénotypiques. Les CHC *AXIN1* sont chromosomiquement instables (G1) contrairement aux *CTNNB1* (G5-G6) (Boyault et al., 2007; Hoshida et al., 2009). Enfin, des études réalisées dans des modèles murins semblent appuyer ces observations: Feng *et al.,* en 2012, montrent que l'invalidation hépatospécifique de l'Axin1 n'entraine pas d'augmentation du niveau nucléaire de β-caténine ou de perte de la zonation hépatique contrairement à l'invalidation d'Apc (autre répresseur de la voie) (Feng et al., 2012). L'ensemble de ces données tend à montrer que les tumeurs présentant un gain de fonction de *CTNNB1* ne sont pas équivalentes aux tumeurs mutées pour *AXIN1*.

Enfin, il existe également des altérations **perte de fonction** d'un autre régulateur négatif de la voie : le gène suppresseur de tumeur ***APC***, mais les mutations d'*APC* dans les CHC restent très rares et ne représentent qu'1 à 2% des cas (Totoki et al., 2014).

a. Caractéristiques morphologiques des tumeurs *CTNNB1* mutées

Comme décrit précédemment, les CHC humains présentant des mutations activatrices du gène *CTNNB1* semblent morphotypiquement différents des autres classes de CHC. Ils forment un groupe homogène de tumeurs chromosomiquement stables et rarement associées à

l'infection par HBV. Morphologiquement parlant, ces tumeurs sont larges et présentent une surexpression de la GS. La forte induction de la GS est une caractéristique majeure des CHC *CTNNB1*. L'immunomarquage GS a été généralement décrit comme un bon outil diagnostic pour discriminer les types de CHC (Fig.22C). De plus, ces tumeurs sont généralement d'aspect verdâtre. Cette caractéristique reflète la présence d'une cholestase, c'est-à-dire une accumulation de bile, au sein des tumeurs (Fig.22A). En 2007, Audard *et al.*suggère que cette cette cholestase serait due à une altération de la synthèse et ou du transport de la bile. La cholestase peut également être retrouvée dans les CHC non mutés pour la β-caténine mais cela reste cependant beaucoup plus rare (Audard et al., 2007). D'autre part, les CHC non mutés pour *CTNNB1* présentent souvent une stéatose, c'est-à-dire une accumulation de gouttelettes lipidiques intracellulaires (Fig22B). Cette stéatose n'est jamais retrouvée dans les CHC mutés *CTNNB1*.

Figure 22 : Caractéristiques phénotypiques des CHC
(A) Vue macrocopique d'un CHC présentant une mutation activatrice de *CTNNB1* et un aspect vert dû à une cholestase intratumorale. **(B)** CHC non muté pour *CTNNB1* représentatif de l'aspect généralement blanchâtre de ce type de CHC. **(C)** Immunohistochimie GS montrant une surexpression de cette enzyme dans la tumeur *CTNNB1* mutée (Audard et al., 2007).

Comme mentionné, différents modèles murins de CHC ont été développés afin d'étudier cette pathologie. Il n'existe pas de modèle parfait puisque le CHC est la résultante complexe d'une combinaison d'évènements. Cependant ces modèles ont permis d'élucider un certains nombres de caractéristiques des CHC et représentent un moyen pertinent d'étudier cette pathologie. Il existe différents modèles murins de CHC activés pour la β-caténine, seul le modèle Apc^{KO} sera présenté ici.

b. Le modèle Apc^{KO}

L'*adenomatous polyposis coli* (*APC*) est un gène suppresseur de tumeur dont les mutations sont associées à la polypose adénomateuse familiale, aux cancers colorectaux sporadiques, et moins fréquemment à certains cancers gastriques. APC est impliquée dans

différents processus cellulaires. Elle participe notamment à la régulation du cytosquelette d'actine et du réseau de microtubules (pour revue voir Aoki and Taketo, 2007).

En 1993, il a été observé que la protéine Apc était capable de lier la β-caténine (Rubinfeld et al., 1993). Différentes études ont pu mettre en évidence que les mutations inactivatrices d'*Apc* conduisaient à une accumulation nucléaire de la β-caténine et à une augmentation de son activité transcriptionnelle médiée par TCF/LEF (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997). Il a été mis en évidence qu'Apc régulait négativement la voie Wnt/β-caténine à différents niveaux. D'une part, elle prend part au complexe conduisant à la dégradation protéasomale de la β-caténine. D'autre part, bien qu'Apc soit majoritairement une protéine cytoplasmique, il a été montré qu'elle pouvait également être présente dans le noyau. Elle est alors capable d'exporter la β-caténine du noyau vers le cytoplasme et donc de diminuer le niveau de formation du complexe β-caténine/TCF. De plus, la liaison d'Apc à la β-caténine dans le noyau diminue la liaison de celle-ci à TCF (Neufeld et al., 2000; Rosin-Arbesfeld et al., 2003). Enfin, il a été montré qu'Apc était capable d'interagir et de stimuler l'activité du complexe répresseur sur la transcription induite par β-caténine/TCF (Hamada and Bienz, 2004; Sierra et al., 2006).

En 2004, Colnot *et al.* décrivent un modèle murin dans lequel l'inactivation de la protéine Apc dans quelques hépatocytes conduit à l'émergence de CHC présentant une activation aberrante de la β-caténine. Bien que les mutations d'*APC* soient rares dans les CHC humains, les études menées sur le modèle CHC-Apc^{KO} ont mis en évidence dans les CHC murins des propriétés histomorphologiques et moléculaires similaires à celles observées dans les CHC humains mutés pour *CTNNB1* (Audard et al., 2007; Colnot et al., 2004). De même, l'invalidation d'Apc dans tout le lobule hépatique sur une courte période conduit à la mise en place d'un programme génique comparable au programme oncogénique observé dans les CHC humains mutés *CTNNB1* (Gougelet et al., 2014). L'ensemble de ces données a permis de démontrer que les souris Apc^{KOliv} et CHC-Apc^{KO} constituaient des modèles pertinents pour l'étude du CHC lié à l'activation de la β-caténine.

V. Métabolisme tumoral

En 2000, Hanahan et Weinberg décrivaient six caractéristiques propres aux cancers. Ces caractéristiques regroupent des capacités distinctes et complémentaires permettant la croissance et la dissémination tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000). En 2011, de nouvelles caractéristiques viennent s'ajouter à leur liste, dont la reprogrammation métabolique (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette reprogrammation métabolique doit permettre de fournir l'énergie nécessaire à la prolifération des cellules tumorales et la synthèse de macromolécules tout en maintenant l'homéostasie énergétique. Près de 80 ans plus tôt, Otto Warburg décrivait déjà un métabolisme particulier dans les cellules tumorales aujourd'hui appelé « effet Warburg ». Il fut longtemps admis que l'effet Warburg était une caractéristique commune à toutes les tumeurs. Cependant, il apparait de plus en plus évident que la reprogrammation métabolique des tumeurs est une caractéristique très hétérogène. La compréhension du métabolisme tumoral est importante d'une part pour la mise en place d'outils diagnostiques mais également pour le développement de nouveaux traitements ciblés.

A. L'effet Warburg

Dans les années 1920, Otto Warburg décrit un métabolisme spécifique aux cellules en prolifération ou tumorales. Il observe que contrairement aux cellules différenciées normales, et même en présence d'oxygène, les cellules tumorales présentent un flux glycolytique très important et le pyruvate produit est alors orienté vers une production de lactate plutôt que vers le cycle de Krebs (Warburg, 1925) (Fig. 23). Ce métabolisme particulier est appelé **glycolyse aérobie** ou **effet Warburg**. Il a ensuite été observé que la **glutamine** était aussi un substrat très fortement utilisé dans les tumeurs présentant un effet Warburg. Dans les années 50, Harry Eagle montrait alors pour la première fois la forte demande en glutamine des cellules proliférantes immortalisées (Eagle, 1955). Depuis, de nombreuses études ont confirmé que des cellules tumorales pouvaient aussi dépendre de la glutamine. Depuis plusieurs années, de nombreuses équipes tentent d'élucider les mécanismes et les raisons entrainant la mise en place de ce métabolisme particulier, et il est apparu depuis, que la reprogrammation métabolique était finalement beaucoup plus complexe que l'image classique « Warburgienne ».

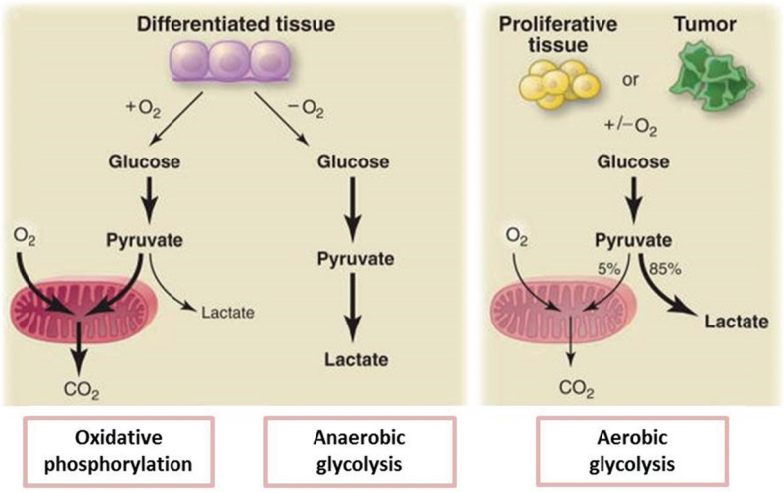


Figure 23 : Schéma représentatif de l'effet Warbug
(Vander Heiden et al., 2009)

B. Reprogrammation métabolique et besoins énergétiques

Il est souvent décrit que les cellules « Warburgiennes » utilisent la glycolyse plutôt que les oxydations phosphorylantes pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP. Warburg expliqua lui-même ce phénotype par un défaut mitochondrial dans les cellules tumorales rendant impossible l'utilisation du métabolisme oxydatif (Warburg, 1956). Cependant, dans les années 20, Herbert Crabtree avait montré que les niveaux de respiration étaient variables d'une tumeur à une autre (Crabtree, 1929). Il a depuis été mis en évidence que de nombreuses tumeurs arborent une activité mitochondriale et une respiration fonctionnelle soulevant alors un certain nombre de questions. Différentes visions concernant la mise en place de cette glycolyse aérobie coexistent. Une étude publiée en 2014 montre notamment que la glycolyse aérobie est une adaptation physiologique rencontrée dans les cellules en prolifération en réponse à un besoin accrue d'énergie (Epstein et al., 2014). Bien que moins efficace que la respiration en terme de production de moles d'ATP/moles de glucose, la glycolyse permet une production d'ATP plus rapide. La glycolyse est donc vue, dans ce contexte, comme un moyen rapide d'obtenir l'énergie nécessaire à la prolifération des cellules tumorales. Cependant, à l'encontre de cette hypothèse, d'autres études ont mis en évidence la faible contribution de la glycolyse à la production d'ATP dans les cellules en prolifération. Finalement, cette contribution est plutôt très hétérogène et très dépendante du contexte cellulaire (Zu and Guppy, 2004). D'autre part, Kilburn *et al.* en 1969 soutenaient que l'ATP n'était pas limitant pour les cellules en prolifération, suggérant que le niveau d'ATP dans une cellule en prolifération n'est pas très différent de celui dans une cellule au repos (Kilburn et al., 1969). Bien que potentiellement non limitant pour la prolifération, l'ATP est néanmoins nécessaire

au maintien des fonctions cellulaires et à de nombreux processus de biosynthèse comme la production de nucléotides ou de lipides. Ainsi, la perte de l'ATP intracellulaire entraine l'apoptose ou la nécrose des cellules (Eguchi et al., 1997).

L'hypoxie est souvent utilisée pour expliquer la synthèse d'ATP à partir de la glycolyse dans les tumeurs. L'utilisation de cette voie ne dépendant pas de la disponibilité en oxygène, elle apporterait un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses. Cependant, le niveau d'oxygène n'est pas limitant pour l'utilisation de la chaine respiratoire. En effet, à des concentrations plus faibles en oxygène elle est certes réduite, mais fonctionne (Chandel et al., 1996). Mais surtout, plusieurs études ont mis en évidence, d'une part que les oxydations phosphorylantes étaient fonctionnelles dans les cellules cancéreuses, d'autre part, qu'elles contribuent à la production d'ATP à des niveaux variables en fonction du type de tumeur et de l'environnement tumoral (Gentric et al., 2016). Par exemple, Guppy *et al*. montrent sur une lignée de cellules de cancer du sein que la respiration contribue à 80% à la production d'ATP. Cette contribution majeure de la respiration à la production d'ATP a également été observée dans d'autres cellules dont des lignées de gliomes et des cellules de carcinomes cervicaux (Guppy et al., 2002). Il a été montré que la glutamine jouait aussi un rôle important dans la production d'ATP par la chaine respiratoire. Sous l'effet de la production préférentielle de lactate à partir du pyruvate produit par glycolyse, le pyruvate n'assure plus la production des intermédiaires du cycle de Krebs. La glutamine devient alors un substrat majeur de cette production d'intermédiaires, appelée anaplérose. Elle entre dans le cycle de Krebs *via* sa transformation en glutamate par la glutaminase, puis en α-cétoglutarate. Dans le cycle de Krebs, elle permet à la fois de synthétiser les différents intermédiaires mais également de produire des équivalents réduits permettant d'alimenter la chaine respiratoire. Les cellules cancéreuses sont donc, en réalité, capables de s'adapter aux besoins énergétiques et aux changements du microenvironnement pour produire de l'ATP. Elles peuvent donc passer d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme glycolytique et inversement (Rodríguez-Enríquez et al., 2010; Rossignol et al., 2004).

Il apparait que certaines cellules tumorales peuvent utiliser à la fois la glycolyse et les oxydations phosphorylantes dans des proportions variables. Au-delà de contribuer à la production d'ATP, les intermédiaires de la glycolyse sont aussi importants pour subvenir aux autres besoins des cellules tumorales. Il apparait donc évident que le glucose et la glutamine jouent aussi un rôle prépondérant dans la synthèse de la biomasse et le maintien de l'équilibre rédox (Fig.24).

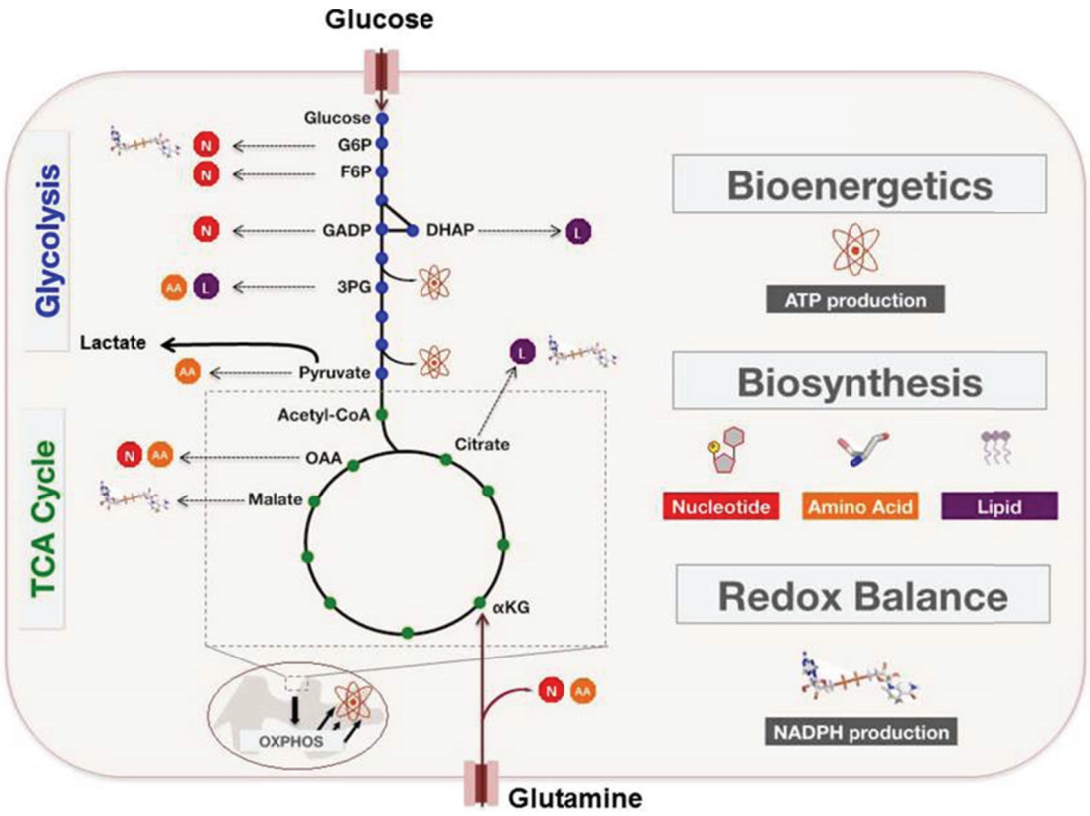


Figure 24 : Utilisation du glucose et de la glutamine par les cellules tumorales
Les cellules tumorales doivent répondre à trois besoins métaboliques différents : énergie, synthèse de macromolécules et maintien de la balance rédox. Les cellules tumorales présentent souvent une utilisation accrue du glucose et de la glutamine qui leurs permet de subvenir à leurs besoins et de proliférer (Cantor and Sabatini, 2012)

C. La biosynthèse

Les cellules en prolifération doivent dupliquer leur contenu afin de donner naissance aux cellules filles. Ainsi, la prolifération cellulaire implique la synthèse de macromolécules dont les trois types les plus souvent étudiés dans le cancer sont les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Les cellules cancéreuses n'augmentent donc pas seulement leur utilisation de nutriments, mais elles modifient également la façon dont elles les utilisent. L'utilisation du glucose et de la glutamine permet de produire les éléments essentiels à la prolifération cellulaire.

a. Acides nucléiques

Les cellules en prolifération ont besoin de synthétiser des nucléotides (purines et pyrimidines) qui s'incorporeront dans l'ADN et l'ARN. La majorité des carbones des purines et des pyrimidines proviennent du 5-phosphoribosyl-α-pyrophosphate (PRPP), issu de la transformation du ribose-5-phosphate (R5P) par la PRPP synthase. Il a été montré que l'activité de cette enzyme était 2 à 10 fois plus importante dans des lymphocytes après

stimulation par un mitogène (Chambers et al., 1974). Cette donnée souligne l'importance de la production de PRPP dans les cellules en prolifération. Trois des intermédiaires de la glycolyse, le fructose-6-phosphate, le glucose-6-phosphate et le glyceraldéhyde-3-phosphate peuvent s'engager dans la voie des pentoses phosphate et entrainer la production de R5P. Ainsi, la glycolyse est une source majeure de carbones pour la biosynthèse des nucléotides. D'autre part, une partie des carbones des pyrimidines provient de l'aspartate qui peut être capté de l'environnement extra-cellulaire ou bien synthétisé à partir de l'oxaloacétate issu du cycle de Krebs. La glutamine servant de précurseur à l'anaplérose du cycle de Krebs dans une grande partie des tumeurs, elle est donc aussi capable de fournir les carbones nécessaires à la synthèse de pyrimidines dans les cellules tumorales. De plus, la glutamine est également un donneur d'azote pour la synthèse des nucléotides. La glutamine fournit donc à la fois des carbones et des azotes pour la synthèse des nucléotides. En 2009, Gaglio *et al.* montrent, dans des lignées fibroblastiques transformées, que la glutamine est nécessaire à la prolifération cellulaire *via* sa contribution à la synthèse d'ADN (Gaglio et al., 2009). D'autre part, en 2015, Tardito *et al.* montrent dans des glioblastomes que la surproduction de glutamine permet aux cellules tumorales de subvenir à la synthèse de nucléotides soulignant d'avantage le rôle important de la glutamine dans la biosynthèse des nucléotides (Tardito et al., 2015).

b. Lipides

Dans les cellules, les lipides sont nécessaires à la synthèse des membranes et à certaines voies de signalisation telles que celles médiées par des récepteurs nucléaires ou des dérivés de l'acide arachidonique. La synthèse *de novo* d'acides gras est souvent retrouvée activée dans les cellules en prolifération et les cellules cancéreuses. Notamment, une augmentation de l'expression de certaines enzymes comme la fatty acid synthase (FAS) est souvent observée (Gansler et al., 1997; Swinnen et al., 2002). Il a été montré que l'activité de ces enzymes était impliquée dans la croissance tumorale. Ainsi, une inhibition de la FAS ou de l'ATP citrate lyase (ACLY), deux enzymes de la lipogenèse, altère la croissance tumorale en diminuant la prolifération et/ou en induisant l'apoptose (Hatzivassiliou et al., 2005; Kridel et al., 2004; Lin et al., 2016b). La glycolyse intervient dans la synthèse *de novo* d'acides gras de différentes façons (cf. Introduction, chapitre I). D'une part, le glycérol-3-phosphate, essentiel à la synthèse des glycérolipides, est produit à partir de dihydroxyacétone, un intermédiaire de la glycolyse, d'autre part, la glycolyse permet de produire du pyruvate qui peut être transformé en acétyl-CoA et engendrer du citrate. Ce citrate, pris en charge par l'ACLY, est un précurseur des acides gras. Cependant, dans un certain nombre de cancers, le

pyruvate issu de la glycolyse est orienté préférentiellement vers le lactate plutôt que vers l'acétyl-CoA. Dans ce cas, le glucose participe donc moins à la lipogenèse. Il a été montré que la glutamine jouait alors un rôle important dans la lipogenèse des cellules tumorales en permettant la production de citrate par le cycle de Krebs en condition hypoxique (Metallo et al., 2012; Wise et al., 2011). La glutamine et le glucose permettent ainsi de maintenir la production des précurseurs de la lipogenèse dans des cellules tumorales utilisant l'effet Warburg.

D. Equilibre oxydo-réducteur

L'équilibre oxydo-réducteur (ou équilibre rédox) peut être définie comme l'équilibre entre la production et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO sont produits notamment dans la mitochondrie par les complexes I et III de la chaine respiratoire et de façon proportionnelle à l'activité de cette chaine. En condition physiologique, ces ERO sont produits en faible quantité et servent de molécules de signalisation à la cellule notamment en contrôlant positivement la prolifération cellulaire et l'adaptation au stress métabolique. Une augmentation du niveau des ERO peut entrainer, entre autre, des dommages à l'ADN et des mutations dans des oncogènes et des gène suppresseurs de tumeurs induisant ainsi la tumorigenèse (Caputo et al., 2012). Cependant, bien qu'ils puissent être pro-tumorigénique, un niveau trop important de ces ERO dans les cellules tumorales peut également être délétère pour elles et endommager leurs macromolécules ou induire leur mort. Afin de survivre, la cellule tumorale met donc en place des mécanismes lui permettant de maintenir son équilibre rédox (Fig.25). L'un de ces mécanismes passe par l'activation du facteur de transcription NRF2. NRF2 joue un rôle important dans la détoxification des ERO et le maintien de l'équilibre rédox. Son activation entraine l'induction de plusieurs enzymes du système antioxydant telles que les thioredoxines, les peroxiredoxines ou les enzymes de synthèse du glutathion. D'autre part, le NADPH est un cofacteur primordial de nombreuses enzymes du système antioxydant, la production d'un niveau suffisant de NADPH est donc nécessaire au maintien de l'homéostasie rédox. Il a été montré que NRF2 contrôlait certaines voies, comme la voie des sérines, capables de produire le NAPDH. Des oncogènes comme KRAS et Myc, par exemple, sont capables d'induire l'activation de NRF2 et donc l'augmentation du système de détoxification (DeNicola et al., 2011). Comme décrit, le NADPH joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'équilibre rédox, une déprivation en NADPH entrainant ainsi la mort cellulaire. Il existe dans le cytoplasme plusieurs moyens de

produire du NADPH dont la voie des pentoses phosphate et le « métabolisme à un carbone » qui permettent de synthétiser notamment la sérine. Les changements métaboliques induits par les oncogènes et le microenvironnement dans les cellules tumorales permettent directement de maintenir le niveau de NADPH. En, effet, il a été montré que de très nombreuses tumeurs exprimaient une isoforme particulière de la pyruvate kinase, la pyruvate kinase M2 tumorale (PKM2). Cette enzyme de la glycolyse catalyse la réaction de transformation du phosphoenolpyruvate (PEP) en pyruvate en générant une molécule d'ATP. Contrairement aux isoformes habituellement exprimées dans les cellules, telle que la L-PK dans le foie, la PKM2 a une plus faible activité, elle permet ainsi l'accumulation des intermédiaires situés en amont du PEP et l'orientation des carbones du glucose vers la voie des pentoses phosphate. Ainsi, l'augmentation du flux dans cette voie permet de générer du NADPH *via* la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) (Mazurek et al., 2005). Il a également été montré que d'autres voies de synthèse du NADPH étaient induites dans les tumeurs. En 2007, DeBerardinis *et al.* montrent dans des glioblastomes que l'addiction à la glutamine va au-delà d'un besoin de produire des nucléotides et des protéines puisqu'elle permet la synthèse des intermédiaires du cycle de Krebs et est le précurseur d'une grande partie du lactate produit par la cellule tumorale (DeBerardinis et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence l'importance de la glutamine dans la production de NADPH. En effet, les glioblastomes utilisent la glutamine pour synthétiser du malate qui sera ensuite pris en charge par l'enzyme malique et converti en pyruvate puis en lactate. La réaction assurée par l'enzyme malique permet alors de produire du NADPH. L'importance de cette voie dans le maintien du statut rédox a également été mis en évidence plus tard dans les cancers pancréatiques (Son et al., 2013). Cependant, toutes les cellules tumorales n'utilisent pas la glutamine dans un but anaplérotique. Il existe donc d'autres façons pour les cellules tumorales de produire du NADPH, parmi lesquelles la réaction assurée par les IDH. Il a été montré que ces enzymes, qui produisent du NADPH en assurant la transformation de l'isocitrate en α-cétoglutarate, jouent un rôle important dans la défense contre les dommages du stress oxydant (Lee et al., 2002).

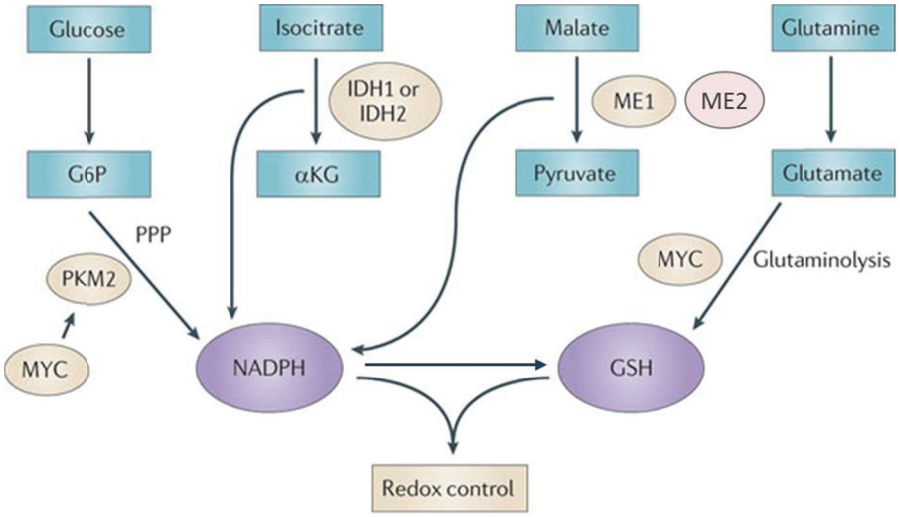


Figure 25 : Mécanismes de contrôle de l'état rédox dans les cellules tumorales
(Cairns et al., 2011)

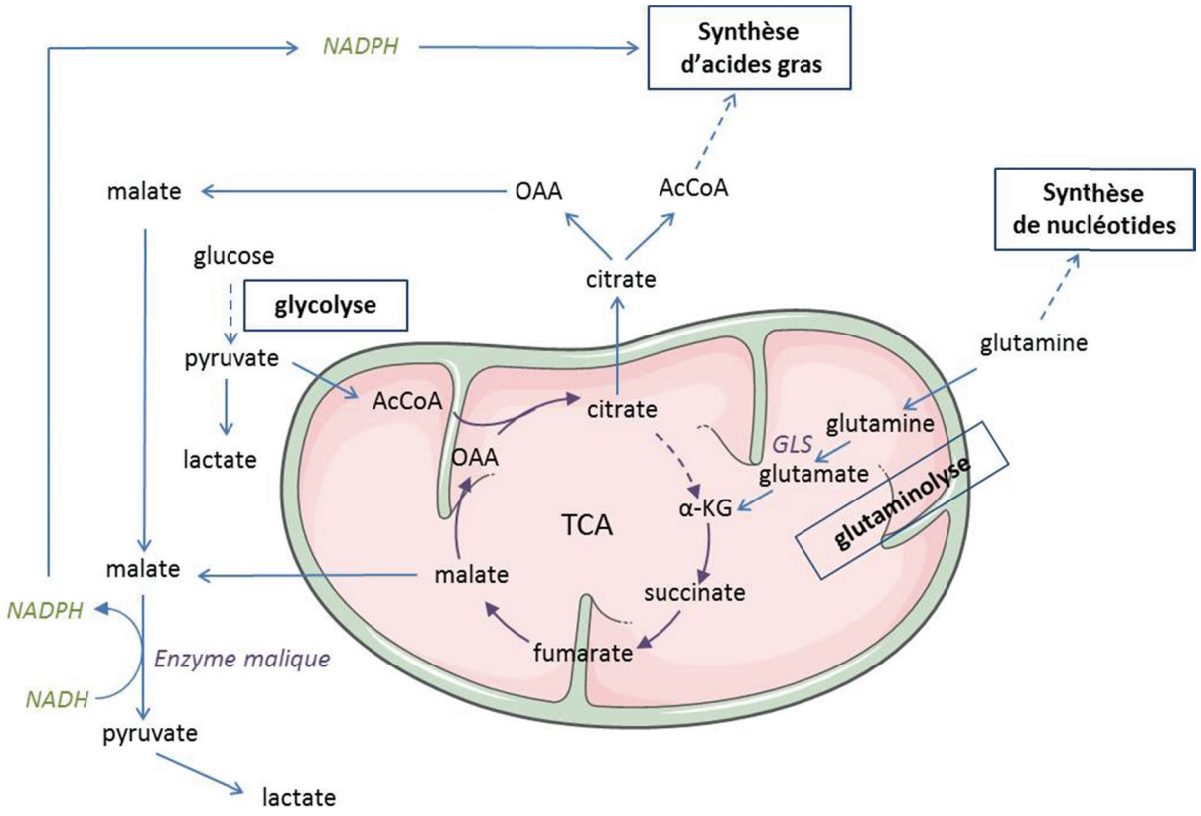


Figure 26 : Schéma récapitulatif des voies métaboliques principalement altérées par la reprogrammation métabolique des cancers « Warburgiens »

E. La reprogrammation métabolique : une caractéristique très hétérogène

Bien que la glycolyse aérobie et la dépendance à la glutamine aient été observées dans de nombreuses tumeurs, il devient de plus en plus évident qu'il n'existe pas un phénotype métabolique que l'on puisse généraliser à tous les cancers. Il est apparu en effet depuis plusieurs années qu'il existe une certaine hétérogénéité au sein des tumeurs. Bien que la reprogrammation métabolique soit caractéristique des cellules tumorales, elle peut, comme nous allons le voir, prendre différentes formes, et les substrats utilisés pour la synthèse des macromolécules et la production d'énergie peuvent varier.

La dépendance à la glutamine est donc très souvent retrouvée dans les tumeurs. Il a été montré qu'en cas de pénurie de glutamine dans le milieu extracellulaire, certaines cellules tumorales ne survivaient pas. Il a également été mis en évidence que l' inhibition de la glutaminase (catalysant la première étape de l'anaplérose liée à la glutamine) pouvait entrainer la mort des cellules cancéreuses mettant en évidence l'importance de la glutamine dans l'anaplérose du cycle de Krebs dans ces contextes (Wang et al., 2010; Wise et al., 2008). Cependant, en 2015, Tartdito *et al.* montrent dans certains types de glioblastomes que l'inhibition de la glutaminase n'entraine pas l'arrêt de la prolifération ou la mort des cellules tumorales (Tardito et al., 2015). Ils mettent ainsi en évidence que l'addiction à la glutamine dans ces tumeurs est indépendante de sa capacité à re-synthétiser les intermédiaires du cycle de Krebs. De façon intéressante, ils montrent que ces cancers sont capables de survivre et de proliférer en absence de glutamine exogène. Ces tumeurs sur-expriment en réalité la glutamine synthase (GS), qui permet la conversion du glutamate en glutamine. Elles sont donc capables de subvenir elles-mêmes à leurs besoins en glutamine sans apport extérieur de cet acide-aminé. Un phénotype équivalent avait déjà été observé dans certains sous-types de cancer du sein (Kung et al., 2011). Dans ces deux études, les auteurs montrent que d'autres classes de glioblastomes et d'autres cancers du sein sont eux largement dépendant de la glutamine extracellulaire, soulignant l'hétérogénéité pouvant exister entre les tumeurs. D'autre part, dans les contextes décrits, la glutamine ne peut pas réapprovisionner le cycle de Krebs, suggérant donc la mise en place d'un autre mécanisme pour l'anaplérose du cycle de Krebs. Des travaux menés sur des glioblastomes ont mis en évidence que lorsque les cellules cancéreuses ne sont pas capables d'utiliser la glutamine pour la synthèse des intermédiaires du cycle de Krebs, un mécanisme compensatoire est mis en place (Cheng et al., 2011).

Cette étude et d'autres ont montré que le glucose par exemple était capable de subvenir à l'anaplérose du cycle de Krebs *via* une augmentation de l'activité de la **pyruvate**

carboxylase (PC), l'enzyme de synthèse de l'oxaloacétate à partir du pyruvate. Il a été montré que l'inhibition de cette enzymeentrainait l'arrêt de la prolifération des glioblastomes, de certains cancers pulmonaires et de cancers du sein, suggérant un potentiel rôle de cette enzyme dans le maintien du cycle de Krebs (Cheng et al., 2011; Phannasil et al., 2017; Sellers et al., 2015). D'autres travaux ont mis évidence l'utilisation directe de l'acétate pour la production d'acétyl-CoA. L'acétate peut-être converti en acétyl-CoA grâce à une ACS, l'acétyl-CoA synthase (ACSS). Deux études publiées en 2014 montrent que certains cancers présentent une forte expression de cette enzyme (Comerford et al., 2014; Mashimo et al., 2014). De plus, l'inhibition de cette enzyme entraine un défaut de tumorigenèse dans les modèles murins utilisés dans ces travaux, suggérant une forte dépendance à l'acétate de certaines tumeurs. Ils montrent également que l'acétate utilisé peut être oxydé dans le cycle de Krebs mais aussi permettre de synthétiser du glutamate, montrant ainsi le rôle de l'acétate dans l'anaplérose du cycle de Krebs. De plus, l'acétyl-CoA produit à partir de l'acétate sert également à la synthèse *de novo* d'acides gras (Comerford et al., 2014; Mashimo et al., 2014; Schug et al., 2015).

Bien que la synthèse *de novo* de lipides soit souvent observée dans les tumeurs, il a été montré que l'**oxydation des acides gras** peut être utilisée comme source additionnelle ou alternative d'énergie dans certains cancers. L'augmentation de l'oxydation des acides gras a notamment été mise en évidence dans certains sous types de cancer du sein triple-négatifs, dans des leucémies mais également dans des tumeurs du poumon et dans des gliomes (Lin et al., 2016a; Park et al., 2016; Rodríguez-Enríquez et al., 2015; Samudio et al., 2010). Certaines de ces études ont montré que l'inhibition de la β-oxydation entrainait un arrêt de la prolifération et/ou induisait l'apoptose des cellules tumorales mettant en avant le rôle important de la β-oxydation dans la respiration et la production d'ATP de ces cellules (Camarda et al., 2016; Lin et al., 2016a).

F. Reprogrammation métabolique et mutations génétiques

La reprogrammation métabolique observée dans les tumeurs est liée à des altérations génétiques. Ces altérations peuvent, comme nous allons le voir, toucher directement des enzymes du métabolisme ou alors toucher des voies oncogéniques capable d'influencer le métabolisme.

a. Mutations d'enzymes du métabolisme

Des mutations au niveau des enzymes du cycle de Krebs ont été retrouvées dans des cancers. La succinate déshydrogénase (SDH) et la fumarate hydratase (FH) sont perdues entre autre dans des paragangliomes et des phéocromacytomes (Astuti et al., 2001; Tomlinson et al., 2002) (Fig.27). Ces deux enzymes sont responsables respectivement de la transformation du succinate en fumarate, et du fumarate en malate. La perte de ces enzymes induit une accumulation de succinate et de fumarate aux propriétés pro-oncogéniques. En effet, l'augmentation des niveaux de succinate ou de fumarate induit une inhibition des dioxygénases ou des prolyl hydrolases responsables de la dégradation des protéines HIF. Dans ces conditions, HIF est stabilisée et induit la mise en place d'un programme pro-oncogénique. De plus, l'inhibition des dioxygénases entraine également une augmentation de la méthylation de l'ADN et donc des modifications épigénétiques (Fig. 27). Plus récemment, les outils de séquençage ont permis de faire le lien entre les mutations de l'isocitrate déshydrogénase (IDH), enzyme du cycle de Krebs, et la tumorigenès. Les mutations des IDH1 et 2 ont été identifiées notamment dans des gliomes, des cholangiocarcinomes ou encore dans des leucémies myéloïdes aigües (Borger et al., 2012; Cohen et al., 2013; Paschka et al., 2010). L'IDH est responsable de la réaction produisant de l'α-cétoglutarate à partir de l'isocitrate. Des mutations d'IDH induisent une modification de ses fonctions enzymatiques : l'IDH mutée produit alors préférentiellement à partir de l'isocitrate le 2-hydroxyglutarate (2-HG), au lieu de l'α-cétoglutarate. Ce métabolite agit alors comme un inhibiteur compétitif des dioxygénases dépendantes de l'α-cétoglutarate et induit des modifications épigénétiques dont des hyperméthylations de l'ADN (Figueroa et al., 2010; Xu et al., 2011) (fig. 27). Un oncométabolite peut être défini comme un métabolite dont l'accumulation dans une tumeur est clairement liée à une mutation spécifique ou directement impliqué dans le développement de la malignité (DeBerardinis and Chandel, 2016). A ce titre, le succinate, le fumarate et le 2-HG sont donc considérés comme des oncométabolites.

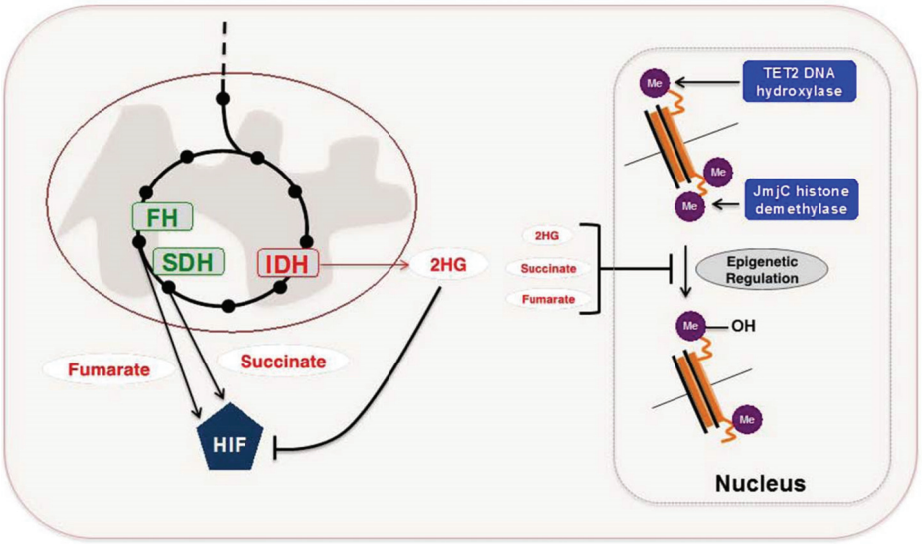


Figure 27 : Les enzymes du métabolisme en tant qu'oncogènes
(Cantor and Sabatini, 2012)

b. Rôle des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs dans la reprogrammation métabolique

Même dans un environnement riche en nutriments, les cellules normales n'importent pas ces nutriments de manière constitutive. En réalité, le métabolisme des cellules est finement régulé par les stimuli extracellulaires comme des signaux hormonaux ou des facteurs de croissance par exemple. Durant la dernière décennie, de nombreuses équipes se sont intéressées aux raisons de la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses. A l'inverse des cellules normales, les cellules cancéreuses accumulent des mutations génétiques leur conférant un certain degré d'indépendance face aux stimuli extérieurs. Ainsi, la reprogrammation métabolique peut être considérée comme une caractéristique inhérente à l'activation d'oncogènes ou de la perte de suppresseurs de tumeurs (Fig.28). Nombre de ces oncogènes ont en effet pour cibles des voies de signalisation contrôlant le métabolisme. C'est le cas par exemple de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) et de son régulateur négatif la phosphatase and tensin homolog (PTEN). La voie PI3K/Akt est impliquée dans la régulation de différents processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, le trafic vésiculaire ou encore le métabolisme glucidolipidique. Les mutations oncogéniques touchant la voie PI3K/Akt augmentent l'activité de cette voie de signalisation aboutissant à une prolifération des cellules cancéreuses indépendante des facteurs de croissance, à de l'invasion cellulaire et à l'apparition de métastases. Les mutations activatrices de PI3K et les mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur PTEN entrainent l'activation des protéines Akt et HIF-1. L'activation de ces deux protéines induit une très forte augmentation de l'utilisation du

glucose par la cellule, notamment en potentialisant les effets des hexokinases et de la phosphofructokinase (deux enzymes clefs de la glycolyse), et en induisant l'expression et la translocation à la membrane du transporteur de forte affinité du glucose GLUT1 (Barthel et al., 1999; Deprez et al., 1997; Gottlob et al., 2001; Wieman et al., 2007). D'autres oncogènes ont également été décrit comme régulant directement le transport et/ou l'utilisation du glucose, c'est le cas par exemple de Ras qui induit la voie des MAPK et l'accumulation de Myc, entrainant le phénotype métabolique observé dans certains cancers pancréatiques notamment (Vizan et al., 2005; Ying et al., 2012).

La perte de gènes suppresseurs de tumeurs entraine également une modification du métabolisme tumoral. Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est un gène impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN, l'apoptose ou encore la sénescence. La perte de ce gène entraine un défaut dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose et est très souvent retrouvée dans le cancer. Il a été montré que la perte de p53 entrainait une augmentation de la glycolyse au détriment du métabolisme oxydatif (pour revue voir Lacroix et al., 2013). En effet, p53 contrôle positivement l'expression de TIGAR, enzyme régulant le niveau d'un activateur glycolytique, le fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) (pour revue voir Lacroix et al., 2013). Ainsi, la perte de p53 permet de lever l'inhibition exercée par TIGAR (TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator) sur le F2,6BP et d'activer la glycolyse (Bensaad et al. 2006). De plus, p53 est également capable d'activer PTEN (inhibiteur de la voie PI3K/Akt). La perte de p53 induit donc la voie PI3K/Akt, qui comme nous l'avons vu précédemment contrôle positivement le métabolisme glycolytique (Stambolic et al., 2001). En 2012, Yuneva *et al.* renforcent l'idée d'un métabolisme tumoral fortement influencé par les oncogènes. Ils mettent en évidence dans des modèles murins de carcinomes hépatocellulaires que des mutations du gène MYC ou du gène MET entrainent des phénotypes métaboliques très différents. Les CHC murins mutés pour MYC présentent des niveaux importants de glycolyse et de glutaminolyse alors que les CHC mutés pour MET ne présentent de glutaminolyse et produisent de grandes quantités de glutamine (Yuneva et al., 2012). De façon intéressante, cette étude montre également que des cancers du poumon mutés pour MYC, au contraire des cancers hépatiques, présentent à la fois une forte expression de la glutamine synthase et de la glutaminase 1, et accumulent de la glutamine. D'autre part, il a été montré que la forte expression de MYC dans des cancers triple négatif du sein était corrélé avec une utilisation accrue des acides gras (Camarda et al., 2016). Ainsi, la reprogrammation

métabolique observée dans une tumeur dépend en effet des mutations géniques qu'elle arbore mais également du tissu dans lequel elle se développe.

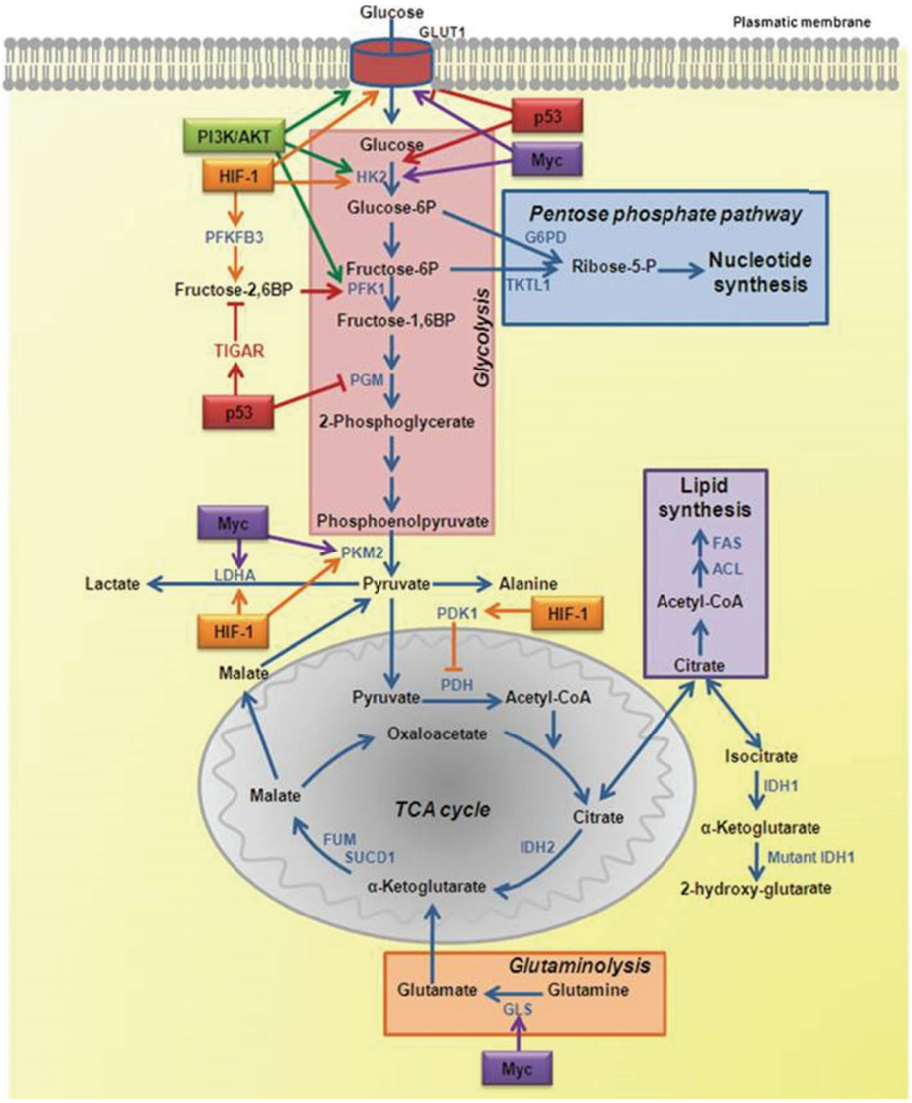


Figure 28 : Régulation du métabolisme par les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur
(Marie and Shinjo, 2011)

G. Métabolisme tumoral et microenvironnement

Les altérations géniques ne déterminent pas seules le phénotype métabolique des tumeurs. Le microenvironnement tumoral joue également un rôle important dans la mise en place de la reprogrammation métabolique des tumeurs. La réponse tumorale à l'hypoxie est un exemple très souvent cité pour expliquer cette notion. L'hypoxie est un phénomène relativement fréquent dans les cancers et est souvent corrélé avec un phénotype très agressif (Tatum et al., 2006). En conditions hypoxiques, différents mécanismes sont mis en place dont

la stabilisation du facteur de transcription HIF entrainant, comme nous l'avons vu précédemment, une augmentation du métabolisme glycolytique au détriment de l'OXPHOS. Les cellules tumorales sont en réalité capables d'influer sur leur microenvironnement pour permettre leur croissance et leur dissémination. Différentes stratégies utilisées par les cellules tumorales ont déjà été élucidées. Dans le cas de l'effet Warburg par exemple, il a été montré que la surproduction de lactate par les cellules tumorales entrainait notamment la stabilisation de HIF1α ainsi que du facteur VEGF favorisant l'angiogenèse (Constant et al., 2000; Sonveaux et al., 2012). De plus, le lactate inhibe localement l'action du système immunitaire, notamment en attenuant l'activation des cellules dendritiques et des cellules T, favorisant ainsi l'invasion tumorale (Colegio et al., 2014; Fischer et al., 2007; Goetze et al., 2011). La sécrétion du lactate dans le milieu extracellulaire par les monocarboxylate transporters (MCT) est couplée au transport d'un proton H^+. Ainsi, la sécrétion de lactate induit également une acidification du milieu environnant. Cette acidification locale entraine une augmentation de l'activité protéolytique des métalloprotéases de la matrice (MMPs) et par conséquent une dégradation de la matrice extracellulaire favorisant l'invasion tumorale (Martínez-Zaguilán et al., 1996). Il existe en réalité une sorte de symbiose entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, décrit comme un modèle de métabolisme tumoral à deux compartiments. Cette symbiose se caractérise par l'utilisation par les cellules tumorales des produits du métabolisme des cellules saines adjacentes. Le « reverse Warburg » est un exemple de cette symbiose. Pour la première fois en 2009, Pavlides *et al.* décrivent ce phénomène dans lequel les cellules fibroblastiques du microenvironnement tumoral produisent de grande quantité de lactate *via* la glycolyse aérobie. Ce lactate est capté par les cellules endothéliales tumorales et une fois transformé en pyruvate, est utilisé dans le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP *via* l'OXPHOS (Pavlides et al., 2009) (Fig.29). Cette symbiose ne se limite pas au « reverse Warburg », d'autres phénotypes existent. Dans le cas des cancers ovariens par exemple, il a été décrit que les tumeurs métastasent très souvent dans l'omentum, organe de l'abdomen principalement constitué d'adipocytes. En 2011, Nieman *et al.* proposent un explication à ce phénomène en montrant que les cellules tumorales sont capables de capter et d'utiliser les acides gras fournis par l'environnement riche en adipocytes pour se fournir en énergie et croître (Nieman et al., 2011). De plus, il a été montré dans des glioblastomes que les cellules tumorales incapables de produire de la glutamine *via* la glutamine synthase étaient capables d'utiliser la glutamine produite abondamment par les astrocytes du microenvironnement (Tardito et al., 2015).

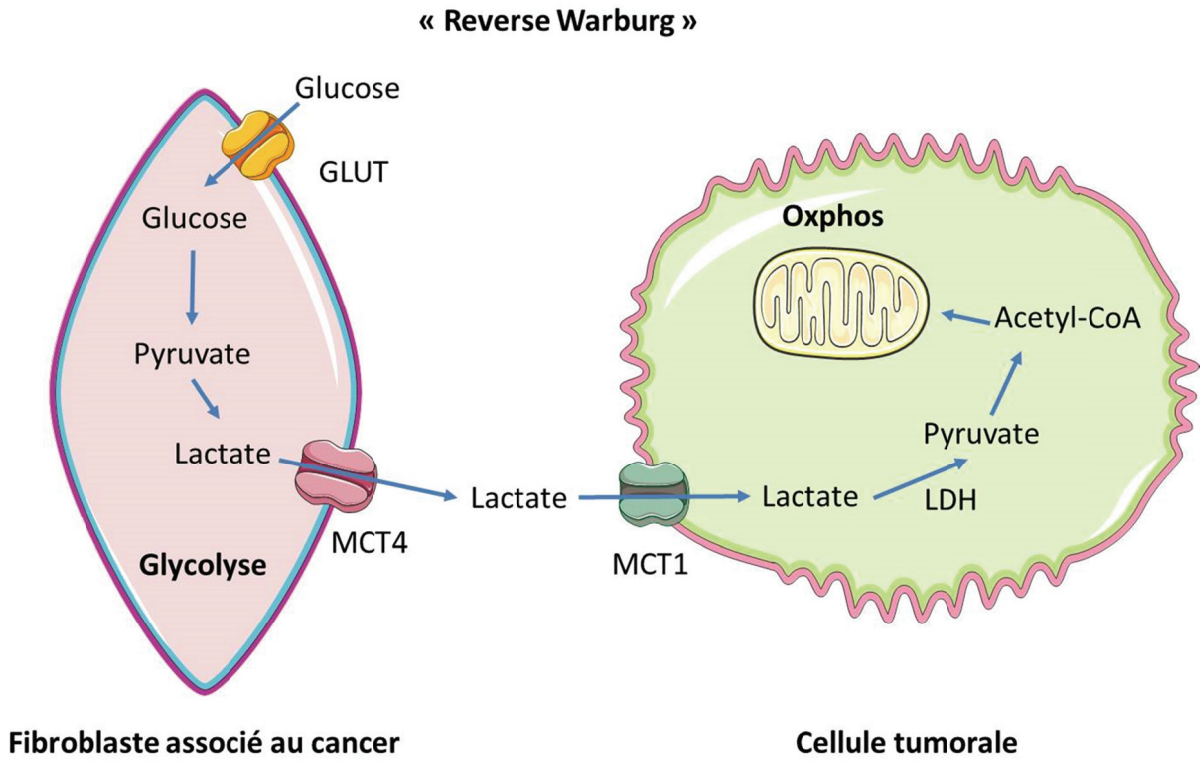


Figure 29 : Schéma représentatif du « reverse Warburg »

H. Le métabolisme comme outil diagnostique

Le développement de méthodes diagnostiques fiables est un enjeu majeur de la recherche en cancérologie. La tomographie par émission de positrons (appelée PET pour « positron emission tomography ») est une méthode d'imagerie non-invasive utilisée en clinique afin de détecter les tumeurs. Elle est basée sur l'utilisation de traceurs radiomarqués, injectés au patient à des concentrations faibles, et permettant une reconstruction tridimensionnelle montrant la localisation et la concentration du traceur d'intérêt. Ce traceur est constitué d'un atome radioactif (le plus souvent Carbone 11, Fluor 18, Azote 13 etc…) attaché à une sonde moléculaire visant une voie métabolique spécifique. Cette méthode d'imagerie est donc en grande partie basée sur les propriétés de reprogrammation métabolique des tumeurs. Elle permet notamment de fournir une image précise des changements métaboliques au sein des tumeurs et donc de visualiser les changements précoces induits par les traitements anti-cancéreux (Dose Schwarz et al., 2005). Bien que permettant d'obtenir des renseignements fonctionnels, l'imagerie PET ne donne cependant pas d'information anatomique précise, c'est pourquoi elle est souvent associée à de la tomodensimétrie (CT pour « computationized tomography ») qui permet d'obtenir ces informations.

Le radioisotope le plus utilisé en PET-scan est le ^{18}Fluorodéoxyglucose (^{18}FDG). Cette molécule analogue du glucose est captée par les cellules puis phosphorylée par une hexokinase. Le FDG phosphorylé n'est ensuite pas métabolisable et s'accumule. Ce traceur est utilisé pour la première fois dans les années 80 pour étudier des tumeurs dans un travail mettant en évidence une corrélation positive entre le captage du ^{18}FDG et le degré de malignité de tumeurs cérébrales (Alavi et al., 1988; Di Chiro et al., 1982). Plus tard, son utilisation a été étendue au corps entier. Aujourd'hui, basée sur l'effet Warburg décrit précédemment et donc l'utilisation accrue de glucose par un grand nombre de tumeur, le ^{18}FDG PET-scan/CT représente la grande majorité des applications de PET-scan utilisées en clinique.

Le ^{18}FDG PET-scan permet de détecter de nombreuses tumeurs et a été utilisée chez de nombreux patients pour suivre leur réponse aux traitements : un changement dans le métabolisme glycolytique reflétant une réponse positive au traitement et une absence de changement, une résistance à la thérapie. Cependant, il existe un certain nombre de limitations dans l'utilisation du ^{18}FDG PET-scan parmi lesquelles : 1) une infection ou une inflammation entraine une augmentation de l'activité glycolytique dans certaines cellules, comme les granulocytes, menant à l'apparition de faux positifs (Bakheet et al., 2000; Min and Amlani, 2014; Weisdorf et al., 1982) ; 2) comme décrit précédemment, il existe des tumeurs ne présentant pas d'utilisation accrue du glucose et donc non détectables par cette méthode, 3) certaines régions saines du corps, comme les tissus lymphoïdes ou le cortex cérébral accumulent naturellement le ^{18}FDG. Il est donc devenu nécessaire de développer de nouveaux radiotraceurs capables de pallier ces limitations et surtout d'explorer d'autres voies métaboliques.

Au-delà de l'effet Warburg, l'étude du métabolisme tumoral a permis de mettre en évidence un certain nombre de voies métaboliques altérées dans les cancers. De ces observations a découlé le développement de différents radiotraceurs utilisables en imagerie PET.

La **choline** est un précurseur des phosphatidylcholines (PC), phospholipides constituant des membranes, important pour la stabilité et la croissance cellulaire. Il a été montré que le transport et l'utilisation de la choline étaient augmentés dans un certain nombre de transformations malignes (Macara, 1989; Narayan et al., 1991; Ronen et al., 1991). Ainsi, différents radiotraceurs dérivés de la choline ont été développés pour être utilisés lorsque le ^{18}FDG PET-scan ne peut pas donner de résultats probants. Le cancer de la prostate fait partie des cancers difficilement détectables en ^{18}FDG PET-scan. La prostate étant située dans la

même zone du corps que la vessie et l'urètre, l'excrétion du ^{18}FDG dans l'urine entraine une accumulation de radioactivité dans ces organes et dissimule les potentielles zones de fortes utilisations du glucose de la prostate. En 1998, Hara *et al.* mettent au point l'utilisation du ^{11}C-choline PET-scan pour l'imagerie des cancers prostatiques. La choline présentant peu d'excrétion dans l'urine, elle a alors présenté une très bonne alternative à l'utilisation du ^{18}FDG PET-scan (Hara et al., 1998). Cette molécule et d'autres dérivés choliniques (comme le ^{18}Furorocholine) ont depuis été utilisés dans la détection de nombreuses tumeurs notamment du rein, de l'œsophage, du cerveau et du poumon.

D'autres molécules impliquées elles aussi dans le métabolisme des acides gras ont été développées. L'**acétate** est utilisé par les tumeurs notamment pour la synthèse *de novo* d'acides gras. Le ^{11}C acétate PET-scan a d'abord été utilisé dans les années 80 dans l'analyse des fonctions du myocarde (Brown et al., 1987). Plusieurs années plus tard, la capacité des tumeurs à utiliser l'acétate pour produire des acides gras a amené à l'utilisation de cette technique dans la détection de cancers tels que des cancers de la prostate, des CHC, des cancers rénaux ou encore cérébraux (Grassi et al., 2012). Il a également été montré que cette méthode présentait un intérêt dans le suivi de la réponse à la radiothérapie dans des cancers prostatiques (Gomez et al., 2012).

Comme décrit précédemment, il existe également des tumeurs capables d'utiliser les acides gras dans la β-oxydation. Différentes équipes ont tenté de mettre au point des molécules utilisables en PET-scan pour détecter le captage et l'oxydation des acides gras. Au début des années 90, une nouvelle molécule est synthétisée, le 14(R,S)-[18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid (FTHA). Cette sonde est dans un premier temps décrite et utilisée pour évaluer la capacité oxydative du myocarde (DeGrado et al., 1991). Au début des années 2000, d'autres travaux portant également sur le myocarde et utilisant cette molécule sont publiés. Il apparait alors difficile de distinguer la part jouée part l'oxydation *versus* le captage des acides gras dans le signal émis (Ci et al., 2006; Takala et al., 2002). D'autres sondes utiles pour la détection de la β-oxydation ont été développées, elles comprennent des dérivées palmitiques et oléiques. Elles n'ont cependant jamais encore été utilisées pour l'étude du métabolisme tumoral. De plus, il est encore une fois difficile de distinguer les différentes voies métaboliques, il serait alors intéressant de coupler l'utilisation de ces radiotraceurs avec un inhibiteur du complexe CPT par exemple afin d'évaluer la part jouer par l'estérification (Cai et al., 2016; Li et al., 2015; Mather et al., 2016; Wyns et al., 1989). Très récemment, une nouvelle molécule a été développée, il s'agit du 3-18F-fluoro-2,2-dimethylpropionic acid. Cette sonde, permettant la détection des premières étapes de la β-oxydation des acides gras, a

été utilisée et validée pour la détection de cancer du sein notamment et semble prometteuse bien que d'autres études approfondies soient nécessaires (Witney et al., 2014).

Enfin, les **acides aminés** (AA) jouent également un rôle important dans diverses voies métaboliques au cours de la prolifération cellulaire. Un certain nombre d'amino-acides radiomarqués et utilisables de PET-scan ont ainsi été développés (Jager et al., 2001). Cette méthode permet d'évaluer notamment l'expression des transporteurs des différents acides aminés comme LAT1 (large amino transporter) dont l'expression est augmentée dans certains cancers (Barollo et al., 2016; Li et al., 2016; Ohshima et al., 2016). Le ^{18}Fluoroglutamine et le ^{18}Fluoropropylglutamine ont par exemple été utilisés pour évaluer l'expression de l'ASCT2 (amino-acid transporter 2), impliqué dans le transport de la glutamine, et la glutaminolyse dans des tumeurs du poumons, colon, ou encore des gliomes (Hassanein et al., 2016; Lieberman et al., 2011; Schulte et al., 2016; Venneti et al., 2015). L'utilisation des AA en imagerie PET-scan permet notamment d'obtenir un meilleur contraste entre la tumeur et le tissu sain environnant que le ^{18}FDG.

I. Le métabolisme comme cible thérapeutique

La reprogrammation métabolique permet aux cellules cancéreuses de subvenir à leurs besoins en énergie et en précurseurs pour la synthèse de la biomasse tout en maintenant un statut redox compatible avec la survie cellulaire. La perturbation du métabolisme tumoral par l'utilisation de drogues pourrait permettre de couper les ressources nécessaires à la prolifération et à la dissémination des cellules cancéreuses. A ce titre, la reprogrammation métabolique est apparue comme une cible intéressante dans le traitement du cancer. Néanmoins, le développement et l'utilisation de molécules ciblant le métabolisme des tumeurs nécessite de prendre en compte différentes considérations.

Les enzymes du métabolisme ciblées dans les tumeurs remplissent des fonctions physiologiques dans les tissus sains, ainsi l'utilisation de molécules dirigées contre ces enzymes se révèle bien souvent toxique pour les tissus sains. De plus, certaines cellules comme les cellules immunitaires, modifient leur métabolisme de manière similaire aux cellules cancéreuses (Pearce et al., 2013). L'utilisation de drogues ciblant le métabolisme nécessite donc une certaine tolérance systémique et peu ou pas d'interférence avec le système immunitaire. Cependant, l'utilisation de certaines drogues a permis de montrer qu'il existait une fenêtre thérapeutique dans le ciblage du métabolisme tumoral. C'est le cas par exemple des antifolates qui ciblent la synthèse de nucléotides et d'ADN (bien souvent augmentée dans

les cellules tumorales). Bien que les antifolates, comme la methotrexate par exemple, présentent une certaine toxicité vis-à-vis des tissus prolifératifs normaux, ils ont néanmoins montré de très bons résultats sur des lymphomes, des leucémies et des cancers du poumon entre autres (Visentin et al., 2012). Ils sont aujourd'hui couramment utilisés en thérapeutique et ont donné lieu au développement de nouvelles molécules ciblant la synthèse d'acides nucléiques, comme le 5-fluorouracil, également approuvé comme traitement anticancéreux (Wilson et al., 2014). En dehors de cette classe de molécules, très peu de drogues ciblant le métabolisme ont aujourd'hui été approuvées en tant qu'agents anticancéreux. Beaucoup d'entre elles ont cependant montré des résultats prometteurs dans des modèles murins ou dans essais pré-cliniques. Ces drogues peuvent cibler directement le métabolisme glucidique, c'est le cas par exemple des inhibiteurs de la lactate déshydrogénase A (LDHA) et des hexokinases (HK). La LDHA, enzyme responsable de la production de lactate à partir du pyruvate, est souvent augmentée dans les cancers présentant un effet Warburg. Il a été montré que la délétion de cette enzyme entrainait une régression tumorale dans des modèles murins de cancers pulmonaires sans toxicité systémique. Il a été également montré que son inhibition pharmacologique diminuait le développement de tumeurs lié à MYC dans des modèles de xenogreffes (Fantin et al., 2006; Xie et al., 2014). Les hexokinases sont responsables de la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate lors de la première étape de la glycolyse. Il a été mis en évidence dans différents modèles murins, notamment de cancer du sein et du poumon, que l'inhibition des HK ralentissait la progression tumorale. Le ciblage de ces enzymes dans des tumeurs glycolytiques présentant une augmentation de leur activité apparait donc comme une fenêtre thérapeutique potentielle. L'utilisation massive de glutamine pour l'anaplérose du cycle de Krebs est largement retrouvée dans les cellules tumorales et semble également être une piste intéressante dans le développement de molécules thérapeutiques. L'efficacité d'inhibiteurs de la glutaminase a été notamment démontré dans des modèles de cancers triple négatifs du sein et de xénogreffes (Gross et al., 2014; Xiang et al., 2015).

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, toutes les tumeurs n'arborent pas un effet Warburg. Certaines tumeurs dépendent d'autres substrats comme les acides gras par exemple. Il a été montré que l'utilisation de l'etomoxir, un inhibiteur de CPT1, dans des modèles de cancer du sein permettait de bloquer la tumorigenèse (Camarda et al., 2016). Cependant, il a été montré que l'etomoxir présentait une forte toxicité hépatique (Holubarsch et al., 2007). Il existe néanmoins d'autres inhibiteurs des CPT, comme la perhexiline et l'oxfenicine, utilisées dans le traitement des angines. Les effets de ces molécules sur des tumeurs n'ont toutefois jamais été étudiés. Ainsi, bien que l'inhibition de l'oxydation des

acides gras semble être une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement de certaines tumeurs, peu d'études ont été réalisées.

Une autre stratégie potentielle, pourrait être de cibler directement l'OXPHOS. La metformine, antidiabétique très largement utilisé dans le traitement du diabète de type 2, a montré des propriétés anticancéreuses dans différentes études. Ces propriétés ont été attribuées à la capacité de la metformine à inhiber le complexe I de la chaine respiratoire et donc à bloquer la production d'énergie par la mitochondrie dans les cellules cancéreuses (Hadad et al., 2011; Wheaton et al., 2014). Seules certaines molécules et voies métaboliques ont été listées ici de façon non exhaustive. Il existe bien évidemment d'autres stratégies, comme le ciblage de voies anaboliques (synthèse d'acides gras, etc…) ou de l'équilibre rédox. (pour revue voir Martinez-Outschoorn et al., 2017)

La plasticité des cellules tumorales est également un enjeu majeur dans le ciblage thérapeutique du métabolisme. En effet, les cellules cancéreuses peuvent modifier leur métabolisme au cours du développement tumoral ou en réponse à un traitement ciblant une voie métabolique particulière. Ainsi, les tumeurs peuvent développer une certaine résistance aux drogues utilisées. Afin de prévenir cette éventuelle résistance, l'utilisation de combinaison de molécules ciblant deux voies métaboliques, ou bien une voie métabolique et un oncogène ou une voie de signalisation pourrait être une stratégie intéressante (Fig. 30).

L'utilisation d'une bonne stratégie thérapeutique requiert la connaissance approfondie du métabolisme mis en place dans la tumeur. C'est pourquoi l'étude de la reprogrammation métabolique et le développement de méthodes permettant de définir les voies métaboliques dérégulées dans les cancers sont des enjeux majeurs du développement de nouvelles thérapies.

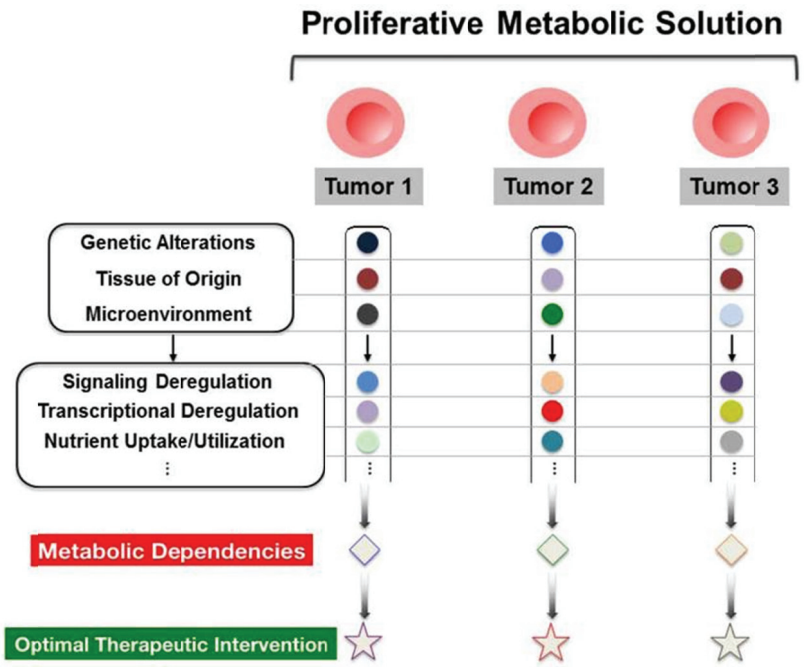


Figure 30 : Stratégie thérapeutique et métabolisme des cellules cancéreuses

La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses est généralement caractérisée par un ensemble d'altérations et d'adaptations leurs permettant de subvenir aux besoins nécessaires à la prolifération cellulaire. C'et ensemble correspond à une combinaison d'évènements génétiques et non-génétiques qui donnent sa signature métabolique et ses dépendances particulières à chaque tumeur. Une meilleure compréhension de cette hétérogénéité inter-tumorale pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies ciblées (Cantor and Sabatini, 2012).

Objectifs

La reprogrammation métabolique fait partie des caractéristiques tumorales décrites par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011). En effet les cellules cancéreuses modifient leur métabolisme afin de subvenir à leur besoin en énergie et synthétiser leurs constituants tout en maintenant l'équilibre rédox. L'effet Warburg, ou glycolyse aérobie, caractérisé par une augmentation importante de la glycolyse et une surproduction de lactate même en présence d'oxygène, est très souvent retrouvé dans les tumeurs. Cette utilisation accrue du glucose par les tumeurs de type « warburgiennes » permet leur détection par imagerie PET-scan fluorodeoxyglucose (PET-scan FDG). Cependant, il est devenu évident qu'il n'existe pas un phénotype métabolique que l'on puisse généraliser à tous les cancers. Il a été montré notamment que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur jouaient un rôle important dans le phénotype métabolique propre de chaque tumeur.

La β-caténine est un régulateur majeur du métabolisme hépatique dont l'activation anormale conduit au développement de carcinomes hépatocellulaires. Les différentes études menées sur les CHC ont permis de mettre en évidence un morphotype particulier dans les 30% de CHC mutés pour la β-caténine. En effet, contrairement aux autres CHC, ceux présentant des mutations activatrices de la β-caténine ne sont jamais stéatosés et sont très souvent cholestatiques (Audard et al., 2007). D'autre part, les données de notre équipe ont mis en évidence que l'activation aberrante de la β-caténine modifiait directement l'expression d'enzymes du métabolisme (Chafey et al., 2009; Gougelet et al., 2014). Cependant ces altérations n'entrainent pas la détection des CHC activés pour la β-caténine par PET-scan FDG. L'absence complète de stéatose et le fait qu'elles restent indétectable en PET-scan FDG suggère un métabolisme particulier associé à l'activation aberrante de la β-caténine.

Le but de cette étude a été d'élucider les altérations métaboliques mises en place à la suite de l'activation aberrante de la β-caténine à la fois dans un modèle prénéoplasique que dans des CHC.

Modèles d’étude

Afin de répondre à notre problématique, nous avons utilisé différents modèles murins.

A. Modèle d'activation de la β-caténine

Le modèle Apc^{KOliv}(*Apc*$^{flox/flox}$Cre$^{TTR-Tam}$) a été décrit par notre équipe pour la première fois en 2004 (Benhamouche et al., 2006a; Colnot et al., 2004). Ces souris sont issues du croisement entre les souris *Apc*$^{flox/flox}$, présentant l'insertion de deux séquence loxP au niveau de l'exon 14 du gène *Apc*, et des souris CreTTR-Tam exprimant la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur hépatospécifique : la transthyrétine (Tannour-Louet et al., 2002). Les contrôles des souris *Apc*$^{flox/flox}$Cre$^{TTR-Tam}$ sont les souris *Apc*$^{flox/flox}$ qui ne possèdent pas la Cre. Dans ce modèle, l'injection d'une forte dose de tamoxifène (80mg/kg de souris) conduit après 6 jours à l'invalidation d'Apc dans tout le lobule hépatique. Cette invalidation entraine la libération du complexe de dégradation et la translocation nucléaire (donc l'activation) de la β-caténine dans tout le foie ainsi que la sortir de quiescence des hépatocytes. Les différentes analyses menées sur ce modèle ont montré qu'il présentait un profil d'expression similaire aux CHC humains mutés pour la β-caténine en faisant ainsi un bon modèle pour notre étude (Audard et al., 2007; Colnot et al., 2004). D'autre part, compte tenu de ces observations et du fait que l'activation de la β-caténine dans des hépatocytes isolés conduit à la tumorigenèse, le modèle Apc^{KOliv} est considéré comme un modèle prétumoral.

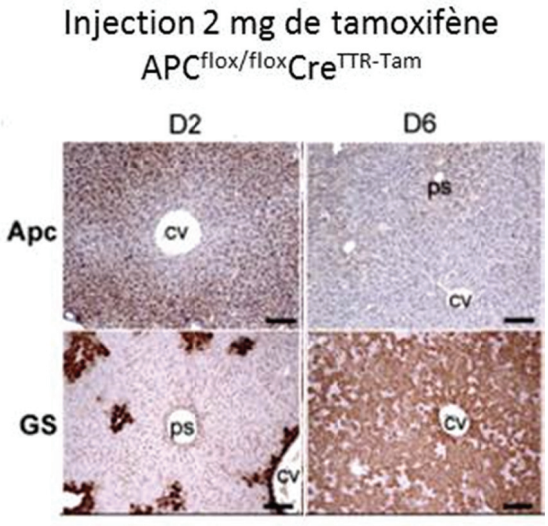


Figure 31 : Modèle prétumoral d'activation de la β-caténine
L'injection d'une forte dose de tamoxifène conduit à l'invalidation d'Apc et à l'activation de la β-caténine dans tout le lobule hépatique après 6 jours (Benhamouche et al., 2006b).

D'autre part, afin d'étudier le métabolisme des CHC, nous disposons de différents modèles. Notre modèle de CHC activé pour la β-caténine est généré en injectant une faible quantité d'adénovirus Cre ($0{,}5x10^9$ pfu) aux souris $Apc^{flox/flox}$. Ainsi, seul quelques hépatocytes présentent une invalidation du gène Apc résultant après 4 à 5 mois à l'émergence de CHC présentant une activation de la β-caténine. Nous appelerons ce modèle dans la suite du manuscrit CHC-Apc^{KO}. Les contrôles de ce modèles sont les souris $Apc^{flox/+}$.

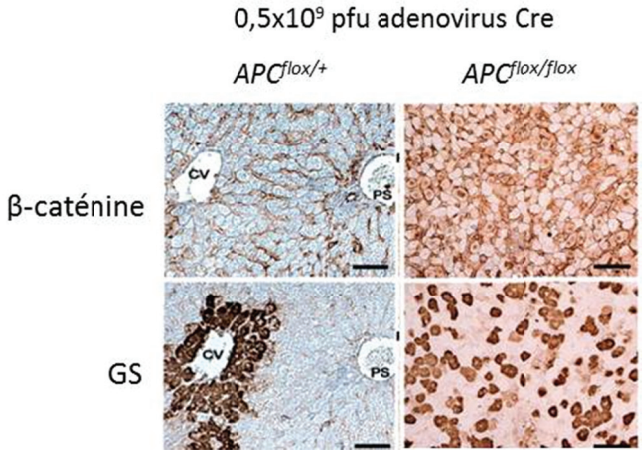


Figure 32 : Modèle de CHC β-caténine activée
L'injection d'une faible dose d'adéno virus Cre conduit à l'invalisation d'*Apc* et donc à l'activation de la β-caténine dans un pourcentage faible d'hépatocytes du lobule comme le montre les immunohistochimie β-caténine et glutamine synthase (GS) après quelques jours d'injection (Colnot et al., 2004)

B. Modèle de CHC sans activation de la β-caténine

Nous avons également utilisé dans notre étude, à titre comparatif, un modèle de CHC ne présentant pas d'activation de la β-caténine, il s'agit du modèle Axin 1^{KOliv}. Ces souris ont été générées dans l'équipe en croisant des souris présentant une insertion de deux séquences loxP, respectivement dans l'exon 3 et l'exon 6 du gène *Axin 1*, avec des souris expimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur AlfP (α-fœtoprotéine). Ainsi, l'invalidation de l'Axin se fait dans le foie à l'état embryonnaire. Bien que l'Axin 1 fasse partie du complexe de dégradation de la β-caténine, il a été montré que les CHC mutés pour la β-caténine et les CHC mutés pour l'Axin 1 ne présentait pas le même phénotype et n'appartenaient pas aux mêmes classes de CHC. De plus, l'étude Abitbol, Dahmani *et al.*, menée dans les équipes, montrent que l'invalidation de l'Axin 1 n'entraine pas d'activation de la voie β-caténine (cf. Annexe 2). Ce modèle nous a permis d'évaluer la spécificité du phénotype métabolique que nous avons observé dans les CHC activés pour la β-caténine.

C. Modèle PPARα KO

Suite à nos expériences sur les précédents modèles, nous avons mis en évidence l'augmentation importante de l'oxydation des acides gras suite à l'activation aberrante de la β-caténine. Nous nous sommes donc demandés ce qu'il se passerait si on activait la β-caténine dans un contexte de défaut de β-oxydation. Les souris PPARα KO présente l'insertion d'une cassette de résistance à la néomycine au niveau de l'exon 8 du gène codant PPARα. Ainsi, les souris PPARα KO présentent une invalidation constitutive de PPARα dans tout l'organisme. Il a été montré que PPARα contrôlait l'oxydation des acides gras, ainsi les souris invalidées pour PPARα présentent un défaut important de l'oxydation des acides gras (Kersten et al., 1999). En croisant les souris PPARα KO avec nos modèles $APC^{flox/flox}Cre^{TTR\text{-}Tam}$ et $APC^{flox/flox}$ nous avons pu générer des souris présentant une activation de la β-caténine dans tout le lobule ou dans quelques hépatocytes dans un foie arborant un défaut de β-oxydation. Nous avons ainsi pu évaluer l'impact du défaut de PPARα, et donc indirectement du défaut de β-oxydation, sur le phénotype des hépatocytes et CHC activés pour la β-caténine.

Résultats

Les résultats seront ici résumés en français puis présentés sous forme d'article scientifique (Introduction – Résultats – Matériel et méthodes – Discussion). Les numéros des figures correspondent ici aux figures de l'article.

Résumé des résultats

Les tumeurs β-caténine activée ne présentent pas d'effet Warburg

Nous avons dans un premier temps analysé la reprogrammation métabolique des tumeurs Apc^{KOliv} (modèle décrit dans la partie « modèle d'étude »). Par des approches de flux métaboliques avec des radioisotopes. Nous avons montré que les tumeurs ne présentaient pas de différences d'oxydation du glucose ou de production de lactate mais une diminution importante de la lipogenèse par rapport au tissu sain. Ces résultats indiquent que les CHC activés pour la β-caténine ne présentent pas d'effet Warburg (cf. Fig. 1A).

Les tumeurs β-caténine activée oxydent de façon importante les acides gras

Les CHC β-caténine activée humains et murins sont caractérisés par une absence de stéatose (Fig. 1B). En période de jeûne, la lipolyse du tissu adipeux induit une accumulation physiologique et transitoire de triglycérides dans le foie. Or, les CHC-Apc^{KO} des souris à jeun ne présentent pas cette caractéristique. Nous avons donc voulu évaluer le métabolisme des acides gras dans ces tumeurs. L'ensemble de nos résultats démontre une reprogrammation métabolique des CHC impliquant une augmentation de la β-oxydation au détriment de l'estérification des acides gras (Fig. 1C et D). La diminution de la lipogenèse et l'augmentation de la β-oxydation seraient donc responsables de l'absence de stéatose observée dans les CHC activés pour la β-caténine.

L'augmentation de l'oxydation des acides gras est une caractéristique des CHC activés pour la β-caténine

Nous avons voulu déterminer si l'absence d'effet Warburg et l'augmentation d'oxydation des acides gras était une caractéristique des CHC activés pour la β-caténine. Nous avons alors utilisé un modèle murin développé au laboratoire qui ne présente pas d'activation de la β-caténine, le modèle $Axin1^{ko}$ (décrit dans la partie « modèles d'étude ») (Fig. 2A). Contrairement à ce que nous avons observé dans les CHC β-caténine activé, les CHC $Axin1^{ko}$ présentent une diminution de l'oxydation du glucose ainsi que de la β-oxydation comparativement au tissu non-tumoral. D'autre part l'estérification de l'oléate est

augmentée dans ces tumeurs (Fig. 2C). La diminution de l'oxydation et la potentielle augmentation de lipogenèse conduisent à la stéatose observée dans les CHC Axin1^{ko}. Il semblerait que l'augmentation de l'oxydation des acides gras soit une caractéristique des CHC activés pour la β-caténine.

Les hépatocytes β-caténine activés prétumoraux ne présentent pas d'effet Warburg

Nous avons ensuite voulu évaluer si la reprogrammation métabolique induite par l'activation de la β-caténine précédait et participait à la transformation tumorale. Nous avons donc analysé le métabolisme des hépatocytes issus des souris Apc^{KOliv} qui présentent une activation aberrante de la β-caténine dans tout le lobule hépatique (décrit dans la partie « modèles d'étude »). L'équipe avait déjà montré que ces foies étaient négatifs en PET-scan FDG. Nous avons, comme dans le modèle tumoral, mis en évidence qu'il n'y avait pas d'effet Warburg dans les hépatocyte β-caténine activés prétumoraux (Fig. 3A).

De façon intéressante, nous avons cependant observé une augmentation des ARN radiomarqués par rapport au niveau total d'ARN dans les hépatocytes prétumoraux, reflétant une incorporation accrue des carbones du glucose dans les ARN, et une induction de la voie des pentoses phosphate (Fig. 3A).

Les carbones du glucose ne sont pas orientés vers les lipides mais vers la glutamine

La glycolyse produit du pyruvate qui peut alors être transformé en lactate par la LDH ou alors entrer dans la mitochondrie où il sera transformé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA et ainsi alimentera le cycle de Krebs. Nous avons montré que l'activité de la PDH n'était pas altérée dans les hépatocytes Apc^{KOliv} (Fig. SI2B). Il semblerait donc qu'il n'y ait pas d'obstacle à l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs et que la production d'acétyl-CoA à partir du glucose soit similaire entre les hépatocytes β-caténine activée et les contrôles.

Nous avons ensuite évalué la lipogénèse. Nous avons, observé une diminution globale de la lipogenèse à partir du glucose. De façon intéressante, l'incorporation des carbones du glucose dans les triglycérides (TG) et diglycérides (DAG) est diminuée significativement, au contraire l'incorporation dans les phospholipides (PL) est augmentée (Fig. 3A). Cela est notamment associé à une augmentation de l'expression de la choline/ethanolamine transférase 1 (CEPT1), enzyme catalysant la première réaction de la synthèse de PL (cf. Annexe 1). Nous avons mis en évidence que ces observations étaient bien dues à une diminution de la

lipogenèse et non à une diminution du flux glycolytique (Fig. 3B et C). Ainsi bien que la lipogenèse soit globalement diminuée, les acides gras (AG) produits à partir du glucose sont réorientés vers une synthèse de PL dans les hépatocytes Apc^{KOliv}.

Les hépatocytes β-caténine activée ne présentent une addiction, mais une surproduction de glutamine

La glutaminolyse est un phénotype très souvent observé dans les tumeurs. L'effet Warburg induit une cataplérose du cycle de Krebs, les cellules tumorales sont alors souvent capables d'utiliser la glutamine afin de resynthétiser les intermédiaires du cycle. Elle peut alors permettre notamment de produire des lipides *via* la synthèse de citrate. Cependant, l'équipe avait déjà montré que l'activation de la β-caténine entrainait une forte répression de la glutaminase 2 (Gls2), enzyme responsable de la transformation de la glutamine en glutamate, et donc nécessaire à son entrée dans le cycle de Krebs. Au contraire, la glutamine synthase (GS), enzyme permettant de produire la glutamine à partir du glutamate est fortement induite par la β-caténine. D'autre part, nous avons observé une diminution de l'oxydation de la glutamine ainsi que de son incorporation dans les lipides dans les hépatocytes prétumoraux comparativement aux contrôles mettant en évidence une absence d'utilisation de la glutamine dans le cycle de Krebs (Fig. 4A et B). Nos résultats montrent au contraire que les carbones du glucose semblent être orientés vers une synthèse de glutamine (Fig. 4D). Ainsi l'augmentation de 3 fois des niveaux de glutamine décrite précédemment dans les hépatocytes Apc^{KOliv} est le résultat d'une augmentation de sa synthèse à partir du glucose et d'une répression de son utilisation dans le cycle de Krebs.

Les hépatocytes β-caténine activée présentent une augmentation de l'oxydation des acides gras et de la synthèse des corps cétoniques

Compte tenu de la diminution du contenu en TG dans les foies Apc^{KOLiv} nous avons évalué le métabolisme des acides gras dans ces hépatocytes (Fig. 4C). Comme précédemment dans les CHC-Apc^{KO}, nous avons observé une induction de la β-oxydation ainsi que de la cétogenèse dans les hépatocytes prétumoraux (Fig. 5A et B). L'activation aberrante de la β-caténine conduit à une augmentation de la β-oxydation au détriment de l'estérification (Fig. 5C et D). La diminution de lipogenèse, l'augmentation de la cétogenèse et l'hydrolyse des TG hépatiques permettait de maintenir élevée et constante l'oxydation des acides gras dans les hépatocytes Apc^{KOliv}.

L'augmentation de β-oxydation dans les hépatocytes prétumoraux conduit à une production effective d'ATP

Nous avons mis en évidence que l'inhibition de la β-oxydation bloquait la prolifération des hépatocytes Apc^{KOliv} en culture (Fig. 6C). Ce résultat met en évidence l'avantage prolifératif de l'utilisation de l'oxydation des acides gras dans ces hépatocytes. Nous avons analysé la production d'énergie dans ces cellules et avons observé une augmentation de la respiration mitochondriale en présence des substrats de la chaîne respiratoire mais également en présence d'acides gras, ainsi qu'une augmentation de la vitesse de production d'ATP (Fig. 6A et B). Ces résultats indiquent que l'utilisation des acides gras permet d'alimenter une chaine respiratoire très active dans les hépatocytes Apc^{KOliv} et conduisent à une production effective d'énergie.

La β-oxydation est essentielle à la tumorigenèse dépendante de l'activation de la β-caténine

Compte-tenu de l'utilisation importante de la β-oxydation dans les hépatocytes Apc^{KOliv}, nous nous sommes demandés quel pouvait être l'importance de ce métabolisme dans la transformation tumorale induite par la β-caténine. Il avait été précédemment montré par l'équipe que le récepteur nucléaire PPARα, qui contrôle la β-oxydation (cf. Introduction chapitre II), était une cible directement induite par la β-caténine (Fig. 7A). Nous avons mis en évidence que l'induction de la β-caténine dans tout le foie des souris PPARα KO ne permettait pas d'induire une β-oxydation aussi forte que dans des foies normaux (Fig. 7B). Il semblerait que la β-oxydation induite par la β-caténine soit en partie dépendante de PPARα.
Nous avons observé que la tumorigenèse induite par la β-caténine était pratiquement inexistante dans les souris présentant une délétion de PPARα (Fig. 7C).

L'ensemble de ces résultats montre que l'induction de la β-oxydation induite par l'activation de la β-caténine est nécessaire au processus de transformation tumorale.

Fatty-acid oxidation is the "Achilles heel" of β-catenin-activated hepatocellular carcinoma

Nadia Senni[1,2,3,4], Mathilde Savall[1,2,3,4], David Cabrerizo Granados[1,2,3,4], Marie-Clotilde Alves-Guerra[1,2,3], Chiara Sartor[1,2,3,4], Isabelle Lagoutte[1,2,3], Patrick Even[5], Angélique Gougelet[1,2,3,4], Hélène Gilgenkrantz[1,2,3,4], Christine Perret[1,2,3,4], Sabine Colnot[1,2,3,4] et Pascale Bossard[1,2,3,4,6]

1: Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France
2: Cnrs, UMR8104, Paris, France
3: Université Paris Descartes,Sorbonne Paris Cité, France.
4 : Equipe labellisée Ligne Nationale contre le Cancer
5: Institut National de la Recherche Agronomique, AgroParisTech, Unité Mixte de Recherche 914 Nutrition Physiology and IngestiveBehaviour, F-75005 Paris, France
6: To whom correspondence should be addressed

Correspondence : Pascale.bossard@inserm.fr
Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes
24 rue du Faubourg Saint-Jacques
75014 Paris, France
Tel : + 33 1 44 41 25 68 Fax :

INTRODUCTION

Tumorigenesis is a multistep process involving pathways modifications promoting unchecked proliferation and abrogating cell death. This uncontrolled and rapid proliferation requires metabolic reprogramming to provide macromolecules and energy, fueling cell growth and division in order to thrive in a potentially deleterious environment [1, 2]. Metabolic reprogramming in cancer is under the direct control of oncogenes, tumor suppressor genes and altered signaling pathways [3]. Moreover, external factors, such as hypoxia and nutrient poor environment could also be part of this metabolic editing allowing survival, growth, expansion and migration of tumor cells. Among the most common metabolic features observed in tumor cells is a high glucose consumption through a glycolytic pathway producing lactate at the expense of the oxidative pathway and this, despite the presence of oxygen [4]. This aerobic glycolytic pathway known as the Warburg effect has been considered for decades as the staple of cancer cell metabolism [5]. This pathway also contributes to the rewiring of glucose carbons into macromolecule synthesis and production of reduced equivalents [6]. Even though the ratio of ATP produced *per* mole of glucose through this pathway is less efficient than through the oxidative phosphorylation, the overall increased speed of glucose flow through glycolysis allows a faster production of ATP and glucose provides carbon sources for biosynthesis precursors required for proliferation of tumor cells. Tumors that are addicted to glucose are often also addicted to glutamine that allows the anaplerosis of the TCA cycle [7]. Finally, such a boosted glycolytic pathway makes tumor cells less dependent on oxygen for ATP production promoting their invasion potential. This glucose addiction is at the root of their detection by Positron emission tomography-scan fluorodeoxiglucose (PET-scan FDG).

Hepatocellular carcinoma (HCC), the major primary liver malignancy, is the sixth

most frequent cancer but is the third leading cause of tumor related death worldwide [8]. Even though HCC is quite an heterogeneous disease, it mostly rises in a context of chronic liver inflammation associated with hepatitis B or C infections, alcohol consumption, obesity or genotoxic exposure such as aflatoxin B [9]. Quite recently, genomic approaches allowed the classification of HCCs drawing their genetic landscape and identifying the altered molecular pathways [10, 11,12]. These molecular studies lead to the classification of HCCs in two large subclasses: one proliferative subclass associated with high chromosomal instability, enrichment in signals related to cell proliferation and cell cycle progression and presenting a more aggressive phenotype, some of these tumors are steatotic. This first class is mostly associated with mutations in *TP53* or *AXIN1*[11].The second class is associated with activating mutations in *CTNNB1*, encoding β-catenin [13, 14]. Mutant β-catenin translocates to the nucleus and activates a β-catenin transcription program that promotes tumorigenesis. This class of HCCs seems to follow a peculiar pattern of pathogenesis as they conserved the molecular traits of differentiated hepatocytes with a high chromosomal stability, lower proliferation index and a very distinctive metabolic morphotype as they are cholestatic and never steatotic[15]. Nowadays even if the molecular pathogenesis of HCC has been elucidated the incidence of mortality remains high. Elucidating the metabolic alterations leading to their pathogenicity could lead to the development of drugs targeting them in accordance to their metabolic specificities.

We therefore investigated the metabolic adaptations triggered by β-catenin oncogenic activation in hepatocytes and asked whether this metabolic reprogramming was a driven force of the process of β-catenin induced liver tumorigenesis. For that purpose, we used a mouse model recapitulating the different stages of *CTNNB1*-mutated HCC in which β-catenin oncogenic signaling is triggered exclusively in hepatocytes by deletion of the tumor suppressor gene, *Apc*[16]. In this model, following oncogenic β-catenin signaling, hepatocytes

leave their quiescent state and express a transcriptional program similar to the one found in human *CTNNB1*-mutated HCCs [17]. We first showed that the metabolic reprogramming of β-catenin-activated HCC did not conformed to the Warburg effect but led to the induction of fatty acid oxidation (FAO) in these tumors. The lack of steatosis of *CTNNB1*-mutated HCC is the conjunction of a decreased lipogenesis and increased FAO. Most importantly, both the initiation and progression of HCC were dramatically impaired following the genetic deletion of PPARα, a master inducer of FAO, highlighting the critical role of FAO in *CTNNB1*-mutated HCC.

RESULTS

β-catenin activated tumors do not conform to the "Warburg effect"

Given the specific metabolic profile of CTNNB1-mutated HCC which are cholestatic and never steatotic, we investigated the metabolic reprogramming in β-catenin-activated HCC using Apc^{KOLIV}mice (hereafter called Apc-HCC) that we previously described and mimics CTNNB1-mutated HCC tumorigenesis[16, 18, 19, 20] (see Methods).

Tumor initiation and development were followed by echography (Fig. S1A). The first tumors were detected 5 months after *Apc* deletion. At month seven, tumor penetrance was at 100% (Fig. S1B). As expected, all Apc-HCC presented a high level of nuclear β-catenin accumulation and glutamine synthetase immunostaining, a surrogate marker for β-catenin activated HCC, while non-tumor hepatic tissues present a regular glutamine synthetase expression pattern restricted to hepatocytes surrounding the centrolobular vein [21, 20] (Fig.S1C).

The metabolism of Apc-HCC was analyzed when tumors reached the average diameter of 6 to 8 mm. We first analyzed the metabolic reprogramming by analyzing the glucose fate. We first measured lactate production by the tumor explants. We did not observe any modification in lactate production by the Apc-HCC explants compared to the non-tumor explants (Fig. 1A). Furthermore, when culture in presence of 25 mM [U-^{14}C] glucose, we also observed no modification of the glucose oxidation rate between Apc-HCC and adjacent non-tumor tissues (Fig. 1A). These results indicated that Apc-HCC were not glycolytic. Moreover, the incorporation of [U-^{14}C] glucose into lipids (esterification rates) was strongly decreased (33%) in the tumor compared to the non-tumor tissues, indicating that lipogenesis from glucose was decreased in Apc-HCC (Fig. 1A).

Altogether, our results showed that Apc-HCC did not used glycolysis as energetic provider demonstrating that Apc-HCC did not conform to the classical Warburg effect described in many tumors.

β-catenin activated tumors oxidize intensively Fatty Acids

One of the hallmark features of *CTNNB1*-mutated HCC are their complete lack of steatosis[15]. Apc-HCC revealed a strong decreased intra-tumoral lipid accumulation at the fasted state while lipid droplets were obvious in the non-tumoral part of the liver (Fig.1B). Indeed, during the fasting period, adipose tissue lipolysis provides the liver with large amount of non-esterified fatty acids (NEFA) which are oxidized in the mitochondrion, excess NEFAs being temporarily stored as triglycerides into small lipid droplets characteristic of a fasting liver (Fig. 1B). We evaluated oleate metabolism by measuring its oxidation into CO_2, its reorientation into ketone bodies as well as its esterification into lipids, in Apc-HCC tumor and non-tumor explants cultured for two hours in presence of 0.3 mM albumin conjugated [1-^{14}C] oleate. When looking at [^{14}C] oleate oxidation in the tumor explants and their adjacent non-

tumor tissues, we observed a robust increase (2 fold) in [$^{14}CO_2$] production with an increase in [^{14}C] acid soluble products (ASP) production (2 fold), compared to the adjacent non-tumor explant (Fig. 1C). Ketogenesis, the synthesis of ketone bodies from the acetyl-CoA produced by fatty acid oxidation, occurs only in hepatocytes and reflects an active β-oxidation in these cells [22]. Unlabeled ketone bodies production was significantly increased (2 fold) in the tumor compared to the non-tumor explants (Fig. 1C). On the other hand, oleate esterification rates into lipids present a drastic drop in tumor tissues (Fig. 1C) compared to the adjacent non-tumor tissues. Overall, in Apc-HCC, we observed a strong reorientation of fatty acids into an oxidative pathway at the expense of esterification. Accordingly, when looking at the triglyceride content of Apc-HCC, these tumors display a strong depletion in triglycerides (10 fold) (Fig. 1C). Overtime, the constant daily cycle through increased fatty acid oxidation, decreased lipogenesis and decreased esterification rates leads to the overall lack of steatotic phenotype in Apc-HCC and likely in *CTNNB1*-mutated HCC (Fig. 1B).

Having shown that Apc-HCC did not conform to the Warburg effect, but revealed a deep fatty acid oxidation, we wonder if this was linked to the transcriptional program controlled by β-catenin in the hepatocyte. We thus used another HCC model where HCC is induced following the deletion of *Axin1* in the hepatocytes, called *Axin1*-HCC (Abitbol *et al*, submitted). We showed that in *Axin1*-HCC, no β-catenin activation was detected (Fig. 2A). When looking at glucose oxidation rates, we observed a significantly decreased glucose oxidation in the tumor tissues compared to the non-tumor explant. (Fig. 2B). Moreover, fatty acid oxidation in Axin1-HCC, *i.e* [$^{14}CO_2$] and [^{14}C] ASP production from [^{14}C] oleate, was strongly decreased compared to the non-tumor tissues and there was an increased incorporation into triglycerides (Fig. 2C). The observed increased lipogenesis and decreased fatty acid oxidation in Axin1-HCC tumors could therefore contribute to their steatotic phenotype (Abitbol *et al.* submitted). Thus, the metabolic profile of Axin1-HCC follows the

Warburg effect and is diametrically opposed to those of Apc-HCC. The increased fatty acid oxidation observed in Apc-HCC appears restricted to HCCs presenting aberrant β-catenin activation.

FAO is the driving force for HCC development in Apc-HCC

We wondered if the peculiar metabolic profile found in Apc-HCC was acquired during the transformation process or was a cell-autonomous driving force of the tumorigenesis process. We therefore analyzed the metabolic consequences of *Apc* loss in pretumoral hepatocytes. Panlobular β-catenin oncogenic activation in the hepatocytes that constitute a pretumoral model was obtained following an acute *Apc* deletion, named Apc^{KO} liver and already described [16,18].

Using primary hepatocyte culture and explants of Apc^{KO} liver and controls, we evaluated glucose metabolism by measuring [U-^{14}C] glucose oxidation into [$^{14}CO_2$]. First, using primary hepatocyte culture of Apc^{KO} liver and controls we found that the amount of [$^{14}CO_2$] produced *per* mole of glucose was similar between Apc^{KO} and control hepatocytes (Fig. 3A). We also assayed pyruvate and lactate production. No difference in pyruvate production and a slight decrease in lactate production (6%) were observed (Fig.3A). Accordingly, Ldh activity, the enzyme catalyzing the rapid reduction of pyruvate into lactate, was not affected by β-catenin activation (Fig.SI2A). Moreover no modification of glucose concentrations was noted in the culture media at the end of the experiments (Fig. SI2A). However, when looking at [^{14}C] incorporation into RNA, we observed a significant increase of radiolabelled RNA relative to the total amount of RNA, indicating that part of the [U-^{14}C] glucose was incorporated into RNA (Fig. 3A). Altogether, similar to the Apc-HCC, the metabolic reprogramming induced by β-catenin activation did not involve a Warburg effect.

We then evaluated the activity of the pyruvate dehydrogenase (Pdh) that converted pyruvate into acetyl-CoA in the mitochondrion by measuring [1-^{14}C] pyruvate oxidation into [$^{14}CO_2$]. Pdh activity is inhibited by phosphorylation of the ser293 of its E1 subunit by pyruvate dehydrogenase kinases. We observed a slight increase of both phosphorylated and total forms in the Apc^{ko} hepatocytes but their ratio is similar between Apc^{ko} and control hepatocytes (Fig.SI2B). We then observed similar oxidation rates between Apc^{ko} and control hepatocytes (figSI1). Pyruvate concentrations and Pdh activity are not altered by β-catenin overactivation (Fig.SI2B), moreover pyruvate carboxylase expression is similar between the two models (Fig. SI2B), therefore indicating that mitochondrial acetyl-CoA production rates from glucose did not differ between Apc^{ko} liver and control hepatocytes.

After entering the Krebs cycle, through lipogenesis, glucose carbons are then rewired into fatty acids which will be esterified into lipids. We investigated the incorporation of glucose carbons into [^{14}C] DAG and [^{14}C] TAG and [^{14}C] phospholipids (PL). The [^{14}C] DAG and [^{14}C] TAG amounts were significantly decreased by 1.5 fold and 2 fold respectively while [^{14}C] PL were slightly but significantly increased by 1.3 fold in Apc^{ko} compared to control hepatocytes (Fig. 3A). The rerouting of glucose carbons into PL is associated with an increased expression of CEPT1, the enzyme catalyzing the first step of PL synthesis (Sartor *et al.* submitted). Even though we observed an increased incorporation into phospholipids, when looking at the total esterification, fewer lipids are synthetized from glucose in Apc^{ko} than in control hepatocytes.

Lipogenesis from glucose is dependent on glucose catabolism, to measure the *de novo* lipogenesis, we used [1-2 ^{14}C] acetate. Cytoplasmic acetyl-CoA synthesis from acetate is catalyzed by the Acss2 enzyme and then used as a substrate for acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS). The level of Acss2 expression did not differ between

Apc^{KO} liver and controls, but there were twice as less [^{14}C] non esterified fatty acids (NEFA) synthetized from [1-2 ^{14}C] acetate in Apc^{KO} than in control hepatocytes and esterification profiles into [^{14}C] TAG, [^{14}C] DAG and [^{14}C] PL were similar to those observed with [^{14}C] glucose (Fig. 3B).The expression of three lipogenic enzymes, acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) and lipin1, the phosphatidic acid phosphatase, was decreased indicated that it is the flux of acetyl-CoA through the lipogenesis pathway that is reduced in Apc^{ko} livers (Fig. 3C). Accordingly, we found that malonyl-CoA was significantly decreased by 33% in Apc^{ko} livers compared to controls (Fig. 3C).

An activation of the glutamine synthase gene (*GLUL*) is a hallmark of *CTNNB1*-mutated HCC and Apc^{ko}livers [15, 21] and we previously described an up-regulation of *Glul* in Apc-HCC [16]. We therefore evaluated [^{14}C] glutamine metabolism in Apc^{ko} and control hepatocytes by measuring its oxidation into [$^{14}CO_2$] and its [^{14}C] incorporation into lipids. We found a significantly decreased glutamine oxidation (2.5 fold) in Apc^{ko} compared to the control cells and moreover a decreased incorporation of its carbons into triglycerides (2 fold) (Fig. 4A and B). Finally, the observed overall depressed lipogenesis from both glucose and glutamine carbons contributes to the 2.5 fold drop in triglyceride content observed in Apc^{ko} hepatocytes (Fig. 4B and C). Thus, as expected from the presence of Glul, there were almost no glutamine catabolism in Apc^{ko} hepatocytes, but, the accumulation of glutamine [17] indicated that, in contrast, there was a synthesis of glutamine likely from glucose. Using [U-^{13}C]-glucose, such glutamine anabolism from glucose has been already described in other tumor models that overexpressed β-catenin and Glul in the liver but also in the lungs [23]. In favor of the hypothesis, we assessed the fate of pyruvate in the mitochondrion, by following pyruvate oxidation into the Krebs cycle using [2-^{14}C] pyruvate. [2-^{14}C] pyruvate will generate [$^{14}CO_2$] only during the second turn of the Krebs cycle. Interestingly, in Apc^{ko} hepatocytes, we observed a significantly decreased [2-^{14}C] pyruvate oxidation (Fig.4C) indicating that

pyruvate was redirected in another pathway, likely glutamine synthesis, in addition to the TCA cycle.

Finally, since increased fatty oxidation is a prominent feature of Apc-HCC, we evaluated [^{14}C] oleate metabolism in primary hepatocytes of Apc^{KO} livers and found a significantly marked increase of [^{14}C] oleate oxidation to [$^{14}CO_2$] and incorporation into [^{14}C] acid soluble products (ASP) (1.7 and 2 fold respectively) (Fig. 5A). A similar difference in oxidation rate (1.7X) was also observed in cultured liver explants (Fig. SI3B). Unlabeled ketone bodies production was then measured in hepatocytes cultured in the presence or the absence of 0.3 mM oleate. In presence of exogenous oleate, both acetoacetate and β-hydroxybutyrate productions were significantly induced in Apc^{KO} livers in agreement with the profile observed with [^{14}C] labeled ASP (Fig.5A). Accordingly, the expression of two ketogenic enzymes: HMG-CoA synthase 2 (HmgCoAs2) and β-hydroxybutyrate dehydrogenase (Bdh1) was increased in Apc^{KO} livers (Fig. 5B).

We also analyzed the esterification rates of [^{14}C] oleate into TAG, DAG and PL and found an overall decreased esterification indicating that in Apc^{KO} livers, the metabolic reorientation of long chain fatty acid toward oxidation was done mostly at the expense of esterification (Fig. 5C and SI3D). Interestingly, we found a highly significant esterification of cholesteryl species in Apc^{KO} livers that correlated with an increase in *Soat1* expression as previously described[17].

Interestingly, in the absence of exogenous oleate, ketone body production was still significantly increased in Apc^{ko} hepatocytes, indicating an active FAO in these cells (Fig. 5A). Adipose triglyceride lipase (ATGL), whose activity has been demonstrated to be correlated to fatty acid oxidation [24], has been identified as a β-catenin direct positive target gene in the liver [17].We therefore treated the cells with 40 μM Atglistatin, an ATGL inhibitor and the basal ketone body production was blunted in the Apc^{ko} hepatocytes indicating that

ATGL activity in the Apc^{ko} hepatocytes contributes to the increased ketone body production observed even in absence of exogenous fatty acids (Fig.SI3C).

Acetyl-CoA, the product of fatty acid oxidation, exerts a feed-back control loop on fatty oxidation[25].Therefore enhanced ketogenesis, by condensing acetyl-CoA into ketone bodies, associated with an increased rate of endogenous lipid hydrolysis turnover, leads to an increased rate of β-oxidation in Apc^{ko} hepatocytes.

In presence of high glucose and insulin, we had observed a decreased malonyl-CoA concentration in Apc^{ko}hepatocytes (Fig. 3C). Malonyl-CoA is an allosteric inhibitor of Cpt1, a key rate-limiting enzyme of fatty acid oxidation[26]. So we analyzed fatty acid oxidation under lipogenic conditions of high malonyl-CoA synthesis, *i.e.* 25 mM glucose and 100 nM insulin. Under these conditions, we observed the expected decreased fatty acid oxidation in control hepatocytes, but in Apc^{ko} hepatocytes, we still observed a robust β-oxidation (Fig. 5D), in agreement with the decreased malonyl-CoA concentrations observed in Apc^{ko} livers. In addition to the overall drop in lipogenesis, and the resultant decreased malonyl-CoA synthesis, fatty acid oxidation was at a higher rate even in presence of glucose.

Having observed in cultured hepatocytes or liver explants an increased β-oxidation, we looked at the overall adiposity of the Apc^{ko} mice. In the days following the tamoxifen injection, we observed in the Apc^{ko} group and the control mice a slight decrease in food intake associated with a decreased adiposity, but as the 2 groups recovered a regular food intake by day 3, the Apc^{ko} kept loosing fat mass overtime while the control mice recovered their adiposity (Fig. SI3E). We then analyzed the respiratory quotient of the two mouse groups and we observed a lower respiratory quotient indicating an increased fatty acid oxidation during daytime (Fig. SI3E). These results confirm that β-catenin activation in the liver leads to an

increased fatty acid consumption which could contribute to the slow depletion of global fatty acid stores (Fig. SI3E).

Taken together, our results indicate that the metabolic reprogramming in Apc^{ko} livers works in a cell-autonomous manner in the hepatocytes. We found that it does not follow the Warburg effect, but it is an oxidative metabolism that used fatty acid as energetic fuel. We found an overall decrease in lipogenesis from glucose, with a significant rewiring of the FA synthesis towards phospholipids and an increased esterification of fatty acids into cholesteryl esters.

Fatty acid oxidation fuels the oxidative phosphorylation and promotes Apc^{ko} hepatocyte proliferation

We then addressed the impact of β-catenin overexpression on mitochondrial substrate utilization and oxygen consumption in real time. A significant increase in both the basal and maximal oxygen consumption rate was observed in Apc^{ko} hepatocytes with both the glutamate/malate or succinate substrates but also with palmitoyl-carnitine, a fatty acid (Fig. 6A). The non ATP-generating respiration (leak) was unaffected. Therefore, the β-catenin activated hepatocytes have an enhanced cell respiratory capacity which is very efficiently fed by FAO.

We then checked whether fatty acids were the preferential substrates used by Apc^{KO} livers. We looked at the ATP production rates in hepatocytes cultured either in presence of oleate (0.3 mM) or glucose (25 mM). Cells were maintained for 5 minutes in a media containing neither glucose nor oleate. Then substrates were added and ATP concentrations were assayed at the time of substrate addition and after 3 minutes to evaluate ATP production under these conditions. We found a higher rate of ATP production in Apc^{KO} hepatocytes from oleate compared to the control cells, but interestingly, ATP production rates from glucose was

lower in the Apc^{KO} hepatocytes supporting that part of the glucose was incorporated in glutamine and did not fuel the Krebs cycle (Fig. 6B).

We then investigated the functional relevance of the increase FAO in Apc^{ko} hepatocytes. When cultured in presence of 0.3 mM albumin bound oleate, Apc^{ko} hepatocyte proliferation rate was 2-fold that of control cells. This was inhibited by etomoxir, a β-oxidation inhibitor, indicating that FAO provides a proliferative advantage to β-catenin activated hepatocytes (Fig. 6C).

Fatty acid oxidation is mandatory for β-catenin tumorigenesis

Our data showed that Apc-HCCs are oxidative tumors that used fatty acid as energetic fuel. One of the key regulators of FAO in the liver is PPARα (peroxisome proliferator activated receptor alpha). Indeed, PPARα knock-out ($PPAR\alpha^{-/-}$) mice have a decreased hepatic β-oxidation that overtime, led to the development of steatosis[27, 28]. Accordingly, we found an increase in PPARα in nuclear extracts from Apc^{ko} mice livers compared to their controls (Fig. 7A). Moreover, Lehwald *et al*. observed a depressed FAO in the β-catenin deleted livers which was due to a decreased PPARα expression[29].

Therefore, following these observations and knowing the involvement of PPARα in hepatic β-oxidation, we first asked whether the increased β-oxidation in the Apc^{ko} livers was due to PPARα activation. For that purpose, we crossed the Apc^{ko} mice with the $PPAR^{-/-}$ mice and analyzed fatty acid oxidation in double knock-out (DKO) liver explants. As expected, liver of double knock-out Apc/PPARα (DKO) presented an activation of the β-catenin signaling and a lack of PPARα expression (Figure A-B). We first analyzed the level of FAO in livers of $PPAR\alpha^{-/-}$, control, Apc^{KO} and DKO mice. As expected, FAO was decreased in $PPAR\alpha^{-/-}$ liver compared to control, it was enhanced (1.7 fold) in Apc^{ko} compared to controls, but this induced FAO was blunted in absence of PPARα, to levels similar to those observed in the

control mice, in the DKO liver, indicating that the boosted β-oxidation in the Apc^{ko} livers was mostly mediated by PPARα (Fig. 7B).

We then asked about the part played by the PPARα induced FAO in β-catenin tumorigenesis. We therefore monitored Apc-HCC development in a context of PPARα deficiency by echography. We found a drastic decrease in the number of HCCs with a tumor penetrance lower than 20% and less than 2 tumors/mice, moreover the HCCs also appeared four months later (10 months *vs* 6 months), showing that deletion of PPARα decreased both initiation and progression of HCC development in Apc^{KO} mice (Fig. 7C).

Taken altogether our results demonstrate that FAO has a critical *in vivo* role on HCC development in Apc^{KO} mice at all step of tumor development, both initiation and progression. These results strongly suggest that the human *CTNNB1*-mutated HCC are oxidative tumors in which the metabolic reprogramming is reliant on FAO for tumor development. FAO is thus mandatory for β-catenin-induced HCC tumorigenesis.

DISCUSSION

In this study, using genetically modified mouse models, we investigated how the β-catenin pathway oncogenic activation, a master pathway of the liver metabolic functions and a frequent event found in human HCC, reshapes a specific metabolic programming during the transformation process. Our main findings are that β-catenin activated tumors do not use the Warburg effect to thrive but strikingly, they instead use a boosted fatty acid oxidation as their main metabolic pathway. We found out that the increased fatty acid oxidation was mandatory to the transformation process of β-catenin overactivated hepatocytes. In addition, they redirect glucose into glutamine synthesis.

For a long time the Warburg effect was considered as a staple of tumor metabolism, but most recently it occurs that tumor cells find ways to survive and proliferate which go way further than the classic increased aerobic glycolysis. From the glutamine dependency to the acetate addiction of some HCCs or even the boosted glucose oxidation observed in glioblastoma[30, 31], the metabolic pathways hijacked by tumors to provide macromolecules and energy supplies are finally quite numerous and depend not only on the activated oncogene but also on the tissue type and the tumor environment [23]. So overall, it occurs that metabolic reprogramming will be as various and subtle as there are tumor types. Moreover, even though some common pathways can be found activated in some tumors, such as fatty acid oxidation in glioblastoma, triple negative breast cancers or leukemia cells, it occurs that these different tumors will use the same pathway for different purposes. For example in acute leukemia myeloid cells, FAO is associated with an uncoupling of ATP production from the electron transfer chain and oxygen consumption and in these cells energy production is therefore assumed by the Warburg effect [32], while in the c-myc overexpressing triple negative breast tumors, FAO is the leading force behind energy production [33]. In our study, the FAO is feeding the electron transfer chain efficiently and producing ATP with no uncoupling, therefore the β-catenin activated carcinomas does not need to rely on glycolysis for ATP production.

In our study, we have shown that FAO is the driving force behind β-catenin oncogenic activity as when FAO activity is decreased we found a drastic decrease in tumor initiation and progression. In β-catenin activated cells, FAO is truly a part of the oncogenic transformation and our observations underline the key role of FAO in tumor initiation induced by β-catenin activation that contributes to the tumor development. Therefore, FAO is part of the oncogenic activity of β-catenin, through a direct or indirect activation of the fatty acid metabolism enzymes by β-catenin.

Recent research had pointed out the important role of FAO not only as a source of ATP, reduced equivalents NADH and FADH2, all critical to cancer cell survival, but also that FAO can contribute to NADPH homeostasis[34]: in glioblastoma cells displaying a high level of FAO, its inhibition drives not only a drastic decrease in ATP levels but also in NADPH concentrations[35]. NADPH, outside of its function in antioxidant responses, is also the cofactor of anabolic enzymes. Therefore, maintaining a level of NADPH for a tumor cell is key for its survival. Interestingly, for a long time, FAO has been considered as a pathway allowing NADPH homeostasis in condition of energetic stress, such as in tumor cells going through phases of nutrient deprivation [3637]. Now, when considering the β-catenin tumor metabolism, it is of interest to note that, finally, most of the glucose is not use for ATP production but is rewired into glutamine synthesis, therefore the cells could be using FAO as an alternate mean for providing ATP but also for their NADPH homeostasis. Associated with an increased pentose phosphate pathway, producing also NADPH and a decreased lipogenesis consuming NADPH, the β-catenin activated tumors will therefore be able to maintain their need in NADPH production**.**

In our study, FAO is also associated with an increased ketogenesis and ketone bodies secretion. One of the advantages for hepatocyte to use ketogenesis is to allow the recycling of Coenzyme A, sparing the ATP needed for its synthesis, CoA which can then be reused in different metabolic pathways including FAO. Moreover, the two ketone bodies being acidic, we could envision a local acidification leading to a decreased immune response towards the tumor cells as it has been described with lactate [38]. More recently, it has been shown that ketone bodies could be pro-tumorigenic by they inhibitory effect on pro-inflammatory response [39].

One of the main goals of the metabolic reprogramming is to promote unchecked proliferation which requires macromolecules synthesis and energy to fuel their growth. When looking at

the metabolic phenotype of human and murine β-catenin activated HCCs, they are mostly characterized by their lack of steatosis, which is the consequence of several altered pathways, a decreased lipogenesis both from glucose and glutamine, an increased hydrolysis of stored lipids and mostly an increased fatty acid oxidation. So when thinking about cell division, we could ponder about the ability for β-catenin activated hepatocytes to generate their biomass, at least in term of membranes. So even though lipid storage is truly decreased in these hepatocytes, we observed a rewiring of newly synthetized fatty acids into phospholipids and an increased esterification of cholesterol by acyls, two major components of all cellular membranes. Even though β-catenin HCCs display a lower rate of proliferation that the other class of HCCs, they still need to generate cellular membranes, therefore they seem to be able to do it through a decreased storage of fatty acids at the expense of cellular membrane components.

So, β-catenin activated tumors rely on FAO for their initiation and growth, but these cells are also characterized by an increase production of glutamine. It has been observed in the recent years that some tumors were producing high levels of glutamine, not used to replenish the Krebs cycle intermediates, such as some glioblastoma cells [40] or *c-myc* activated lung cancers [23]. In the glioblastoma, glutamine was mostly used to feed the biosynthesis of purine and pyrimidine bases and in our previous work we had observed an induced expression of the pyrimidine and purine enzymes contributing to their synthesis [17]. So, while anabolism from glucose is mostly downplayed when looking at lipids, glucose carbons are still used for ribose synthesis and associated with glutamine increased biosynthesis it could drive the nucleotide needs for cell growth. As mentioned, maintaining a redox status compatible with cell survival is key for tumor cells and glutamine *per se* contributes indirectly to this homeostasis through the production of glutathione. Associated with a production of NADPH (through the pentose

phosphate pathway and FAO) this glutathione synthesis could therefore contribute to the maintenance of a redox status allowing cell survival and proliferation.

Using specific metabolic pathways inhibitors nowadays is a logical step towards treating cancers, but unfortunately it occur that tumor cells are able to adapt again and switch to a different metabolism. Tumor cells will acquire drug resistances allowing the selection of tumor clones by switching their metabolic substrates to escape the metabolic blockade [41]. This tumor plasticity could be one of the main hindrances to treating tumors with metabolic inhibitors, but in the case of the β-catenin activated tumors they present a strong metabolic inflexibility as decreasing the FAO is sufficient to abolish tumor initiation. Therefore, we could consider using FAO inhibitors as a mean to treat *CTNNB1* mutated HCCs. Clinical assays have been done with etomoxir, the CPT1 irreversible inhibitor targeting all isoforms of the enzyme, but unfortunately due to a strong hepatotoxicity they had to be stopped. On the other hand, more recently, a reversible inhibitor, the Teglicar®, specific to the hepatic isoform of CPT1, has proved to be efficient in preclinical test against leukemias, it was until recently in phase II clinical test for treating diabetes [42], such a molecule could be considered as a therapeutic approach to treat *CTNNB1* mutated HCCs.

AKNOWLEDGMENTS

We are very thankful to the 'Mitomaniac' team led by Frederic Bouillaud for all our discussions on the wonders of mitochondria and mostly to Anne Lombes for her patience. We wish to thank Nadia Boussetta who took care of our mice and managed our little colony. We are also very thankful to Julien Planchais for its very helpful discussions on the PPARα mice.

FUNDINGS

Nadia Senni got fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) and the ARC fundations. Mathilde Savall got a fellowship from the French Ministery of Research. This

work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (2014-2016 labellisation), the Agence Nationale de la Recherche (WNT-METABOLIV, 2010-2014) and the société française d'hépatologie (AFEF).

MATERIAL AND METHODS

Animals

Mice are housed in colony cages with a 12-h light/12-h dark cycle in a temperature-controlled environment (21°C) and fed ad libitum with a standard laboratory chow diet: composition 65% carbohydrate, 11% lipids, and 24% proteins (SAFE 03) in EOPS condition.

The Apc^{KOLiv} mice, which model both the pretumoral and the tumor development of *CTNNB1*-activated human tumors, have been already described[16, 20, 18, 19.]. $Apc^{lox/lox}$/TTR-$Cre^{Tam,}$ which received intra-peritoneally one injection of 1.5 mg tamoxifen (MP Biomedicals), constitutes the so-called "pretumoral" model. This results in a deletion of *Apc* in all hepatocytes and the early death of the animals (mostly before 15 jours) from major metabolic defects [16, 20].To obtain liver tumors, *Apc* deletion should be done in less than 70% of hepatocytes in order to prevent the death of the animals [16]. This can be obtained, either by an unique injection of a lower dose of tamoxifen (0,75mg), or by intravenous injection of AdCre. To obtain a reproducible model of liver tumor development, we observed that the partial *Apc* inactivation in the hepatocytes with AdCre injection was the best efficient method. So, liver tumors were obtained by intravenous injection of 0.5 $x10^9$ Pfu of Adcre in two-month old mice of ($Apc^{lox/lox}$/TTR-Cre^{Tam}, $Apc^{lox/lox}$) and controls ($Apc^{+/lox}$/TTR-CreTam, $Apc^{+/lox}$) were injected with the same dose of AdCre. The tumor development was followed twice monthly by 2D-ultrasound (Vevo 770).

We used PPARα Knock-out (KO) mice created by Lee *et al*. to obtain Apc^{KOLIV} ; $PPAR^{KO}$, controls were Apc^{KOLIV} ; $PPAR^{WT28}$.

For food intake quantification, 5 months old male mice were housed individually in metabolic cages (Techniplast) for 2 weeks. After a 5 days period of adaptation, mice received their intraperitoneal injection of tamoxifen. Food and water intake were assessed daily.

All animal procedures were carried out in accordance with French government regulations, with the approval of the Paris-Descartes Ethics Committee for animal experimentation, under protocol CEEA34.CP.077.12. Animal experimentation permit number A-75-1845 was obtained from the French Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche.

Indirect calorimetry

In vivo indirect open circuit calorimetry was performed as previously described[43]. Respiratory exchanges and spontaneous activity signals of freely moving mice were computed at 2-s intervals using a customized computer-assisted data acquisition program. This system has the capacity to continuously separate total VO2 and VCO2 between resting and activity thus allowing precise measurement of resting metabolic rate and of the cost of activity in freely moving rodents[44].

Primary hepatocyte cultures

For hepatocyte primary cultures, livers were perfused 6 days after tamoxifen injection to $Apc^{lox/lox}$ and their respective controls mice, after viability check by trypan blue exclusion, the cells were plated in William's E medium (supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin and 1% (w/v) Bovine Serum Albumin). Four hours after plating, the media was changed for William's E media containing 10^{-9} M dexamethasone, penicillin-streptomycin.

Metabolic fluxes analysis

All metabolic fluxes experiments were done either on platted hepatocytes in primary culture in Williams E media (1 000 000 cells *per* point, in triplicate) in 25 cm^2 flasks or on tumor and non-tumor liver explants (75-100 mg *per* point in triplicate) in suspension in Krebs Henseleit buffer (pH 7.4) in conical glass vials. For tumor and non-tumor explants, fasted mice (18 h fasting) or refed mice (18 h fasting, 4 h refeeding) were killed and livers were removed. Tumors were isolated from the adjacent tissues, tumor and non-tumor liver pieces were rapidly chopped in ~2 mm^3 pieces and incubated in Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4).

Metabolic fluxes on primary hepatocytes

For all metabolic assays, unless mentioned, 5 hours after seeding in 25 cm2 flasks, cells were cultured for 18 hours in William's E medium without serum. Glucose oxidation and lipid synthesis from glucose were determined during the last 3 h of culture in the presence of 25 mM [U-^{14}C] D-glucose plus 100 nM insulin. Medium is collected for $^{14}CO_2$ production. Cells were washed 33X in ice cold PBS, scraped and incorporation into lipids was analyzed after TLC separation. For *de novo* lipogenesis rate from acetate, 5 mM [1-2 ^{14}C] acetate was added during the last 2 h of culture and incorporation into lipids analyzed after TLC separation. For pyruvate metabolism, cells were incubated for the last 2 hours in William's E medium containing 6 mM [1-2^{14}C] pyruvate (0.1 Ci/mole) and oxidation rates ($^{14}CO_2$ production) were determined as previously described [45]. For glutamine metabolism, cells were incubated with 2 mM [^{14}C] L-glutamine for the last two hours of culture and $^{14}CO_2$ production rates analyzed [^{14}C]. [^{14}C] incorporation into lipids was analyzed after TLC separation.

Fatty acid oxidation and esterification were determined during the last 2 hours of culture in presence of 0.5 mM carnitine, 0.3 mM [1-^{14}C] oleate (0.5 Ci/mol) bound to 1% (w/v) free

fatty acid bovine serum albumin, either in presence of 10 mM glucose or of 25 mM glucose and 100 nM insulin. Medium is then collected for $^{14}CO_2$ production and [^{14}C] acid soluble products (mainly ketone bodies).

Metabolic fluxes on liver explants

Liver explants from either fasted mice or refed mice were incubated in Krebs Henselheit buffer at 37°C for 2 hours: for oleate metabolism, oxidation and esterification rates were determined after incubation in presence of 0.3 mM [1-^{14}C] oleate (0.5 Ci/mol) bound to 1% (w/v) free fatty acid bovine serum albumin. For glucose metabolism, oxidation and esterification rates were assayed after incubation with 25 mM [U-^{14}C] D-glucose (μCi/mmol). At the end of the incubation times, the media is transferred to a new conical glass vial for CO_2 and ASP production rates and the liver explants are washed three times in ice cold PBS before processing them for lipid extraction and analysis.

$^{14}CO_2$ production measurement

At the end of the experiments, the incubation media are transferred into a conical glass vial topped by a rubber cap. Perchloric acid is injected into the incubation media through the rubber cap to a final concentration of 4% (v/v). Benzethonium hydroxide is injected through the rubber cap into a plastic well suspended above the incubation media. During 1 hour of vigorous shaking in a water bath at 25°C, the released [^{14}C] CO_2 is trapped by the benzethonium hydroxide. At the end of the experiment, [^{14}C] CO_2 is assessed by scintillation counting. The neutralized perchloric acid extracts are analyzed for [^{14}C] acid-soluble products.

^{14}C incorporation into intracellular lipids and TAG quantification

After 3 washes in ice cold PBS, cellular lipids from liver, tumor and non-tumor explants or cultured hepatocytes were extracted in chloroform/methanol (2:1, v/v) by vortexing vigorously for 10 min. After centrifugation, the organic phase is collected and air dried. After solubilization in chloroform/methanol, lipids were separated by thin layer chromatography on silica gel 60 plates (Mercks) with petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (84.5: 15: 0.5, v/v/v) as the mobile phase. Lipids were then revealed by iodine vapor staining. For ^{14}C incorporation into lipids, [^{14}C] PL, [^{14}C] DAG, [^{14}C] NEFA, [^{14}C] TAG and [^{14}C] cholesteryl esters bands were cut out and counted in scintillation liquid.

For unlabeled TAG quantification, after TLC, the triglycerides fraction was then eluted from the silica gel by acetone and quantified by the Triglycerides FS Kit (DyaSis Diagnostic Systems GmbH) according to the manufacturer's instructions.

Oxygen consumption

Cell homogenates or mitochondria preparations were introduced in the respiratory chambers of an oxygraph O2 k (Oroboros). Respiration was determined under basal conditions, in the presence of oligomycin (1ug/ml) and/or increasing amount of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). Leak was calculated in the presence of oligomycin. Maximal respiration was determined with CCCP. The mitochondrial respiratory control is basal/leak ratio. Mitochondrial respiration was inhibited by potassium cyanide (1mmol/l).

Enzyme assays

Pyruvate dehydrogenase activity was measured by the release of $^{14}CO_2$ by cells incubated for 1 hour with William's E medium containing 0.1 mM [1-^{14}C] pyruvate (1.67 Ci/mole).

Ldh activity was assayed in the cytosolic fraction of freshly prepared cell or tissue lysates after centrifugation (100 000g). Protein concentrations in the cytosolic extracts were adjusted to 1 mg/ml. Pyruvate to lactate conversion speed was evaluated by the NADH disappearance

rates (µmole/min) assayed by spectrophotometry at 340 nm over 5 minutes after addition of NADH and 0.6 mM pyruvate to the cytosolic fraction [46].

Metabolite quantification

For β-hydroxybutyrate, acetoacetate, lactate and pyruvate quantification, cell culture media or Krebs Henselheit buffer at the end of the experiments were deproteinized in ice-cold 4 % (w/v) perchloric acid and metabolites were assayed on neutralized perchloric filtrates by enzymatic methods as described by Girard et al. [47]. Glucose concentrations in the culture media at the end of the experiments were determined by the Glucose GO assay Kit (Sigma, USA) according to the manufacturer's instructions. For ATP production, right after isolation, cells were starved for 5 minutes prior to adding either 25 mM glucose or 0.3 mM albumin bound oleate. A sample of cells was collected at time point 0 and 3 minute and flash frozen in a lysis buffer. ATP concentration was then evaluated in these samples using the ATP HSII kit (Roche).

Malonyl-CoA concentrations were determined by ultraperformance liquid chromatography as previously described (Waters, ON, Canada) [48].

Western blot analysis and ECL detection

For total protein preparation, liver or primary hepatocytes were homogenized in a lysis buffer (50 mMTris·HCl, pH 7.5, 150 mMNaCl, 5 mM EDTA, 30mM $Na_4P_2O_7$, 50 mMNaF, 1% Triton, 10 mg/mL leupeptin, 10mg/mL pepstatin, 10 mg/mL aprotinin, 1 mM DTT). Nuclear or cytoplasmic preparations from fresh liver samples or primary hepatocytes were prepared according to Schreiber *et al.* modified by Bossard *et al*.[49]. Mitochondria were isolated in a sucrose buffer (0.3 M sucrose, 5 mMTris/HCl and 1 mM EGTA (pH 7.4)) using differential centrifugation [29]. Protein concentrations were measured by Bradford assays (Bio-Rad). For western blotting, the nitrocellulose membranes were probed overnight with a primary

antibody against the protein of interest and then incubated with a HRP-conjugated secondary antibody for subsequent detection with an enhanced chemiluminescence system (Biorad).

Isolation of total mRNA and quantitative analysis by Real-Time RT-PCR

Total RNAs were extracted and purified with TriPure isolation Reagent (Roche). The efficiency of β-catenin activation was determined by RT-qPCR through the measurement of glutamine synthase mRNA expression as compared to 18S RNA. Reverse transcription was done with Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Real-time PCR was performed with 10ng of reverse-transcribed RNA mixed with various set of specific forward and reverse primers (100 nM) and 2,5 mM $MgCl_2$ in 1×Luminaris Color HiGreenqPCR master mix (Thermo Scientific) using a LightCycler LC480 apparatus (Roche). All samples were normalized to the threshold cycle value for 18S RNA, chosen as an invariant control. Forward and reverse primers used for the specific amplification of cDNA fragments were designed to hybridize mouse transcripts. Primer sequences will be provided on request. For ^{14}C incorporation, total RNA were purified according to Chirgwin *et al.* and separated from DNA by equilibrium density gradient ultracentifugation on CsCl[50].

xCELLigence assay

Hepatocyte adhesion and cell cycle progression were measured with the xCELLigence system (Roche). Five hours after seeding, the cells were cultured in William's E media supplemented with different substrates or metabolic inhibitors. The impedance was then measured for 36 6r

Histology and Immunohistochemestry

Immediately after the mice were killed, liver samples were fixed in 4% buffered formaldehyde over night at 4°C and then stored in 70%(v/v) ethanol at 4°C until inclusion in

paraffin. Hemalun/Eosin staining was done on 3 µm paraffin-embedded fixed liver sections. For immunochemistry, 5 µm paraffin-embedded fixed liver sections were deparaffinized and hydrated. Antigen was retrieved in a decloacking chamber (Biocare medical) in a citrate buffer (pH 6) (Vector laboratories). Endogenous peroxidase were inactivated with 3 % H_2O_2 (v/v) for 20 min at room temperature. After blocking the liver sections in blocking solution (MOM kit, vector laboratories) for mouse antibodies or 2% SNC (v/v), 1% BSA (w/v) for rabbit antibodies), there are incubated with the primary antibody overnight at 4°C. After 20 min incubation with a biotinylated secondary antibody, staining was revealed using an ABC (Avidin Biotin Complex)-DAB (3,3'-diaminobenzidine) system (Vector laboratories). Sections were then counterstained with hemalun, and slides were mounted (Coverquick 3000 VWR) after dehydration.

Oil red O staining

Frozen sections (10 µm) were fixed in 4% formaldehyde aqueous solution for 10 min, then washed 3 times with PBS. Sections were incubated 30 min in an Oil red O solution (Oil red O powder 0.3 % (w/v), triethyl-phosphate 36 % (v/v)) at room temperature under stirring. After 5 washes in deionized water, slides were mounted with Vectashield® (Vector laboratories).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± SEM and analyzed using Instat software (GraphPad Prism). Unpaired *t* test with Welsh correction were used to compare data sets. Statistical significance was set at $p<0.05$.

REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell;144:646-74.
2. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab 2008;7:11-20.
3. Nagarajan A, Malvi P, Wajapeyee N. Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. Trends Cancer;2:365-377.
4. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat Rev Cancer 2004;4:891-9.
5. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science 1956;123:309-14.
6. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev 2009;23:537-48.
7. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. Nat Rev Cancer;16:619-34.
8. Villanueva A, Hernandez-Gea V, Llovet JM. Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence. Nat Rev Gastroenterol Hepatol;10:34-42.
9. Knudsen ES, Gopal P, Singal AG. The changing landscape of hepatocellular carcinoma: etiology, genetics, and therapy. Am J Pathol;184:574-83.
10. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, Cunha AS, Bioulac-Sage P, Perret C. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. Oncogene 2007;26:774-80.
11. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology 2007;45:42-52.
12. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology;149:1226-1239 e4.
13. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:8847-51.
14. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. Gastroenterology 2001;120:1763-73.

15. Audard V, Grimber G, Elie C, Radenen B, Audebourg A, Letourneur F, Soubrane O, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Cavard C, Terris B. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. J Pathol 2007;212:345-52.
16. Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, Giovannini M, Perret C. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:17216-21.
17. Gougelet A, Torre C, Veber P, Sartor C, Bachelot L, Denechaud PD, Godard C, Moldes M, Burnol AF, Dubuquoy C, Terris B, Guillonneau F, Ye T, Schwarz M, Braeuning A, Perret C, Colnot S. T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. Hepatology;59:2344-57.
18. Anson M, Crain-Denoyelle AM, Baud V, Chereau F, Gougelet A, Terris B, Yamagoe S, Colnot S, Viguier M, Perret C, Couty JP. Oncogenic beta-catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. J Clin Invest;122:586-99.
19. Gougelet A, Sartor C, Bachelot L, Godard C, Marchiol C, Renault G, Tores F, Nitschke P, Cavard C, Terris B, Perret C, Colnot S. Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in liver cancer with beta-catenin-mutations. Gut.
20. Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, Vasseur-Cognet M, Kuo CJ, Kahn A, Perret C, Colnot S. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev.Cell. 2006;10:759-770.
21. Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Levy L, Lamers WH, Kitajewski J, Kahn A, Perret C. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene 2002;21:8293-301.
22. McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. Annu Rev Biochem 1980;49:395-420.
23. Yuneva MO, Fan TW, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T, Mates JM, Alonso FJ, Wang C, Seo Y, Chen X, Bishop JM. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. Cell Metab;15:157-70.
24. Ong KT, Mashek MT, Bu SY, Greenberg AS, Mashek DG. Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. Hepatology;53:116-26.
25. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. J.Clin.Invest 1977;60:265-270.
26. McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. Diabetes Metab Rev. 1989;5:271-284.
27. Montagner A, Polizzi A, Fouche E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, Barquissau V, Regnier M, Lukowicz C, Benhamed F, Iroz A, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Cano P, Mselli-Lakhal L,

Mithieux G, Rajas F, Lagarrigue S, Pineau T, Loiseau N, Postic C, Langin D, Wahli W, Guillou H. Liver PPARalpha is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. Gut.

28. Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator- activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. Mol Cell Biol 1995;15:3012-3022.
29. Lehwald N, Tao GZ, Jang KY, Papandreou I, Liu B, Pysz MA, Willmann JK, Knoefel WT, Denko NC, Sylvester KG. beta-Catenin regulates hepatic mitochondrial function and energy balance in mice. Gastroenterology;143:754-64.
30. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang XL, Rajagopalan KN, Maddie M, Vemireddy V, Zhao Z, Cai L, Good L, Tu BP, Hatanpaa KJ, Mickey BE, Mates JM, Pascual JM, Maher EA, Malloy CR, Deberardinis RJ, Bachoo RM. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. Cell Metab;15:827-37.
31. Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, Walters H, Tantawy MN, Fu A, Manning HC, Horton JD, Hammer RE, McKnight SL, Tu BP. Acetate dependence of tumors. Cell;159:1591-602.
32. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, Kaluarachchi K, Bornmann W, Duvvuri S, Taegtmeyer H, Andreeff M. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. J Clin Invest;120:142-56.
33. Camarda R, Zhou AY, Kohnz RA, Balakrishnan S, Mahieu C, Anderton B, Eyob H, Kajimura S, Tward A, Krings G, Nomura DK, Goga A. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. Nat Med;22:427-32.
34. Kawashima I, Mitsumori T, Nozaki Y, Yamamoto T, Shobu-Sueki Y, Nakajima K, Kirito K. Negative regulation of the LKB1/AMPK pathway by ERK in human acute myeloid leukemia cells. Exp Hematol;43:524-33 e1.
35. Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. Biochim Biophys Acta;1807:726-34.
36. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. Nature;485:661-5.
37. Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, Gao S, Puigserver P, Brugge JS. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. Nature 2009;461:109-13.
38. Choi SY, Collins CC, Gout PW, Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? J Pathol;230:350-5.

39. Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, D'Agostino D, Planavsky N, Lupfer C, Kanneganti TD, Kang S, Horvath TL, Fahmy TM, Crawford PA, Biragyn A, Alnemri E, Dixit VD. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. Nat Med;21:263-9.
40. Tardito S, Oudin A, Ahmed SU, Fack F, Keunen O, Zheng L, Miletic H, Sakariassen PO, Weinstock A, Wagner A, Lindsay SL, Hock AK, Barnett SC, Ruppin E, Morkve SH, Lund-Johansen M, Chalmers AJ, Bjerkvig R, Niclou SP, Gottlieb E. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. Nat Cell Biol;17:1556-68.
41. Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pages M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. Nat Rev Clin Oncol;14:11-31.
42. Ricciardi MR, Mirabilii S, Allegretti M, Licchetta R, Calarco A, Torrisi MR, Foa R, Nicolai R, Peluso G, Tafuri A. Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: functional preclinical effects in leukemias. Blood;126:1925-9.
43. Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M, Guerre-Millo M, Moustaid-Moussa N, Ferre P, Quignard-Boulange A. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 2005;54:991-9.
44. Even PC, Perrier E, Aucouturier JL, Nicolaidis S. Utilisation of the method of Kalman filtering for performing the on-line computation of background metabolism in the free-moving, free-feeding rat. Physiol Behav 1991;49:177-87.
45. Esteves P, Pecqueur C, Ransy C, Esnous C, Lenoir V, Bouillaud F, Bulteau AL, Lombes A, Prip-Buus C, Ricquier D, Alves-Guerra MC. Mitochondrial retrograde signaling mediated by UCP2 inhibits cancer cell proliferation and tumorigenesis. Cancer Res;74:3971-82.
46. Vanderlinde RE. Measurement of total lactate dehydrogenase activity. Ann Clin Lab Sci 1985;15:13-31.
47. Ferre P, Pegorier JP, Williamson DH, Girard J. Interactions in vivo between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in the newborn rat. Biochem.J. 1979;182:593-598.
48. Pulinilkunnil T, Kienesberger PC, Nagendran J, Sharma N, Young ME, Dyck JR. Cardiac-specific adipose triglyceride lipase overexpression protects from cardiac steatosis and dilated cardiomyopathy following diet-induced obesity. Int J Obes (Lond);38:205-15.
49. Bossard P, Zaret KS. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. Development 1998;125:4909-4917.
50. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 1979;18:5294-5299.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: No Warburg effect and sharp increase of β-oxidation in β-catenin activated tumors

(A) Two months after tumor initiation, tumor and non-tumor explants were cultured for 2 hours in a media containing 25 mM [U-^{14}C] glucose and glucose metabolism was assayed. Left panel: lactate production. Middle panel: glucose oxidation rates into [$^{14}CO_2$]. Right panel: esterification rates. White boxes: non tumor tissue explants, black boxes: β-catenin activated tumor explants. Six tumor loads and their non-tumor counterparts were analyzed in independent experiments. Results are means ± S.E.M. of triplicate flasks from three independent experiments. ***P*<0.01. (B) Oil Red O staining of neutral lipids on cryostat sections encompassing non tumor tissues (NT) and tumor tissues (T). (C) Two months after tumor initiation, tumor and non-tumor adjacent liver tissue explants were cultured for 2 hours in a media containing 0.3 mM [1-^{14}C] oleate. Left panel: oleate oxidation into CO_2. Middle panel: [^{14}C] acid soluble products (ASP). Right panel: unlabeled ketone bodies production. (D) Left panel: esterification rates. Middle panel: tumor and non-tumor tissues triglycerides content in fasting mice. White boxes: non tumor tissues, black boxes: tumor tissues. Left panel: iodine staining of a TLC plate of tumor and non-tumor tissues lipid extract. TAG: triglycerides, PL: phospholipids, L: loading control. 7 tumor loads and their non-tumor counterparts were analyzed in independent experiments. Results are means ± S.E.M. of triplicate flasks from three independent experiments. ***P*<0.01.

Figure 2: Tumors without β-catenin activation does not oxidize preferentially fatty acids

(A) Axin$^{-/-}$ hepatic tumors and adjacent tissues histological analysis: representative immunostaining of paraffin embedded liver section encompassing tumor and non-tumor tissues for β-catenin expression (left panel) showing no accumulation in the tumor and glutamine synthetase showing no expression in the tumor and a restricted expression around the central veins (cv) in the non-tumor tissues (right panel). (B) Tumor and non-tumor adjacent liver tissue explants from fed mice were cultured for 2 hours in a media containing 25 mM [U-^{14}C] glucose. Left panel oxidation rates into [$^{14}CO_2$], Right panel: esterification rates into lipids. White boxes: non tumor tissues, grey boxes: tumor tissues. (C)

Tumor and non-tumor explants from fasting mice were cultured for 2 hours in presence of 0.3mM [1-^{14}C] oleate. Left panel: oleate oxidation into [$^{14}CO_2$]. Right panel: [^{14}C] acid soluble products (ASP). Lower panel: esterification profiles. White boxes: non tumor tissues, grey boxes: tumor tissues. Results are means ± S.E.M. of triplicate flasks from three independent experiments. ***P*<0.01.

Figure 3: β-catenin overactivation does not alter glycolytic rates in pretumoral hepatocytes

Primary mouse hepatocytes isolated from Apc^{ko} or control mice 6 days after tamoxifen injection were cultured for 24h in presence of 25 mM glucose and 100nM insulin. White boxes: control hepatocytes. Black boxes: Apc^{ko} hepatocytes. (A) For the last three hours of culture [U-^{14}C] glucose was added. Left panel: Glucose oxidation rates into [$^{14}CO_2$]. Middle panel: lactate and pyruvate concentrations in the culture media. Right panel: after thin layer chromatography (TLC) of the lipid extracts, esterification rates into TAG, DAG and PL were quantified. Extreme right panel: [^{14}C] incorporation into RNA. (B) Left panel: immunoblot analysis of cellular extracts using specific antibody for ACSS2 and GAPDH. Right panels: For the last two hours of culture [1-^{14}C] acetate was added to the culture media to assay *de novo* lipid synthesis from acetyl-CoA. After TLC, [^{14}C] incorporation into NEFA, TAG, DAG and PL was quantified. (C) Left panel: immunoblot analysis of cellular extracts using specific antibody for ACC, FAS, Lipin and γ tubulin. Right panel: malonyl CoA concentrations. Results are means ± S.E.M. of triplicate flasks from three independent experiments. **P*<0.05, ***P*<0.01 and ***P<0.005.

Figure 4: β-catenin activated hepatocytes are not addicted to glutamine

(A) Primary mouse hepatocytes isolated from Apc^{ko} or control mice 6 days after tamoxifen injection were cultured for 24h in presence of 25 mM glucose and 100nM insulin then for the last three hours of cultures in presence of [^{14}C] glutamine and glutamine oxidation into [$^{14}CO_2$] was analyzed. White boxes: control hepatocytes. Black boxes: Apc^{ko} hepatocytes. (B) Left panel: quantification of [^{14}C] incorporation from glutamine into TAG, DAG and PL after TLC separation. Middle panel: intracellular triglycerides content at the end of the experiment. Right panel: Representative thin layer chromatography of lipid extracted from control and Apc^{ko} hepatocytes. (C) Neutral lipid Oil Red O

staining on frozen sections from control and Apc^{ko} livers showing the overall decreased content in Apc^{ko} livers. Results are means ± S.E.M. of triplicate flasks from three independent experiments. (D) Primary mouse hepatocytes isolated from Apc^{ko} or control mice 6 days after tamoxifen injection were cultured for 1 hour in presence of 6 mM [2-^{14}C] pyruvate. Left panel: oxidation rates into [$^{14}CO_2$]. **P<0.01 and ***P<0.005.

Figure 5: β-catenin activated hepatocytes oxidize preferentially fatty acids.

Primary mouse hepatocytes isolated from Apc^{ko} or control mice 6 days after tamoxifen injection were cultured for 24h in presence of 10 mM glucose (A-C) or 25 mM glucose and 100 nM insulin (D). For the last two hours of culture, albumin bound [1-^{14}C] oleate (0.3 mM) was added. (A) Left panel: oleate oxidation into [$^{14}CO_2$] and [^{14}C] acid soluble products (ASP). Right panel: ketone bodies production in presence or in absence of oleate. Light grey and dark grey boxes: production in absence of oleate in control and Apc^{ko} respectively, white and black boxes production in presence of 0.3 mM oleate in control and Apc^{ko} respectively. (B) Immunoblot analysis of cellular extracts using specific antibodies for HMGCoAS2, Bdh1 and γ tubulin. (C) After thin layer chromatography (TLC) of the lipid extracts, esterification rates into TAG, DAG, PL and cholesteryl esters were quantified. (D) Oleate oxidation into CO_2 and [^{14}C] acid soluble products (ASP) in presence of 25 mM glucose and 100 nM insulin.

Figure 6: Fatty acid oxidation fuels the oxidative phosphorylation and promotes Apc^{ko} hepatocyte proliferation

(A) Mitochondrial respiration was determined in basal conditions, in the presence of oligomycin (1 mg/mL; leak) and in the presence of increasing amounts of CCCP(1–20 mmol/L) to determine the maximal respiration rate. Left panel: in presence of succinate, right panel in presence of glutamate/malate, lower panel: in presence of palmitoyl-carnitine. White boxes: control hepatocytes homogenate. Black Boxes: Apc^{ko} hepatocytes homogenates. Results are means ± S.E.M. of triplicate from three independent experiments. ***P<0.005 (B) ATP production rates over a three minute period of time in hepatocytes incubated in presence of either 0.3 albumin bound oleate or 25 mM glucose. White boxes: control hepatocytes. Black Boxes: Apc^{ko} hepatocytes. Results are means ± S.E.M. of

quadruplicates from two independent experiments. **P<0.01. (C) Doubling time analyzed by impedance measurement in real time over a 30 hour period of time, in presence of either 0.3 mM oleate or in presence of 0.3 mM oleate and etomoxir.

Figure 7: Fatty acid oxidation is mandatory to β-catenin tumorigenesis

(A) Immunoblot analysis of nuclear extracts from control, Apc^{ko} and $PPAR\alpha^{ko}$ mouse livers using specific antibodies for PPARα and P84 proteins. (B) Left panel: immunostaining of glutamine synthetase on liver section from control, Apc^{ko}, $PPAR\alpha^{ko}$ and $Apc^{ko}/PPAR\alpha^{ko}$ mice 6 days after tamoxifen injection. Right Panel: control, Apc^{ko}, $PPAR\alpha^{ko}$ and $Apc^{ko}/PPAR\alpha^{ko}$ liver tissue explants were maintained for 2 hours in a media containing 0.3mM albumin bound [1-^{14}C] oleate and oleate oxidation into CO_2 was quantified. Light grey box: $PPARa^{-/-}$, white box: control, black box: Apc^{ko} and dark grey box: $Apc^{ko}/ PPAR\alpha^{-/-}$ liver explants. (C) β-catenin tumorigenesis in $PPAR\alpha^{ko}$ livers. Upper panels: immunostaining for β-catenin expression showing accumulation in the tumor (T), for glutamine synthetase showing staining of the tumor and of hepatocytes around the central vein in non-tumor tissues of $Apc^{ko}/ PPAR\alpha^{-/-}$.Left panel: tumoral load was quantified at time of sacrifice. Grey box: $Apc^{ko}/ PPAR\alpha^{-/-}$, black box: $Apc^{ko.}$ Tumoral penetrance was analyzed as the percentage of mice presenting a tumor at each time point. Greyline: $Apc^{ko}/ PPAR\alpha^{ko}$ mice (n=17). Black line: Apc^{ko} mice (n=18)**.**

SUPPLEMETARY FIGURE LEGENDS

SI1 Tumor development in Apc^{ko} mice

(A) Left panel: echography imaging of liver from Apc^{ko} mice 5 months after *Apc* deletion. Right panel: macroscopic appearance of representative tumors from Apc^{ko} mice 7 months after *Apc* deletion. Arrowhead indicates tumors. (B) Tumor penetrance after *apc* deletion. n=18. (C) Right panel: representative immunostaining for β-catenin expression showing accumulation in the tumor (T), for glutamine synthetase showing staining of the tumor and of hepatocytes around the central vein (cv) in non-tumor tissues (NT).

SI2 Glucose metabolism in β catenin activated hepatocytes

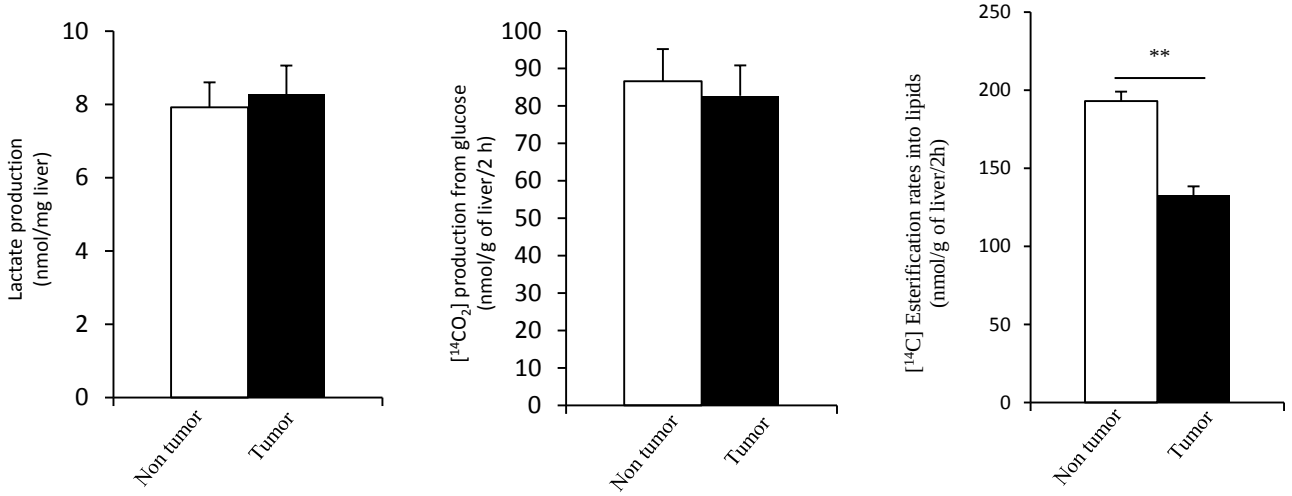
Pan lobular β catenin activation was achieved 6 days after tamoxifen injection. (A) Primary mouse hepatocytes isolated from Apc^{ko} or control mice 6 days after tamoxifen injection were cultured for 24h in presence of 25 mM glucose and 100 nM insulin. For the last three hours of culture [U-^{14}C] glucose was added. Left panel: Glucose concentration in the culture media. Righ panel: Ldh activity in primary hepatocytes. White boxes: control hepatocytes. Black boxes: Apc^{ko} hepatocytes. (B) Immunoblot analysis of mitochondria extracts using specific antibody for Pdh, phospho-Pdh ser293, pyruvate carboxylase and porine. Center panel: relative expression of non-phosphorylated Pdh quantified on immunoblots by Image Lab software (Biorad). Right panel: Pdh activity assayed by oxidation of [1-^{14}C] pyruvate into [$^{14}CO_2$]. Results are means ± S.E.M. of triplicate flasks from three independent experiments.

SI3 Fatty acid metabolism in β catenin activated hepatocytes

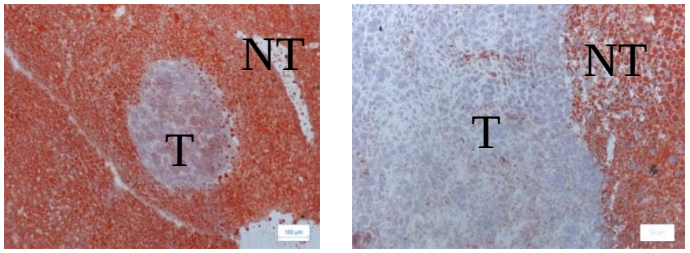
(A) Primary mouse hepatocytes isolated from Apc^{ko} or control mice 6 days after tamoxifen injection were cultured for 24h in presence of 25 mM glucose and 100nM insulin. After TLC separation, triglycerids content was quantified. (B) Explants from either Apc^{ko} or control mouse livers were cultured for 2 hours in presence of [1-^{14}C] oleate and oxidation rates into [$^{14}CO_2$] were quantified. White boxes: control liver explants. Black boxes: explants from Apc^{ko} mouse livers. (C) Ketone body production in absence of exogenous oleate and presence of vehicle (light grey box) or atglistatin 40 µM (dark grey box). (D) Overall oleate fate analysis. (E) Left panel: Daily food intake and fat mass analysis in Apc^{ko} or control mouse following tamoxifen injection. Right panel: respiratory quotient (VCO2/VO2) of Apc^{ko} or control mice fed *ad libitum*.

Figure 1

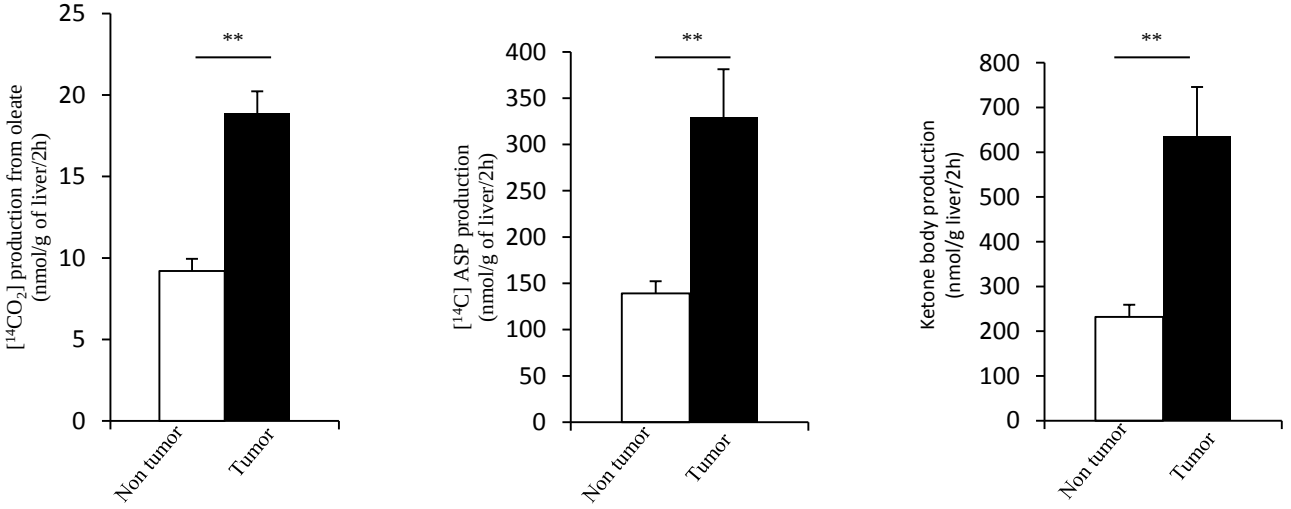
(A)



(B)



(C)



(D)

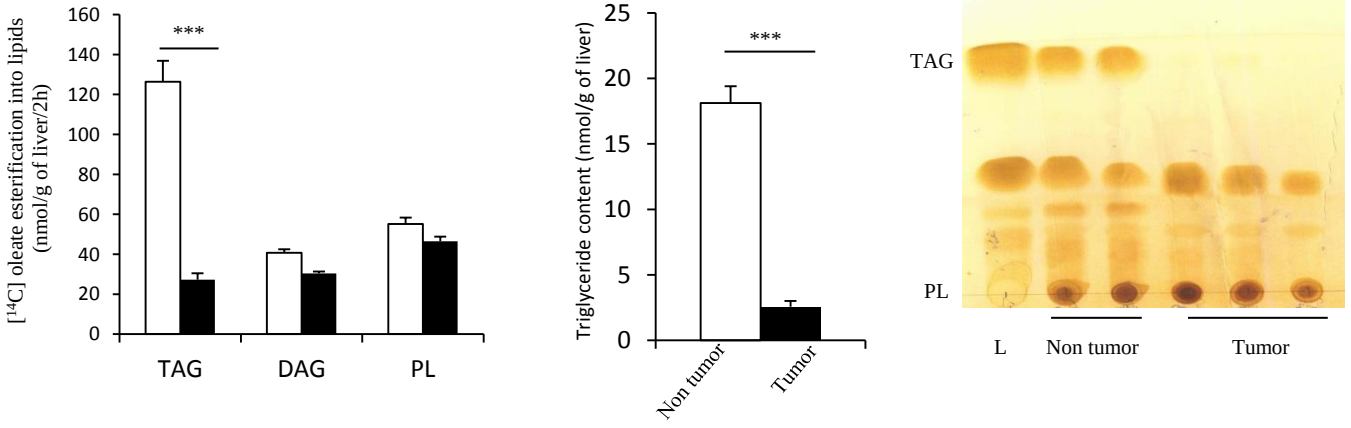
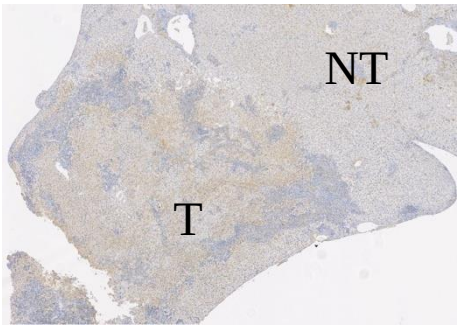
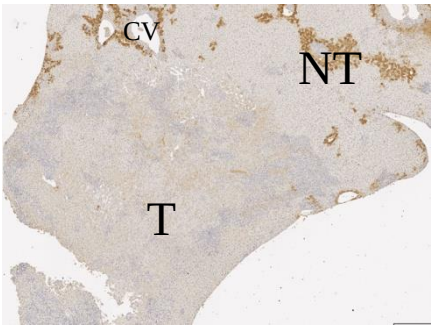


Figure 2

(A)

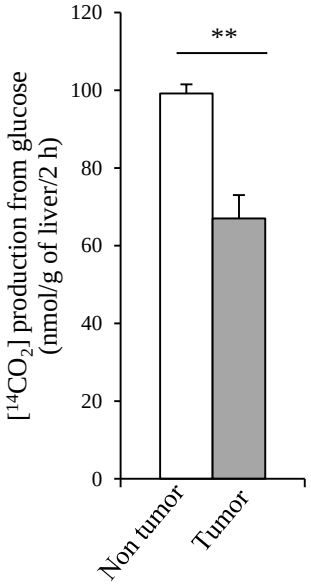


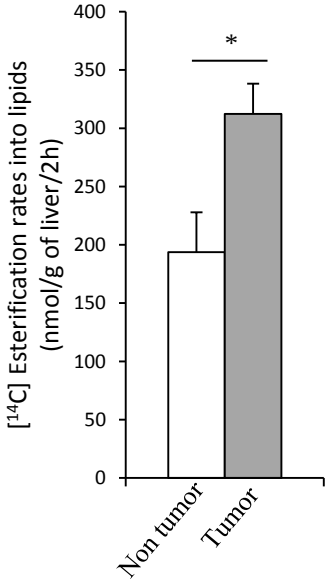
β-catenin



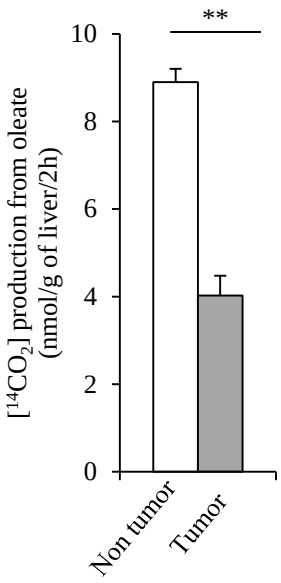
Glutamine synthetase

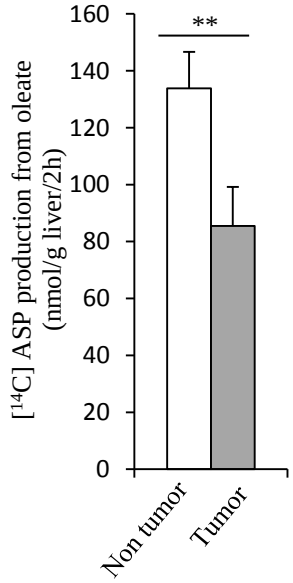
(B)





(C)





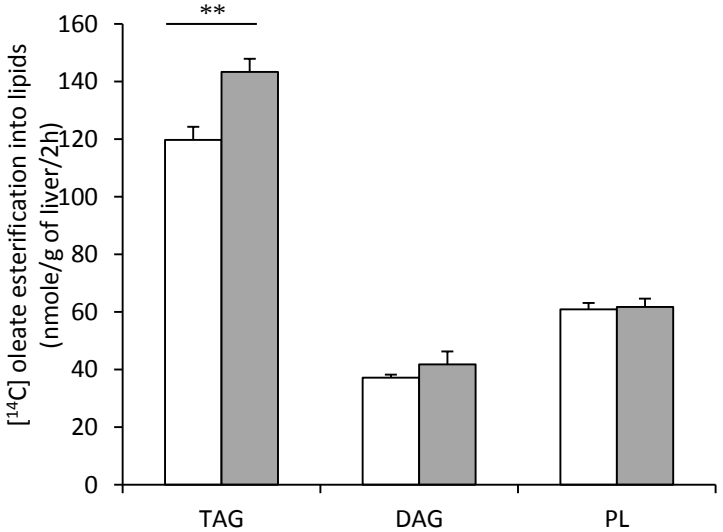


Figure 3

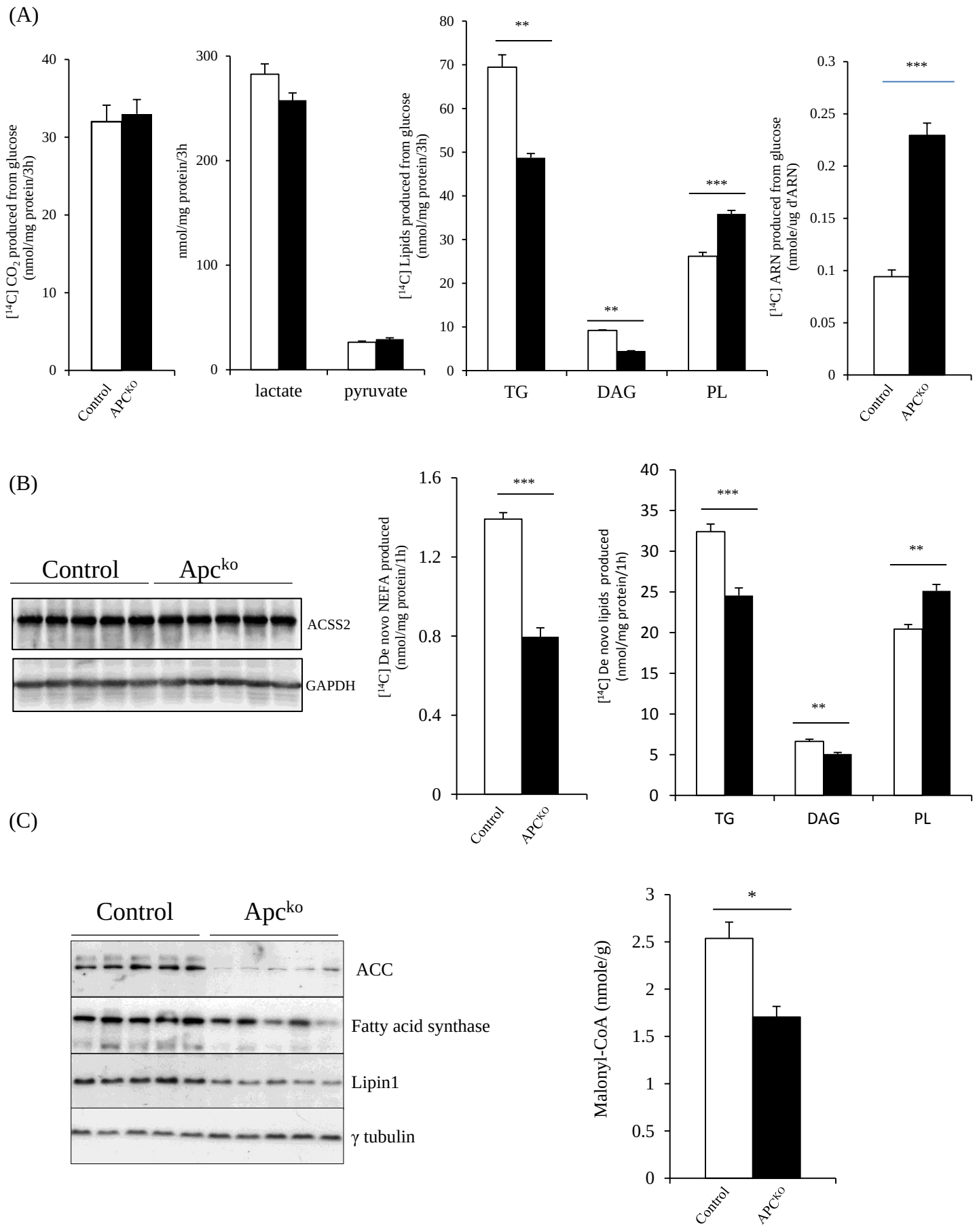
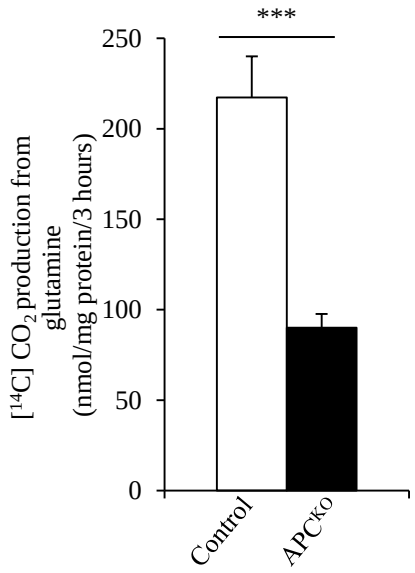
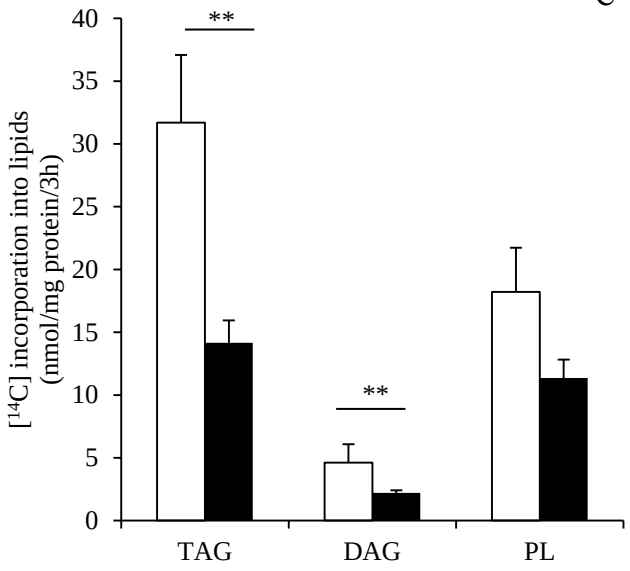

(A)
[14C] CO2 produced from glucose (nmol/mg protein/3h)
Control
APCKO
nmol/mg protein/3h
lactate
pyruvate
[14C] Lipids produced from glucose (nmol/mg protein/3h)
TG
DAG
PL
[14C] ARN produced from glucose (nmole/ug d'ARN)
(B)
Control
Apcko
ACSS2
GAPDH
[14C] De novo NEFA produced (nmol/mg protein/1h)
[14C] De novo lipids produced (nmol/mg protein/1h)
(C)
Control
Apcko
ACC
Fatty acid synthase
Lipin1
γ tubulin
Malonyl-CoA (nmole/g)

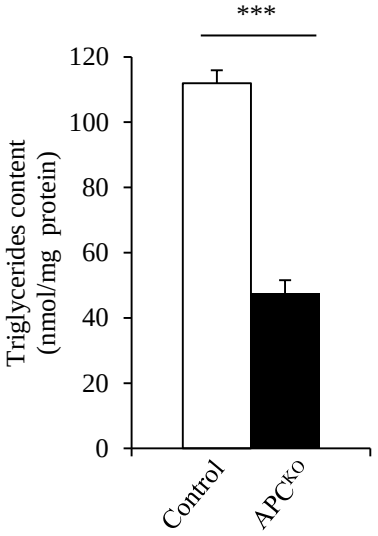
Figure 4

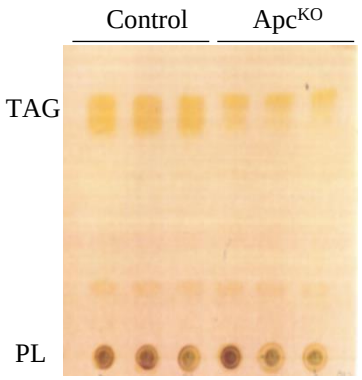
(A)



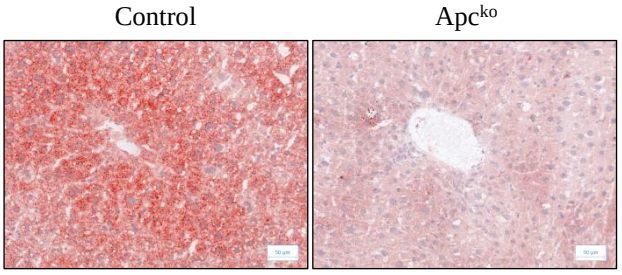
(B)







(C)



(D)

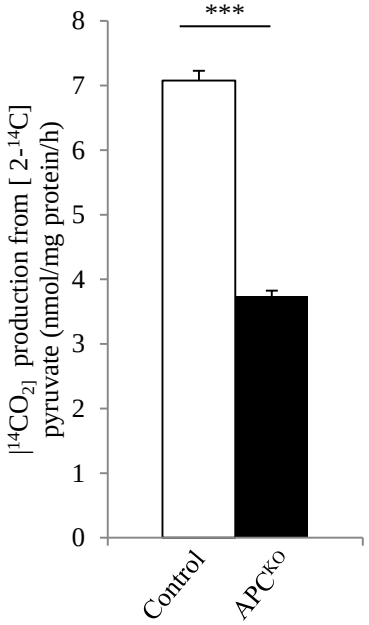
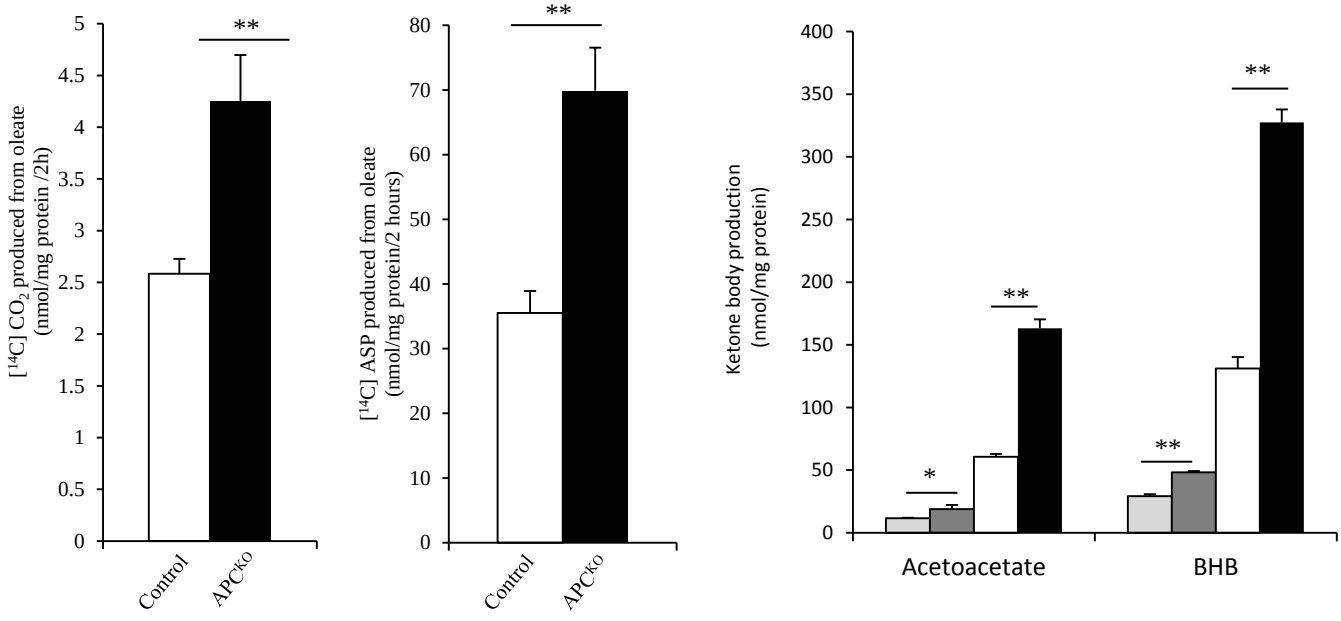
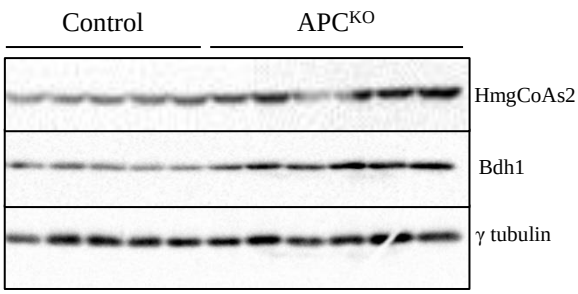


Figure 5

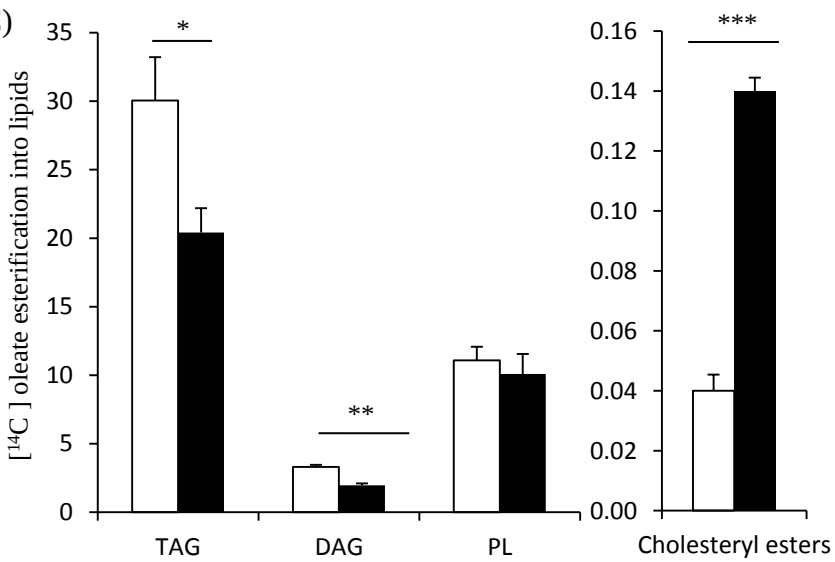
(A)



(B)



(C)



(D)

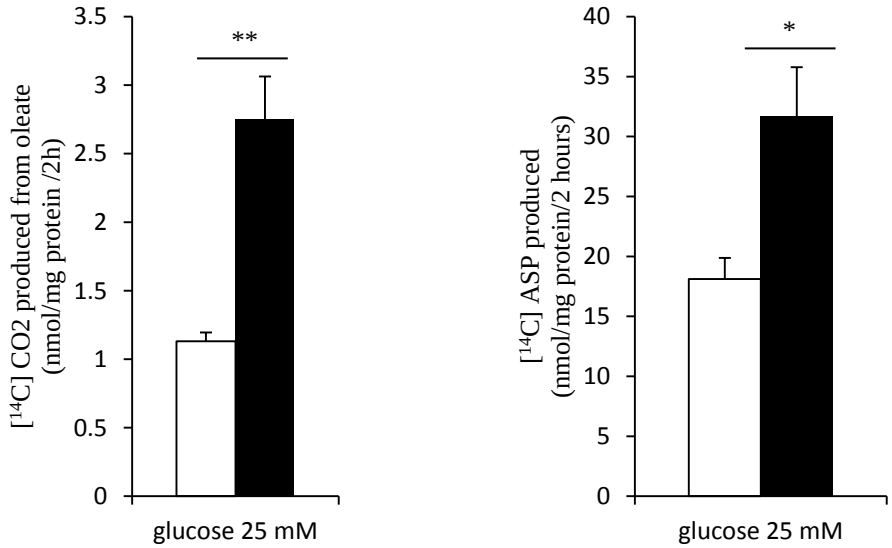


Figure 6

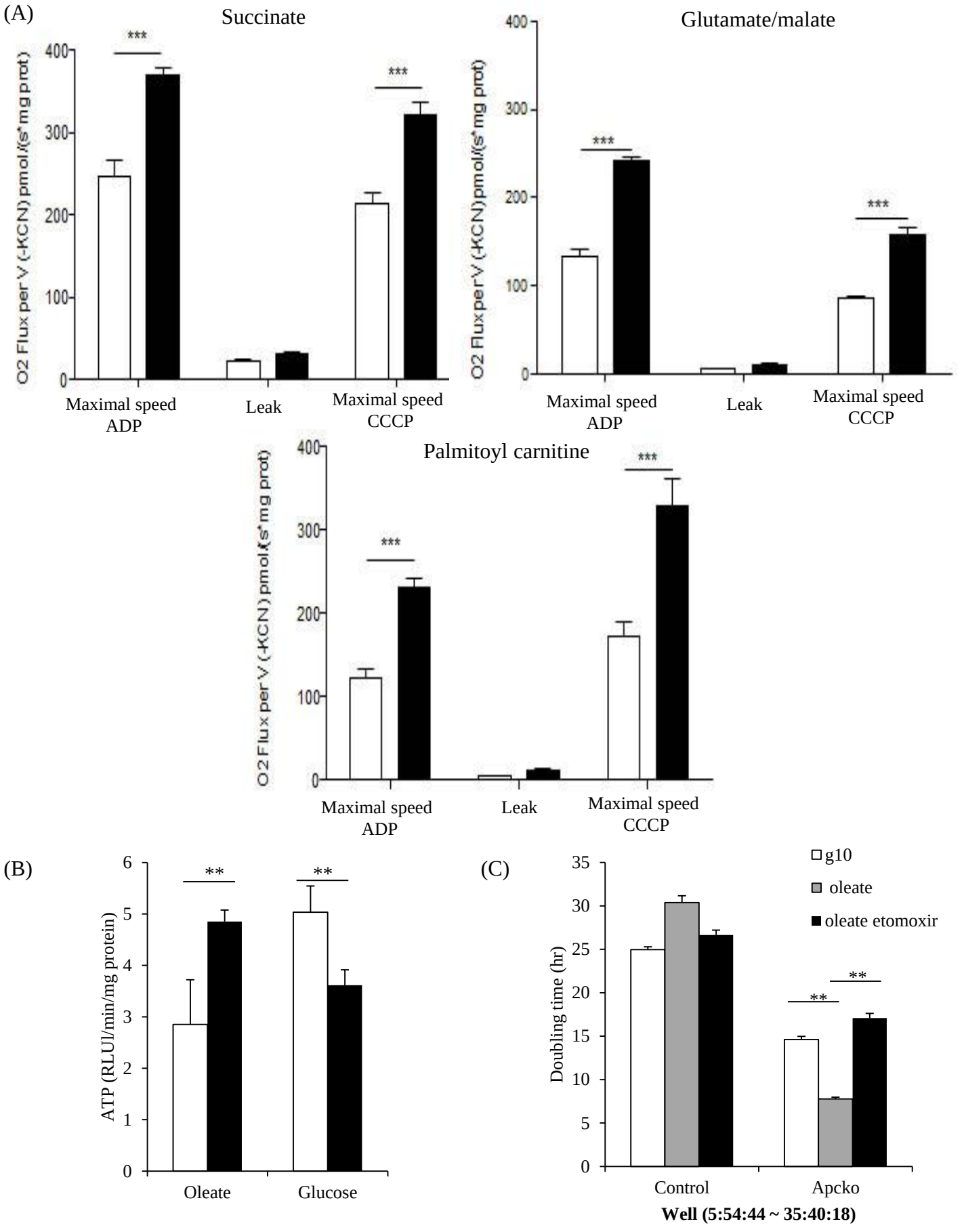
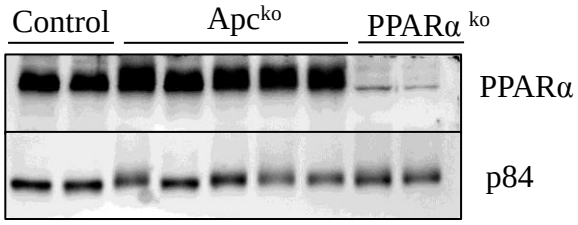
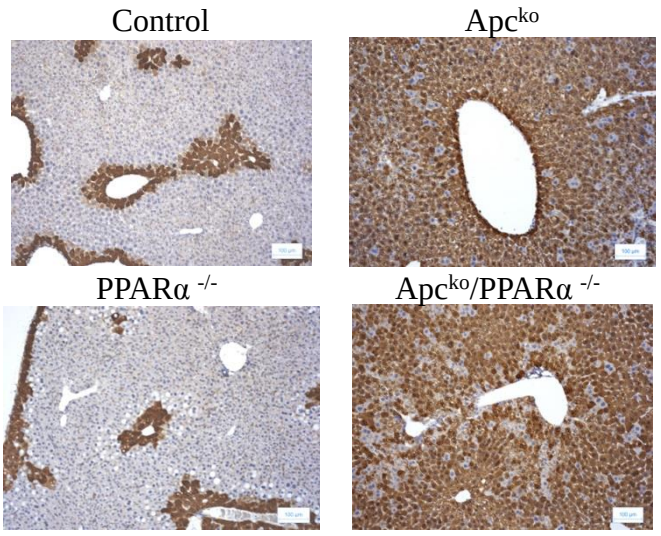

(A)
Succinate
Glutamate/malate
Palmitoyl carnitine
O2 Flux per V (-KCN) pmol/(s*mg prot)
400
300
200
100
0
***
Maximal speed ADP
Leak
Maximal speed CCCP
(B)
ATP (RLUl/min/mg protein)
6
5
4
3
2
1
0
**
Oleate
Glucose
(C)
Doubling time (hr)
35
30
25
20
15
10
5
0
g10
oleate
oleate etomoxir
Control
Apcko
Well (5:54:44 ~ 35:40:18)

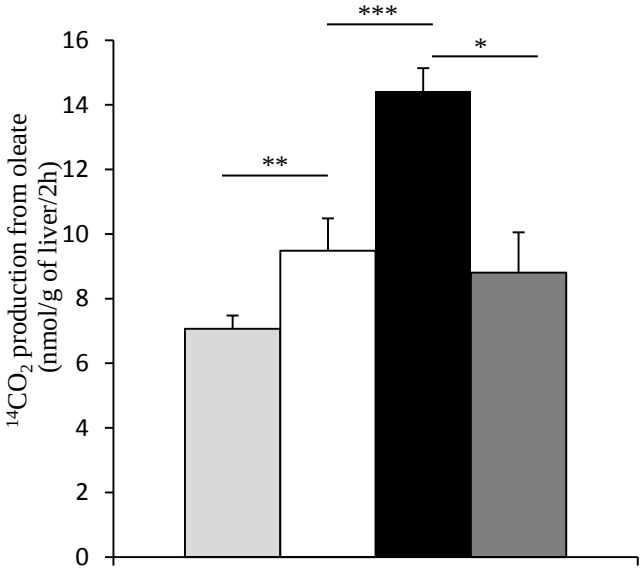
Figure 7

(A)

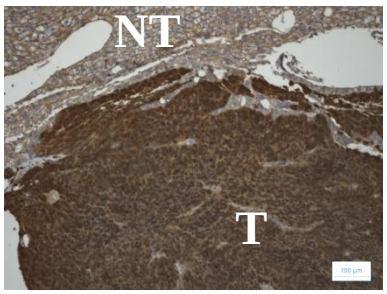


(B)

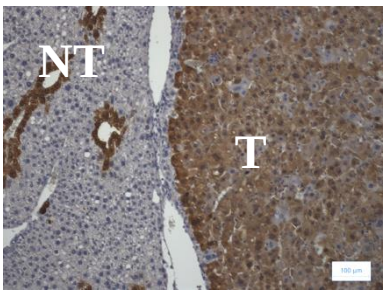




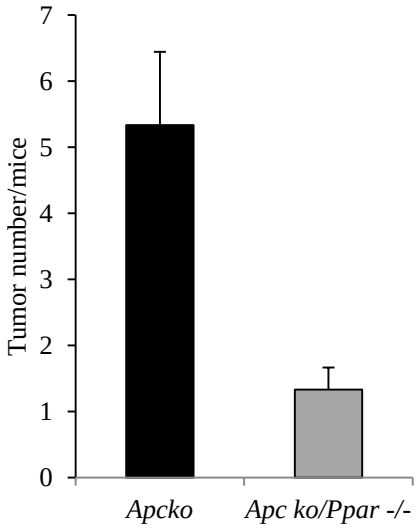
(C)



β-catenin



Glutamine synthetase



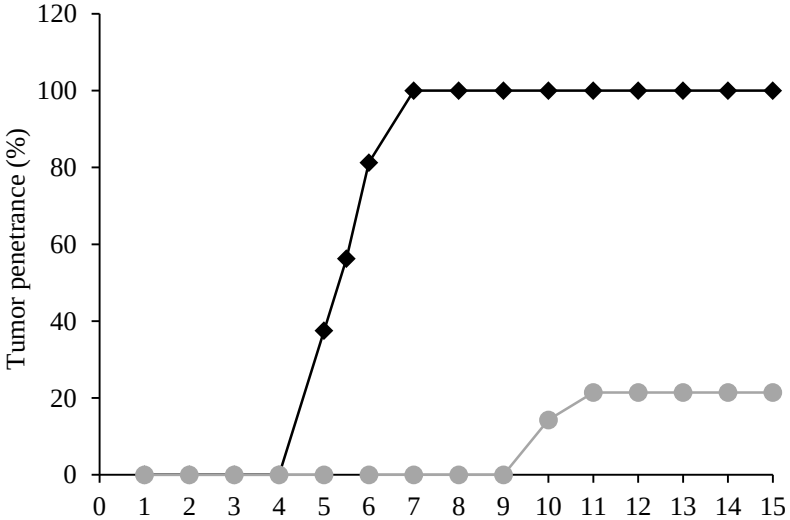
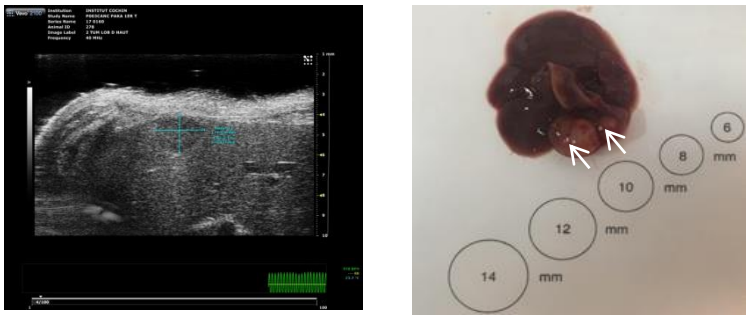
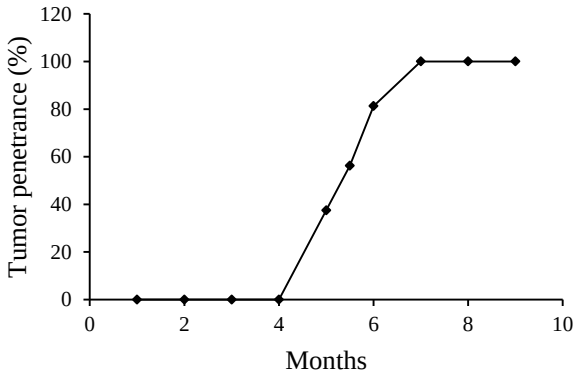


Figure SI1

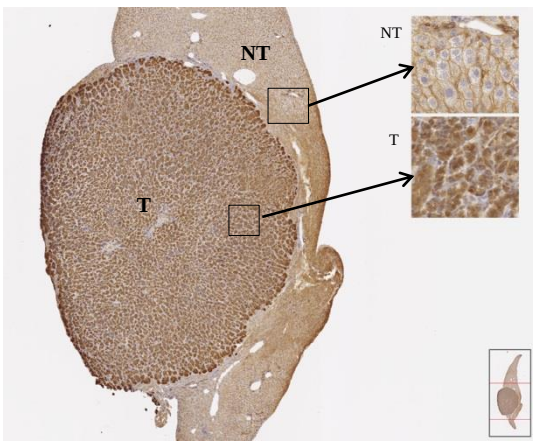
(A)



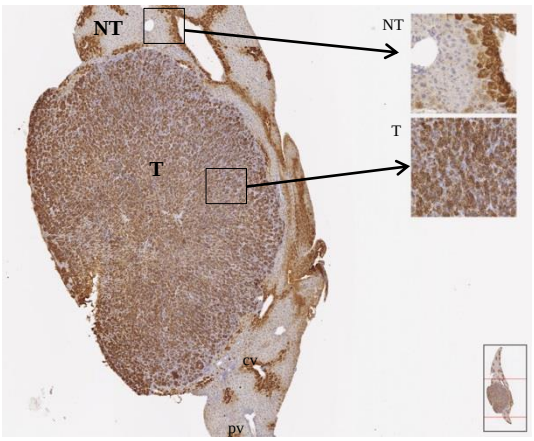
(B)



(C)



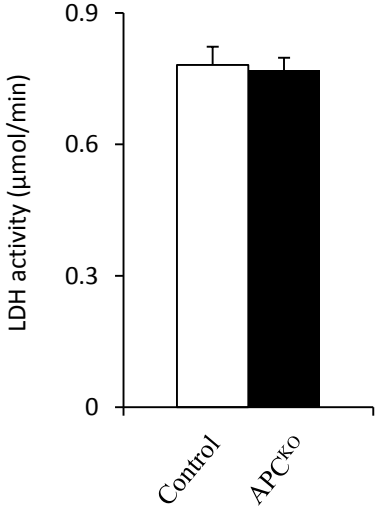
β-catenin

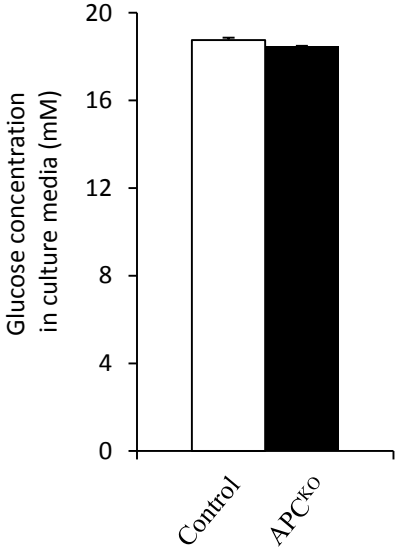


Glutamine synthetase

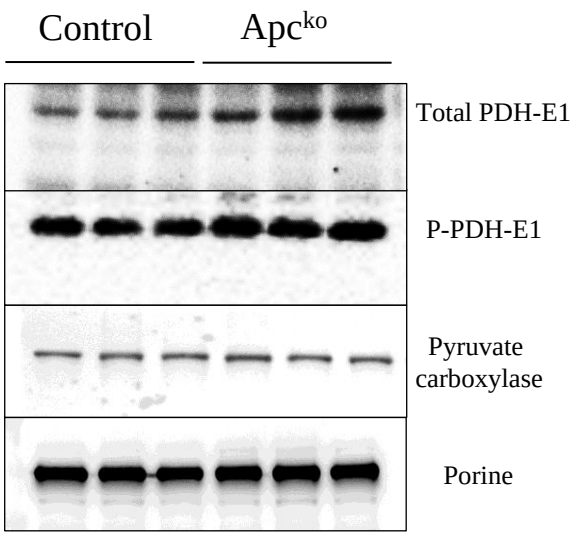
SI2

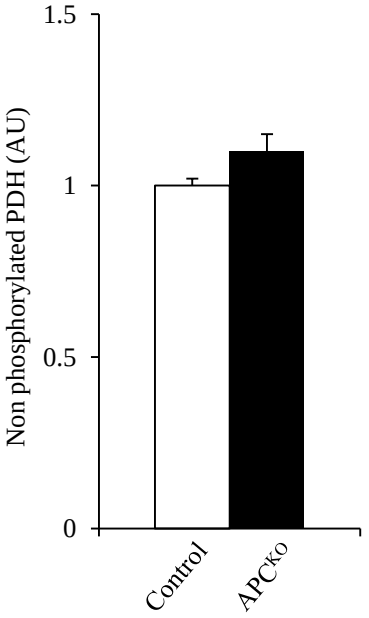
(A)

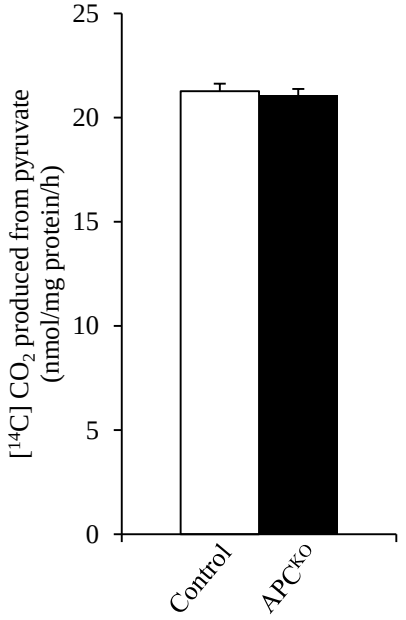

LDH activity (µmol/min)
0.9
0.6
0.3
0
Control
APC^KO


Glucose concentration in culture media (mM)
20
16
12
8
4
0
Control
APC^KO

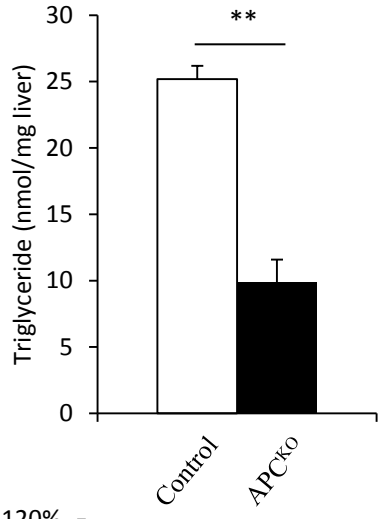
(B)


Control
Apc^ko
Total PDH-E1
P-PDH-E1
Pyruvate carboxylase
Porine

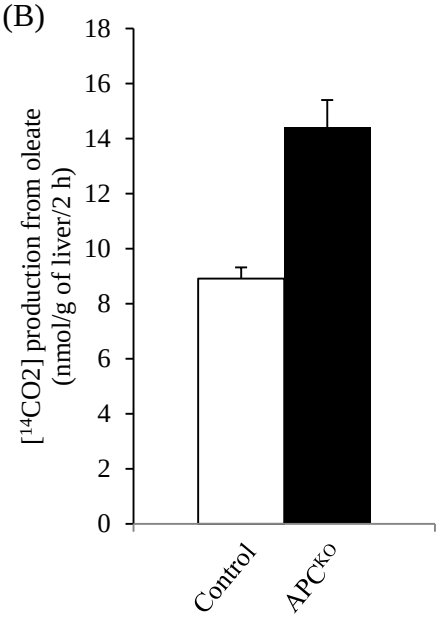

Non phosphorylated PDH (AU)
1.5
1
0.5
0
Control
APC^KO


[14C] CO2 produced from pyruvate (nmol/mg protein/h)
25
20
15
10
5
0
Control
APC^KO

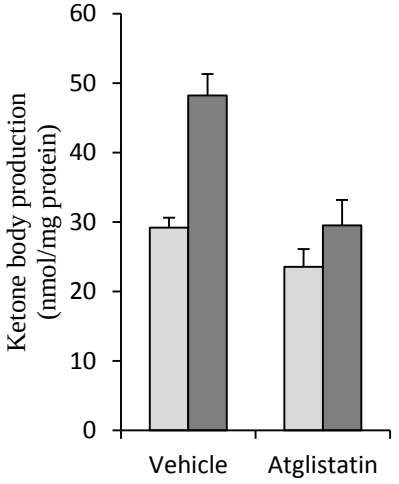
(A)


Triglyceride (nmol/mg liver)
30
25
20
15
10
5
0
**
Control
APCKO

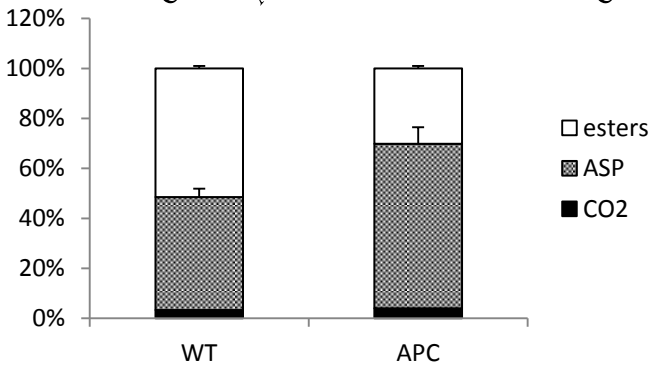
(B)


[14CO2] production from oleate (nmol/g of liver/2 h)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Control
APCKO

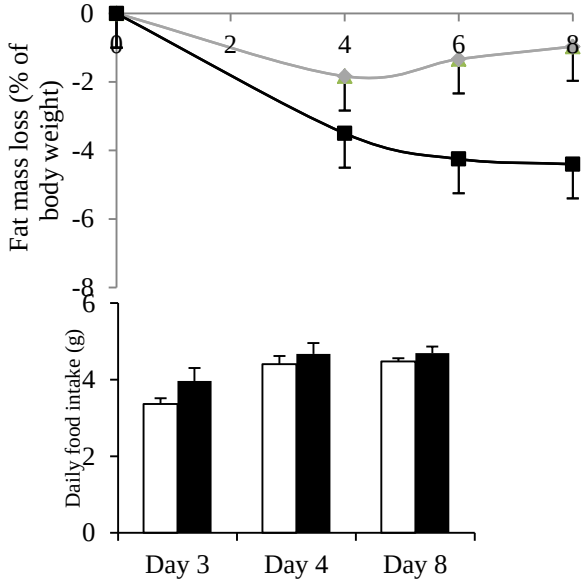
(C)

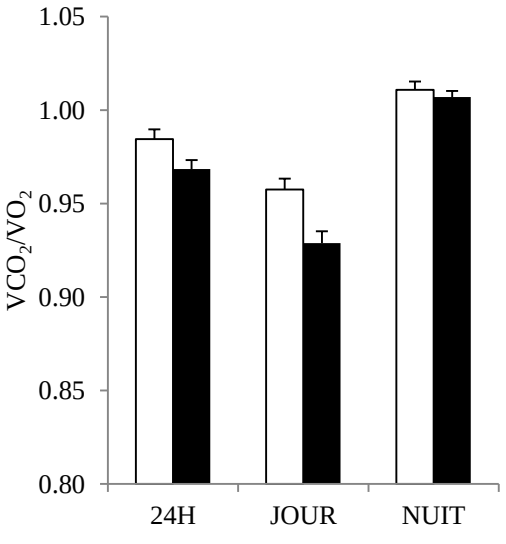

Ketone body production (nmol/mg protein)
60
50
40
30
20
10
0
Vehicle
Atglistatin

(D)


120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
esters
ASP
CO2
WT
APC

(E)


Fat mass loss (% of body weight)
0
-2
-4
-6
-8
0
2
4
6
8
Daily food intake (g)
6
4
2
0
Day 3
Day 4
Day 8


VCO2/VO2
1.05
1.00
0.95
0.90
0.85
0.80
24H
JOUR
NUIT

Discussion

Il est admis depuis de nombreuses années maintenant que la reprogrammation métabolique est une caractéristique majeure des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette modification du métabolisme est le résultat d'un ensemble de facteurs environnementaux et génétiques permettant aux cellules tumorales de pouvoir proliférer sans contrainte et de survivre en maintenant l'équilibre rédox. Il a été montré que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur jouaient un rôle prépondérant dans la mise en place du métabolisme particulier propre à chaque tumeur (Pavlova and Thompson, 2016). De plus, Il est apparu que le métabolisme tumoral présentait un fort potentiel à la fois pour le diagnostic des tumeurs mais également pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, démontrant ainsi l'importance de connaitre et de comprendre le métabolisme particulier inhérent à chaque tumeur (Vander Heiden, 2011).

La β-caténine est une protéine responsable notamment de la régulation et de la zonation de nombreuses fonctions métaboliques hépatiques (Torre et al., 2010). Les mutations activatrices du gène *CTNNB1* codant la β-caténine sont responsables d'environ 20 à 40% des carcinomes hépatocellulaires (Zucman-Rossi et al., 2015). Ces tumeurs présentent un phénotype particulier puisque, contrairement aux autres CHC, elles ne sont jamais stéatosiques et sont très souvent cholestatiques. Ceci suggére ainsi un métabolisme propre aux CHC liés à l'activation aberrante de la β-caténine (Audard et al., 2007).

Nous avons montré que les CHC et les hépatocytes présentant une activation aberrante de la β-caténine (modèle Apc^{KOliv}, appelé également modèle prétumoral) possédaient un métabolisme bien particulier caractérisé notamment par une dépendance à l'oxydation des acides gras.

Phénotype métabolique des hépatocytes et tumeurs présentant une activation aberrante de la β-caténine

Activation de la β-caténine et utilisation du glucose

La reprogrammation métabolique se traduit dans de nombreuses tumeurs par l'effet Warburg, c'est-à-dire une augmentation de la glycolyse même en condition aérobie. Dans ce cas, le glucose est orienté principalement vers la production de lactate plutôt que vers la mitochondrie où il permettrait d'alimenter les oxydations phosphorylantes (OXPHOS) (Pavlova and Thompson, 2016). Le PET-scan ^{18}Fluorodéoxyglucose (PET-scan FDG) est une

méthode d'imagerie médicale basée sur cette caractéristique, elle permet en effet de détecter les zones présentant une forte utilisation du glucose (Croteau et al., 2016). En 2009, l'étude de Chafey *et al.* menée dans notre équipe, a montré que les foies présentant une activation de la β-caténine dans tout le lobule hépatique (modèle Apc^{KOliv}) ne présentaient pas une augmentation du captage du FDG par rapport aux foies contrôles (Chafey et al., 2009). Nous montrons ici sur le modèle Apc^{KOliv} que l'entrée dans la cellule et l'oxydation du glucose ne sont pas altérées par rapport aux contrôles. D'autre part, les études de l'équipe ont mis en évidence que l'expression des transporteurs du glucose Glut1 et Glut2, ainsi que celle des enzymes de la glycolyse, L-PK, GK et HK1 et HK2 ne sont pas altérées dans les foies Apc^{KOliv}, contribuant ainsi au maintien d'une entrée et d'un flux glycolytique normal. De plus, bien que l'expression de la LDHa soit augmentée (Chafey et al., 2009), nous montrons ici que ni son activité, ni les niveaux de lactate extra- et intra-cellulaires ne sont modifiés dans les foies Apc^{KOliv} (cf. Article Fig. 3A et SI2A). La LDHa catalyse l'interconversion du pyruvate en lactate (et vice versa), l'orientation de la réaction dépendra principalement du ratio NADH/NAD cytoplasmique. Ainsi les ratios de lactate/pyruvate vont être très fortement corrélés à la quantité de NADH et de NAD cytoplasmique. Ce ratio reste constant entre les Apc^{KOliv} et leurs contrôles et n'est pas altéré non plus par une plus grande quantité de LDHa. Finalement la présence d'une plus grande quantité de LDHa n'altère pas le sens de la réaction dans les foies Apc^{KOliv} ni la quantité produite. Nous avons retrouvé les mêmes résultats concernant l'utilisation du glucose et la production de lactate sur le modèle CHC-Apc^{KO} mettant en évidence l'absence d'effet Warburg dans les carcinomes hépatocellulaires présentant une activation aberrante de la β-caténine (cf. Article Fig. 1A). De plus, les données générées dans notre équipe, et non encore publiées, montrent que ces tumeurs murines ne sont pas non plus détectées en PET-scan FDG (cf. Annexe 1). D'autre part, ces travaux sur une cohorte humaine de 18 patients atteints de CHC montrent que plus de 80% des CHC mutés pour la β-caténine ne sont pas détectables en PET-Scan FDG. Ces données pourraient expliquer alors le fait que le PET-scan FDG soit une méthode peu sensible et peu satisfaisante pour la détection des CHC β-caténine (Trojan et al., 1999).

La surproduction de lactate dans les tumeurs est souvent associée à un défaut de l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs et donc une oxydation du glucose diminuée (Feron, 2009; McFate et al., 2008). Cette entrée nécessite la transformation du pyruvate en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Dans nos modèles, n'ayant pas d'orientation accrue du glucose vers le lactate, nous avons donc voulu savoir si les carbones

du glucose pouvaient effectivement être utilisés dans la mitochondrie. Dans des tumeurs présentant un effet Warburg, il a souvent été observé une augmentation de l'expression des pyruvate déshydrogenase kinases. Ces enzymes, en phosphorylant la PDH, inhibent son activité et donc l'utilisation du pyruvate dans le cycle de Krebs. Cette diminution explique en partie la diminution de l'oxydation du glucose observé dans les tumeurs de type Warburg. L'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK 4) est augmentée dans les foies Apc^{KOliv} (Gougelet et al., 2014). J'ai bien observé une augmentation de la phosphorylation de la PDH, mais également une augmentation de son expression. Globalement l'expression de la forme active de la PDH (non phosphorylée) et son activité, évaluée par la production de $^{14}CO_2$ à partir de pyruvate marqué au ^{14}C sur son premier carbone (1-C pyruvate), ne sont pas altérées dans les hépatocytes Apc^{KOliv} (cf. Article Fig. SI2B). De plus, dans une expérience de flux effectuée avec ce pyruvate 1-^{14}C, mais cette fois en présence de glucose, nous n'avons pas observé de différence d'activité de la PDH. Ce résultat indique que la quantité de pyruvate non radioactif produite à partir du glucose est similaire entre un foie Apc^{KOliv} et un foie sain. Il apparait donc qu'il y ait un flux glycolytique et une entrée du produit de la glycolyse, c'est-à-dire le pyruvate, dans le cycle de Krebs similaires entre les Apc^{KOliv} et leurs contrôles. On peut alors s'interroger sur le devenir et l'utilisation des carbones du glucose dans les cellules Apc^{KOliv}.

Il est souvent observé dans les tumeurs une induction de la synthèse *de novo* d'acides gras. Le citrate, intermédiaire du cycle de Krebs, est le précurseur de ces acides gras. Ainsi, les cellules tumorales utilisent le glucose ou la glutamine pour synthétiser ce citrate et finalement des acides gras. Nous avons donc évalué l'utilisation du glucose dans la voie lipogénique. L'augmentation de cette voie dans les cellules tumorales est souvent associée à l'induction de l'ATP citrate lyase (ACLY) et de la fatty acid synthase (FAS) (Little and Kridel, 2008; Zaidi et al., 2012). Les résultats publiés par l'équipe précédemment et ceux de notre étude montrent que l'expression aberrante de la β-caténine dans des hépatocytes entraine une diminution de ces enzymes (Chafey et al., 2009; Gougelet et al., 2014). Les acides gras produits par la lipogenèse possèdent une chaîne supérieure à 16 carbones. Or, le métabolome réalisé par notre équipe montre à l'état nourri (et donc en situation lipogénique) une diminution globale des acides gras dont la chaine est égale ou supérieure à 16 carbones dans les hépatocytes Apc^{KOliv}, suggérant ainsi un défaut de lipogenèse. D'autre part, comme décrit plus haut, la production *de novo* d'acides gras dans les tumeurs se fait principalement à partir du glucose ou de la glutamine. Nous montrons dans notre étude que la lipogenèse à

partir de ces deux substrats est diminuée dans les hépatocytes Apc^{KOliv}. Nos flux réalisés avec de l'acétate radiomarqué montrent bien que cette diminution n'est pas associée à une altération du flux glycolytique mais bien à une diminution de la synthèse *de novo* d'acides gras. De façon cohérente, à l'état nourri, nous avons observé une diminution du contenu en triglycérides dans les foies activés pour la β-caténine, comparativement aux foies contrôles, cette diminution pouvant être attribuée, en partie du moins, à une lipogenèse moins active (cf. Article Fig. 3 et 4).

De façon intéressante, bien que la lipogenèse soit globalement diminuée, nous avons observé une orientation préférentielle des acides gras néosynthétisés vers une synthèse de phospholipides (cf. Article Fig. 3). Les résultats du métabolome effectué par l'équipe ont également montré une composition en phopholipides différentes dans les foies délétés pour Apc par rapport aux contrôles, avec en particulier une augmentation de la proportion en phosphatidyl-choline. Cette réorientation est en partie due à une augmentation de l'expression des enzymes de synthèse des phospholipides et contribue aussi à la forte consommation de choline de ces cellules (cf. Annexe 1). La prolifération cellulaire implique la production d'éléments nécessaires à la constitution de membranes cellulaires, et les phospholipides font parties intégrantes de ces constituants. La production préférentielle de phospholipides, et leur composition particulière, dans les cellules activées pour la β-caténine permettraient à la fois de synthétiser les membranes cellulaires mais également de conférer des propriétés particulières aux cellules tumorales. De façon cohérente, nous avons observé une augmentation de l'estérification de l'oléate sur le cholesterol dans les foies Apc^{KOliv} (cf. Article Fig. 5C). Les esters de cholesterol sont aussi un des composants majeurs des membranes cellulaires. Ainsi, si on compare le devenir des lipides dans les hépatocytes β-caténine activée et leurs contrôles : un hépatocyte quiescent stocke préférentiellement les lipides néosynthétisés. En revanche, un hépatocyte β-caténine activée sortira de quiescence, ne stockera pas les lipides, mais synthétisera les composants nécessaires aux membranes de sa cellule fille. Il semble alors évident que les carbones du glucose ne sont pas majoritairement utilisés pour la synthèse *de novo* d'acides gras, mais alors dans quel but sont-ils utilisés?

Activation de la β-caténine et surproduction de glutamine

Nous avons observé une diminution de l'oxydation du pyruvate dans le cycle de Krebs (cf. Article Fig. 4D). Ce résultat, associé à l'augmentation de des niveaux de glutamine et à l'augmentation de l'expression des enzymes conduisant à sa synthèse dans les foies Apc^{KOliv} semble indiquer une sortie massive des carbones du glucose vers la glutamine. La glutamine

est l'acide aminé le plus abondant du corps humain. Il a été montré que de nombreuses tumeurs présentent une addiction à la glutamine et l'utilisent dans un but anaplérotique, c'est-à-dire afin de resynthétiser les intermédiaires du cycle de Krebs (Wang et al., 2010; Wise et al., 2008). On sait depuis longtemps maintenant que la GS, enzyme produisant la glutamine à partir du glutamate, est une cible canonique très fortement induite par l'activation de la β-caténine (Cadoret et al., 2002). Elle est d'ailleurs utilisée comme marqueur en anatomopathologie sur les CHC afin de déterminer s'ils présentent une activation de la β-caténine (Lo and Ng, 2011). Notre équipe a montré que la concentration de glutamine était trois fois plus importante dans les foies des souris Apc^{KOliv} (Gougelet et al., 2014). De plus, la Gls2, enzyme permettant la conversion de la glutamine en glutamate, et donc son utilisation par le cycle de Krebs, est fortement réprimée par la β-caténine (Cadoret et al., 2002; Chafey et al., 2009). Nous avons montré dans le modèle Apc^{KOliv} et en utilisant de la glutamine radiomarquée au ^{14}C que celle-ci n'était pas oxydée dans le cycle de Krebs (cf. Article Fig. 4). L'ensemble de ces résultats indique que l'activation de la β-caténine, dans les hépatocytes et CHC, induit une surproduction de glutamine à partir du glucose et celle-ci n'est pas utilisée dans un but anaplérotique.

La vitesse de synthèse de l'ATP à partir du glucose est moindre dans les Apc^{KOliv} (cf. Article Fig.6B). De plus, l'utilisation des substrats alimentant les complexes I et II donnait lieu à une respiration mitochondriale très efficace dans les foies Apc^{KOliv} (cf. Article Fig. 6A). Ainsi, il semblerait donc qu'il y ait bien une partie des carbones du glucose qui soit utilisée dans une voie non productrice d'ATP, telle que la glutaminogenèse. Bien qu'il semble de prime abord que la glycolyse et l'oxydation du glucose ne soient pas différentes entre une cellule normale et une cellule présentant une activation aberrante de la β-caténine, il s'avère que ces deux cellules ne l'utilisent pas de la même façon.

On peut alors se demander quel est le devenir de cette glutamine, quel est l'intérêt pour la cellule tumorale de produire de telles quantités de cet acide aminé et surtout si cela lui confère un avantage sélectif.

Il existe des tumeurs produisant de grandes quantités de glutamine et qui ne l'utilisent pas pour la synthèse des intermédiaires du cycle de Krebs, c'est par exemple le cas de certains glioblastomes (Tardito et al., 2015). Dans ces tumeurs, il a été montré que la glutamine produite par les cellules tumorales leurs permettait notamment d'alimenter la production de purines et pyrimidines. La synthèse de ces constituants des acides nucléiques, est primordiale pour les cellules en prolifération (cf. Introduction, chapitre V). La glutamine participe à la

synthèse de ces composants notamment en donnant directement les azotes nécessaires à leur production (Cory and Cory, 2006). Les données du Chip-seq générées par l'équipe ont mis en évidence que la phophoribosyl-pyrophosphate-amidotranférase, enzyme limitante de cette voie de synthèse, était une cible positive directe de la β-caténine. Ainsi, l'utilisation de glutamine radiomarquée sur les azotes, ou bien l'utilisation d'un isotope lourd non radioactif, pourrait permettre, par une approche de flux métaboliques, d'évaluer la participation de la glutamine à la synthèse des purines et pyrimidines dans nos modèles.

De façon très intéressante, dans notre analyse des devenirs du glucose, nous avons aussi observé une augmentation de l'incorporation des carbones du glucose dans les ARN (cf. Article Fig. 3A). Cela suggère indirectement, une augmentation de l'activité de la voie des pentoses phosphate dans les hépatocytes Apc^{KOliv}. Cette voie permet à partir du glucose-6-phosphate, la production, entre autres de ribose et de déoxyribose, s'incorporant dans les nucléotides. Il semblerait donc que l'activation aberrante de la β-caténine participe, *via* la voie des pentoses phosphate, et *via* la surproduction de glutamine, à la synthèse de nucléotides

Il a aussi été montré que la glutamine inhibait l'autophagie (Nicklin et al., 2009). L'autophagie est un processus biologique catabolique durant lequel la cellule dégrade les organelles et les macromolécules de son cytoplasme afin de recycler les constituants, notamment dans des conditions pauvres en nutriments, mais elle permet également d'éliminer des organelles non fonctionnelles. Or ce processus complexe a été décrit à la fois comme pro-tumorigénique dans certains cas et anti-tumorigénique dans d'autres : Globalement, l'autophagie aurait un rôle plutôt anti-tumoral dans les cellules saines, les protégeant, en recyclant les protéines et en dégradant les organelles endommagés. Au contraire, elle serait plutôt pro-tumorale dans les cellules cancéreuses notamment en leur permettant d'obtenir leur énergie par recyclage des macromolécules (Lorin et al., 2013). Ici, compte tenu de la surproduction de glutamine, nous pouvons nous poser la question de la présence ou non d'une autophagie dans nos modèles et de l'importance de son inhibition dans la survie et la progression tumorale des tumeurs β-caténine.

D'autre part, il est important pour la cellule tumorale de maintenir l'homéostasie rédox (cf. Introduction chapitre V). La glutamine participe au maintien de ce statut notamment *via* la production de glutathion qui participe aux défenses anti-oxydantes. Il est possible que la surproduction de glutamine dans les hépatocytes et CHC activés pour la β-caténine contribue au maintien du statut rédox. De plus, associée à une augmentation de la voie des pentoses

phosphate, productrice de NADPH, l'activation de la β-caténine dans les hépatocytes contribuerait au maintien d'un ratio NADPH/NADP cytoplasmique élevé qui participe lui aussi au maintien du statut redox.

Compte tenu des rôles potentiels de la surproduction de glutamine dans la tumorigenèse liée à la β-caténine, nous pouvons nous demander quelles seraient les conséquences d'une inhibition de sa synthèse sur cette tumorigenèse. Le modèle murin présentant une double invalidation de la glutamine synthase et d'Apc a été généré par notre équipe. L'analyse du phénotype, aussi bien dans le modèle prétumoral que dans le modèle tumoral, permettra alors d'élucider l'importance de la glutamine dans la transformation cancéreuse liée à la β-caténine.

Finalement, bien qu'il soit apparu que les carbones du glucose participent à la production de macromolécules (ARN, ADN, phospholipides ...) dans les hépatocytes et CHC activés pour la β-caténine, ils ne semblent pas être la source de leur énergie.

Source d'énergie des CHC activés pour la β-caténine

Nous nous sommes intéressés à l'autre source d'énergie potentielle du foie, à savoir les acides gras. En effet, le foie sain à l'état post-absorptif, utilise les acides gras comme source principale d'énergie. Les flux réalisés avec de l'oléate, un acide gras à chaîne longue (C18, monoinsaturé), ont montré que les cellules et les CHC activés pour la β-caténine étaient caractérisés par une augmentation importante de la β-oxydation, associée à une activation de la cétogenèse, aussi bien à l'état de jeûne qu'à l'état renourri. Nous nous sommes alors interrogés sur ce qui permettait de maintenir cette oxydation des acides gras élevée et constante.

L'augmentation de synthèse des corps cétoniques est ici associée à l'augmentation de l'expression de deux enzymes de la cétogenèse : l'HGMCS2 et la BDH1 (cf. Article Fig.5). La cétogenèse permet de prendre en charge l'excédent d'acétyl-CoA produit par la β-oxydation. L'acétyl-CoA est un inhibiteur des enzymes de la β-oxydation. La vitesse maximale du cycle de Krebs étant limitée, la cétogenèse mise en place dans le foie permet donc d'éviter l'accumulation d'acétyl-CoA (et donc l'inhibition de la β-oxydation). D'autre part, la production de corps cétoniques permet aussi un recyclage des CoA à moindre frais, fournissant du CoA libre nécessaire au bon fonctionnement de nombreuses voies métaboliques telles que l'oxydation des acides gras (Girard et al., 1992). Nous avons par

ailleurs bien une augmentation de la quantité de CoA libre dans les Apc^{KOliv}. Ainsi, l'augmentation de la cétogenèse permet de maintenir une β-oxydation active suite à l'activation de la β-caténine.

Nous savons également que l'oxydation des acides gras est dépendante de l'activité de CPT1. Cette enzyme régulant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie est inhibée par un intermédiaire de la lipogenèse : le malonyl-CoA (McGarry and Foster, 1979). Or nous avons montré que la lipogenèse était diminuée dans les cellules Apc^{KOliv}, de même que le niveau de malonyl-CoA. De ce fait l'inhibition sur CPT1 est levée ce qui permet donc l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et leur oxydation (cf. Article Fig. 3). Cette diminution de la quantité de malonyl-CoA est due principalement à la diminution de l'expression d'ACC1 et d'ACC2 (et non à une augmentation de son utilisation par la fatty acid synthase) conduisant à une diminution conjointe de la production de malonyl-CoA à devenir lipogénique mais aussi la production de l'inhibiteur allostérique de la CPT1.

Nous avons mis en évidence, dans les foies et les CHC activés pour la β-caténine, une diminution du contenu en TG à l'état de jeûne s'associant parfaitement avec l'induction de l'oxydation des acides gras observée (cf. Article Fig. 4C). De plus, la diminution en TG s'accompagne d'une diminution du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques. Les TG stockés dans les gouttelettes lipidiques peuvent être utilisés pour servir de substrats à la β-oxydation. L'adipose triglyceride lipase (ATGL) est une des enzymes capables d'hydrolyser ces TG dans le foie (Wu et al., 2011). Les analyses transcriptomiques et de Chip-seq réalisées par l'équipe ont montré que l'ATGL était une cible positive directe de la β-caténine. Nous avons en effet observé une augmentation de l'expression génique de cette enzyme dans les foies et hépatocytes Apc^{KOliv}. D'autre part, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ATGL (Atglistatin) sur le modèle prétumoral *in vivo*, entraine une diminution de la concentration des corps cétoniques intrahépatiques (cf. Article Fig. SI3C). Cette diminution est le reflet d'une baisse de l'oxydation des acides gras, semblant appuyer l'hypothèse d'un rôle de l'hydrolyse des acides gras sur le maintien de la β-oxydation suite à l'activation aberrante de la β-caténine. En plus d'une augmentation de l'ATGL, nous avons aussi observé une augmentation de l'expression de la lipoprotéine lipase. Cette enzyme contribue à l'hydrolyse des triglycérides stockés dans les chylomicrons circulants et la libération d'acides gras qui seront ensuite captés par le foie, contribuant à l'apport en acides gras.

Ainsi, l'augmentation et le maintien de l'oxydation des acides gras semblent être permis par l'action coordonnée de la diminution de lipogenèse, de l'augmentation de la

cétogenèse et de l'hydrolyse des TG. Il serait intéressant cependant de déterminer si la β-caténine agit également directement sur la β-oxydation ou si le mécanisme de régulation est uniquement indirect *via* le contrôle d'autres voies métaboliques (lipogenèse et cétogenèse). Nous avons cependant déjà observé qu'il n'y avait pas de modification du niveau d'ARN de certaines des enzymes de la β-oxydation : l'enoyl-CoA hydratase, de la long chain- et de la medium chain- acyl-CoA deshydrogénase (LCAD et MCAD). Cela indique que les effets de la β-caténine passeraient principalement par une activation de voies permettant un flux accru et constant d'acides gras dans la chaine enzymatique de la β-oxydation.

Il semblerait donc que la β-caténine soit capable de mettre en place un programme génique capable à la fois de fournir les substrats et d'induire les voies métaboliques nécessaires à la β-oxydation.

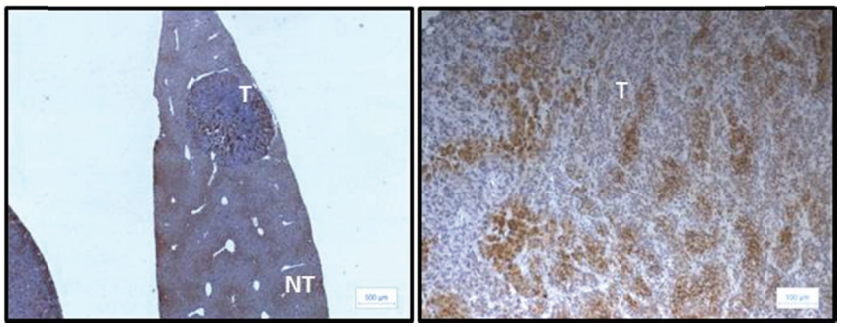
Mais cette augmentation de la β-oxydation conduit-elle à une production effective d'énergie ?

Activation de la β-caténine, respiration mitochondriale et production d'ATP

Les équivalents réduits ($FADH_2$ et NADH) produits par l'oxydation des acides gras alimentent la chaine respiratoire qui produit de l'ATP. Certaines cellules, y compris tumorales, sont capables d'induire un découplage mitochondrial, c'est-à-dire d'empêcher la production effective d'ATP induite par l'oxydation des substrats au profit d'une dissipation énergétique sous forme de chaleur (Samudio et al., 2009). Nous avons observé une respiration mitochondriale beaucoup plus importante, associée à une très forte production d'ATP, dans les dans les hépatocytes Apc^{KOliv}. Cette activité accrue de la chaine respiratoire n'est pas associée à une augmentation d'un découplage, elle reste très efficace dans sa production d'ATP (cf. Article Fig. 6). D'autre part, l'augmentation de la respiration mitochondriale en présence d'un acide gras, le palmitoyl-carnitine, montre que la β-oxydation alimente réellement la chaine respiratoire dans les foies Apc^{KOliv}. De plus, contrairement aux cellules saines, la vitesse de synthèse de l'ATP produit à partir de l'oléate est plus importante dans les cellules β-caténine activée. En revanche, la vitesse de synthèse de l'ATP à partir du glucose est moindre dans ces cellules, indiquant qu'une partie des carbones du glucose n'alimenterait pas la production d'ATP, ce qui pourrait être du à leur réorientation dans une voie anabolique de production de glutamine. Ces deux observations renforcent l'idée que le glucose est orienté majoritairement vers la synthèse de glutamine et que les acides gras sont la source principale d'énergie des hépatocytes activés pour la β-caténine.

Ces résultats ont été obtenus sur des modèles *ex vivo* d'explants et de cellules hépatiques dans des conditions normoxiques. Cependant, de nombreuses tumeurs sont hypoxiques, or la vitesse de la chaine respiratoire est aussi dépendante de la concentration en oxygène dans le tissu. Nous avons donc voulu voir d'une part si nos tumeurs étaient hypoxiées *in vivo* et si nos observations sur une oxydation des acides gras accrue dans les Apc^{KOliv} étaient toujours d'actualité dans des conditions de faibles concentrations en oxygène. Nous avons utilisé une sonde, l'hypoxyprobe, permettant de marquer l'hypoxie au sein des tissus *in situ*. Nous avons alors observé que bien qu'il existe des zones hypoxiques au sein de nos CHC β-caténine activée, celles-ci ne représentent qu'une faible proportion de la tumeur totale. L'hypoxyprobe est par ailleurs capable de détecter le gradient d'oxygène le long de l'axe portal-centrolobulaire du foie sain.

Immunohistochimie « hypoxyprobe », marquage de l'hypoxie



Statut de l'hypoxie dans les CHC-Apc^{KO}

A) Marquage des zones hypoxiées à « l'hypoxyprobe », à gauche (l'échelle indiquée est de 500µm) marquages du tissus non tumoral et du tissu tumoral ; à droite, image de la tumeur à plus fort grossissement (l'échelle indiquée est de 100µm).

L'analyse des flux métaboliques à l'oléate ^{14}C a montré que même en condition faible en oxygène, les explants hépatiques du modèle Apc^{KOliv} oxydent plus les acides gras que les contrôles. De plus, la présence d'une hypoxie tissulaire n'est pas non plus antinomique avec une oxydation active, même si celle-ci est diminuée elle reste possible.

Nous savons que le transfert d'électrons à travers la chaine respiratoire induit la production naturelle d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), *via* une « fuite » naturelle d'électrons, générant principalement l'ion superoxide (Murphy, 2009). Nous montrons que l'activité de la chaine respiratoire est fortement augmentée dans nos modèles d'activation de la β-caténine (cf. Article Fig. 6A). Cette augmentation peut conduire à une surproduction d'ERO, et cette production augmente d'autant plus si la tumeur présente des zones hypoxiées. L'excès d'ERO dans les cellules saines peut induire des dommages à l'ADN et la

prolifération, ainsi les ERO sont-elles considérées souvent comme pro-tumorigéniques. (Weinberg et al., 2010). Cependant, lorsque les niveaux d'ERO sont trop élevés dans les tumeurs, elles peuvent également être délétères pour la survie de la cellule cancéreuse puisqu'elles peuvent endommager les macromolécules et déclencher une mort cellulaire (Murphy et al., 2011). Afin de pouvoir survivre, la cellule tumorale doit alors mettre en place certains mécanismes afin de maintenir l'homéostasie rédox (cf. Introduction chapitre V). Comme décrit précédemment, la glutamine participe, de différentes façons au contrôle du niveau d'ERO dans la cellule. L'un de ces points de contrôle passe par la production directe, à partir de la glutamine, de glutathion, un tripeptide responsable de la neutralisation des radicaux peroxides (Welbourne, 1979). Il est donc possible que la surproduction de glutamine permette ici de maintenir la concentration d'ERO à un niveau tolérable par la cellule tumorale.

Il a été montré, notamment dans des lymphomes et des mélanomes utilisant l'OXPHOS pour la production d'énergie, que les cellules tumorales augmentaient leur système de détoxification des ERO afin de maintenir un statut rédox viable (Caro et al., 2012; Vazquez et al., 2013). Au vu du métabolisme oxydatif dans les CHC et hépatocytes activés pour la β-caténine, il est possible qu'un tel mécanisme soit également mis en place. En 2013, en utilisant un modèle murin d'invalidation hépatospécifique de la β-caténine, l'équipe de K. Sylvester montrait qu'en absence de β-caténine, les hépatocytes étaient beaucoup plus sensibles aux dégâts oxydatifs, indiquant que la β-caténine pouvait donc jouer un rôle protecteur (Tao et al., 2013).

D'autre part, les analyses protéomiques menées par l'équipe, ainsi que nos expériences de PCR quantitative en temps réel, ont montré une induction de plusieurs enzymes impliquées dans la détoxification des ERO et dans les défenses antioxydantes telles que certaines glutathion-S-transferases, peroxiredoxines, thioredoxines et peroxiredoxines réductase (Chafey et al., 2009 et données personnelles). Ainsi, *via* une induction d'enzymes de détoxification des ERO ou en contribuant à la synthèse globale de glutathion et son maintien à l'état réduit, les cellules présentant une hyperactivation de la β-caténine pourraient se protéger contre les dégâts générés par une hyperactivité de la chaine respiratoire. Compte tenu des rôles différents que jouent les ERO dans des cellules saines et des cellules tumorales, nous pouvons également nous poser la question de l'évolution du système anti-oxydant et la part jouée par les ERO au cours de la transformation cancéreuse liée à la β-caténine. Il est fort possible que la transformation tumorale, très fortement liée à l'oxydation accrue des acides gras soit aussi la conséquence d'un déséquilibre de l'état redox.

Importance de la β-oxydation des acides gras dans la tumorigenèse liée à la β-caténine

Nous avons montré que les CHC activés pour la β-caténine utilisaient de façon importante la β-oxydation. Les voies métaboliques altérées sont similaires dans les cellules prétumorales indiquant que la reprogrammation métabolique précède la transformation tumorale des hépatocytes β-caténine activée (cf. Article Fig. 1, 3 et 5). On peut alors s'interroger sur l'importance de cette reprogrammation métabolique dans la tumorigenèse β-caténine.

Nos expériences ont démontré que la tumorigenèse liée à une activation anormale de la β-caténine était fortement diminuée dans un modèle murin présentant un défaut de β-oxydation hépatique (cf. Article Fig. 7C). Cette donnée montre que la β-oxydation fait partie intégrante de la transformation tumorale et souligne son importance dans l'initiation tumorale liée à la β-caténine. Non seulement la reprogrammation métabolique précède la tumorigenèse β-caténine, mais elle semble également participer au développement tumoral et donc prendre part au caractère oncogénique de la β-caténine.

Qu'elle est l'importance de cette reprogrammation métabolique dans le maintien et la progression de la tumeur ? Différentes études ont montré qu'il existait d'autres tumeurs, notamment des cancers du sein et des glioblastomes, qui présentaient elles aussi une dépendance à l'oxydation des acides gras. Dans ces études l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre la CPT1 a permis de stopper ou de diminuer significativement la prolifération tumorale (Camarda et al., 2016; Lin et al., 2016a). Comme mentionné, nous avons déjà utilisé l'étomoxir, inhibiteur de CPT1, sur les hépatocytes Apc^{KOliv} en culture. Nos expériences sur des cultures primaires d'hépatocytes ont montré que la présence d'oléate conférait un avantage prolifératif uniquement aux hépatocytes présentant une activation aberrante de la β-caténine. Cet avantage est lié à son oxydation, puisque l'étomoxir inhibe cette prolifération (cf. Article Fig. 6C). L'augmentation de l'oxydation des acides gras est associée à une augmentation de l'activité de la chaine respiratoire et de la vitesse de production d'ATP.

Actuellement, nous sommes en train de tester les effets de cet inhibiteur sur la progression tumorale *in vivo*. Si le seul apport des acides gras à la tumorigenèse est vraiment leur capacité à alimenter la chaine respiratoire en équivalents réduits (NADH et $FADH_2$), et donc à contribuer de façon majoritaire à la synthèse d'ATP, on pourrait aussi envisager des inhibiteurs de la chaine respiratoire, comme la metformine, aujourd'hui utilisé en clinique comme traitement anticancéreux. En comparant les effets de la metformine à ceux de

l'étomoxir ou d'un autre inhibiteur de l'oxydation des acides gras, on pourrait aussi déterminer la part jouée par l'activité de la chaine respiratoire dans les effets des acides gras sur la tumorigenèse β-caténine.

Finalement dans les différentes modifications métaboliques induites par l'activation de la β-caténine, il semblerait que l'oxydation des lipides soit une étape critique de la transformation tumorale. Il est bien entendu évident qu'on ne peut pas ignorer l'hyperproduction de glutamine et que limiter cette hyperproduction pourrait aussi altérer le potentiel oncogénique de la β-caténine. Cependant, bien que l'oxydation des acides gras semble primordiale dans notre contexte, il a été montré que les cellules tumorales étaient capables de s'adapter et de changer leur métabolisme en fonction des conditions. Ainsi, les cellules tumorales peuvent acquérir une certaine résistance face aux drogues en modifiant l'utilisation des substrats (Martinez-Outschoorn et al., 2017). L'utilisation de ces inhibiteurs permettrait alors également d'évaluer l'importance que prennent les autres voies de synthèse d'énergie, comme la glycolyse, lorsque la β-oxydation est inutilisable dans les hépatocytes Apc^{KOliv}.

Dans le cas des hépatocytes Apc^{KOliv}, il semblerait qu'une diminution de la β-oxydation soit clairement suffisante à stopper la transformation tumorale. Quelles que soient les altérations métaboliques induites par cette diminution de la β-oxydation, elles ne sont pas suffisantes pour permettre la survie et la prolifération d'un clone tumoral. En revanche, il est fort possible qu'une inhibition complète de la β-oxydation, comme cela serait le cas avec l'utilisation d'inhibiteurs de la β-oxydation puisse conduire à une adaptation métabolique des cellules tumorales et la sélection de clones pouvant alors survivre et proliférer.

CHC β-caténine et environnement tumoral

La tumeur et son microenvironnement sont capables de communiquer (cf. Introduction chapitre V). Il existe une sorte de relation symbiotique entre la tumeur et les cellules du microenvironnement. Dans certains cas, comme le « reverse Warburg », la cellule tumorale peut produire des substrats qui seront utilisés par les cellules du microenvironemment et inversement (Pavlides et al., 2009). Ainsi, on peut imaginer que la glutamine produite en excès par les hépatocytes Apc^{KOliv} puisse être utilisée par les autres cellules. Un tel cas a déjà été observé dans certains glioblastomes, où les cellules tumorales produisent en excès la glutamine captée et utilisée par les cellules environnantes souvent dans un but anaplérotique

(Tardito et al., 2015). Cela a également été montré pour le lactate qui peut servir de substrat énergétique aux cellules environnantes (Pavlides et al., 2009). On peut ici imaginer qu'il existe un mécanisme similaire pour les corps cétoniques qui sont produits en excès par les CHC β-caténine activés. En effet les corps cétoniques sont des substrats énergétiques que la majorité des cellules (sauf les hépatocytes) sont capables d'utiliser pour alimenter le cycle de Krebs. Leur utilisation dans un but anaplérotique par les cellules du microenvironnement est alors parfaitement envisageable.

La surproduction de lactate dans les tumeurs à effet Warburg entraine une acidification locale occasionnant une inhibition de la réponse immunitaire anti-cancéreuse (Choi et al., 2013). Les corps cétoniques sont des molécules acides. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que l'excès de corps cétoniques, produit par les CHC activés pour la β-caténine, entraine, comme le lactate, une acidification locale et une diminution alors la réponse immunitaire anti-cancéreuse favorisant la progression tumorale. De plus, une étude très récente a montré que les corps cétoniques avaient un effet inhibiteur sur la réponse pro-inflammatoire et donc un effet potentiellement pro-tumorigénique (Youm et al., 2015). Ces données renforcent l'hypothèse d'un impact des corps cétoniques sur le microenvironnement au profit de la tumeur.

D'autre part, nous avons aussi observé dans notre modèle prétumoral une diminution de la masse grasse suite à l'invalidation d'Apc comparativement aux souris contrôles (cf. Article Fig. SI3E). La prise alimentaire étant similaire entre ces souris, une diminution de celle-ci n'est pas responsable du phénotype observé. Cette perte de masse grasse peut être due à l'augmentation de l'oxydation hépatique mais aussi à une diminution de la lipogenèse entrainant une diminution globale des stocks lipidiques. Mais il est aussi possible que l'activation de la β-caténine dans le foie, et l'augmentation du besoin en acides gras pour la β-oxydation en découlant, entraine aussi une modification du métabolisme en systémique. L'hypothèse selon laquelle les tumeurs seraient capables de dicter le métabolisme en systémique a déjà été faite (Lee et al., 2016). La cachexie se définie comme une perte de masse corporelle importante. Elle est très souvent retrouvée chez les patients atteints de cancer et peut être associée ou non à une anorexie (une baisse importante de la prise alimentaire). La perte du tissu adipeux est une des caractéristiques de la cachéxie. Il a été montré que les tumeurs sont capables de produire des signaux, comme des cytokines, pouvant induire la lipolyse du tissu adipeux (Al-Zoughbi et al., 2014). Il a été mis en évidence, notamment dans des cellules tumorales du sein et des ovaires, que les acides gras ainsi libérés

permettaient alors de subvenir aux besoins énergétiques, de promouvoir la croissance et la prolifération de la tumeur (Balaban et al., 2017; Nieman et al., 2011). Il est possible que les CHC activés pour la β-caténine sécrètent eux aussi ces messagers permettant de libérer les acides gras du tissu adipeux. Il serait alors intéressant d'observer si la tumorigenèse β-catenine est accompagnée d'une perte de la masse grasse et bien entendu de vérifier en parallèle la prise alimentaire des animaux. Un sécrétome permettrait peut-être d'établir une signature sérique spécifique aux CHC β-caténine et d'identifier les hépatokines/cytokines impliquées.

Importance de la β-caténine dans la reprogrammation métabolique

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur jouent un rôle prépondérant dans la reprogrammation métabolique des cellules tumorales (cf. Introduction chapitre V) (Pavlova and Thompson, 2016). Les oncogènes impliqués ont souvent un rôle sur le métabolisme en situation physiologique. C'est le cas par exemple de l'oncogène PI3K qui est impliqué dans la régulation du métabolisme glucodolipidique (Tarrado-Castellarnau et al., 2016). Or, la β-caténine est un régulateur majeur du métabolisme hépatique. Elle est notamment responsable de l'expression et de la zonation de la GS (Benhamouche et al., 2006b; Cadoret et al., 2002). D'autre part, il a été montré que la que la β-oxydation et la respiration mitochondriale étaient fortement perturbées dans les foies des souris délétées pour la β-caténine (Lehwald et al., 2012). Nous montrons dans notre étude que l'activation de la β-caténine entraine une augmentation et une potentialisation de l'oxydation des acides gras et de la respiration, ainsi qu'une surproduction de glutamine. D'autre part, nous n'avons pas retrouvé un tel phénotype métabolique dans des CHC ne présentant pas d'activation de la β-caténine (modèle $Axin1^{KO}$ cf. Article Fig. 2). Il semblerait que la reprogrammation métabolique observée dans les CHC activés pour la β-caténine soit un reflet direct des effets de cet oncogène sur le métabolisme.

En 2012, Yuneva *et al.* mènent une étude sur les différences métaboliques existant entre des CHC induits par c-Myc et des CHC induits par c-Met. Les CHC induits par c-Met montrent une augmentation de la production de glutamine à partir du glucose contrairement aux CHC c-Myc qui eux présentent une utilisation accrue de la glutamine (Yuneva et al., 2012). Les mutations de c-Met dans les CHC sont par ailleurs associées à une activation de la β-caténine. On peut alors se demander si le phénotype métabolique observé dans ces CHC n'est pas dû à l'activation aberrante de la β-caténine dans ces CHC. Cependant, dans cette même étude les auteurs ont observé que les cancers pulmonaires présentant une activation de c-Myc surexprimentaussi la glutamine synthase et accumulent la glutamine contrairement aux

cancers hépatiques c-Myc. Cela indique aussi que la surexpression de la GS n'est pas le propre des tumeurs β-caténine activée et que la reprogrammation métabolique induite par un oncogène peut varier suivant l'origine cellulaire de la tumeur. Ainsi, les cancers triple négatifs du sein exprimant très fortement c-Myc présentent une importante dépendance à l'oxydation des acides gras (Camarda et al., 2016). Finalement, il se pourrait aussi qu'au-delà du rôle même de la β-caténine sur le métabolisme, le phénotype métabolique observé dans nos modèles soit également le reflet d'une spécificité tissulaire. Le foie possède physiologiquement la capacité d'oxyder les acides gras. Ainsi, la β-caténine pourrait se servir de cette proprité hépatique pour la transformation tumorale. Cependant, d'autres évènements oncogéniques, comme la perte de l'Axin 1, ne conduisent pas à une augmentation de la β-oxydation. Ces données mettent en évidence que la β-caténine est capable d'induire une augmentation de la β-oxydation qui fait partie intégrante de sa capacité oncogénique. Il existe d'autres tumeurs présentant une activation de la β-caténine comme par exemple les cancers colorectaux ou les tumeurs corticosurrénaliennes (Gaujoux et al., 2011; Morin et al., 1997). Il serait intéressant d'étudier le métabolisme de ces tumeurs afin de déterminer si la β-caténine induit un phénotype métabolique tumoral similaire quel que soit le tissu, ou, comme cela a été observé dans l'étude de Yuneva, que l'origine tissulaire joue aussi un rôle primordial dans la reprogrammation métabolique.

Rôle de PPARα dans le phénotype métabolique lié à l'activation aberrante de la β-caténine

Il semblerait que la β-caténine soit responsable en elle-même du phénotype métabolique observé dans les hépatocytes et CHC-Apc^{KO}. Mais on peut s'interroger sur les mécanismes mis en place et modifiant le métabolisme suite à l'activation aberrante de la β-caténine.

Comme décrit précédemment, nous avons montré que l'activation ponctuelle de la β-caténine dans le modèle PPARα KO ne permettait pas d'induire la carcinogenèse hépatique (cf. Article Fig. 7C). Les analyses de Chip-Seq et RNA-seq effectuées par l'équipe ont montré que PPARα était une cible directement induite par la β-caténine. Nous avons bien observé une induction de l'expression de PPARα dans les foies Apc^{KOliv}. De plus, l'HMGCS2 et BDH1, enzymes de la cétogenèse, augmentées lors de l'activation de la β-caténine, sont des cibles directes de PPARα (cf. Article Fig. 5B). De plus, parmi les enzymes de la lipogenèse dont l'expression est affectée par l'induction de la β-caténine, nous avons observé une diminution

de l'expression de la lipin1. En revanche, en regardant la localisation subcellulaire de cette enzyme, nous avons vu qu'il avait une forte diminution dans le cytoplasme mais un maintien dans le noyau. Or, cette enzyme a été décrite comme jouant le rôle d'un co-activateur de PPARα dans le noyau (Finck et al., 2006). D'autre part, comme décrit plus haut, l'activation de la β-caténine induit l'ATGL. Or, il a été montré dans plusieurs études que l'ATGL régulait l'activité de PPARα notamment en permettant la libération de médiateurs essentiels à la formation du ligand de PPARα. Il a été mis en évidence que l'absence d'ATGL diminuait l'activité de ce récepteur nucléaire (Haemmerle et al., 2011). Ainsi, la diminution de production de corps cétoniques observée en présence de l'atglistatine (inhibiteur de l'ATGL) pourrait être due à la fois à la diminution de la disponibilité du substrat de la β-oxydation et à la diminution d'activité de PPARα. Il se pourrait donc que les effets de la β-caténine sur la β-oxydation passent par son action directe et indirecte sur PPARα.

Cependant, les résultats de nos flux métaboliques sur les foies des souris présentant une double invalidation de PPARα et d'Apc montrent que l'oxydation des acides gras dans ces foies, bien qu'inférieure aux foies Apc^{KOliv}, est augmentée par rapport aux foies PPARα KO (cf. Article Fig. 7B). L'expression de l'HMGCS2 et de BDH1 est diminuée dans les foies PPARα KO. Or, nous avons observé une induction de leur expression dans les foies doublement invalidés par rapport aux foies invalidés simplement pour PPARα. Ce résultat indique clairement que la β-caténine est capable de stimuler l'expression de ces enzymes indépendamment de PPARα, mais à des niveaux moindres. Cela signifie que, s'il existe bien un mécanisme d'induction de l'oxydation des acides gras par la β-caténine dépendant de PPARα, il y a également un mécanisme indépendant dans les foies et CHC activés pour la β-caténine.

PPARα/β-caténine : un dialogue complexe ?

Il semblerait que la β-caténine exerce un contrôle positif direct sur le récepteur nucléaire PPARα. Mais au-delà de ça, comme décrit dans l'introduction (cf. Introduction chapitre III), il est connu que la β-caténine, seule ou avec son partenaire TCF, est capable d'interagir avec des récepteurs nucléaires. Notamment, il a été mis en évidence que les autres membres de la famille PPARs, à savoir PPARγ et PPARβ/δ, étaient capables de moduler la signalisation induite par β-caténine et de se lier physiquement avec celle-ci. Il a été montré que PPARγ exerçait un contrôle négatif sur la signalisation Wnt. Ainsi l'induction de la signalisation PPARγ, par l'utilisation de ligand spécifique, induit l'inhibition de la

signalisation Wnt/β-caténine notamment dans les cellules du colon (Liu et al., 2006; Lu and Carson, 2010). Au contraire, il a été mis en évidence que PPARβ/δ était capable d'amplifier la signalisation Wnt/β-caténine et d'induire directement la transcription dépendante de TCF dans les ostéoblastes (Scholtysek et al., 2013). Compte tenu des rapports qu'il existe entre la signalisation β-caténine et les récepteurs nucléaires PPARs, on peut se questionner sur un potentiel contrôle de la voie Wnt/β-caténine par PPARα.

Diagnostique et thérapeutique des CHC β-caténine activée

Nous avons vu dans l'introduction qu'une bonne connaissance du métabolisme tumoral peut permettre de développer l'utilisation de différents outils diagnostiques et le développement de thérapies ciblées (Vander Heiden, 2011). Notamment avec l'émergence de nouvelles molécules utilisables en PET-scan. Dans notre cas, le PET-Scan acide gras n'est pas encore une méthode fiable (cf. Introduction chapitre V). Cependant des tumeurs présentant une forte capacité à oxyder les acides gras telles que les CHC β-caténine ou les cancers du sein triple négatif à forte expression de c-Myc, pourraient être utilisées comme de bons modèles afin d'évaluer cette technique.

Il a été montré que l'inhibition de l'oxydation des acides gras dans les tumeurs dépendantes de cette voie métabolique permettaient de freiner la progression tumorale (Camarda et al., 2016; Lin et al., 2016a). Nous avons mis en évidence dans notre étude que l'utilisation d'un de ces inhibiteurs, l'étomoxir, sur les hépatocytes activés pour la β-caténine diminuait la prolifération cellulaire (cf. article Fig. 6C): la prochaine étape étant de démontrer l'effet anti-tumoral de cet inhibiteur sur les CHC β-caténine *in vivo*. Il a déjà été utilisé dans des essais cliniques, cependant, les effets hépatotoxiques de l'étomoxir ont conduit à l'interruption de ces essais. Il existe néanmoins d'autres inhibiteurs de CPT1, utilisés par exemple dans le traitement des angines et bénéficiant donc d'une autorisation de mise sur le marché, ou encore le Teglicar, inhibiteur réversible spécifique de l'isoforme hépatique de CPT1 (Conti et al., 2011; Martinez-Outschoorn et al., 2017). Enfin, l'inhibiteur de l'ATGL, Atglisatin, que nous avons utilisé, pourrait également permettre de diminuer indirectement l'oxydation des acides gras (Ong et al., 2011; Reid et al., 2008).

L'inhibition totale de l'oxydation des acides gras pourrait être délétère pour les tissus sains. Nous avons montré (dans le modèle PPARα KO) qu'il suffisait de diminuer la β-oxydation, et non pas de la supprimer complètement, pour empêcher l'apparition des tumeurs β-caténine. L'utilisation d'un traitement étant dictée par la balance entre les bénéfices et les

risques (effets secondaires, toxicité etc…), la modulation fine de la β-oxydation pourrait être envisagée comme un traitement efficace contre les CHC β-caténine. L'inhibiteur de l'ATGL qui limiterait l'apport intracellulaire d'acides gras ou l'utilisation du Tegiclar, l'inhibiteur réversible de CPT1α, sont peut-être des solutions envisageables.

En associant l'utilisation d'inhibiteurs de la β-oxydation à des techniques d'imagerie PET-scan permettant de discriminer les CHC *CNNTB1* des autres classes de CHC, comme les PET-scan fluorocholine (cf. Annexe 1), nous pourrions alors imaginer pouvoir traiter et cibler spécifiquement ces CHC.

Bibliographie

Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Abo-Hashema, K.A., and Wakil, S.J. (2001). Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. Science *291*, 2613–2616.

Adeva-Andany, M.M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., and Pazos-García, C. (2016). Liver glucose metabolism in humans. Biosci. Rep. *36*, e00416.

Akkaoui, M., Cohen, I., Esnous, C., Lenoir, V., Sournac, M., Girard, J., and Prip-Buus, C. (2009). Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. Biochem. J. *420*, 429–438.

Alavi, J.B., Alavi, A., Chawluk, J., Kushner, M., Powe, J., Hickey, W., and Reivich, M. (1988). Positron emission tomography in patients with glioma. A predictor of prognosis. Cancer *62*, 1074–1078.

Al-Zoughbi, W., Al-Zhoughbi, W., Huang, J., Paramasivan, G.S., Till, H., Pichler, M., Guertl-Lackner, B., and Hoefler, G. (2014). Tumor macroenvironment and metabolism. Semin. Oncol. *41*, 281–295.

Aoki, K., and Taketo, M.M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. J. Cell Sci. *120*, 3327–3335.

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

Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P.L., Douglas, F., George, E., Sköldberg, F., Husebye, E.S., Eng, C., and Maher, E.R. (2001). Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. Am. J. Hum. Genet. *69*, 49–54.

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

Bakheet, S.M., Powe, J., Kandil, A., Ezzat, A., Rostom, A., and Amartey, J. (2000). F-18 FDG uptake in breast infection and inflammation. Clin. Nucl. Med. *25*, 100–103.

Balaban, S., Shearer, R.F., Lee, L.S., van Geldermalsen, M., Schreuder, M., Shtein, H.C., Cairns, R., Thomas, K.C., Fazakerley, D.J., Grewal, T., et al. (2017). Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. Cancer Metab. *5*, 1.

Bansal, M.B. (2016). Hepatic stellate cells: fibrogenic, regenerative or both? Heterogeneity and context are key. Hepatol. Int. *10*, 902–908.

Barollo, S., Bertazza, L., Watutantrige-Fernando, S., Censi, S., Cavedon, E., Galuppini, F., Pennelli, G., Fassina, A., Citton, M., Rubin, B., et al. (2016). Overexpression of L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1) and 2 (LAT2): Novel Markers of Neuroendocrine Tumors. PloS One *11*, e0156044.

Barthel, A., Okino, S.T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J.P., and Roth, R.A. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. J. Biol. Chem. *274*, 20281–20286.

Behari, J., Li, H., Liu, S., Stefanovic-Racic, M., Alonso, L., O'Donnell, C.P., Shiva, S., Singamsetty, S., Watanabe, Y., Singh, V.P., et al. (2014). β-catenin links hepatic metabolic zonation with lipid metabolism and diet-induced obesity in mice. Am. J. Pathol. *184*, 3284–3298.

Beilke, L.D., Aleksunes, L.M., Holland, R.D., Besselsen, D.G., Beger, R.D., Klaassen, C.D., and Cherrington, N.J. (2009). Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. *37*, 1035–1045.

Benhamouche, S., Decaens, T., Perret, C., and Colno, S. (2006a). Voie Wnt/β-caténine et zonation métabolique du foie : un nouvel acteur pour un ancien concept. Médecine/Sciences *22*, 904–906.

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

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. Cell *126*, 107–120.

Bianchi, A., Evans, J.L., Iverson, A.J., Nordlund, A.C., Watts, T.D., and Witters, L.A. (1990). Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. J. Biol. Chem. *265*, 1502–1509.

Bilic, J., Huang, Y.-L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.-M., Bienz, M., and Niehrs, C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. Science *316*, 1619–1622.

Bohinc, B.N., and Diehl, A.M. (2012). Mechanisms of disease progression in NASH: new paradigms. Clin. Liver Dis. *16*, 549–565.

Boj, S.F., van Es, J.H., Huch, M., Li, V.S.W., José, A., Hatzis, P., Mokry, M., Haegebarth, A., van den Born, M., Chambon, P., et al. (2012). Diabetes risk gene and Wnt effector Tcf7l2/TCF4 controls hepatic response to perinatal and adult metabolic demand. Cell *151*, 1595–1607.

Borger, D.R., Tanabe, K.K., Fan, K.C., Lopez, H.U., Fantin, V.R., Straley, K.S., Schenkein, D.P., Hezel, A.F., Ancukiewicz, M., Liebman, H.M., et al. (2012). Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. The Oncologist *17*, 72–79.

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

Braeuning, A., Sanna, R., Huelsken, J., and Schwarz, M. (2009). Inducibility of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics in mice with liver-specific knockout of Ctnnb1. Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. *37*, 1138–1145.

Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M., and Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology *137*, 354–366.

Brown, M., Marshall, D.R., Sobel, B.E., and Bergmann, S.R. (1987). Delineation of myocardial oxygen utilization with carbon-11-labeled acetate. Circulation *76*, 687–696.

Bünger, M., van den Bosch, H.M., van der Meijde, J., Kersten, S., Hooiveld, G.J.E.J., and Müller, M. (2007). Genome-wide analysis of PPARalpha activation in murine small intestine. Physiol. Genomics *30*, 192–204.

Burns, S.P., Cohen, R.D., Iles, R.A., Bailey, R.A., Desai, M., Germain, J.P., and Going, T.C. (1999). Zonation of gluconeogenesis, ketogenesis and intracellular pH in livers from normal and diabetic ketoacidotic rats: evidence for intralobular redistribution of metabolic events in ketoacidosis. Biochem. J. *343 Pt 1*, 273–280.

Cadigan, K.M., and Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*.

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

Cai, Z., Mason, N.S., Anderson, C.J., and Edwards, W.B. (2016). Synthesis and preliminary evaluation of an ^{18}F-labeled oleic acid analog for PET imaging of fatty acid uptake and metabolism. Nucl. Med. Biol. *43*, 108–115.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nat. Rev. Cancer *11*, 85–95.

Camarda, R., Zhou, A.Y., Kohnz, R.A., Balakrishnan, S., Mahieu, C., Anderton, B., Eyob, H., Kajimura, S., Tward, A., Krings, G., et al. (2016). Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. Nat. Med. *22*, 427–432.

Campbell, F.M., Kozak, R., Wagner, A., Altarejos, J.Y., Dyck, J.R.B., Belke, D.D., Severson, D.L., Kelly, D.P., and Lopaschuk, G.D. (2002). A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. J. Biol. Chem. *277*, 4098–4103.

Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. Cancer Discov. *2*, 881–898.

Caputo, F., Vegliante, R., and Ghibelli, L. (2012). Redox modulation of the DNA damage response. Biochem. Pharmacol. *84*, 1292–1306.

Cariou, B., and Staels, B. (2014). GFT505 for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis and type 2 diabetes. Expert Opin. Investig. Drugs *23*, 1441–1448.

Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 11452–11457.

Caro, P., Kishan, A.U., Norberg, E., Stanley, I.A., Chapuy, B., Ficarro, S.B., Polak, K., Tondera, D., Gounarides, J., Yin, H., et al. (2012). Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell *22*, 547–560.

Cattin, A.-L., Le Beyec, J., Barreau, F., Saint-Just, S., Houllier, A., Gonzalez, F.J., Robine, S., Pinçon-Raymond, M., Cardot, P., Lacasa, M., et al. (2009). Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. Mol. Cell. Biol. *29*, 6294–6308.

Chafey, P., Finzi, L., Boisgard, R., Caüzac, M., Clary, G., Broussard, C., Pégorier, J.-P., Guillonneau, F., Mayeux, P., Camoin, L., et al. (2009). Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. Proteomics *9*, 3889–3900.

Chakravarthy, M.V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2005). "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. Cell Metab. *1*, 309–322.

Chambers, D.A., Martin, D.W., and Weinstein, Y. (1974). The effect of cyclic nucleotides on purine biosynthesis and the induction of PRPP synthetase during lymphocyte activation. Cell *3*, 375–380.

Chandel, N.S., Budinger, G.R., and Schumacker, P.T. (1996). Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase function. J. Biol. Chem. *271*, 18672–18677.

Cheng, H.C., Yang, C.M., and Shiao, M.S. (1993). Zonation of cholesterol and glycerolipid synthesis in regenerating rat livers. Hepatol. Baltim. Md *17*, 280–286.

Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A.R., Jin, E.S., Matés, J.M., and DeBerardinis, R.J. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 8674–8679.

Choi, C.S., Savage, D.B., Abu-Elheiga, L., Liu, Z.-X., Kim, S., Kulkarni, A., Distefano, A., Hwang, Y.-J., Reznick, R.M., Codella, R., et al. (2007). Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 16480–16485.

Choi, H., Chun, Y.-S., Kim, T.-Y., and Park, J.-W. (2010). HIF-2alpha enhances beta-catenin/TCF-driven transcription by interacting with beta-catenin. Cancer Res. *70*, 10101–10111.

Choi, S.Y.C., Collins, C.C., Gout, P.W., and Wang, Y. (2013). Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? J. Pathol. *230*, 350–355.

Ci, X., Frisch, F., Lavoie, F., Germain, P., Lecomte, R., van Lier, J.E., Bénard, F., and Carpentier, A.C. (2006). The effect of insulin on the intracellular distribution of 14(R,S)-[18F]Fluoro-6-thia-heptadecanoic acid in rats. Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging *8*, 237–244.

Cohen, A.L., Holmen, S.L., and Colman, H. (2013). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. Curr. Neurol. Neurosci. Rep. *13*, 345.

Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature *513*, 559–563.

Colletti, M., Cicchini, C., Conigliaro, A., Santangelo, L., Alonzi, T., Pasquini, E., Tripodi, M., and Amicone, L. (2009). Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. Gastroenterology *137*, 660–672.

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

Comerford, S.A., Huang, Z., Du, X., Wang, Y., Cai, L., Witkiewicz, A.K., Walters, H., Tantawy, M.N., Fu, A., Manning, H.C., et al. (2014). Acetate dependence of tumors. Cell *159*, 1591–1602.

Constant, J.S., Feng, J.J., Zabel, D.D., Yuan, H., Suh, D.Y., Scheuenstuhl, H., Hunt, T.K., and Hussain, M.Z. (2000). Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc. *8*, 353–360.

Conti, R., Mannucci, E., Pessotto, P., Tassoni, E., Carminati, P., Giannessi, F., and Arduini, A. (2011). Selective reversible inhibition of liver carnitine palmitoyl-transferase 1 by teglicar reduces gluconeogenesis and improves glucose homeostasis. Diabetes *60*, 644–651.

Cory, J.G., and Cory, A.H. (2006). Critical roles of glutamine as nitrogen donors in purine and pyrimidine nucleotide synthesis: asparaginase treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. Vivo Athens Greece *20*, 587–589.

Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. Biochem. J. *23*, 536–545.

Croteau, E., Renaud, J.M., Richard, M.A., Ruddy, T.D., Bénard, F., and deKemp, R.A. (2016). PET Metabolic Biomarkers for Cancer. Biomark. Cancer *8*, 61–69.

Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Yeo, M., Good, V.M., Thompson, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2003). Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. EMBO J. *22*, 494–501.

DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. Sci. Adv. *2*, e1600200.

DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 19345–19350.

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

DeGrado, T.R., Coenen, H.H., and Stocklin, G. (1991). 14(R,S)-[18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid (FTHA): evaluation in mouse of a new probe of myocardial utilization of long chain fatty acids. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. *32*, 1888–1896.

Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G., and Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. J. Biol. Chem. *274*, 32048–32054.

DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., et al. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. Nature *475*, 106–109.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. J. Biol. Chem. *272*, 17269–17275.

Di Chiro, G., DeLaPaz, R.L., Brooks, R.A., Sokoloff, L., Kornblith, P.L., Smith, B.H., Patronas, N.J., Kufta, C.V., Kessler, R.M., Johnston, G.S., et al. (1982). Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [18F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. Neurology *32*, 1323–1329.

DiRenzo, J., Söderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliastro, M.H., Ricote, M., Ingrey, S., Hörlein, A., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. Mol. Cell. Biol. *17*, 2166–2176.

Dose Schwarz, J., Bader, M., Jenicke, L., Hemminger, G., Jänicke, F., and Avril, N. (2005). Early prediction of response to chemotherapy in metastatic breast cancer using sequential 18F-FDG PET. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. *46*, 1144–1150.

Dowell, P., Ishmael, J.E., Avram, D., Peterson, V.J., Nevrivy, D.J., and Leid, M. (1999). Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. J. Biol. Chem. *274*, 15901–15907.

Dragani, T.A. (2010). Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics. J. Hepatol. *52*, 252–257.

Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., and Wahli, W. (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell *68*, 879–887.

Eagle, H. (1955). The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. J. Exp. Med. *102*, 595–600.

Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer Res. *57*, 1835–1840.

Epstein, T., Xu, L., Gillies, R.J., and Gatenby, R.A. (2014). Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. Cancer Metab. *2*, 7.

Essers, M.A.G., de Vries-Smits, L.M.M., Barker, N., Polderman, P.E., Burgering, B.M.T., and Korswagen, H.C. (2005). Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. Science *308*, 1181–1184.

Evans, J.L., Quistorff, B., and Witters, L.A. (1989). Zonation of hepatic lipogenic enzymes identified by dual-digitonin-pulse perfusion. Biochem. J. *259*, 821–829.

Evans, J.L., Quistorff, B., and Witters, L.A. (1990). Hepatic zonation of acetyl-CoA carboxylase activity. Biochem. J. *270*, 665–672.

Fantin, V.R., St-Pierre, J., and Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. Cancer Cell *9*, 425–434.

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

Feng, G.J., Cotta, W., Wei, X.Q., Poetz, O., Evans, R., Jardé, T., Reed, K., Meniel, V., Williams, G.T., Clarke, A.R., et al. (2012). Conditional Disruption of Axin1 Leads to Development of Liver Tumors in Mice. Gastroenterology *143*, 1650–1659.

Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol. *92*, 329–333.

Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell *18*, 553–567.

Finck, B.N., Gropler, M.C., Chen, Z., Leone, T.C., Croce, M.A., Harris, T.E., Lawrence, J.C., and Kelly, D.P. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1α/PPARα regulatory pathway. Cell Metab. *4*, 199–210.

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., et al. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood *109*, 3812–3819.

Frohnert, B.I., Hui, T.Y., and Bernlohr, D.A. (1999). Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. J. Biol. Chem. *274*, 3970–3977.

Gaglio, D., Soldati, C., Vanoni, M., Alberghina, L., and Chiaradonna, F. (2009). Glutamine deprivation induces abortive s-phase rescued by deoxyribonucleotides in k-ras transformed fibroblasts. PloS One *4*, e4715.

Gampe, R.T., Montana, V.G., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Willson, T.M., and Xu, H.E. (2000). Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. Mol. Cell *5*, 545–555.

Gansler, T.S., Hardman, W., Hunt, D.A., Schaffel, S., and Hennigar, R.A. (1997). Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. Hum. Pathol. *28*, 686–692.

Gaujoux, S., Grabar, S., Fassnacht, M., Ragazzon, B., Launay, P., Libé, R., Chokri, I., Audebourg, A., Royer, B., Sbiera, S., et al. (2011). β-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 328–336.

Gentric, G., Mieulet, V., and Mechta-Grigoriou, F. (2016). Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. Antioxid. Redox Signal.

Georgiadi, A., Boekschoten, M.V., Müller, M., and Kersten, S. (2012). Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart. Physiol. Genomics *44*, 352–361.

Gervois, P., Vu-Dac, N., Kleemann, R., Kockx, M., Dubois, G., Laine, B., Kosykh, V., Fruchart, J.C., Kooistra, T., and Staels, B. (2001). Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. J. Biol. Chem. *276*, 33471–33477.

Girard, J., Ferré, P., Pégorier, J.P., and Duée, P.H. (1992). Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. Physiol. Rev. *72*, 507–562.

Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L.A., and Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. Int. J. Oncol. *39*, 453–463.

Gomez, J.H., Blake, M., Hernandez, J.O., Balam, J., and Teh, B.S. (2012). C11-Acetate Positron Emission Tomography (PET) for Prostate Cancer Patients Undergoing Radiation Therapy. Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys. *84*, S371–S372.

Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R.B., and Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. Genes Dev. *15*, 1406–1418.

Gougelet, A., Torre, C., Veber, P., Sartor, C., Bachelot, L., Denechaud, P.-D., Godard, C., Moldes, M., Burnol, A.-F., Dubuquoy, C., et al. (2014). T-cell factor 4 and β-catenin

chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. Hepatol. Baltim. Md *59*, 2344–2357.

Grassi, I., Nanni, C., Allegri, V., Morigi, J.J., Montini, G.C., Castellucci, P., and Fanti, S. (2012). The clinical use of PET with (11)C-acetate. Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging *2*, 33–47.

Gross, M.I., Demo, S.D., Dennison, J.B., Chen, L., Chernov-Rogan, T., Goyal, B., Janes, J.R., Laidig, G.J., Lewis, E.R., Li, J., et al. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. Mol. Cancer Ther. *13*, 890–901.

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

Guppy, M., Leedman, P., Zu, X., and Russell, V. (2002). Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. Biochem. J. *364*, 309–315.

Guzmán, M., and Castro, J. (1989). Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. Biochem. J. *264*, 107–113.

Guzmán, M., Bijleveld, C., and Geelen, M.J. (1995). Flexibility of zonation of fatty acid oxidation in rat liver. Biochem. J. *311 (Pt 3)*, 853–860.

Hadad, S., Iwamoto, T., Jordan, L., Purdie, C., Bray, S., Baker, L., Jellema, G., Deharo, S., Hardie, D.G., Pusztai, L., et al. (2011). Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. Breast Cancer Res. Treat. *128*, 783–794.

Haemmerle, G., Moustafa, T., Woelkart, G., Büttner, S., Schmidt, A., van de Weijer, T., Hesselink, M., Jaeger, D., Kienesberger, P.C., Zierler, K., et al. (2011). ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-α and PGC-1. Nat. Med. *17*, 1076–1085.

Hamada, F., and Bienz, M. (2004). The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear beta-catenin from TCF. Dev. Cell *7*, 677–685.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Hanf, R., Millatt, L.J., Cariou, B., Noel, B., Rigou, G., Delataille, P., Daix, V., Hum, D.W., and Staels, B. (2014). The dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist GFT505 exerts anti-diabetic effects in db/db mice without peroxisome proliferator-activated receptor gamma-associated adverse cardiac effects. Diab. Vasc. Dis. Res. *11*, 440–447.

Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., et al. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. Nature *485*, 195–200.

Hara, T., Kosaka, N., and Kishi, H. (1998). PET imaging of prostate cancer using carbon-11-choline. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. *39*, 990–995.

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

Hassanein, M., Hight, M.R., Buck, J.R., Tantawy, M.N., Nickels, M.L., Hoeksema, M.D., Harris, B.K., Boyd, K., Massion, P.P., and Manning, H.C. (2016). Preclinical Evaluation of 4-[18F]Fluoroglutamine PET to Assess ASCT2 Expression in Lung Cancer. Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging *18*, 18–23.

Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D.E., Andreadis, C., Shaw, A.N., Dhanak, D., Hingorani, S.R., Tuveson, D.A., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. Cancer Cell *8*, 311–321.

Häussinger, D., Lamers, W.H., and Moorman, A.F. (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. Enzyme *46*, 72–93.

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

Hertz, R., Bishara-Shieban, J., and Bar-Tana, J. (1995). Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. J. Biol. Chem. *270*, 13470–13475.

Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. J. Cell Biol. *125*, 1327–1340.

Holubarsch, C.J.F., Rohrbach, M., Karrasch, M., Boehm, E., Polonski, L., Ponikowski, P., and Rhein, S. (2007). A double-blind randomized multicentre clinical trial to evaluate the efficacy and safety of two doses of etomoxir in comparison with placebo in patients with moderate congestive heart failure: the ERGO (etomoxir for the recovery of glucose oxidation) study. Clin. Sci. Lond. Engl. 1979 *113*, 205–212.

Hoogeboom, D., Essers, M.A.G., Polderman, P.E., Voets, E., Smits, L.M.M., and Burgering, B.M.T. (2008). Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity. J. Biol. Chem. *283*, 9224–9230.

Hoshida, Y., Nijman, S.M.B., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.-P., Chiang, D.Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., et al. (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. *69*, 7385–7392.

Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. Cell *105*, 391–402.

Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. Cell *90*, 871–882.

Hummasti, S., and Tontonoz, P. (2006). The peroxisome proliferator-activated receptor N-terminal domain controls isotype-selective gene expression and adipogenesis. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *20*, 1261–1275.

Ip, W., Shao, W., Song, Z., Chen, Z., Wheeler, M.B., and Jin, T. (2015). Liver-specific expression of dominant-negative transcription factor 7-like 2 causes progressive impairment in glucose homeostasis. Diabetes *64*, 1923–1932.

Jager, P.L., Vaalburg, W., Pruim, J., de Vries, E.G., Langen, K.J., and Piers, D.A. (2001). Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. *42*, 432–445.

Jones, D.C., Ding, X., and Daynes, R.A. (2002). Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. J. Biol. Chem. *277*, 6838–6845.

Jungermann, K., and Katz, N. (1989). Functional specialization of different hepatocyte populations. Physiol. Rev. *69*, 708–764.

Kaidi, A., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. Nat. Cell Biol. *9*, 210–217.

Katz, N., Teutsch, H.F., Jungermann, K., and Sasse, D. (1977). Heterogeneous reciprocal localization of fructose-1,6-bisphosphatase and of glucokinase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue. FEBS Lett *83*, 272–276.

Katz, N., Thiele, J., and Giffhorn-Katz, S. (1989). Zonal distribution of fatty acid synthase in liver parenchyma of male and female rats. Eur. J. Biochem. *180*, 185–189.

Katz, N.R., Fischer, W., and Giffhorn, S. (1983a). Distribution of enzymes of fatty acid and ketone body metabolism in periportal and perivenous rat-liver tissue. Eur. J. Biochem. *135*, 103–107.

Katz, N.R., Fischer, W., and Ick, M. (1983b). Heterogeneous distribution of ATP citrate lyase in rat-liver parenchyma. Microradiochemical determination in microdissected periportal and perivenous liver tissue. Eur. J. Biochem. *130*, 297–301.

Kersten, S. (2014). Integrated physiology and systems biology of PPARα. Mol. Metab. *3*, 354.

Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. J.Clin.Invest *103*, 1489–1498.

Kilburn, D.G., Lilly, M.D., and Webb, F.C. (1969). The energetics of mammalian cell growth. J. Cell Sci. *4*, 645–654.

Kim, W., Kim, M., and Jho, E.H. (Feb 15). Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. Biochem J *450*, 9–21.

Kliewer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., et al. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 4318–4323.

Kmieć, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. *161*, III–XIII, 1-151.

Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. Organogenesis *4*, 68–75.

Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T.Y., Stange, D.E., van de Wetering, M., van Es, J.H., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., et al. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. Nature *488*, 665–669.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science *275*, 1784–1787.

Kridel, S.J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N., and Smith, J.W. (2004). Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. Cancer Res. *64*, 2070–2075.

Kung, H.-N., Marks, J.R., and Chi, J.-T. (2011). Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. PLoS Genet. *7*, e1002229.

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

Lacroix, M., Linares, L.K., and Le Cam, L. (2013). [Role of the p53 tumor suppressor in metabolism]. Med. Sci. MS *29*, 1125–1130.

de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegebarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., et al. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. Nature *476*, 293–297.

Lee, G.Y., Kim, N.H., Zhao, Z.-S., Cha, B.S., and Kim, Y.S. (2004). Peroxisomal-proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the rat hepatic malonyl-CoA decarboxylase gene: a key regulation of malonyl-CoA level. Biochem. J. *378*, 983–990.

Lee, S.M., Koh, H.-J., Park, D.-C., Song, B.J., Huh, T.-L., and Park, J.-W. (2002). Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. Free Radic. Biol. Med. *32*, 1185–1196.

Lee, Y.-M., Chang, W.-C., and Ma, W.-L. (2016). Hypothesis: solid tumours behave as systemic metabolic dictators. J. Cell. Mol. Med. *20*, 1076–1085.

Lehwald, N., Tao, G.-Z., Jang, K.Y., Sorkin, M., Knoefel, W.T., and Sylvester, K.G. (2011). Wnt-β-catenin signaling protects against hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. Gastroenterology *141*, 707–718, 718-5.

Lehwald, N., Tao, G.-Z., Jang, K.Y., Papandreou, I., Liu, B., Liu, B., Pysz, M.A., Willmann, J.K., Knoefel, W.T., Denko, N.C., et al. (2012). β-Catenin regulates hepatic mitochondrial function and energy balance in mice. Gastroenterology *143*, 754–764.

Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. Proc Natl Acad Sci U A *96*, 7473–7478.

Li, L., Di, X., Wu, M., Sun, Z., Zhong, L., Wang, Y., Fu, Q., Kan, Q., Sun, J., and He, Z. (2016). Targeting tumor highly-expressed LAT1 transporter with amino acid-modified nanoparticles: Toward a novel active targeting strategy in breast cancer therapy. Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.

Li, M., Zhao, H., Zhang, X., Wood, L.D., Anders, R.A., Choti, M.A., Pawlik, T.M., Daniel, H.D., Kannangai, R., Offerhaus, G.J.A., et al. (2011). Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. Nat. Genet. *43*, 828–829.

Li, Y., Huang, T., Zhang, X., Zhong, M., Walker, N.N., He, J., Berr, S.S., Keller, S.R., and Kundu, B.K. (2015). Determination of Fatty Acid Metabolism with Dynamic [11C]Palmitate Positron Emission Tomography of Mouse Heart In Vivo. Mol. Imaging *14*, 516–525.

Lieberman, B.P., Ploessl, K., Wang, L., Qu, W., Zha, Z., Wise, D.R., Chodosh, L.A., Belka, G., Thompson, C.B., and Kung, H.F. (2011). PET imaging of glutaminolysis in tumors by 18F-(2S,4R)4-fluoroglutamine. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. *52*, 1947–1955.

Lin, H., Patel, S., Affleck, V.S., Wilson, I., Turnbull, D.M., Joshi, A.R., Maxwell, R., and Stoll, E.A. (2016a). Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. Neuro-Oncol.

Lin, H.-P., Cheng, Z.-L., He, R.-Y., Song, L., Tian, M.-X., Zhou, L.-S., Groh, B.S., Liu, W.-R., Ji, M.-B., Ding, C., et al. (2016b). Destabilization of Fatty Acid Synthase by Acetylation Inhibits De Novo Lipogenesis and Tumor Cell Growth. Cancer Res. *76*, 6924–6936.

Little, J.L., and Kridel, S.J. (2008). Fatty acid synthase activity in tumor cells. Subcell. Biochem. *49*, 169–194.

Liu, H., Fergusson, M.M., Wu, J.J., Rovira, I.I., Liu, J., Gavrilova, O., Lu, T., Bao, J., Han, D., Sack, M.N., et al. (2011). Wnt signaling regulates hepatic metabolism. Sci. Signal. *4*, ra6.

Liu, J., Wang, H., Zuo, Y., and Farmer, S.R. (2006). Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin. Mol. Cell. Biol. *26*, 5827–5837.

Lo, R.C.-L., and Ng, I.O.-L. (2011). Hepatocellular Tumors: Immunohistochemical Analyses for Classification and Prognostication. Chin. J. Cancer Res. *23*, 245–253.

Lorin, S., Hamaï, A., Mehrpour, M., and Codogno, P. (2013). Autophagy regulation and its role in cancer. Semin. Cancer Biol. *23*, 361–379.

Loud, A.V. (1968). A QUANTITATIVE STEREOLOGICAL DESCRIPTION OF THE ULTRASTRUCTURE OF NORMAL RAT LIVER PARENCHYMAL CELLS. J. Cell Biol. *37*, 27.

Louet, J.F., Chatelain, F., Decaux, J.F., Park, E.A., Kohl, C., Pineau, T., Girard, J., and Pegorier, J.P. (2001). Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. Biochem. J. *354*, 189–197.

Lu, D., and Carson, D.A. (2010). Repression of beta-catenin signaling by PPAR gamma ligands. Eur. J. Pharmacol. *636*, 198–202.

Macara, I.G. (1989). Elevated phosphocholine concentration in ras-transformed NIH 3T3 cells arises from increased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown. Mol. Cell. Biol. *9*, 325–328.

Mao, J., DeMayo, F.J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T.E., Kordari, P., Chirala, S.S., Heird, W.C., and Wakil, S.J. (2006). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 8552–8557.

Marie, S.K.N., and Shinjo, S.M.O. (2011). Metabolism and Brain Cancer. Clinics *66*, 33–43.

Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B., and Auwerx, J. (1997). Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. J. Biol. Chem. *272*, 28210–28217.

Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. Nat. Rev. Clin. Oncol. *14*, 11–31.

Martínez-Zaguilán, R., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Chu, Y.W., Gillies, R.J., and Hendrix, M.J. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. Clin. Exp. Metastasis *14*, 176–186.

Mashimo, T., Pichumani, K., Vemireddy, V., Hatanpaa, K.J., Singh, D.K., Sirasanagandla, S., Nannepaga, S., Piccirillo, S.G., Kovacs, Z., Foong, C., et al. (2014). Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. Cell *159*, 1603–1614.

Mather, K.J., Hutchins, G.D., Perry, K., Territo, W., Chisholm, R., Acton, A., Glick-Wilson, B., Considine, R.V., Moberly, S., and DeGrado, T.R. (2016). Assessment of myocardial metabolic flexibility and work efficiency in human type 2 diabetes using 16-[18F]fluoro-4-thiapalmitate, a novel PET fatty acid tracer. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *310*, E452-460.

Matsumura, T., and Thurman, R.G. (1984). Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule. Eur. J. Biochem. *140*, 229–234.

Matsumura, T., Kashiwagi, T., Meren, H., and Thurman, R.G. (1984). Gluconeogenesis predominates in periportal regions of the liver lobule. Eur. J. Biochem. *144*, 409–415.

Mazurek, S., Boschek, C.B., Hugo, F., and Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. Semin. Cancer Biol. *15*, 300–308.

McFate, T., Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N.D., Wu, H., Schell, M.J., Tsang, T.M., Teahan, O., et al. (2008). Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity Controls Metabolic and Malignant Phenotype in Cancer Cells. J. Biol. Chem. *283*, 22700–22708.

McGarry, J.D., and Foster, D.W. (1979). In support of the roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransferase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. J. Biol. Chem. *254*, 8163–8168.

McGarry, J.D., Takabayashi, Y., and Foster, D.W. (1978). The role of malonyl-coa in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. J BiolChem *253*, 8294–8300.

McLin, V.A., Rankin, S.A., and Zorn, A.M. (2007). Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. Dev. Camb. Engl. *134*, 2207–2217.

Meertens, L.M., Miyata, K.S., Cechetto, J.D., Rachubinski, R.A., and Capone, J.P. (1998). A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPARalpha. EMBO J. *17*, 6972–6978.

Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. Nature *481*, 380–384.

Min, Z., and Amlani, M. (2014). Pulmonary Mycobacterium kansasii Infection Mimicking Malignancy on the (18)F-FDG PET Scan in a Patient Receiving Etanercept: A Case Report and Literature Review. Case Rep. Pulmonol. *2014*, 973573.

Mogilenko, D.A., Kudriavtsev, I.V., Shavva, V.S., Dizhe, E.B., Vilenskaya, E.G., Efremov, A.M., Perevozchikov, A.P., and Orlov, S.V. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor α positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor α-mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic-derived cells. J. Biol. Chem. *288*, 1726–1738.

Monga, S.P. (2015). β-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. Gastroenterology *148*, 1294–1310.

Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., et al. (2016). Liver PPARα is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. Gut *65*, 1202–1214.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science *275*, 1787–1790.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J. *417*, 1–13.

Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.-G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., Gems, D., et al. (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. Cell Metab. *13*, 361–366.

Narayan, P., Jajodia, P., Kurhanewicz, J., Thomas, A., MacDonald, J., Hubesch, B., Hedgcock, M., Anderson, C.M., James, T.L., and Tanagho, E.A. (1991). Characterization of prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and normal prostates using transrectal 31phosphorus magnetic resonance spectroscopy: a preliminary report. J. Urol. *146*, 66–74.

Nault, J.C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., Zucman-Rossi, J., et al. (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. Nat. Commun. *4*, 2218.

Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R., and White, R.L. (2000). APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. EMBO Rep. *1*, 519–523.

Neuveut, C., Wei, Y., and Buendia, M.A. (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. J. Hepatol. *52*, 594–604.

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. Cell *136*, 521–534.

Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., Romero, I.L., Carey, M.S., Mills, G.B., Hotamisligil, G.S., et al. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. Nat. Med. *17*, 1498–1503.

Ober, E.A., Verkade, H., Field, H.A., and Stainier, D.Y.R. (2006). Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. Nature *442*, 688–691.

Ohshima, Y., Kaira, K., Yamaguchi, A., Oriuchi, N., Tominaga, H., Nagamori, S., Kanai, Y., Yokobori, T., Miyazaki, T., Asao, T., et al. (2016). Efficacy of system l amino acid transporter 1 inhibition as a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci. *107*, 1499–1505.

Ong, K.T., Mashek, M.T., Bu, S.Y., Greenberg, A.S., and Mashek, D.G. (2011). Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning. Hepatol. Baltim. Md *53*, 116–126.

Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. EMBO J. *8*, 1711–1717.

Park, J.H., Vithayathil, S., Kumar, S., Sung, P.-L., Dobrolecki, L.E., Putluri, V., Bhat, V.B., Bhowmik, S.K., Gupta, V., Arora, K., et al. (2016). Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. Cell Rep. *14*, 2154–2165.

Paschka, P., Schlenk, R.F., Gaidzik, V.I., Habdank, M., Krönke, J., Bullinger, L., Späth, D., Kayser, S., Zucknick, M., Götze, K., et al. (2010). IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *28*, 3636–3643.

Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., et al. (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. Cell Cycle Georget. Tex *8*, 3984–4001.

Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell Metab. *23*, 27–47.

Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2015). Molecular mechanism of PPARα action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. *62*, 720–733.

Pearce, E.L., Poffenberger, M.C., Chang, C.-H., and Jones, R.G. (2013). Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. Science *342*, 1242454.

Perry, J.K., Lins, R.J., Lobie, P.E., and Mitchell, M.D. (2010). Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy. Clin. Sci. *118*, 451–457.

Phannasil, P., Ansari, I.H., El Azzouny, M., Longacre, M.J., Rattanapornsompong, K., Burant, C.F., MacDonald, M.J., and Jitrapakdee, S. (2017). Mass spectrometry analysis shows the biosynthetic pathways supported by pyruvate carboxylase in highly invasive breast cancer cells. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1863*, 537–551.

Piscaglia, F., Svegliati-Baroni, G., Barchetti, A., Pecorelli, A., Marinelli, S., Tiribelli, C., Bellentani, S., and HCC-NAFLD Italian Study Group (2016). Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. Hepatol. Baltim. Md *63*, 827–838.

Planas-Paz, L., Orsini, V., Boulter, L., Calabrese, D., Pikiolek, M., Nigsch, F., Xie, Y., Roma, G., Donovan, A., Marti, P., et al. (2016). The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. Nat. Cell Biol. *18*, 467–479.

Quistorff, B., Dich, J., and Grunnet, N. (1986). Periportal and perivenous hepatocytes retain their zonal characteristics in primary culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. *139*, 1055–1061.

Reddy, J.K., and Hashimoto, and T. (2001). PEROXISOMAL β-OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR–ACTIVATED RECEPTOR α: An Adaptive Metabolic System. Annu. Rev. Nutr. *21*, 193–230.

Reid, B.N., Ables, G.P., Otlivanchik, O.A., Schoiswohl, G., Zechner, R., Blaner, W.S., Goldberg, I.J., Schwabe, R.F., Chua, S.C., and Huang, L.-S. (2008). Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. J. Biol. Chem. *283*, 13087–13099.

Riggleman, B., Schedl, P., and Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. Cell *63*, 549–560.

Rinella, M.E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. JAMA *313*, 2263–2273.

Rocha, A.S., Vidal, V., Mertz, M., Kendall, T.J., Charlet, A., Okamoto, H., and Schedl, A. (2015). The Angiocrine Factor Rspondin3 Is a Key Determinant of Liver Zonation. Cell Rep. *13*, 1757–1764.

Rodríguez, J.C., Gil-Gómez, G., Hegardt, F.G., and Haro, D. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. J. Biol. Chem. *269*, 18767–18772.

Rodríguez-Enríquez, S., Carreño-Fuentes, L., Gallardo-Pérez, J.C., Saavedra, E., Quezada, H., Vega, A., Marín-Hernández, A., Olín-Sandoval, V., Torres-Márquez, M.E., and Moreno-Sánchez, R. (2010). Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. Int. J. Biochem. Cell Biol. *42*, 1744–1751.

Rodríguez-Enríquez, S., Hernández-Esquivel, L., Marín-Hernández, A., El Hafidi, M., Gallardo-Pérez, J.C., Hernández-Reséndiz, I., Rodríguez-Zavala, J.S., Pacheco-Velázquez, S.C., and Moreno-Sánchez, R. (2015). Mitochondrial free fatty acid β-oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. *65*, 209–221.

Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. Nat. Genet. *40*, 1461–1465.

Ronen, S.M., Rushkin, E., and Degani, H. (1991). Lipid metabolism in T47D human breast cancer cells: 31P and 13C-NMR studies of choline and ethanolamine uptake. Biochim. Biophys. Acta *1095*, 5–16.

Rosin-Arbesfeld, R., Cliffe, A., Brabletz, T., and Bienz, M. (2003). Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. EMBO J. *22*, 1101–1113.

Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., and Capaldi, R.A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. Cancer Res. *64*, 985–993.

Royo, T., Pedragosa, M.J., Ayté, J., Gil-Gómez, G., Vilaró, S., and Hegardt, F.G. (1995). Immunolocalization of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase in rat liver. J. Cell. Physiol. *162*, 103–109.

Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. Science *262*, 1731–1734.

Samudio, I., Fiegl, M., and Andreeff, M. (2009). Mitochondrial Uncoupling and the Warburg Effect: Molecular Basis for the Reprogramming of Cancer Cell Metabolism. Cancer Res. *69*, 2163–2166.

Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., Kaluarachchi, K., Bornmann, W., Duvvuri, S., Taegtmeyer, H., et al. (2010). Pharmacologic

inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. J. Clin. Invest. *120*, 142–156.

Sapiro, J.M., Mashek, M.T., Greenberg, A.S., and Mashek, D.G. (2009). Hepatic triacylglycerol hydrolysis regulates peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. J. Lipid Res. *50*, 1621–1629.

Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., et al. (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. Nat. Genet. *24*, 245–250.

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

Sawey, E.T., Chanrion, M., Cai, C., Wu, G., Zhang, J., Zender, L., Zhao, A., Busuttil, R.W., Yee, H., Stein, L., et al. (2011). Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. Cancer Cell *19*, 347–358.

Scalera, A., and Tarantino, G. (2014). Could metabolic syndrome lead to hepatocarcinoma via non-alcoholic fatty liver disease? World J. Gastroenterol. *20*, 9217–9228.

Scholtysek, C., Katzenbeisser, J., Fu, H., Uderhardt, S., Ipseiz, N., Stoll, C., Zaiss, M.M., Stock, M., Donhauser, L., Böhm, C., et al. (2013). PPARβ/δ governs Wnt signaling and bone turnover. Nat. Med. *19*, 608–613.

Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., and Auwerx, J. (1996). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. EMBO J *15*, 5336–5348.

Schug, Z.T., Peck, B., Jones, D.T., Zhang, Q., Grosskurth, S., Alam, I.S., Goodwin, L.M., Smethurst, E., Mason, S., Blyth, K., et al. (2015). Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. Cancer Cell *27*, 57–71.

Schulte, M.L., Hight, M.R., Ayers, G.D., Liu, Q., Shyr, Y., Washington, M.K., and Manning, H.C. (2016). Non-Invasive Glutamine PET Reflects Pharmacological Inhibition of BRAF(V600E) In Vivo. Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging.

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

Sellers, K., Fox, M.P., Bousamra, M., Slone, S.P., Higashi, R.M., Miller, D.M., Wang, Y., Yan, J., Yuneva, M.O., Deshpande, R., et al. (2015). Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. J. Clin. Invest. *125*, 687–698.

Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., and Jones, K.A. (2006). The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. Genes Dev. *20*, 586–600.

Solanas, G., Miravet, S., Casagolda, D., Castaño, J., Raurell, I., Corrionero, A., Herreros, A.G. de, and Duñach, M. (2004). β-Catenin and Plakoglobin N- and C-tails Determine Ligand Specificity. J. Biol. Chem. *279*, 49849–49856.

Son, J., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., et al. (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. Nature *496*, 101–105.

Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C.J., Végran, F., Verrax, J., Kennedy, K.M., Moon, E.J., Dhup, S., Danhier, P., Frérart, F., et al. (2012). Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. PloS One *7*, e33418.

Souza-Mello, V. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. World J. Hepatol. *7*, 1012–1019.

Sporn, M.B., and Liby, K.T. (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. Nat. Rev. Cancer *12*, 564–571.

Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T.W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. Mol. Cell *8*, 317–325.

Stanulović, V.S., Kyrmizi, I., Kruithof-de Julio, M., Hoogenkamp, M., Vermeulen, J.L.M., Ruijter, J.M., Talianidis, I., Hakvoort, T.B.M., and Lamers, W.H. (2007). Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. Hepatol. Baltim. Md *45*, 433–444.

Stenvall, A., Larsson, E., Strand, S.-E., and Jönsson, B.-A. (2014). A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. Phys. Med. Biol. *59*, 3353–3371.

Sung, W.-K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., Lee, N.P., Lee, W.H., Ariyaratne, P.N., Tennakoon, C., et al. (2012). Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. Nat. Genet. *44*, 765–769.

Surapureddi, S., Yu, S., Bu, H., Hashimoto, T., Yeldandi, A.V., Kashireddy, P., Cherkaoui-Malki, M., Qi, C., Zhu, Y.-J., Rao, M.S., et al. (2002). Identification of a transcriptionally active peroxisome proliferator-activated receptor alpha -interacting cofactor complex in rat liver and characterization of PRIC285 as a coactivator. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 11836–11841.

Swinnen, J.V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., and Verhoeven, G. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. Int. J. Cancer *98*, 19–22.

Takala, T.O., Nuutila, P., Pulkki, K., Oikonen, V., Grönroos, T., Savunen, T., Vähäsilta, T., Luotolahti, M., Kallajoki, M., Bergman, J., et al. (2002). 14(R,S)-[18F]Fluoro-6-thia-heptadecanoic acid as a tracer of free fatty acid uptake and oxidation in myocardium and skeletal muscle. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging *29*, 1617–1622.

Tanaka, S., Mohr, L., Schmidt, E.V., Sugimachi, K., and Wands, J.R. (1997). Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. Hepatol. Baltim. Md *26*, 598–604.

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

Tao, G.-Z., Lehwald, N., Jang, K.Y., Baek, J., Xu, B., Omary, M.B., and Sylvester, K.G. (2013). Wnt/β-catenin signaling protects mouse liver against oxidative stress-induced apoptosis through the inhibition of forkhead transcription factor FoxO3. J. Biol. Chem. *288*, 17214–17224.

Tardito, S., Oudin, A., Ahmed, S.U., Fack, F., Keunen, O., Zheng, L., Miletic, H., Sakariassen, P.Ø., Weinstock, A., Wagner, A., et al. (2015). Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. Nat. Cell Biol. *17*, 1556–1568.

Tarrado-Castellarnau, M., Atauri, P. de, and Cascante, M. (2016). Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. Oncotarget *7*, 62726–62753.

Tatum, J.L., Kelloff, G.J., Gillies, R.J., Arbeit, J.M., Brown, J.M., Chao, K.S.C., Chapman, J.D., Eckelman, W.C., Fyles, A.W., Giaccia, A.J., et al. (2006). Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. Int. J. Radiat. Biol. *82*, 699–757.

Teutsch, H.F., Altemus, J., Gerlach-Arbeiter, S., and Kyander-Teutsch, T.L. (1992). Distribution of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase in primary lobules of rat liver. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *40*, 213–219.

Tomlinson, I.P.M., Alam, N.A., Rowan, A.J., Barclay, E., Jaeger, E.E.M., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., et al. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. Nat. Genet. *30*, 406–410.

Torre, C., Perret, C., and Colnot, S. (2010). Molecular determinants of liver zonation. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. *97*, 127–150.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. CA. Cancer J. Clin. *65*, 87–108.

Tosh, D., Alberti, G.M., and Agius, L. (1988). Glucagon regulation of gluconeogenesis and ketogenesis in periportal and perivenous rat hepatocytes. Heterogeneity of hormone action and of the mitochondrial redox state. Biochem. J. *256*, 197–204.

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

Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., and Greenberg, M.E. (2003). The many forks in FOXO's road. Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. *2003*, RE5.

Trojan, J., Schroeder, O., Raedle, J., Baum, R.P., Herrmann, G., Jacobi, V., and Zeuzem, S. (1999). Fluorine-18 FDG positron emission tomography for imaging of hepatocellular carcinoma. Am. J. Gastroenterol. *94*, 3314–3319.

Trus, M., Zawalich, K., Gaynor, D., and Matschinsky, F. (1980). Hexokinase and glucokinase distribution in the liver lobule. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *28*, 579–581.

Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., and Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. EMBO J. *11*, 433–439.

Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of β-catenin. EMBO J. *31*, 2714–2736.

Vander Heiden, M.G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. Nat. Rev. Drug Discov. *10*, 671–684.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science *324*, 1029–1033.

Vazquez, F., Lim, J.-H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C.B., Granter, S.R., Widlund, H.R., Spiegelman, B.M., et al. (2013). PGC1α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. Cancer Cell *23*, 287–301.

Venneti, S., Dunphy, M.P., Zhang, H., Pitter, K.L., Zanzonico, P., Campos, C., Carlin, S.D., La Rocca, G., Lyashchenko, S., Ploessl, K., et al. (2015). Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. Sci. Transl. Med. *7*, 274ra17.

Visentin, M., Zhao, R., and Goldman, I.D. (2012). The antifolates. Hematol. Oncol. Clin. North Am. *26*, 629–648, ix.

Vizan, P., Boros, L.G., Figueras, A., Capella, G., Mangues, R., Bassilian, S., Lim, S., Lee, W.-N.P., and Cascante, M. (2005). K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in NIH3T3 mice [corrected] fibroblasts. Cancer Res. *65*, 5512–5515.

Wahli, W., and Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. Trends Endocrinol. Metab. TEM *23*, 351–363.

Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C.Y., and Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. Nature *524*, 180–185.

Wang, J.-B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L.B., Dias, S.M.G., Dang, C.V., et al. (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. Cancer Cell *18*, 207–219.

Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. J. Cancer Res. *9*, 148–163.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. Science *123*, 309–314.

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 8788–8793.

Weisdorf, D.J., Craddock, P.R., and Jacob, H.S. (1982). Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes: differential activation in phagocytosis and chemotaxis. Blood *60*, 888–893.

Welbourne, T.C. (1979). Ammonia production and glutamine incorporation into glutathione in the functioning rat kidney. Can. J. Biochem. *57*, 233–237.

Wheaton, W.W., Weinberg, S.E., Hamanaka, R.B., Soberanes, S., Sullivan, L.B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G.M., Budigner, G.S., et al. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. eLife *3*, e02242.

Wieman, H.L., Wofford, J.A., and Rathmell, J.C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. Mol. Biol. Cell *18*, 1437–1446.

Willson, J.S.B., Godwin, T.D., Wiggins, G. a. R., Guilford, P.J., and McCall, J.L. (2013). Primary hepatocellular neoplasms in a MODY3 family with a novel HNF1A germline mutation. J. Hepatol. *59*, 904–907.

Wilson, P.M., Danenberg, P.V., Johnston, P.G., Lenz, H.-J., and Ladner, R.D. (2014). Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. Nat. Rev. Clin. Oncol. *11*, 282–298.

Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 18782–18787.

Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E.S., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 19611–19616.

Witney, T.H., Pisaneschi, F., Alam, I.S., Trousil, S., Kaliszczak, M., Twyman, F., Brickute, D., Nguyen, Q.-D., Schug, Z., Gottlieb, E., et al. (2014). Preclinical evaluation of 3-18F-fluoro-2,2-dimethylpropionic acid as an imaging agent for tumor detection. J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. *55*, 1506–1512.

Wölfle, D., and Jungermann, K. (1985). Long-term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocyte cultures. Eur. J. Biochem. *151*, 299–303.

Wolfrum, C., Borrmann, C.M., Borchers, T., and Spener, F. (2001). Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 2323–2328.

Wong, C.R., Nguyen, M.H., and Lim, J.K. (2016). Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. World J. Gastroenterol. *22*, 8294.

Wu, J.W., Wang, S.P., Alvarez, F., Casavant, S., Gauthier, N., Abed, L., Soni, K.G., Yang, G., and Mitchell, G.A. (2011). Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. Hepatol. Baltim. Md *54*, 122–132.

Wyns, W., Schwaiger, M., Huang, S.C., Buxton, D.B., Hansen, H., Selin, C., Keen, R., Phelps, M.E., and Schelbert, H.R. (1989). Effects of inhibition of fatty acid oxidation on myocardial kinetics of 11C-labeled palmitate. Circ. Res. *65*, 1787–1797.

Xiang, Y., Stine, Z.E., Xia, J., Lu, Y., O'Connor, R.S., Altman, B.J., Hsieh, A.L., Gouw, A.M., Thomas, A.G., Gao, P., et al. (2015). Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis. J. Clin. Invest. *125*, 2293–2306.

Xie, H., Hanai, J.-I., Ren, J.-G., Kats, L., Burgess, K., Bhargava, P., Signoretti, S., Billiard, J., Duffy, K.J., Grant, A., et al. (2014). Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. Cell Metab. *19*, 795–809.

Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Plunket, K.D., Moore, L.B., Collins, J.L., Oplinger, J.A., Kliewer, S.A., Gampe, R.T., McKee, D.D., et al. (2001). Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 13919–13924.

Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.-T., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases. Cancer Cell *19*, 17–30.

Yeh, T.-H., Krauland, L., Singh, V., Zou, B., Devaraj, P., Stolz, D.B., Franks, J., Monga, S.P.S., Sasatomi, E., and Behari, J. (2010). Liver-specific β-catenin knockout mice have bile canalicular abnormalities, bile secretory defect, and intrahepatic cholestasis. Hepatol. Baltim. Md *52*, 1410–1419.

Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. Cell *149*, 656–670.

Yoon, J.C., Ng, A., Kim, B.H., Bianco, A., Xavier, R.J., and Elledge, S.J. (2010). Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. Genes Dev. *24*, 1507–1518.

Youm, Y.-H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M., Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T.D., et al. (2015). The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. Nat. Med. *21*, 263–269.

Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., et al. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. Cell Metab. *15*, 157–170.

Zaidi, N., Swinnen, J.V., and Smans, K. (2012). ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. Cancer Res. *72*, 3709–3714.

Zierz, S., Katz, N., and Jungermann, K. (1983). Distribution of pyruvate kinase type L and M2 in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue with different dietary states. Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem. *364*, 1447–1453.

Zu, X.L., and Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. Biochem. Biophys. Res. Commun. *313*, 459–465.

Zucman-Rossi, J., Benhamouche, S., Godard, C., Boyault, S., Grimber, G., Balabaud, C., Cunha, A.S., Bioulac-Sage, P., and Perret, C. (2007). Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. Oncogene *26*, 774–780.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C., and Llovet, J.M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology *149*, 1226–1239.e4.

Annexes

Choline addiction enables non-invasive imaging of β-catenin-mutated hepatocellular carcinomas, in which it constitutes a therapeutic target.

Chiara Sartor[1-3]*, Nadia Senni[1-3]*, Angélique Gougelet[1-3]*, Julien Calderaro[4], Giuliana Amaddeo[5], Laetitia Fartoux[6], Marie Lequoy[6-7], Dominique Wendum[7-8], Jean-Noël Talbot[9-10], Aurélie Prignon[10], Julia Chalaye[11], Sandrine Imbeaud[12], Jessica Zucman-Rossi[12], Cécile Godard[1-3], Pascale Bossard[1-3], Olivier Rosmorduc[6-7], Sabine Colnot[1-3].

*Contributed equally to the work

[1]Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, 75014, France; Equipe labellisée LNCC, Paris, France.
[2]Cnrs, UMR8104, Paris, 75014, France.
[3]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, 75006, France.
[4]Anatomie Pathologique, Hôpital Universitaire Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France.
[5]Médecine Interne, Hôpital Universitaire Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France.
[6]Service d'Hépatologie, Hôpital St-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 6, Paris, France.
[7]INSERM, UMR_S938 Centre de Recherche Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg St-Antoine, 75012 Paris, France.
[8]Anatomie Pathologique, AP-HP, Hôpital St Antoine, Paris, France; Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Paris, France.
[9]Médecine Nucléaire, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France.
[10]Plateforme LIMP, UMS28, Phénotypage du petit animal, UPMC, Paris, France.
[11]Radiologie, Hôpital Universitaire Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France.
[12]INSERM, UMR 1162, Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Institut Universitaire d'Hematologie, Paris, France.

Correspondence to Sabine Colnot :
Sabine.colnot@inserm.fr
Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes
24, rue du Faubourg Saint Jacques
75014 PARIS, FRANCE
Tel: +33 144412567 Fax: +33 144412421

ABSTRACT

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the second cause of cancer death worldwide, due to its resistance to chemotherapy and to a poor life expectancy after diagnosis. Fluoro-deoxyglucose Positron Emission Tomography (FDG-PET) is an imaging method that helps the early diagnosis but it detects only sixty percent of HCCs and until now, it has not been shown to be able to genetically classify tumors, a prerequisite to treat patients with more efficient and pathway-specific targeted therapies.

One third of the HCCs is characterized by activating mutations in *CTNNB1* encoding β-catenin. These tumors show unique transcriptomic, histological and metabolic specificities and previous results showed that they are FDG-PET negative.

We demonstrate herein that the liver metabolic signature of β-catenin is affecting choline metabolism. Choline is an essential nutrient contributing to phospholipid synthesis and methylation processes. Fluoro-choline PET (FCH-PET) imaging in liver tumors is under development, and we re-analyzed two distinct french cohorts of patients with HCCs, for whom FCH-PET and FDG-PET imagings were undertaken. We found a strong correlation between *CTNNB1*-mutations and FCH-PET positivity in HCC. The same correlation was found in mouse HCCs, by the use of two models, one dependent on β-catenin activation, the so-called Apc-knock-out model, and the other independent on β-catenin status, i.e. the diethylnitrosamine-induced model of HCC.

Morevoer, suppressing choline and methionine intakes from the diet reversed the hepatomegalic phenotype developed following β-catenin activation. Such a reversal also occurred for β-catenin-dependent DNA methylation. In fact, we showed that ^{14}C-choline incorporated into intracellular phospholipids, both in primary hepatocytes and tumors. More interestingly, ^{14}C-choline also integrated secreted phospholipids in hepatocytes and tumors specifically in a context of β-catenin activation, and we linked this phenomenon with an increase in bile synthesis in these livers. We finally showed that ^{14}C-choline is a potent methyl group donor for DNA methylation, and this occurs only in β-catenin-activated tumors.

In conclusion, this study demonstrates that a simple non-invasive and routinely FCH-PET analysis should be used to genotype β-catenin-mutated HCCs. This increased metabolism of choline has unique consequences in β-catenin-activated hepatocytes and is a therapeutic target for this category of HCCs.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common liver primitive cancer and the third leading cause of cancer-related death worldwide. HCC development is a multistep process, driven by genetic, viral and environmental factors. In eastern countries, its onset has increased, as a consequence of hepatitis and cirrhosis due to the infection with the hepatitis B and C viruses, to alcohol consumption and to metabolic dysfunction (Knudsen et al., 2014). The prognosis of HCC remains unfavorable in humans, and its non-invasive early diagnosis a thorny issue. Moreover, the genetics of these tumors is complex, and there is a need for an early diagnosis of the altered signaling pathways, that could allow targeted therapies to be successfully administered. Biomarkers in blood serum are used, the most common being the α-fetoprotein (AFP) assay, which however has a quite low sensitivity (60%), and has no specificity in terms of altered signaling pathway. Imaging methods have emerged to follow high-risk patients without needing the use of invasive methods. The ^{18}F-Fluoro Deoxyglucose (^{18}F-FDG) Positron Emission Tomography (PET) and its hybrid version including computed tomography (PET/CT) has been useful to detect many cancers, but its use is limited in the liver because of a low sensitivity (60% overall) (Talbot et al., 2010). FDG-PET positivity is based on the addiction of tumor cells to glucose, a well-documented property known as the Warburg effect, that consists in a high rate of glycolysis directed to lactate production, conferring to the tumor a metabolic and growth advantage (Bensinger and Christofk, 2012). The inability of FDG-PET to detect all HCCs could be linked to heterogenous tumoral phenotypic traits. Indeed, one major genetic mutation characterize one third of the HCCs, and consists in activating mutations in *CTNNB1*, encoding β-catenin, leading to an aberrant and constitutive activation of β-catenin signaling (de La Coste et al., 1998; Miyoshi et al., 1998; Schulze et al., 2015). The Wnt/β-catenin pathway plays a dual role in the adult liver: through its limited activation to the pericentral area of the liver, it patterns the so-called hepatic metabolic zonation (Benhamouche et al., 2006; Torre et al., 2010). When activated by oncogenic mutations, its aberrant accumulation leads to liver tumorigenesis (Cavard et al., 2008). Interestingly, β-catenin-mutated HCCs have peculiar characteristics: a low proliferation rate, a high differentiation grade and a better prognosis than non-mutated ones (Boyault et al., 2007; Hoshida et al., 2009). They also exhibit specific metabolic properties: they are mostly cholestatic (Audard et al., 2007), they overexpress a panel of genes defining metabolic zonation (Gougelet et al., 2014), among which is the glutamine

synthetase, a target of β-catenin and a histological marker of these tumors (Audard et al., 2007).

In previous studies, we used genetically-engineered mice developing β-catenin-activated HCCs, through the hepatic loss of the main break of β-catenin signaling, the Adenomatous Polyposis Coli (Apc) tumor suppressor gene. These HCCs are quite similar to their human counterpart with *CTNNB1* activating mutations, sharing their transcriptome and metabolic characteristics (Colnot et al., 2004; Gougelet et al., 2014). Using this model in a FDG-PET approach, we demonstrated that β-catenin-activated livers had no addiction to glucose (Chafey et al., 2009). An elegant study showed thereafter that genetic mutations in liver tumors pattern tumor metabolism; they either elicit a Warburg-type response, or a more complex metabolic response characterized by glutamine synthetase overexpression and glutamine production with only a mild FDG addiction (Yuneva et al., 2012). Altogether, these data suggest that an accurate PET determination could discriminate and genotype HCCs, and this could be a significant breakthrough to treat patients with targeted therapies without a need for invasive genotyping methods.

We focused on a ^{18}F-fluorocholine (FCH) PET approach, because we previously showed its higher sensitivity compared to FDG-PET, in order to detect well-differentiated HCCs (Fartoux et al., 2012; Talbot et al., 2010). Choline is an essential nutrient that allows the synthesis of phosphatidylcholine, a major lipid of the membranes. In the liver, it is also used for VLDL and bile formation. Choline is also used as the major methyl-group donor of the cell. For these reasons, cancer cells may be characterized by their ability to incorporate choline actively, and as an example, FCH-PET is now routinely used for the detection of prostate cancer (Glunde et al., 2011). An increased choline metabolism is mostly characterized by an increase in Choline kinase α, whose expression is controlled by a number of oncogenic pathways, such as Ras, Mapk, PI3K-AKT, AP1 and HIF1 (Glunde et al., 2011). We postulated that β-catenin pathway could also be such a signal increasing choline metabolism.

In the present study, we revisited metabolomics of the β-catenin-activated mouse liver, and found a deregulation in choline products. We then assessed that CTNNB1-mutated hHCCs were revealed by their FCH-PET positivity, contrary to non-mutated HCCs. These features were also found in genetically- or chemically-engineered tumoral mice. By using *in vitro* and *in vivo* methods, we found a role of choline in regulating liver size and DNA methylation, two aspects that can be crucial for liver tumorigenesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals, tumor follow-up and MCD diet

Mice carrying the two floxed alleles on the 14th exon of the Apc gene (here referred to as Apc$^{lox/lox}$) were interbred with TTR-CreTam mice to generate Apc$^{lox/lox}$/TTR-CreTam mice (Colnot et al., 2004; Tannour-Louet et al., 2002). Two-month old male Apc$^{lox/lox}$/TTR-CreTam mice were Apc-invalidated with an intraperitoneal injection of either a low (0.75mg) or a high (2mg) dose of Tamoxifen, generating so-called Apc^{ko} animals. In our experimental settings, Tamoxifen-injected Apc$^{lox/lox}$/Cre-negative mice were used as controls (Ctrl). Animals injected with 2mg developed a panlobular activation of β-catenin; they were sacrified 6 or 7 days after Tamoxifen injection and used as a pretumoral model for either short-term molecular studies (Day 7) or primary hepatocyte culture (Day 6). The mice injected with 0.75mg Tamoxifen activated β-catenin in single hepatocytes (Gougelet et al., 2015): they were kept for long-term tumorigenesis studies.

C57Bl/6 male mice (Janvier, France) were injected with Diethylnitrosamine (DEN) at 14 days after birth. Tumor development of DEN-injected and Apc^{ko} mice was followed up by ultrasonography from 5 months after Tamoxifen or DEN injection (Small animal imagery facility, Cochin Institute). When tumors reached 2mm diameter, they were analyzed by micro-PET (Tenon Hospital, Paris), and thereafter mice were sacrified for tumor sampling and analysis.

For the studies of mice fed a Methionine and Choline Deficient (MCD) diet, two-month male mice were given a MCD diet (SNIFF, Germany) during 7 days. Then the mice were injected with Tamoxifen (2mg/mouse) and another 7-day MCD diet period was done before sacrifice. The efficiency of the diet was assessed by the appearance of small lipid droplets in the MCD control mice, due to the defect in VLDL formation in these mice.

All animal procedures were carried out according to French governmental regulations, and were approved by the ethical committee of Paris Descartes University.

Micro-PET analysis in mice

PET imaging was performed on Apc^{ko} and DEN-injected with a Mosaic animal PET system (Philips Medical systems, Cleveland, OH, USA). Mice were imaged with ^{18}F-Fluorocholine (Ison or Advanced Accelerator Applications, France). Mice were anesthetized with a mixture of 1.5% isoflurane and oxygen. Animals were injected intravenously in the retro-orbital sinus

with 5 ± 2MBq. For ^{18}F-Fluorocholine, static PET acquisitions were performed during an exposure time of 10 minutes, 15 min after injection. Images were reconstructed and data were analyzed using PETView and Syntegra–Philips software (PETView; Philips Medical Systems). Tracer uptake was quantified using maximum standardized uptake value (SUVmax, g/mL). SUVmax = measured maximal volumic activity in the tumor (Bq/mL) x body weight (g) / injected activity (Bq).

Patients, PET/CT analysis and histomorphological characterization

The "St-Antoine" cohort: Data of 18 patients with one or two HCC nodules on MRI or contrast-enhanced CT were analyzed. *The "Créteil" cohort*: Data of 20 patients with one or two HCC nodules on MRI or contrast-enhanced CT were analyzed. They all gave their written informed consent to be included in a prospective phase III study comparing FCH and FDG PET/CT for the detection of HCC (Eudract 2006-0000538-11). Each patient underwent both FDG and FCH PET/CT examinations on two different days in a random order within less than 2 months.

PET/CT examinations and interpretations were performed as previously described (Fartoux et al., 2012). Briefly, for both FDG and FCH PET/CTs, lesions were considered positive if they corresponded to non physiological foci with high radiotracer uptake.

The resected specimens were treated after surgery in accordance with French law and ethical guidelines. A part was suddenly frozen in liquid nitrogen, the other was fixed in 4% formol to be included in paraffin. For the "Créteil" cohort, only paraffin-embedded tumor samples were obtained and analyzed by immunohistochemistry for β-catenin and glutamine synthetase positivity. The number of lesions and the maximal diameter of the main HCC nodule were determined on the resected specimen. Histological differentiation grade was assessed.

Another cohort of human HCCs with genetically well-characterized HCCs was used: it is constituted of 155 normal and tumoral samples used for an Affymetrix microarray analysis (Boyault et al., 2007).

Mutation screening

Genomic DNA samples were extracted thanks to the NucleoSpin Triprep, Macherey-Nagel kit. Mutations analysis in the exon3 of β-catenin gene was done on amplified DNA (25ng) by

PCR (PF : AAC CCT GGC TAT CAT TCT GCT; PR : AGG ACT TGG GAG GTA TCC ACA), followed by a Sanger sequencing.

RNA extraction and qPCR

RNA was extracted with Trizol® (Life technologies ^{TM}) or thanks to the NucleoSpin Triprep, Macherey-Nagel, depending on the available tissue. RNAs were dosed and a Reverse Transcription PCR was performed (Thermo scientific). The primers and the reagents for qPCRs were either SybRgreen or Taqman (see table S1; Thermo scientific). Normalizations were done against 18s ribosomal RNA. The PCRs were done on a LightCycler II apparatus (Roche).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was undertaken using 5 µm sections of fixed paraffin-embedded liver (human and mouse). The sections were deparaffinized, hydrated and antigen retrieval was performed in a hot-water bath at 95°C for 20min with citrate buffer pH6 (Vector H-3300). After the blocking step, the slides were incubated with primary antibody for 1H at RT (see table S2) and after with biotinylated secondary antibody (1/750 for mouse, 1/200 for rabbit antibodies). IHC were revealed with an ABC (Avidin Biotin Complex) – DAB (3, 3'-diaminobenzidine) system. Nuclei were then evidenced by Mayer's hemalun solution and the slides were mounted after dehydration.

Metabolomic Profiling

Metabolomic profiling of 16 frozen samples (8 Apc knock-out livers, 8 control livers; 100 mg/sample) was performed with Metabolon, Inc (Durham, USA). Part of these results have been described elsewhere (Gougelet et al., 2014). Liquid chromatography/mass spectrometry in positive and negative modes and gas chromatography/mass spectrometry were used. A total of 469 metabolites were measured. No metabolites were filtered out based on a 25% missing data criteria.

[Methyl ^{14}C] Choline metabolism

Isolation of control or transgenic hepatocytes by collagenase perfusion has been described elsewhere (Gougelet et al., 2015). Primary hepatocytes were cultivated first in Williams E medium for 24 h, then during the last 2 h in Williams E containing 0.01 mM [Methyl -^{14}C] choline (0.1 Ci/mol).

The tumors or the non-tumoral adjacent tissues were carefully dissected out and then chopped down into 1 to 2 mm^3 pieces. One hundred to 150 mg of these explants were incubated for 2 hours at 37 °C into Williams E media containing 0.01 mM [Methyl-^{14}C] choline (0.1 Ci/mol). The medium was then collected for lipid secretion assay : 3 ml were layered under 5 ml of 150 mM NaCl and centrifuged for 18 h at 10°C at 110 000 g. [Methyl-^{14}C]-Choline incorporation into secreted lipids was directly assayed by scintillation counting of 500 µl from the top fraction.

The primary hepatocytes or the explants were washed 3 X in PBS (phosphate buffered saline) then mechanically homogenized in PBS. One fifth of the homogenate was used for protein measurement using the Bradford assay (Bio-Rad laboratories, USA). The lipid soluble fraction was then extracted from the remaining homogenate with chloroform/methanol (2/1, v/v), and separated by thin layer chromatography on silica gel plates. After iodine staining, the different lipid species were collected and ^{14}C incorporation assayed by scintillation counting.

^{14}C-methylated DNA was assayed on a water-soluble fraction after a phenol/chloroform (1/1, v/v), pH 8.0 extraction. Two more chloroform extractions of the aqueous phase were done. After RNAse A treatment, genomic DNA was pelleted by 300 mM sodium acetate pH 4.8 and ethanol (1/3, v/v). DNA was quantified by spectrophotometry at 260 nm, and [Methyl -^{14}C] incorporation into DNA was measured by scintillation counting of the whole genomic DNA fraction.

DNA methylation measurement

Input DNA was extracted from frozen livers by a classic phenol-chloroform-isoamyl-alcohol/chloroform or obtained using NucleoSpin Triprep, Macherey-Nagel. DNA methylation was quantified using Epigentek kit, measuring 5-methylcytosine levels by the use of capture and detection antibodies and then quantification through an ELISA-like colorimetric reaction.

Statistical analysis

We assessed the statistical significances of the data using GraphPad Prism 6 software. The tests used were parametric and assumed a Gaussian distribution, as tested by R software.

RESULTS

β-catenin has an impact on choline metabolism in mouse livers

In an attempt to identify the metabolic landscape generated by β-catenin in the liver, we previously adopted a metabolomics strategy, enlightening biliary acids and glutamine products as being accumulated in Apc^{ko} livers, whereas triglycerides and fatty acids were dramatically decreased (Gougelet et al., 2014). We revisited these data and among the accumulated metabolites, we found phospholipids from the lysolipid subfamily, affecting only products of the choline but not those of the ethanolamine pathway (Figure 1A, B). We also found after feeding an increase in intracellular choline, and in its intermediate product CDP-choline, generated by the Kennedy pathway. Sphingolipids accumulated much more, and the pathway of choline oxidation generating Betaine and Methionine was altered, with a lesser amount of Betaine, and a higher amount of Methionine and Homocysteine. Then, we used a previous screening of mRNA-Seq done on the same samples as the metabolites, and found an association of these deregulations with an increased gene expression of the *Oct1, Oct2, Oct3*, *Ctl2* choline transporters, of the *Cept1* enzyme of the Kennedy pathway and of the *Sgms* enzymes of the sphingolipid synthesis (Figure 1B, Table S3 for a full overview). Altogether, these data suggest that the uptake and metabolism of choline are altered by β-catenin overactivation, through gene expression modifications.

Genotyping human β-catenin-mutated HCCs with FCH-PET

We took advantage of the cohort of "St-Antoine" patients with HCCs who had been screened through a systematic double PET/CT screening, i.e. FDG-PET and FCH-PET, before resection or biopsy of the tumor. Eighteen patients were selected with distinct features (Table 1). We assessed the status of β-catenin activation on paraffin-embedded tissue by a GS immunostaining (a score of 3 corresponding to *CTNNB1*-mutated status as previously assessed (Audard et al., 2007)), and on frozen tumors by *CTNNB1* exon-3 sequencing on one part, and on the other part by qPCR assessment of β-catenin target genes, GS and Axin2, on tumors (T) compared to their non tumoral adjacent liver tissue (NT) (the threshold chosen was a T versus NT ratio upper than 5). The positivity for PET was either only visually estimated, or confirmed by SUVmax ratios between T and NT, using a threshold of 1.5.

We had to exclude 6 patients from this series: two because the biopsy performed was exhausted and we could not assess GS immunostaining, 2 others because their PET showed a

complex pattern, as FDG and FCH-PET analyses showed both positive and negative areas. The last 2 tumors excluded had discordant data between GS immunostainings that were positive, and *CTNNB1* sequencing or/and qPCR assessments, which were negative: this suggests an intra-tumoral heterogeneity.

For the 12 informative patients, 6 were FCH positive, among which only one was FDG positive, and all of these were *CTNNB1*-mutated (mut) (Table 1); the six other patients were FCH-negative, among which three were FDG positive and all of them were *CTNNB1*-wild-type (wt). An illustration of these data is shown in Figure 2 for one patient of each genotype.

We decided to extend this analysis to the "Créteil" cohort for which we got less informative data and we based our assessment of β-catenin mutational status on immunohistochemistry data: 10 HCC samples were GS positive and were defined as being β-catenin-activated, and 10 were GS negative, defined β-catenin wild-type. With these settings, we found again that β-catenin-activated HCCs had a significant higher uptake of choline (SUV max) than β-catenin wild type ones. The same trend was found when the tumor versus non tumor SUV ratio was considered, even if not significant. Altogether, these results show that there is a significant higher uptake of choline in β-catenin-activated HCCs than in wild type ones.

Then, we looked at expression of genes involved in choline metabolism and transport on two cohorts of HCCs: the "St-Antoine" one by a RT-qPCR analysis (Figure 3A), and one cohort of genetically-characterized HCCs by a genome-wide microarray analysis (Boyault et al., 2007) (Figure 3B). We searched for a differential gene expression (mut *versus* wt) in the orthologous genes described in Table S3 for mice, relevant for acting in choline metabolism. We found that *CHKA* and *PCYT1A* expression were upregulated in HCCs regardless of their mutation status, but they were found increased in *CTNNB1*-mut tumors compared to *CTNNB1*-wt tumors (Figure 3B). These deregulations were specific for HCC, as their expression in adenomas were not distinguishable from normal livers, regardless of their genetic alteration. In the two cohorts, there was either a trend or a significant increased expression of CHKA, CEPT1 and PCYT1A mRNAs, the three main enzymes of the choline Kennedy pathway, in *CTNNB1*-mut/FCH-PET positive HCCs compared to *CTNNB1*-wt ones.

Altogether, these data showed that in the case of homogenous tumors, PET-FCH positivity is powerful to discriminate *CTNNB1*-mutated HCCs, whereas it is not the case for FDG-PET. This is accompanied with a mild increase of expression of the enzymes of the choline Kennedy pathway, not seen in adenomas, suggesting that this is specific for HCCs.

FCH-PET is also efficient to genotype mouse β-catenin-activated tumors

To assess whether the Apc^{ko} model of mouse liver tumors can be used to unravel the mechanism and consequences of choline deregulation by β-catenin, we first measured the uptake of choline in Apc^{ko} livers (Figure 4A). This was done *in vivo* by FCH-microPET and revealed an increased uptake of choline in these livers compared to controls (Figure 4B). A similar result was obtained *in vitro* on primary cultures of hepatocytes: the uptake of Methyl-^{14}C-Choline by Apc^{ko} hepatocytes was increased compared to controls (Figure 4C).

Next, we developed two mouse models of HCCs: one is linked to Apc inactivation and β-catenin gain-of-function (Colnot et al., 2004), whereas the second is induced by diethylnitrosamine (DEN) and is independent from β-catenin status (Aydinlik et al., 2001). After the emergence of tumors within 5 to 8 months (screened by ultrasonography), FCH-PET was done (Figure 4D,E). Tumor size and numbers do not differ between both models, as assessed by the liver to body weight ratio (Figure 4D). In the 7 Apc^{ko} tumoral livers studied, FCH-positive spots were systematically detected, corresponding to the location of tumors after sacrifice (Figure 4D, E). In mouse tumors, Cept1 mRNA expression was specifically induced in Apc^{ko} tumors and not in DEN-induced ones, both at the mRNA and at the protein level (Figure S1B). Chkα but also Chkβ were as well induced but were not specific for β-catenin status. In the 10 DEN-induced tumoral livers, 3 cases of FCH positivity were detected, rather occurring in larger tumors (Figure 4D, E). In conclusion, β-catenin favors choline uptake by the hepatocyte, and β-catenin-activated tumors in mice can be characterized, as in humans, by their FCH positivity, which is higher than in the non-activated DEN-induced tumors.

Choline dietary intake controls Apc^{ko} liver size and β-catenin-dependent DNA methylation

In order to define whether the choline preferential uptake of β-catenin-activated hepatocytes has functional consequences, we deprived mice from choline and methionine dietary intake. We submitted Apc^{ko} mice to a Methionine-Choline Deficient diet (MCD). The MCD diet is able to suppress choline substrate for phospholipid synthesis, while the coupling with Methionine deficiency also suppresses choline as a methyl group donor (Figure 1B). This diet was administered during 15 days (Figure 5A), because longer administrations generate long term inflammatory and cancer consequences. These carcinogenic effects are due to a dramatic steatosis originating mainly from the absence of VLDL formation and lipid

export (Mato and Lu, 2011). As our purpose was to identify immediate consequences of choline depletion, we checked by Oil Red O stainings that small lipid droplets began to accumulate by 15 days (D15) (data not shown), demonstrating the efficiency of the depletion at D15 and justifying this time point proposed for our experiment (Figure 5A).

When mice were fed a conventional diet, 7 days after Tamoxifen injection the panlobular Apc inactivation led to a severe hepatomegaly linked with hepatocyte hyperproliferation ((Benhamouche et al., 2006; Colnot et al., 2004), and Figure 5B, C). Interestingly, under a MCD diet, this hepatomegaly was completely abolished (Figure 5B). We expected that this hepatomegaly could be linked to a default in hepatocyte proliferation, which requires membrane formation and thus phospholipid production. However, the proliferation of hepatocytes at day 7 remained constant (Figure 5C). No difference in the size of the hepatocytes could be detected by comparing Apc^{ko} livers in either diet (data not shown).

Nevertheless, we tested another parameter potentially controlled by choline intake, which is DNA methylation. Under a conventional diet, Apc^{ko} hepatocytes tended to be overmethylated on cytosines, and this DNA methylation was dramatically down regulated when mice were fed a MCD diet (Figure 5D). Moreover, the expression of the DNA methyltransferases Dnmt1 and Dnmt3a was induced in Apc^{ko} livers in conventional diet. This increase was completely abolished when Apcko mice are fed a MCD diet.

In summary, we have shown that depleting both choline and methionine intakes, leads to a reversal of the hepatomegaly of Apc^{ko} mice, whose cause is still to be deciphered. It also leads to a reversal of DNA methylation, suggesting that choline has a major role as a methyl group donor in β-catenin-activated hepatocytes.

β-catenin specifically orientates choline fate to secreted phospholipids and to methylated DNA

To better understand the fate of choline and its specificity regarding β-catenin status, we analyzed its incorporation in phospholipids and its contribution to DNA methylation. Two models of cultures incubated with Methyl-^{14}C-Choline were chosen: primary hepatocytes and tumor explants (either of DEN-induced or Apc^{ko} origin) (Figure 6). Firstly, we detected a significant accumulation of ^{14}C in intracellular phospholipids, in both primary hepatocytes and tumors of either model (Figure 6A). We expect that this incorporation was linked to hepatocyte proliferation, as Apc^{ko} primary hepatocytes, as well as DEN-induced and Apc^{ko} tumors are strongly proliferating (Figure 6B).

Secondly, we measured the accumulation of ^{14}C in secreted phospholipids (Figure 6C): in the liver, they should be represented by the VLDL production, but also by the bile secreted in the medium which is rich in phospholipids. Interestingly, both Apcko primary hepatocytes and tumor explants strongly incorporated choline in their secreted phsopholipids. This was not the case for DEN-induced tumors, meaning that this effect should be specific for β-catenin activation. We previously showed that Apcko livers produced less blood VLDL than normal livers (Gougelet et al., 2014), suggesting that the incorporation of choline into VLDL is not a major fate in Apcko livers. Interestingly, we also showed that β-catenin activation was an inducer of bile acid synthesis through a transcriptional increase in Cyp7a1 and Cyp27a1 gene expressions (Gougelet et al., 2014). Moreover, CTNNB1-mut HCCs are often cholestatic (Audard et al., 2007). These data suggested that choline could be preferentially incorporated in secreted bile phospholipids. To test this hypothesis, we measured the bile flow of Apcko livers, and found that there is a trend in a faster bile flow, and consequently to an increased bile synthesis, potentially requiring more synthesis of both phospholipids and bile acids.

Third, we searched for ^{14}C incorporation in tumor DNA that would endorse the role of Choline as a methyl group donor for DNA methylation. We found that DNA from Apc^{ko} tumors was enriched in ^{14}C, contrary to DEN-induced tumors.

Altogether we have shown here that ^{14}C-Choline is used to synthesize phospholipid membranes, and this is associated with hepatocyte proliferation. Moreover and specifically in a context of β-catenin activation, ^{14}C-Choline contributes to the synthesis of secreted phospholipids, which are probably bile phospholipids, and to DNA methylation.

DISCUSSION

The major breakthrough of this study was to uncover that an imaging non-invasive method would be able to genotype tumors. To our knowledge, this has never been described before in the cancer field. We are aware that the cohorts that we used are still a limited series that requires an extension to validate this potentiality for FCH-PET to genotype *CTNNB1*-mutated tumors. However, the same correlation was found in mice, reinforcing the strength of our data. In fact, in a previous study, we showed that FCH-PET was more sensitive than FDG-PET to detect well-differentiated HCCs (Talbot et al., 2010), and this fits well with the fact that *CTNNB1*-mut HCCs are globally better differentiated than *CTNNB1*-wt ones (Cavard et al., 2008; Hoshida et al., 2009).

But our data also show that an increased choline uptake would not only be a diagnostic tool, but could be a therapeutic target. In fact, the depletion of choline and methionine in diet leads to immediate functional consequences, occurring in Apc^{ko} hepatocytes and not in control ones. Particularly, the effect of choline deprivation to suppress hepatomegaly was dramatic. We have not brought here the evidence that this is due to an impaired hepatocyte proliferation linked to a default in phospholipid amount needed for membrane synthesis. We showed in a previous work that the proliferation of Apc^{ko} hepatocytes occurred from day 3 after Tamoxifen and was maximal at Day 4 (D4), rather than at day 7 (Benhamouche et al., 2006). We can thus hypothesize that MCD diet could alter hepatocyte proliferation at D4, time point that has to be tested for proliferation in new experimental settings.

Choline plays another key role in β-catenin dependent liver tumorigenesis process. It takes part in DNA methylation. We showed here that Apc^{ko} hepatocytes tended to have an increased DNA methylation on cytosines compared to controls. We also showed that this methylation was choline-dependent and β-catenin specific for several reasons. First, it is reversed when choline is depleted, second ^{14}C is found in DNA as soon as 2 hours after Apc^{ko} hepatocytes are cultivated in the presence of ^{14}C-Choline, third this flow of ^{14}C in DNA is not found in DEN-induced tumors, despite the fact that they overexpress the DNA methyltransferases Dnmt1 and Dnmt3 at the same level as Apc^{ko} tumors (Figure S1C). HCC is considered as a CpG Island Methylator Phenotype (CIMP+), with many promoters being hypermethylated (Li et al., 2010). Correlations between methylation patterns and different etiologies have been made (Neumann et al., 2012), and the methylation of specific loci has been associated with *CTNNB1*-mut HCCs (Nishida et al., 2007). DNA hypermethylation is

thought to be tumor promoting and choline addiction by tumor cells could play a role in β-catenin dependent tumorigenesis through this means and not only through the synthesis of phospholipids.

A last role that appears to be specific for β-catenin-activated liver tumors is the incorporation of choline in secreted phospholipids. Our hypothesis that these secreted phospholipids could come from an increased bile synthesis relies upon different points. The first one is that the bile flow is faster in Apc^{ko} livers, and this goes well with our previous study, showing a direct impact of β-catenin on bile acid synthesis (Gougelet et al., 2014). This is also supported by the inverse phenotype found in mice with a hepatospecific β-catenin knock-out that have a decreased bile flow (Yeh et al., 2010). Lastly, this fate of choline is particularly relevant in tumorigenesis, due to the cholestatic phenotype found in *CTNNB1*-mut HCCs that could be related to an increased bile production (Audard et al., 2007). As the bile can be toxic due to hydrophobic bile acids, it can be postulated that this choline-derived bile accumulation should have pro-carcinogenic effects.

Thus, the involvement of choline in the Kennedy pathway to produce phospholipids has both β-catenin independent consequences on hepatocyte proliferation, and β-catenin-dependent consequences on secreted phospholipids. The global link of choline-derived with cell proliferation constitutes probably the reason for which the enzymes of the Kennedy pathway, i.e. CHKA, CEPT1, PCYT1A are induced in HCCs regardless of their genotype, with only a trend to further increase in *CTNNB1*-mut tumors compared to wt ones. Moreover, we were not able to identify in tumors a choline transporter that would be a target of β-catenin, and explaining the increased uptake of choline. But there are many choline transporters (the specific ones belong to the OCT or the CTL family), and moreover choline can also be transported into the cell by facilitated diffusion (Bieze et al., 2014).

Due to this plethora of potential oncogenic roles for choline in β-catenin-activated HCCs, it would be tempting to test in our mouse cancer models, anticancer drugs targeting the choline pathway, such as MN58b and TCD-717, two specific inhibitors of the choline kinase α, able to reduce cell proliferation, the latter being approved by the FDA for a phase I clinical trial (Lacal and Campos, 2015).

Lastly, we propose here a tool to diagnose β-catenin-activated HCCs. The question is what is the interest to specifically diagnose this subcategory of liver cancers? As already specified in the introduction, the therapeutic tool currently used to treat patients with HCCs is mainly

the resection. There are some indications to treat these patients with Sorafenib, a tyrosine kinase inhibitor, but with no major therapeutic effects (Peck-Radosavljevic et al., 2010). We expect that the information of the genetic mutation involved in HCCs would allow the patients to access to targeted therapies. We actually have shown in several studies that β-catenin-activated liver tumors have particular characteristics, in terms of transcriptome, histomorphotype, and metabolism. They have also a better prognosis and should be treated distinctly than *CTNNB1*-wt tumors. In a recent study, we have shown that their miRNome is distinct from *CTNNB1*-wt tumors (Gougelet et al., 2015). We have applied a therapeutic strategy based on the use of a Locked Nucleic Acid blocking the effect of miR-34a, a target of β-catenin, and we have shown that this LNA-34a was efficient *in vivo* for reducing the progression of β-catenin-activated mouse tumors. This effect is supposed to be specific for β-catenin activation. But we can expect that in the near future, direct and druggable inhibitors of β-catenin signaling will be characterized as antitumoral agents. A recent screen performed *in vivo* using a zebrafish model of liver cancer has identified such molecules. Among them, one antidepressant, amitriptyline, was successful to decreased tumor burden in a mouse HCC model (Evason et al., 2015). Nevertheless, a prerequisite to use these targeted therapies will consist in an efficient genotyping of HCCs, done as early as possible and in a non-invasive way. Genotyping HCCs with FCH-PET could pave the way for a powerful use of these targeted therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Christine Perret for her scientific support, the staff of the Animal Facilities of Cochin Institute, and of the Small Animal Imagery Facility of Cochin Institute for their efficiency in ultrasonography screening. We also thank Claire Provost (LIMP, Tenon Hospital, Paris) for helpful discussions.

FUNDINGS

Chiara Sartor and Nadia Senni got fellowships from the French Ministery of Research, and the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), and the ARC Fundation. This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Labellisation Program 2011-2013 and 2014-2016), and the Agence Nationale de la Recherche (WNT-METABOLIV, 2010-2014).

REFERENCES

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

Aydinlik, H., Nguyen, T.D., Moennikes, O., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2001). Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors. Oncogene *20*, 7812-7816.

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

Bensinger, S.J., and Christofk, H.R. (2012). New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. Semin Cell Dev Biol *23*, 352-361.

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

Cavard, C., Colnot, S., Audard, V., Benhamouche, S., Finzi, L., Torre, C., Grimber, G., Godard, C., Terris, B., and Perret, C. (2008). Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. Future Oncol *4*, 647-660.

Chafey, P., Finzi, L., Boisgard, R., Cauzac, M., Clary, G., Broussard, C., Pegorier, J.P., Guillonneau, F., Mayeux, P., Camoin, L*., et al.* (2009). Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. Proteomics *9*, 3889-3900.

Colnot, S., Decaens, T., Niwa-Kawakita, M., Godard, C., Hamard, G., Kahn, A., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 17216-17221.

de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.A., Buendia, M.A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A*., et al.* (1998). Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 8847-8851.

Fartoux, L., Balogova, S., Nataf, V., Kerrou, K., Huchet, V., Rosmorduc, O., and Talbot, J.N. (2012). A pilot comparison of 18F-fluorodeoxyglucose and 18F-fluorocholine PET/CT to predict early recurrence of unifocal hepatocellular carcinoma after surgical resection. Nucl Med Commun *33*, 757-765.

Glunde, K., Bhujwalla, Z.M., and Ronen, S.M. (2011). Choline metabolism in malignant transformation. Nat Rev Cancer *11*, 835-848.

Gougelet, A., Sartor, C., Bachelot, L., Godard, C., Marchiol, C., Renault, G., Tores, F., Nitschke, P., Cavard, C., Terris, B*., et al.* (2015). Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in liver cancer with beta-catenin-mutations. Gut.

Gougelet, A., Torre, C., Veber, P., Sartor, C., Bachelot, L., Denechaud, P.D., Godard, C., Moldes, M., Burnol, A.F., Dubuquoy, C*., et al.* (2014). T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. Hepatology *59*, 2344-2357.

Hoshida, Y., Nijman, S.M., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.P., Chiang, D.Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M*., et al.* (2009). Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. Cancer research *69*, 7385-7392.

Knudsen, E.S., Gopal, P., and Singal, A.G. (2014). The changing landscape of hepatocellular carcinoma: etiology, genetics, and therapy. The American journal of pathology *184*, 574-583.

Mato, J.M., and Lu, S.C. (2011). The hepatocarcinogenic effect of methionine and choline deficient diets: an adaptation to the Warburg effect? Alcohol Clin Exp Res *35*, 811-814.

Miyoshi, Y., Iwao, K., Nagasawa, Y., Aihara, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., and Nakamura, Y. (1998). Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. Cancer research *58*, 2524-2527.

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

Talbot, J.N., Fartoux, L., Balogova, S., Nataf, V., Kerrou, K., Gutman, F., Huchet, V., Ancel, D., Grange, J.D., and Rosmorduc, O. (2010). Detection of hepatocellular carcinoma with PET/CT: a prospective comparison of 18F-fluorocholine and 18F-FDG in patients with cirrhosis or chronic liver disease. J Nucl Med *51*, 1699-1706.

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

Torre, C., Perret, C., and Colnot, S. (2010). Molecular determinants of liver zonation. Prog Mol Biol Transl Sci *97*, 127-150.

Yuneva, M.O., Fan, T.W., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Mates, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y*., et al.* (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. Cell Metab *15*, 157-170.

Table 1: Cohort of 18 patients with ^{18}F-Choline and ^{18}FDG PET/CT characterization.

The differentiation grade of the tumors is depicted as follows: W = well differentiated, MW =Moderately well, M = Moderately, P = Poorly. The histological characterization of GS immunostaining is as follows: 3 = diffuse and intense staining, 2 = heterogenous and/or moderate staining, 1 = low intensity of staining and/or few tumoral cells with positive staining.

Id		Patient characteristics				Tumor characteristics & Histology			β-catenin status					PET-Scan			
									DNA	IHC	mRNA T/NT			F-Choline		FDG	
Patient Id Sex		**Age**	**Cirrhosis**	**Etiology**	**AFP**	**Nodule size (mm)**	**Multi-focal**	**Differentiation grade**	**CTNNB1 mutations**	**GS**	**GS**	**Axin2**	**β-catenin status**	**SUV Ratio T/NT**	**PET FCh**	**SUV Ratio T/NT**	**PET FDG**
CTNNB1-mutated, FCh-POS																	
7749	M	69	0	HCV	4	120	0	W	S33P	3	45	24	+	2.24	+	1.24	-
9543	M	61	1	HBV+OH	7	20	0	W	S37F	3	66	37	+	1.85	+	1.24	-
4341	F	52	1	HCV+OH	96	50	0	MW	G34V	3	97	24	+	2.43	+	0.35	-
5493	M	62	0	HFE	6.7	80	0	MW	H36P	3	406	101	+	2.6	+	nd	-
6742	M	55	0	OH	35	25	1	M	Dr5P	3	31	8.8	+	nd	+	nd	+
961	M	66	1	OH	7	50	1	M	nd	3	nd	nd	+	nd	+	nd	-
CTNNB1-wild type, FCh-NEG																	
1519	M	57	1	VHC	448	14	0	MW	wt	2	5.7	2.8	-	1.37	-	1	-
2635	F	66	0	VHC	87	51	0	MW	wt	2	0.5	7.1	-	0.97	-	1.77	+
612	M	49	0	VHB	12	57	0	MW	wt	1	1.3	1.9	-	0.9	-	1.74	+
5205	M	54	1	VHC	12	20	0	MW	wt	1	4.9	4.3	-	nd	-	nd	-
4340	M	52	1	VHB	700	90	0	M	wt	1	1.1	3.4	-	0.94	-	3.25	+
5895	M	68	1	OH	8	47	0	W	wt	1	5.2	1.3	-	1	-	1	-
Tumor heterogeneity																	
909	M	70	0	NASH	59	70	1	W/M	S33P	3	8.5	3.5	?	nd	+ / -	nd	+ / -
9125	M	70	1	VHC	50	80	0	MW	wt	3	1.3	1.8	?	2.1	+	1	-
4379	M	37	1	VHB	194	20	0	M	wt	2	6.7	1.2	?	nd	+ / -	nd	+ / -
5162	M	60	1	VHC	4620	50	1	P	wt	3	0.8	0.5	?	nd	+	nd	+
Non informative (biopsy with no frozen tissue)																	
8215	M	49	1	VHC	31230	100	0	P	nd	nd	nd	nd	?	1.5	+	2.1	+
6340	M	70	1	NASH	1125	40	1	W	nd	nd	nd	nd	?	2.5	+	1	-

A

SUB PATHWAY	CHOLINE PATHWAY	PLATFORM	FASTED APC KO/CTRL	FED APC KO/CTRL
Glycerolipid metabolism	choline	LC/MS pos	0.88	1.31
	choline phosphate	LC/MS pos	0.85	0.85
	cytidine 5'-diphosphocholine	LC/MS pos	1.83	3.23
Lysolipid	1-myristoyl-GPC	LC/MS pos	1.76	1.47
	1-palmitoyl-GPC	LC/MS pos	3.59	1.29
	2-palmitoyl-GPC*	LC/MS pos	2.33	1.50
	1-palmitoleoyl-GPC*	LC/MS pos	3.01	1.52
	2-palmitoleoyl-GPC*	LC/MS pos	1.35	1.33
	1-heptadecanoyl-GPC	LC/MS pos	2.39	1.06
	1-stearoyl-GPC	LC/MS pos	2.96	1.50
	2-stearoyl-GPC*	LC/MS pos	1.51	1.03
	1-oleoyl-GPC	LC/MS pos	4.00	2.37
	2-oleoyl-GPC*	LC/MS pos	3.49	1.57
	1-linoleoyl-GPC	LC/MS pos	1.57	1.14
	2-linoleoyl-GPC*	LC/MS pos	2.77	1.09
	1-eicosatrienoyl-GPC*	LC/MS pos	1.50	1.43
	2-eicosatrienoyl-GPC*	LC/MS pos	1.48	1.26
	1-arachidonoyl-GPC*	LC/MS pos	1.94	1.73
	2-arachidonoyl-GPC*	LC/MS pos	4.00	2.58
	2-docosapentaenoyl-GPC*	LC/MS pos	2.60	1.95
	1-docosahexaenoyl-GPC*	LC/MS pos	3.17	1.64
	2-docosahexaenoyl-GPC*	LC/MS pos	6.42	2.32

SUB PATHWAY	SPHINGOLIPID PATHWAY	PLATFORM	FASTED APC KO/CTRL	FED APC KO/CTRL
Sphingolipid	sphinganine	LC/MS pos	2.65	3.28
	sphingosine	LC/MS pos	2.85	2.74
	palmitoyl sphingomyelin	GC/MS	0.96	1.33
	stearoyl sphingomyelin	GC/MS	2.51	2.26

ETHANOLAMINE PATHWAY	PLATFORM	FASTED APC KO/CTRL	FED APC KO/CTRL
ethanolamine	GC/MS	0.91	1.24
phosphoethanolamine	LC/MS neg	1.46	1.08
cytidine-5'-diphosphoethanolamine	LC/MS pos	1.18	1.37
1-palmitoyl-GPE	LC/MS neg	1.34	0.99
2-palmitoyl-GPE*	LC/MS pos	2.50	1.08
1-stearoyl-GPE	LC/MS neg	1.19	0.90
1-oleoyl-GPE	LC/MS neg	1.36	1.30
2-oleoyl-GPE*	LC/MS neg	1.05	1.11
1-linoleoyl-GPE*	LC/MS neg	0.53	0.62
2-linoleoyl-GPE*	LC/MS neg	1.08	1.30
1-arachidonoyl-GPE*	LC/MS neg	0.79	1.04
2-arachidonoyl-GPE*	LC/MS pos	2.73	1.36
2-docosapentaenoyl-GPE*	LC/MS pos	2.34	1.28
2-docosahexaenoyl-GPE*	LC/MS pos	4.17	1.62

INOSITOL PATHWAY	PLATFORM		
1-palmitoyl-GPI*	LC/MS neg	1.26	0.80
1-stearoyl-GPI	LC/MS neg	0.85	0.87
2-stearoyl-GPI*	LC/MS neg	0.72	0.76
1-arachidonoyl-GPI*	LC/MS neg	0.82	0.96
2-arachidonoyl-GPI*	LC/MS neg	1.12	1.84

BETAINE/METHIONINE/FOLATE PATHWAY	PLATFORM		
betaine	LC/MS pos	1.00	0.52
dimethylglycine	GC/MS	1.11	0.73
S-adenosylhomocysteine (SAH)	LC/MS neg	0.79	0.75
methionine	LC/MS pos	0.93	1.30
homocysteine	GC/MS	1.50	4.03
5-methyltetrahydrofolate (5MeTHF)	LC/MS neg	0.64	0.26

B

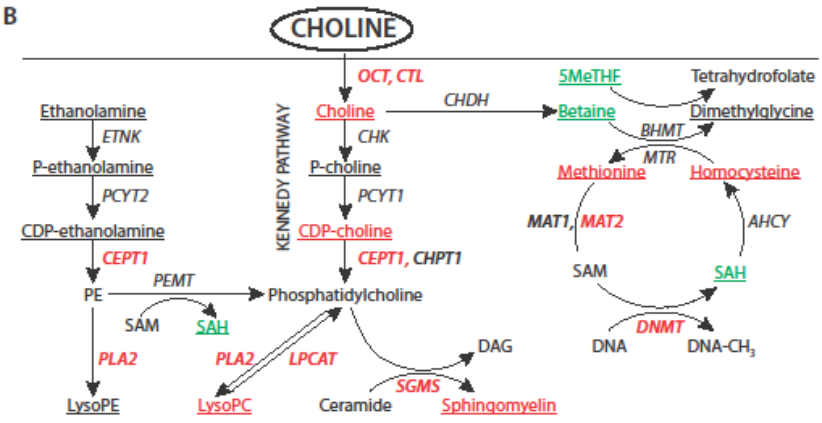


Figure 1 : Metabolites resulting from choline metabolism accumulate after β-catenin overactivation in mouse liver. (A) Metabolomic analysis assessing the metabolites differentially accumulated in Apc^{ko} versus Apc^{Ctrl} livers at Day 7 after Tamoxifen-mediated inactivation of Apc. In red and yellow, significant fold accumulations ($p<0.01$) ; in blue, less significant ones ($p<0.05$) ; in green and yellow, significant decreased amounts ($p<0.01$). (B) Choline metabolism and its deregulations in Apcko livers. The metabolites measured in the metabolomic study are underlined. In red appear those which are accumulated, and in green those with a decreased amount. In italics are depicted the enzymes and transporters involved in choline metabolism, in red when their mRNA expression is deregulated (Table S3, for a complete overview of the mRNA-Seq data focused on choline metabolism).

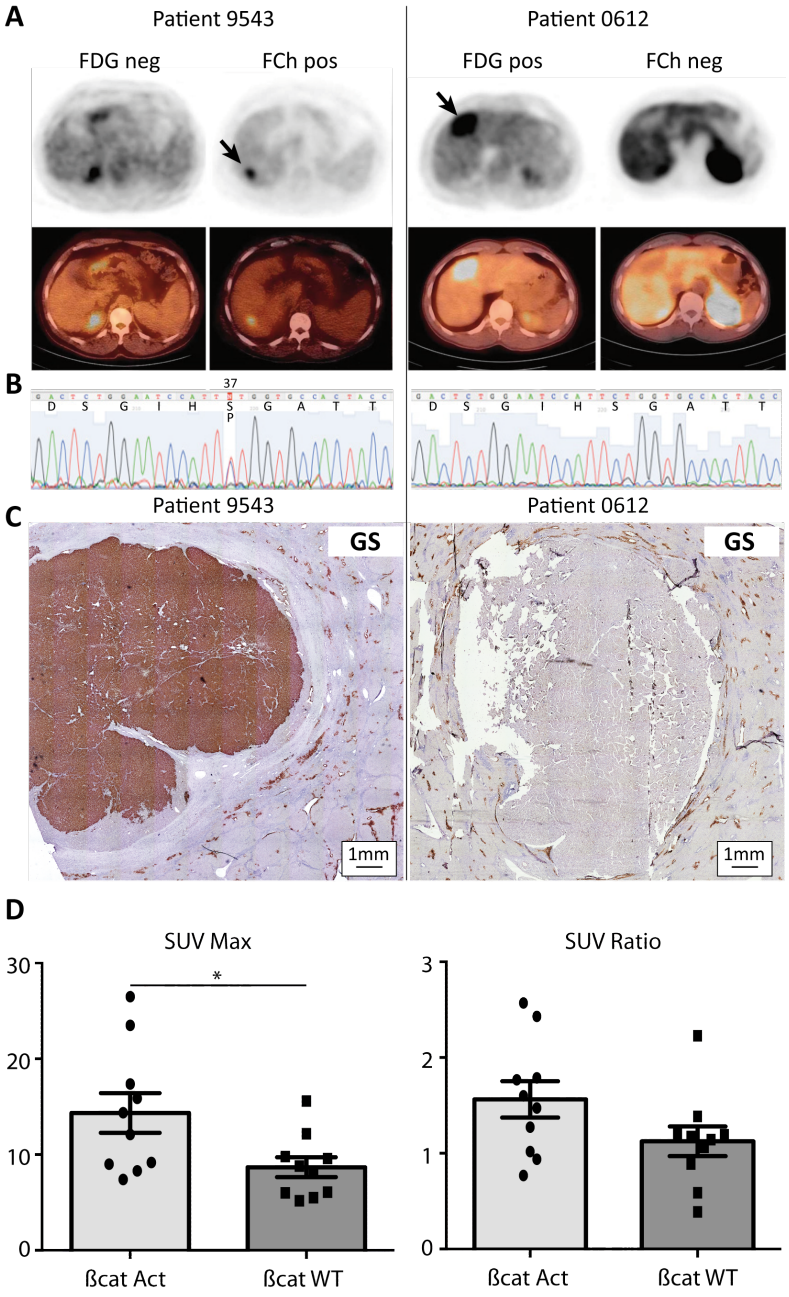


Figure 2 : Correlation between PET/CT analyses and β-catenin activation in patients with HCCs. On the left, one example of "St-Antoine" patient with F-Choline positive and β-catenin-activated HCC is shown, and on the right, one example of patient with F-Choline negative PET and non β-catenin-activated HCC. These data derive from Table 1. (A) PET/CT data : FDG and FCH, up PET and down PET/CT fusion. (B) Sanger sequencing of *CTNNB1* gene. The heterozygous S37P mutation of patient 9543 is shown by a double band for nucleotides T and C. (C) GS immunostainings of the tumors, illustrating β-catenin activation, is diffuse and positive for patient 9543, and low for patient 612. (D) "Créteil" cohort: Relationship between b-catenin activation status and F-Choline positivity. On the left, the SUV max of the liver tumor, and on the right the SUV ratio Tumor/Non Tumor.

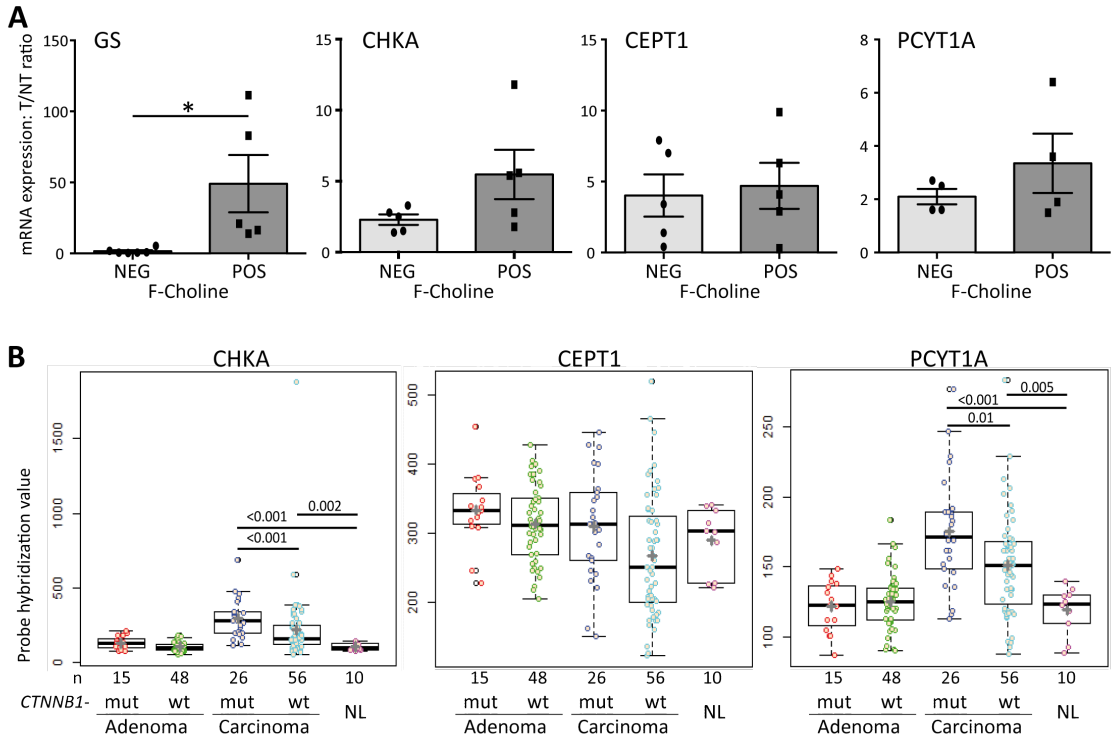


Figure 3 : In human HCCs, gene expression of choline metabolism enzymes correlates with *CTNNB1* mutations. In (A) the "St-Antoine" PET cohort is studied by qPCR ; in (B) the cohort described in (Boyault, Hepatology 2007) was analyzed by microarray. The tumors samples are divided in FCh-POS (n=5 or n=4), FCh-NEG (n=5 or n=4) in (A). Student t-tests with Welch corrections have been done in (A) and two-way ANOVA in (B). *p<0.05, **p<0.01.

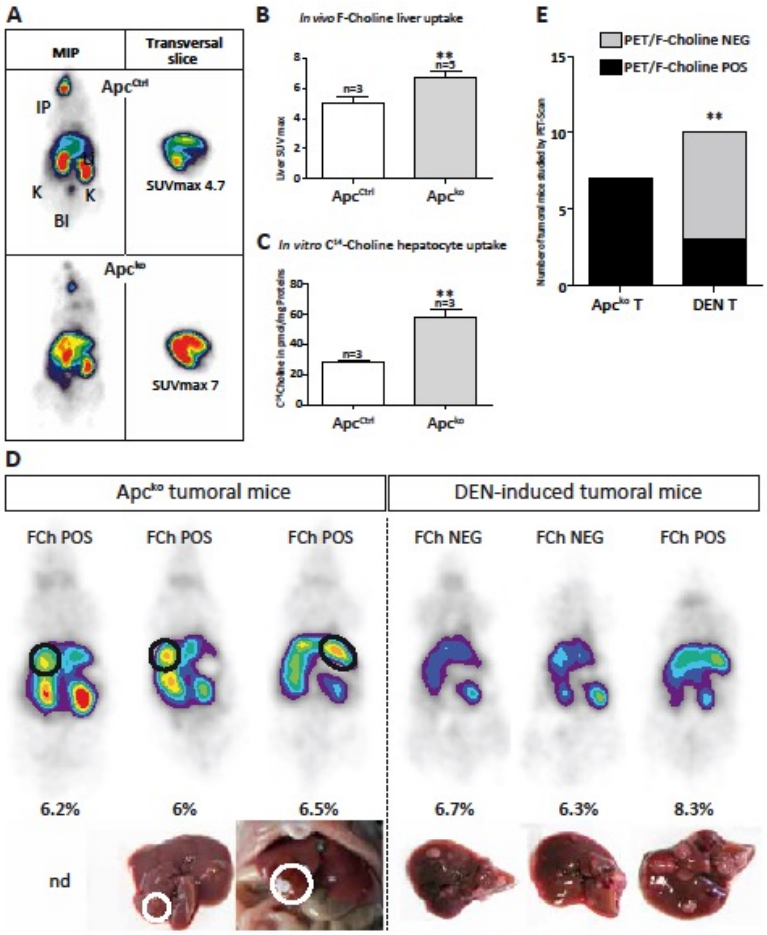


Figure 4 : Increased uptake of F-choline in mice with β-catenin overactivated livers and tumors. (A) one representative example of microPET performed on mice with Apcko panlobular inactivation (Day 7 after tamoxifen). MIP = Maximum Intensity Projection, SUVmax = Maximum Standardized Uptake Value. (B) Graphic representation of the liver SUVmax in Apc^{ko} versus Ctrl mice. (C) Uptake of ^{14}C-choline in primary hepatocyte cultures. In (A,C), **p<0.01 (Student t-test with Welch correction). (D) Longitudinal slices of F-Choline PET for tumoral mice. The mice were sacrified one week after PET : tumors are shown and the liver to body weight ratio mentioned ; (E) Summary of the F-Choline PET experiments in mice, **p<0.01 (Fisher exact t-test).

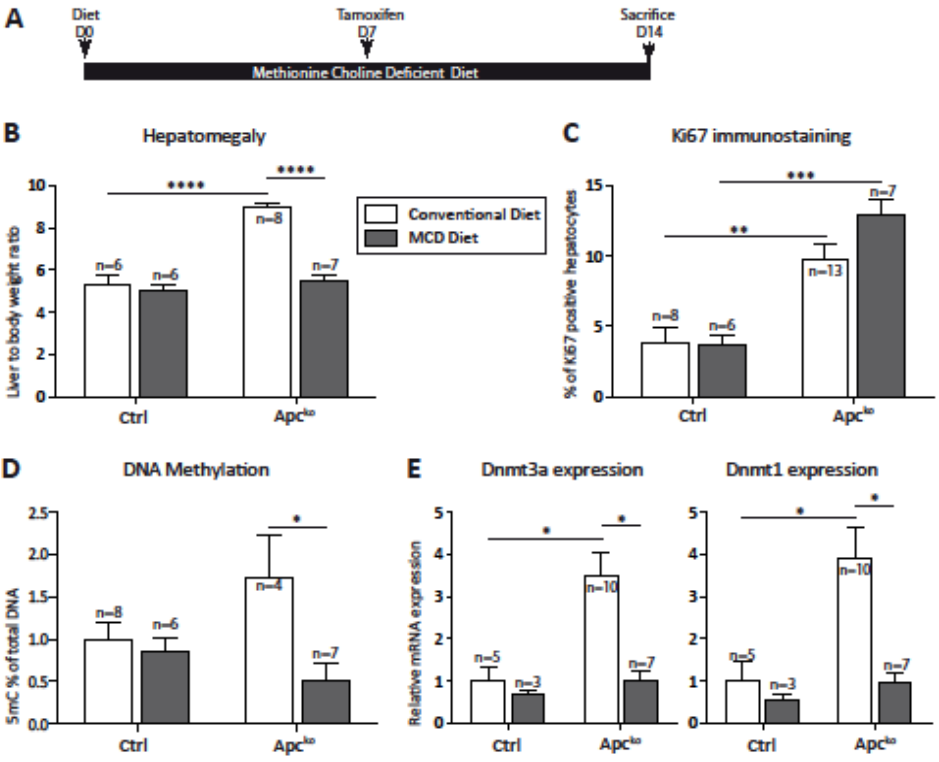


Figure 5 : Functional consequences of abolishing choline dietary intake through a Methionine-Choline Deficient (MCD) diet. (A) Experimental design ; (B) Assessment of hepatomegaly through liver to body weight ratio measurement at sacrifice; (C) Proliferation as a percentage of Ki67-positive hepatocytes ; (D) DNA methylation on cytosines ; (E) Gene expression. Two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons tests were done.

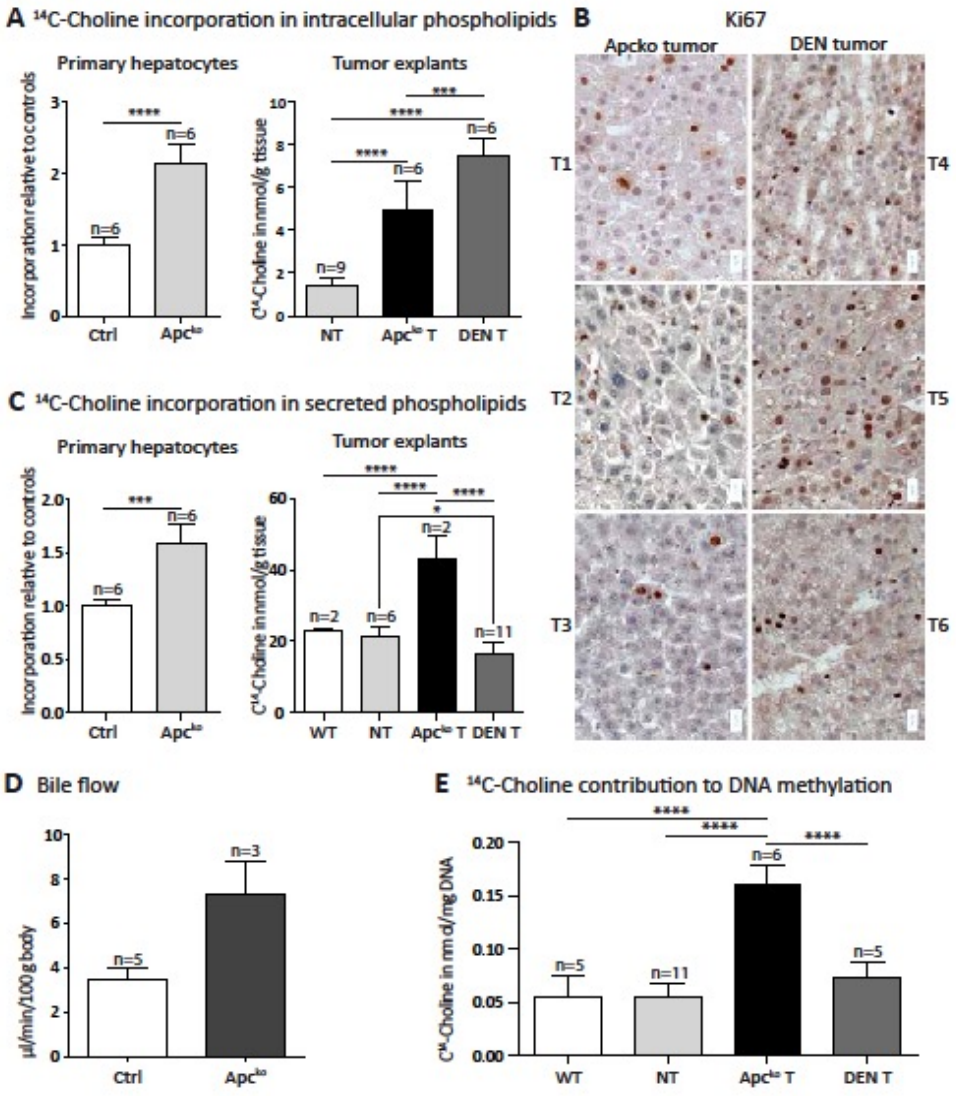


Figure 6 : Fates of ^{14}C-choline in β-catenin-activated mouse hepatocytes and tumors. Choline incorporation in (A) intracellular phospholipids, (C) secreted phospholipids, was assessed in primary hepatocytes and (Apc^{ko} and DEN) tumor explants ; (B) Equivalent proliferation in Apc^{ko} and DEN tumors was assessed by Ki67 immunostaining ; (D) Bile flow tended to be faster in Apc^{ko} mice ; (E) Choline contributes preferentially to DNA methylation in Apc^{ko} tumors. Student t-tests or two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons tests were done.

SUPPLEMENTAL MATERIALS

Table S1 : Oligonucleotides used for qPCR analyses

GENE	Primers		Technology
	MOUSE	**HUMAN**	
CHKalpha	LP: TAGCTCAGAACCCGCCTAAA RP: ACTCAGGCTCCTCCTGTTGA	LP: GTTTGCCCTTGCATCTCATT RP: AGTCCTCCCCACAGTCACAC	SybRgreen
CEPT1	LP: TGGGAATGGCTAGTTGGAAG RP: AATGAAAAGGCCACAAGCAC	LP: GCTTGAGCCCTTAATGCAAG RP: CTTGCCTGTTTCCCATCAAT	
CHKbeta	LP: TGGAACAGTACCTCCCAAGC RP: GCAAGTCCTGGATCTGCTTC	LP: TTCTTCTGGGGTCTGTGGTC RP: CCTTCTGCTCGTTGTTCCTC	
DNMT1	LP: ACCGCTTCTACTTCCTCGAGGCCT A RP: GTTGCAGTCCTCTGTGAACACTGT GG	-	
DNMT3	LP: CCTGCAATGACCTCTCCATT RP:CGGCCAGTACCCTCATAAAG	-	

PCYT1A	Mm00447774_m1	Hs00192339_m1	Taqman
GS	Mm00725701_s1	Hs00365928_g1	

Table S2 : Antibodies used in immunohistochemistry studies

Protein	dilution	Reference antibody	secondary biotinylated Ab
Glutamine Synthetase	1/400	BD Transduction LaboratoriesTM. Ref: 610518	mouse 1/750
CTP Phosphocholine Cytidylyltransferase alpha (CCT1α or Pcyt1α)	1/100	USBiological. Ref: C7948-36	rabbit 1/200
Choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1)	1/200	ProteinTechTM. Ref: 20496-1-AP	rabbit 1/200

Table S3 : mRNA expressions of choline-related genes extracted from mRNA-Seq data (analyzed in Gougelet *et al.* Hepatology, 2014). In yellow and red, the most significant gene expression differences (fold ratio >2 AND p<0.05), in red, less significant ones (2> fold ratio >1.5 AND p<0.05).

Symbol	Aliases	Description	Keyword	Expression in WT mice (arbitrary value)	Apcko/Ctrl fold	Apcko/Ctrl p-value
Ahcy	CuBP, SAHH	adenosylhomocysteiNAse	Homocysteine	84	0.76	0.23
Ahcyl1	Ahcy-rs3, DCAL, Irbit	putative_adenosylhomocysteinase_2	Homocysteine	30	**1.59**	**0.03**
Ahcyl2	Adohcyase3	putative_adenosylhomocysteiNAse_3_isoform_1	Homocysteine	5	1.20	0.49
Bhmt		betaine-homocysteine_S-methyltransferase_1	Betaine	560	0.81	0.94
Bhmt2		betaine-homocysteine_S-methyltransferase_2	Betaine	64	1.00	0.99
Cept1		choline/ethanolaminephosphotransferase_1	Choline	8	**1.89**	**5.1E-03**
Chdh		choline_dehydrogeNAse,_mitochondrial_precursor	Choline	78	1.32	0.20
Chka	CK, CK/EK-alpha, Chetk-alpha, Chk, ChoK, EK, EtnK-alpha	choline_kinase_alpha_isoform_1	Choline	13	1.31	0.21
Chkb	Chetk, Chkl, Ck, Ck/Ek, Ck/Ek-beta, Ckb, Ckekb, Ek	choline/ethanolamine_kiNAse	Choline	12	1.30	0.25
Chpt1		cholinephosphotransferase_1_isoform_2	Choline	26	1.27	0.26
Dnmt1	Cxxc9, Dnmt, Dnmt1o, MCMT, MTase, Met-1, Met1, MommeD2,	DNA_(cytosine-5)-methyltransferase_1_isoform_1	Methionine	4	**2.41**	**5.9E-04**
Dnmt3a		DNA_(cytosine-5)-methyltransferase_3A_isoform_2	Methionine	7	**2.23**	**1.1E-03**
Dnmt3b	MmuIIIB	DNA_(cytosine-5)-methyltransferase_3B_isoform_3	Methionine	1	1.18	0.72
Etnk1	EKI1	ethanolamine_kiNAse_1	Ethanolamine	24	1.02	0.88
Etnk2	EKI 2, Eki2, Tuc1	ethanolamine_kiNAse_2	Ethanolamine	140	1.59	0.07
Lpcat1	Aytl2, LPCAT, rd11	Lysophosphatidylcholine_acyltransferase	lysophospholipides	0.01	**3.94**	**0.02**
Lpcat2	Aytl1, Aytl1a, lpafat1	lysophosphatidylcholine_acyltransferase_2	lysophospholipides	0.02	**8.63**	**3.9E-04**
Lpcat2b	Aytl1b	lysophosphatidylcholine_acyltransferase_2B	lysophospholipides	0	not detected	
Lpcat3	C3f, Grcc3f, Lpcat, Lpeat, Lplat5, Lpsat, Mboat5, Moact5, Oact5, PTG	lysophospholipid_acyltransferase_5	lysophospholipides	33	1.00	0.40
Lpcat4	Agpat7, Aytl3, LPEAT2	lysophospholipid_acyltransferase_LPCAT4	lysophospholipides	0	**5.06**	0.08
Mat1a		S-adenosylmethionine_synthase_isoform_type-1	Methionine	1030	0.60	0.12
Mat2a		S-adenosylmethionine_synthase_isoform_type-2	Methionine	11	**1.93**	**0.00308**
Mat2b		methionine_adenosyltransferase_2_subunit_beta	Methionine	6	**1.78**	**0.02**
Mtr	MS	methionine_synthase	Methionine	2	1.68	0.13
Mtrr	MSR	methionine_synthase_reductase	Methionine	2	1.64	0.14
Pcyt1a	CTalpha, Cctalpha, Ctpct, Cttalpha	choline-phosphate_cytidylyltransferase_A	Choline	29	1.34	0.18
Pcyt1b	CTTbeta	choline-phosphate_cytidylyltransferase_B_isoform	Choline	0.03	0.76	0.59
Pcyt2	ET	ethanolamine-phosphate_cytidylyltransferase	Ethanolamine	224	1.09	0.74
Pemt	PEAMT, PEMT2, Pempt, Pempt2	phosphatidylethanolamine_N-methyltransferase	Choline	87	0.98	0.92
Pla2g10	PLA2GX, mGXsPLA2, sPLA2-X	group_10_secretory_phospholipase_A2_precursor	lysophospholipides	0	not detected	
Pla2g15	ACS, LLPL, Lpla2, Lypla3	group_XV_phospholipase_A2_precursor	Phospholipase	5	**1.87**	**0.01**
Pla2g1b	Pla2a, sPLA2IB	phospholipase_A2_precursor	lysophospholipides	0	not detected	
Pla2g6	PNPLA9, iPLA(2)beta, iPLA2, iPLA2beta	85_kDa_calcium-independent_phospholipase_A2	lysophospholipides	16	**2.69**	**8.9E-06**
Sgms1	Mob, Sms1, Sor1, Tmem23	phosphatidylcholine:ceramide	Phospholipase	2	**5.43**	**1.5E-10**
Sgms2		phosphatidylcholine:ceramide	Phospholipase	18	**1.74**	**0.01**
Slc22a1	Lx1, Oct1, Orct, Orct1	solute_carrier_family_22_member_1	Choline	131	**3.84**	**4.3E-07**
Slc22a2	Oct2, Orct2	solute_carrier_family_22_member_2	Choline	0.04	2.90	0.22
Slc22a3	EMT, Oct3, Orct3, Slca22a3	solute_carrier_family_22_member_3	Choline	1	**16.00**	**4.9E-23**
Slc44a1	CTL1	solute_carrier_family_44,_member_1	Choline	11	1.25	0.31
Slc44a2	CTL2	choline_transporter-like_protein_2_isoform_1	Choline	0.05	**5.17**	**1.3E-04**
Slc44a3	CTL3	choline_transporter-like_protein_3	Choline	2	1.14	0.66
Slc44a4	CTL4, NG22	choline_transporter-like_protein_4	Choline	0	2.11	0.74
Slc44a5	CTL5	choline_transporter-like_protein_5	Choline	0	not detected	
Slc46a1	HCP1, Pcft	proton-coupled_folate_transporter	folate	22	0.88	0.58
Slc5a7	CHT1	high_affinity_choline_transporter_1	Choline	0	not detected	

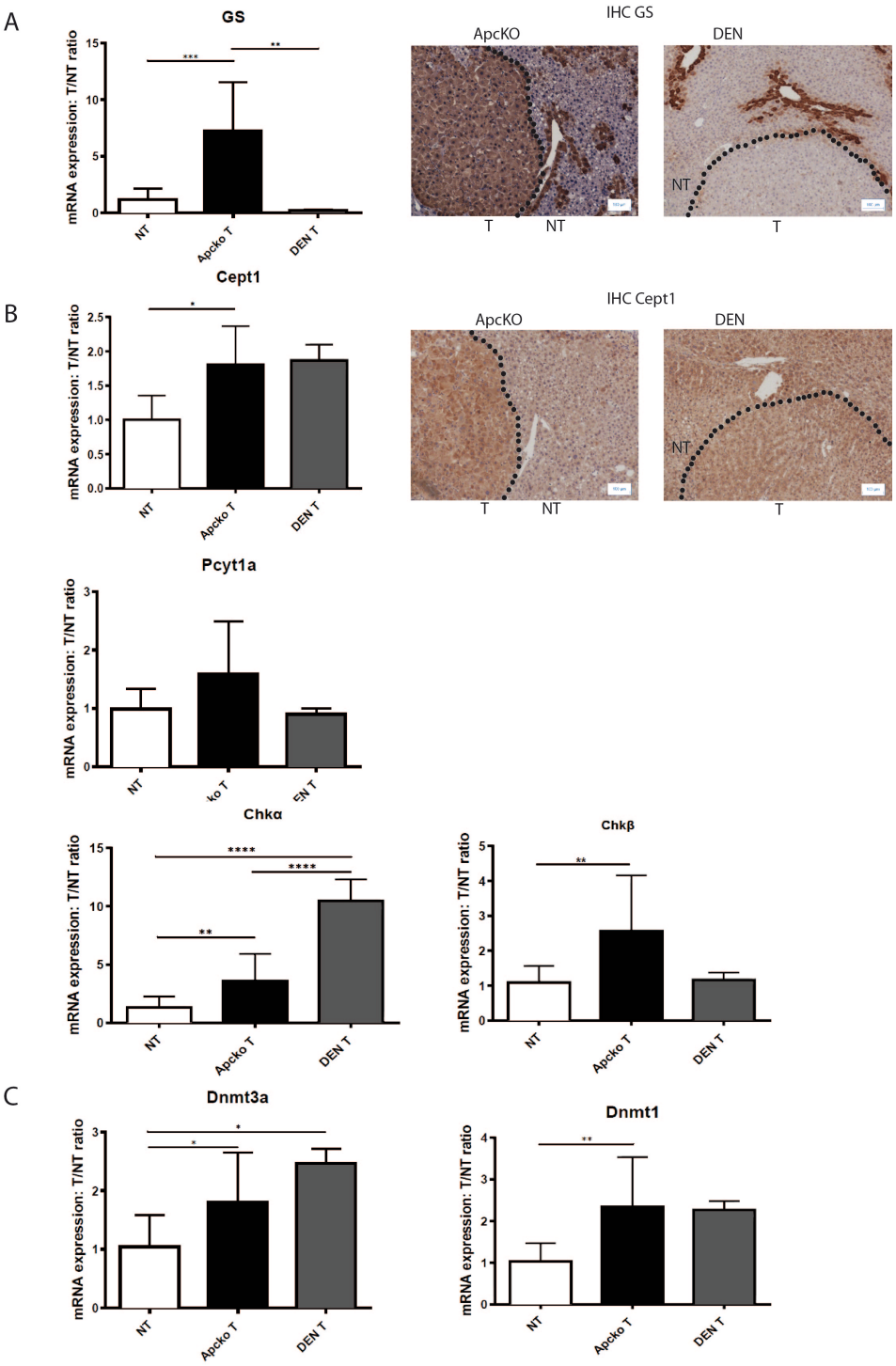


FIGURE S1 : (A) Apc^{ko} and DEN-induced tumors show (A) respectively a β-catenin activation or not, according to the expression of GS, and to its protein accumulation revealed by immunostaining. (B) Expression of enzymes from the Kennedy pathway : Cept1, Chkα and β are significantly induced in Apc^{ko} tumors compared controls. Cept1 protein accumulates only in Apc^{KO} and not in DEN tumors. Pcyt1α shows a trend to increase but is not significant. A global trend of increased expression also occurs in DEN tumors. (C) Expression of the DNA methyltransferases : In both DEN-induced and Apc^{ko} tumors, they have an increased expression, in comparison to controls.

AXIN1 LIVER-SPECIFIC DELETION INDUCES HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN MICE WITHOUT BETA-CATENIN ACTIVATION

Shirley Abitbol*[1,2,3,4], Rajae Dahmani*[1,2,3,4], Cédric Coulouarn[5], Bruno Ragazzon[1,2,3], Nadia Senni[1,2,3,4], Pascale Bossart[1,2,3,4], Pierre Sohier[1,2,3,4], Gisèle Grimber[1,2,3], Valerie Drouet[1,2,3,4], Emilie Tournier[1,2,3], Florent Dumont[1,2,3], Pierre-Alexandre Just[1,2,3,4,6], Benoît Terris[1,2,3,4,6], Christine Perret[1,2,3,4] **, Hélène Gilgenkrantz[1,2,3,4]**

[1]INSERM, U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France.

[2]CNRS, UMR8104, F-75014 Paris, France.

[3]Université Paris Descartes, F-75014 Paris, France.

[4]Equipe labellisée LNCC.

[5]INSERM, UMR991, Université de Rennes 1, F-35033 Rennes, France.

[6]APHP, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, Hôpital Cochin, Pathology Department, 75014 Paris, France

* Equal contributions

** Corresponding authors

***Corresponding authors:** Institut Cochin, INSERM U 1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 PARIS, FRANCE. Fax: 33 1 44 41 24 21; E-mail: helene.gilgenkrantz@inserm.fr; Phone: 33 1 44 41 24 72
christine.perret@inserm.fr; Phone: 33 1 44 41 25 64

For Peer Review

List of Abbreviations :HCC: Hepatocellular carcinoma; APC: Adenomatous polyposis coli; LEF-1: lymphoid enhancer-binding factor 1; TCF: T-cell transcription factor; PCR: Polymerase Chain Reaction); SPF :specific pathogen free; WT: Wild type; GS: Glutamine synthetase; RT-qPCR: reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction; NEFA: non essential fatty acids; TAG: triacid glycerol; IPA: Ingenuity pathway analysis; GSEA: Gene set enrichment analysis; T: tumors; NT: non-tumoral part; FC :Fold change; Hmmr : Hyaluronan-mediated motility receptor; Hmgcr :3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase; Sqle : squalene epoxidase; Rhamm*:* receptor of hyaluronan-mediated motility; GSI: gamma secretase inhibitors.

Financial Support: This study was supported by the LNCC (*Ligue Nationale Contre le Cancer*) and *Association Française pour l'Etude du Foie* (AFEF)

Key words: Liver, cancer, tumor signature, mouse model, mevalonate

For Peer Review

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third cause of cancer death worldwide. The Wnt/beta-catenin pathway is the pathway most frequently deregulated in HCC (e.g. mutations of *CTNNB1*, *AXIN1*, or unfrequently *APC*). Inactivating mutations of the gene encoding AXIN1, a scaffolding protein known as a negative regulator of the Wnt/β-catenin signaling pathway, are observed in more than 10% of HCCs. Surprisingly, genomic studies have shown that HCCs with activating beta-catenin (*CTNNB1*) mutations form another group of HCCs separate from those with biallelic inactivating *AXIN1* mutations. We investigated the possible role of AXIN1 in liver carcinogenesis independently of Wnt/β-catenin activation, by creating two mouse models of liver-specific AXIN1 deficiency. We found that mice with liver *Axin1* deletion developed steatotic, trabecular and moderately differentiated HCC, with a latency of eight months and a prevalence of 40%. Primary HCC occurred in the absence of β-catenin-driven activation of the transcriptional program in pretumoral livers or tumors. Mouse HCCs with *Axin1* deletion clustered with molecular subgroups of human HCC known to be different from HCC with *CTNNB1* mutations, and were found to be enriched in transcriptional signatures associated with a poor prognosis and stemness. Other oncogenic pathways, such as the TGF-β, YAP and Notch pathways, for which crosstalk with Axin1 has been observed, were induced in these tumors. Finally, the mevalonate pathway was found to be activated in Axin1-deficient tumors. These pathways constitute potentially interesting targets for the treatment of HCC due to *AXIN1* mutations.

Conclusion: Our results demonstrate that *AXIN1*-inactivating mutations are sufficient to cause HCC that clearly differ from other HCCs with Wnt/β-catenin pathway-activating mutations.

For Peer Review

AXIN1 is a scaffolding protein initially identified as a negative regulator of the canonical Wnt pathway, mutations of which cause duplication of the *Xenopus* embryonic axis. Mutant mice lacking Axin1 show embryonic lethality (1). The Wnt/β-catenin pathway is a conserved signaling pathway governing embryonic development, homeostasis and liver zonation in adults. In the absence of Wnt stimulation, the cytosolic concentration of β-catenin remains low due to a multiprotein destruction complex including CK1α, GSK3β, YAP/TAZ, APC and AXIN1, which promotes the phosphorylation of β-catenin. Once phosphorylated, β-catenin is recognized by β-TrCP, a component of the E3 ubiquitin ligase complex, and degraded by the proteasome. AXIN1 is commonly described as the rate-limiting factor of the destruction complex (2). In response to Wnt stimulation, the destruction complex is recruited to the membrane. This stabilizes β-catenin, which then enters the nucleus and activates the expression of Wnt target genes, mostly through the lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF-1) and T-cell transcription factor (TCF). In addition to its well-known role in the downregulation of β-catenin, AXIN1 also exhibits a positive role in the transduction of Wnt/β-catenin pathway. In particular, AXIN1 is a partner of the Wnt signalosome that is recruited to the membrane following Wnt stimulation (3, 4). AXIN1 also interacts with many other signaling pathways, including the Notch (5, 6), TGF-β (7), YAP/TAZ (8) c-Myc (9), JNK (10, 11) and TP53 pathways (12). In some of them, AXIN1 has been shown to act independently of the Wnt/β-catenin pathway (9, 10). Interestingly, many of these pathways are deregulated in liver carcinogenesis.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most frequent cause of cancer death worldwide (13). HCC is a highly heterogeneous disease, occuring in a context of chronic liver injury and inflammation leading to cirrhosis (13). Recent genomic studies have provided an accurate description of the landscape of genetic changes underlying HCC and have identified the molecular pathways most frequently altered. The Wnt/β-catenin pathway is one of the

For Peer Review

most frequently deregulated pathways (14-17). Molecular studies have shown that HCCs can be assigned to two major molecular subclasses. One -the proliferative class- is broadly characterized by chromosomal instability, an enrichment of signals relating to cell proliferation and progression through the cell cycle, and is generally associated with a more aggressive phenotype. The second -the non-proliferative class- is characterized by chromosomal stability, a retention of the molecular traits of normal hepatocytes and is generally associated with a better prognosis (15).

Mutations of the *CTNNB1* gene encoding β-catenin are frequently observed in HCC (11-37%) (14-18). Inactivating mutations of two other partners from the Wnt/β-catenin pathway are also found in HCC: *AXIN1* (5-15%) and, more rarely, *APC* (1-2%). As both APC and AXIN1 belong to the β-catenin destruction complex, it was anticipated that a loss of AXIN1 function in the liver would lead to aberrant activation of the β-catenin pathway, as reported for inactivating *Apc* mutations in mice (19). Consistent with this prediction, Satoh *et al*. showed that HCC cell lines with *AXIN1* mutations displayed an activation of Wnt/β-catenin signaling, although this effect was weak (20). The observation that human HCCs with biallelic inactivating *AXIN1* mutations expressed a genetic program different from that in HCCs with activating *CTNNB1* mutations was therefore surprising. These two types of mutations indeed belonged to the two different classes of HCC described above: enrichment in *CTNNB1* mutations was associated with poor proliferation and a good prognosis while enrichment in *AXIN1* mutations was associated with high levels of proliferation and a poor prognosis (21, 22). In addition, the conditional loss of Axin1 in mouse hepatocytes was found to lead to the transient upregulation of some targets of β-catenin (23). HCC developed in this model, but no molecular characterization of these tumors was carried out (23). These conflicting observations call into question the predicted effect of AXIN1 loss in terms of Wnt/β-catenin pathway activation in HCC.

For Peer Review

To address this question, we engineered two mouse models lacking Axin1 specifically in the embryonic or adult liver. Primary HCCs developed in about 40% of the mice in which *Axin1* was invalidated, with a latency of 8-9 months. These tumors displayed no upregulation of β-catenin target genes, but an induction of genes from the Notch, TGFβ, YAP and mevalonate oncogenic pathways was observed. Thus, although all the genomic studies to date describing the mutations underlying HCC have classified tumors with either *CTNNB1* or *AXIN1* mutations as belonging to the same "Wnt/beta-catenin" group, HCCs with *AXIN1* mutations and HCCs with *CTNNB1*-activating mutations should clearly be considered to belong to different groups. HCCs with *AXIN1* mutations belong to the human S1 subtype of tumors engaged in crosstalk with the TGFβ pathway and are enriched in transcriptional signatures associated with a poor prognosis, invasion and stemness.

Materials and Methods

Mouse models

The *Axin1*-targeting construct was generated from PCR (Polymerase Chain Reaction) products amplified from the DNA of 129/SV ES cells with the Pfx polymerase (Life Technologies). A schematic diagram of the $Axin^{fl/fl}$ alleles and procedure of mice obtention is provided in Figure 1A. Briefly, for the targeting vector construct, *LoxP* sites were introduced upstream from *Axin1* exon 3 and downstream from *Axin1* exon 6, and a hygromycin cassette flanked by *FRT* sites was introduced as a selection marker downstream from *Axin1* exon 6. The targeting construct was introduced by electroporation into embryonic stem cells from mouse strain 129/SV, and selected on plates containing hygromycin. Liver specificity was achieved by crossing the mice with Alfp-Cre mice (24) to generate KO LivEmb mice, or with TTR-Cre-Tam mice (25), which express the Cre recombinase specifically in hepatocytes after tamoxifen injection, to generate KO LivAd mice. In KO LivAd mice, *Axin1* deletion was

For Peer Review

induced by two intraperitoneal injections of tamoxifen one day apart (1.4 mg; ICN) in adult mice (2 to 3 months old). The murine model of liver-targeted *Apc*-depletion has been described elsewhere (19). All animal procedures were carried out in accordance with French government regulations, with the approval of the Paris-Descartes Ethics Committee for animal experimentation, under protocol CEEA34.CP.077.12. Mice were housed in SPF (specific pathogen free) conditions. Wild type (WT) control mice are monogenic $Axin^{fl/fl}$ cohoused littermates.

Western blot analysis

Total protein extracts were obtained from 100 mg of frozen mouse liver, which was homogenized in lysis buffer in a bead mill, with the Tissue Lyser disruption system (Qiagen, Hilder, Germany). Proteins were resolved by SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose and blocked by incubation with 5% BSA or 5% milk. Blots were incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C, washed, incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling) and developed by enhanced chemiluminescence techniques (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Images were recorded with a 3.2-megapixel CCD camera driven by the LAS 4000 mini device (GE Healthcare). The antibodies used were directed against Axin1 (1:500); Annexin A2, p-c-Jun, ERK, p-ERK, YAP/TAZ, Smad2/3, TGF-β (1:1000), from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); Axin2 (1:500), from Abcam (Cambridge, UK); γ-tubulin (1:10000), from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); and GAPDH (1:200),a from Santa Cruz Biotechnology (Sant Cruz, CA, USA).

Immunohistochemistry We cut 4 µm-thick liver sections, which were then fixed in formalin and embedded in paraffin before use for immunohistochemistry. The primary antibodies used

For Peer Review

were anti-β-catenin clone 14 (1/50), anti-glutamine synthetase (GS) (1:400) from BD Biosciences (Erembodegem, Belgium); and anti-Sox9 (1:2000) from Millipore (Temecula, CA, USA), γH2AX Ser139 (1: 50) from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). The primary antibodies were incubated with the sections overnight at 4°C.The sections were then incubated with a biotinylated secondary antibody. Avidin-biotin amplification was performed (Jackson Laboratories), followed by detection with diaminobenzidine as the substrate (Jackson Laboratories) and counterstaining with hematoxylin. Anti-GS immunohistochemistry was performed with the MOM kit (Vector Laboratories). Representative images were taken with an Olympus digital camera. Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) was used to analyze the sections from the captured TIFF images.

Analysis of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction

RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction) was performed with 1 µg of total RNA and the Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics), with random hexamer as primers. Quantitative PCR reactions were performed with the Light Cycler 480 Sybr Green I Master kit (Roche) and specific primers (Eurogentec), on a Light Cycler 480 thermocycler.

Values were normalized against 18S ribosomal RNA. Primer sequences are indicated in Supplementary Table 1.

Pan-genomic RNA profiling

We used freshly frozen samples from eight tumors from five KO LivEmb mice and corresponding adjacent non-tumoral liver samples. The cDNA obtained was purified and fragmented. We checked for fragmentation with a 2100 Bioanalyzer, and the cDNA was then end-labeled with 153 biotin, using Terminal Transferase (WT terminal labeling kit,

For Peer Review

Affymetrix). The cDNA was then hybridized to GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Arrays (Affymetrix) at 45°C for 17 hours. The chips were washed on an FS450 fluidic station FS450, according to specific protocols, and scanned with a GCS3000 7G. The image was analyzed with Expression Console software to obtain raw data (CEL files) and metrics for quality control. The data obtained have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Microarray data were analyzed with R-based BRB-Array Tools, as previously described (26)

Metabolic flux analysis

Metabolic flux experiments were performed on suspensions of tumor and non-tumor liver explants (100-150 mg per point) in Krebs Henseleit buffer (pH 7.4), in conical glass vials. Tumors were separated from the adjacent tissues, and pieces of tumor and non-tumor tissue from the liver were rapidly chopped into small pieces (~2 mm^3). For analyses of mevalonate metabolism, [^{14}C] incorporation into cholesterol species was assessed after the incubation of explants in 1.6 mM [2-^{14}C] mevalonolactone for 2 hours at 37°C. After three washes in ice-cold PBS, cellular lipids from liver tumor and non-tumor explants were extracted in chloroform/methanol (2:1, v/v) by vortexing vigorously for 10 minutes and centrifuging. The organic phase was collected and allowed to dry in air. The dried lipids were dissolved in chloroform/methanol and separated by thin-layer chromatography on silica gel 60 plates (Merck) with petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (169: 30: 1, v/v/v) as the mobile phase. The lipids were then detected by staining with iodine vapor. For ^{14}C incorporation into lipids, PL, [^{14}C] cholesterol, NEFA (non essential fatty acids), TAG (triacid glycerol) and [^{14}C] cholesteryl ester bands were excised and counted in scintillation fluid.

Statistical analysis and data mining

For Peer Review

Student's *t* test and paired *t* tests were used for comparisons of variables, as indicated. Ingenuity pathway analysis (IPA) software (Mountain View, CA, USA) was used to examine the functional association between differentially expressed genes and to identify the molecular functions and gene networks displaying the most significant alterations, with the IPA scoring system. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed with the Java tool application available at the Broad Institute (Cambridge, MA, USA), using the default settings.

For Peer Review

Results

Axin1 deletion in the liver induces HCC without Wnt/β-catenin pathway activation

We generated an *Axin1* conditional knockout mouse (Axin1$^{lox/lox}$) in which exons 4 and 5, encoding part of the GSK3β and β-catenin binding site, were flanked by *loxP* sites (Figure 1A, B). Homozygous Axin1$^{lox/lox}$ mice were crossed with two different mouse strains to target Cre recombinase expression to either the hepatoblasts in the embryonic liver (Alfp-Cre mice)(24) or the hepatocytes in the adult liver upon tamoxifen injection (TTR-Cre-Tam mice)(25). Double-transgenic (Alfp-Cre;Axin1$^{lox/lox}$) or (TTRCre-Tam;Axin1$^{lox/lox}$) mice were born in Mendelian ratios. The loss of *Axin1* in the liver was confirmed by western blotting, in both models (Figure 1C). For convenience, double-transgenic Alfp-Cre;Axin1$^{lox/lox}$ mice and TTR-Cre-Tam;Axin1$^{lox/lox}$ mice will be referred to as KO LivEmb and KO LivAd mice, respectively. Mutant mice were monitored for liver tumorigenesis by ultrasonography. Liver tumors were detected before the age of eight months in about 30% of mutant mice. Macroscopic liver tumors had developed in 46.4% of mice in the embryonic mutant model and 39% of mice in the adult mutant model by the age of 12 months (Figure 2A), but in none of the control monogenic mice. Similar proportions of male and female mice developed tumors (14/33 male mice and 5/12 female mice). About 15% of the mice developed multifocal tumors in both models, but only one mouse had an invasive tumor phenotype with lung metastases (KO LivEmb model) (Suppl. Fig. 1A). These tumors were diagnosed as hepatocellular carcinomas, and their morphological features were similar in both models: moderate differentiation, with a pattern of macro- or microtrabecular growth (Suppl. Fig. 1B). Focal or extensive macro- or microvesicular steatosis was observed in 85% of these tumors (Figure 2A and Suppl. Fig. 1B). Nuclear atypia and mitotic activity were heterogeneous, generally at low levels, but striking in a few tumors (Suppl. Fig. 1B). We used γH2AX

For Peer Review

staining as a marker of DNA double-strand breaks and found it induced in the tumor samples compared to the adjacent non-tumor samples (Suppl. Fig. 1C). No nuclear or cytoplasmic β-catenin staining was observed, but strong expression of this protein was occasionally observed at the membrane (Figure 2B). No immunostaining for glutamine synthetase (GS), a surrogate marker of HCC with β-catenin activation, was observed in any of the tumors (Figure 2B). The expression of β-catenin target genes was similar in tumor and adjacent non-tumor tissues, as shown by RT-qPCR (Figure 2C). Accordingly, Axin2 was not more strongly expressed in tumor than in non-tumor samples (Figure 2D). Equivalent results were obtained in both KO LivEmb and KO LivAd mouse models. Finally, we also assessed the expression of genes encoding known components of the Wnt/β-catenin signaling pathway (*Fzd7, DKK3, TCF4, TCF1, LRP6, Dvl1*), none of which were found to be induced in tumors (Suppl. Fig. 1D).

Deletion of Axin1 in embryonic or adult liver does not lead to Wnt/β-catenin pathway activation in pre-tumoral livers

Mutant pre-tumoral livers were analyzed four months after birth (KO LivEmb) or after tamoxifen injection in adult KO LivAd mice. The livers of mutant mice had a normal histological appearance in both models, with a conserved lobular architecture (Figure 3A) and no evidence of hepatocyte injury (data not shown). An analysis of the β-catenin subcellular distribution revealed that it was present at the membrane but did not accumulate in the cytoplasm or nucleus, contrary to livers of *Apc* mutant mice (KO APC) (Figure 3A). We also immunolocalized GS, as a target of beta-catenin and a marker of liver zonation; no alterations were observed in either of the models. GS was limited to a few layers of hepatocytes around the central vein, as in control livers, whereas it was found throughout the entire lobule in *Apc* mutant mice (Figure 3A). Consistent with these data, RT-qPCR showed an absence of

For Peer Review

modulation of the expression of β-catenin transcriptional targets in the two models, contrasting with the strong deregulation of these targets in the livers of *Apc* mutant mice (Figure 3B).

We analyzed the expression of β-catenin positive target genes (*Axin2*, *Sp5*, *Lect2*, *Cyp2E1* and *Glul*) at earlier time points after tamoxifen injection No induction of these genes was observed four or 15 days after *Axin1* deletion (Suppl. Fig. 2 A,B). In particular, no induction of Axin2 protein synthesis was observed four or 15 days after tamoxifen injection in KO LivAd mice (Suppl. Fig. 2 C,D). Thus, *Axin1* deletion, whether long-term or short term and occurring during embryonic liver development or in adults, does not lead to activation of the canonical β-catenin pathway.

Deregulated oncogenic pathways in mouse HCCs with Axin1 deletion

As the Wnt/β-catenin pathway was clearly not the *bona fide* oncogenic activated pathway in HCC with *Axin1* deletion, we searched for other oncogenic pathways that might be involved. We established a gene signature for HCCs with *Axin1* deletion, by profiling seven tumors (T) from five KO LivEmb mice and adjacent non-tumoral (NT) samples from these mice using microarrays. The analysis identified 657 genes as upregulated and 447 genes as downregulated in the tumors (fold-change (FC)>1.5 and *P*-value<0.05; Suppl. Table 2). The biological functions associated with the differentially expressed genes were evaluated by gene ontology analysis. This analysis revealed a significant upregulation of genes involved in mitosis, cytokinesis and cell division (Suppl. Table 3), known markers of the proliferative class of HCCs. GSEA was performed with the C2 curated gene sets and the C6 oncogenic gene sets of the Molecular Signatures Database (MSigDB, V5.2) to characterize mouse HCCs with *Axin1* deletion (Suppl. Tables 4A,B and 5). Unsupervised GSEA highlighted specific signatures associated with stemness and EMT (epithelial mesenchymal transition) (Suppl.

For Peer Review

Table 4A,B). AXIN1 is a scaffolding protein known to interact with several oncogenic signaling pathways other than the Wnt/β-catenin pathway, including the Notch, YAP, JNK, TGFβ and c-myc pathways (6-9, 27). We therefore focused on these pathways, for which GSEA revealed significant enrichment in the C2 (Supp. Table 4B) and C6 (Suppl Table 5) collections and for which AXIN1 was known to be a partner.

We first evaluated enrichment for a Notch 384-gene tumor signature defined in Alfp-NICD mouse tumors expressing the Notch1 intracellular domain (28) in the gene expression profiles of livers with *Axin1* deletion (T vs. NT). Strong enrichment in this signature was observed in Axin1 deficient tumors (Figure 4A), with 143 genes (37%) of this Notch tumor signature commonly deregulated in HCCs with *Axin1* deletion (Suppl. Table 6). We confirmed the induction of some of these genes by RT-PCR on a different set of seven KO LivAd tumors (Figure 4B). Levels of the osteopontin (Spp1) protein, a Notch target predictive of a poor prognosis in both HCC and intrahepatic cholangiocarcinoma (29), were found to be induced in 5/7 KO LivAd tumors (Suppl. Fig. 3A). We also observed in most of the tumor samples of both models, but not in the corresponding non-tumor samples, a nuclear accumulation of Sex-determining region Y-box9 (Sox9), a marker of liver progenitor cells expressed during embryogenesis that is also a Notch target gene (Figure 4C). Finally, enrichment was detected for a YAP signature (30) in our GSEA analysis (Figure 4D, Suppl. Table 5). Upregulation of the Yap target genes *Birc5*, *Hmmr* (Hyaluronan-mediated motility receptor) and *Cyr61* in tumors with *Axin1* deletion was confirmed by RT-PCR on a different set of seven KO LivAd tumors (Figure 4E). Protein-based analyses revealed the heterogeneous induction of Yap and Taz production in some, but not all tumors with *Axin1* deletion (Figure 4F). *Hmmr*, a positive direct Yap target gene strongly induced in tumors with *Axin1* deletion, is known to be dependent on the mevalonate/cholesterol pathway for its transcription (31, 32) and to be a

For Peer Review

marker of poor prognosis and invasion in lung carcinoma (33). Interestingly, GSEA indicated that cholesterol homeostasis was disturbed in *Axin1* deleted tumors (Figure 5A and Suppl. Table 7). We investigated the expression of the genes of the mevalonate pathway in more detail and found that *Lss*, *Sqle*, *Hmgcr* and *Hmgcs* were indeed induced in tumors at the mRNA level (Figure 5B). We therefore analyzed cholesterol biosynthesis from [^{14}C]-labeled mevalonate in four tumors *in vivo* (2 from KO LivEmb mice and 2 from KO LivAd mice). The incorporation of cholesterol species was much stronger in tumors than in non-tumor tissue, confirming the induction of cholesterol flux in tumors with *Axin1* deletion (Figure 5C).

We then focused on the TGFβ and JNK pathways, which are known to interact directly with Axin1. TGF-β expression was induced in half the tumors (Figure 5C) and GSEA confirmed that the gene profile of HCC tumors with *Axin1* deletion was enriched in the pro-oncogenic TGF-β signature (34) (Figure 5D). Finally, we evaluated c-jun phosphorylation as a marker of JNK activation and poor prognosis in HCC (35, 36); western blotting showed c-jun phosphorylation to be induced in most tumors (Suppl. Fig. 3B). By contrast, c-myc production and activation were heterogeneous, but generally not induced in tumors (data not shown).

Mouse HCCs with Axin1 deletion cluster with human proliferative HCCs and have progenitor and poor prognosis signatures

We then evaluated the relevance of mouse tumors with *Axin1* deletion to carcinogenesis in humans. Interestingly, GSEA on mouse HCCs with *Axin1* deletion revealed enrichment in gene signatures associated with subclasses belonging to the “proliferative class” with a more invasive phenotype and a worse outcome: G123 described by Boyault *et al*. (22), S1 described by Hosdida (37), and the proliferation subclass described by Chiang *et al*. (38) (Suppl. Table

For Peer Review

4B, Figure 6A). Accordingly, we found an enrichment in tumor signatures associated with invasion, stemness and poor prognosis features ($p<0.05$) (Figure 6A and Suppl. Table 4AB). Accordingly, fetal genes, such as *Afp*, *H19*, *Tff3*, *Spink3*, *Cbr3* and *Ly6d,* were among the genes most strongly induced in tumors (Figure 6B). We investigated the protein levels of various markers and the activation of pathways known to be associated with poor prognosis in HCC. Anxa2 (39) and pERK (40) were found to be induced in all *Axin1*-deficient liver tumors in both models (Figure 6C).

Taken together, our results demonstrate that the loss of *Axin1* in mouse liver induces HCC independently of Wnt/β-catenin pathway activation and that these tumors belong to the "proliferative" subclass of HCC and have a poor clinical outcome.

For Peer Review

DISCUSSION

This study demonstrates that *Axin1* inactivation can trigger the development of sporadic HCC independently of Wnt/β-catenin pathway activation. Mice with *Axin-1* depletion in the liver developed HCCs clustering with the previously described human subgroups of HCC (22, 37, 38), which display chromosomal instability and a transcriptional signature associated with poor prognosis, invasiveness and stemness. These subgroups are clearly different from the group of tumors with beta-catenin gene mutations (Figure 7).

Our finding that tumors with *Axin1* deletions do not display Wnt/β-catenin pathway activation is of particular importance, because all previous studies, including the most recent studies based on whole-exome or whole-genome analyses of human HCCs, placed HCCs with *AXIN1* mutations and those with *CTNNB1* mutations in the same group (15, 41). This classification was based on the notion that CTNNB1 and AXIN1 are both involved in the Wnt/β-catenin pathway and on previous reports of a weak activation of β-catenin signaling in human HCC cell lines bearing inactivating *AXIN1* mutations (20). Different mechanisms of β-catenin activation may lead to qualitative and quantitative differences in Wnt pathway induction. Llovet's group described two molecular classes of HCC displaying Wnt pathway activation: one associated with *CTNNB1* mutations, and the second displaying crosstalk with TGFβ signaling (42). However, in the second group (Wnt-TGFβ), no expression of the classical liver-β-catenin target genes, such as *GLUL* or *LGR5*, was observed and numerous partners of the Wnt/β-catenin pathway were induced (*FZD7, DKK2, DKK3, TCF4, TCF1, LRP6, WNT1, WNT10b, DVL1*), reflecting activation of the Wnt/β-catenin pathway. By contrast, we observed no induction of any of these classical or partner genes in either of the models studied, in tumors or non-tumor liver samples, at any time after tamoxifen injection, excluding even transient activation of the β-catenin pathway. The lack of an upregulation of

For Peer Review

Axin2 expression is not consistent with the hypothesis of Axin2-mediated compensation. Our data differ from those reported by Feng *et al*., reporting that *Axin1* deletion in mice results in the induction of some β-catenin target genes (23). This discrepancy may be due to the mouse models used, which differed in terms of both the invalidation construct and the Cre recombinase used, the expression of which was not restricted to the liver in Feng's study. Thus, although AXIN1 has been described as the limiting scaffolding protein of the β-catenin degradation complex (2), it does not play the expected negative role in β-catenin signaling at least in quiescent adult mouse liver *in vivo*. These tumors should thus be classified in a different subgroup from HCCs with other Wnt/β-catenin pathway mutations (Figure 7).

The reason for the lack of β-catenin activation after *Axin1* deletion in hepatocytes *in vivo* is currently unclear. Interestingly, we observed a weak induction of the Wnt/β-catenin pathway in human HCC cell lines with *Axin1* mutations, and in primary hepatocyte cultures derived from mice with *Axin1* deletions (data not shown). However, as in human HCC cell lines with *AXIN1* mutations (20), the observed induction was much weaker than that observed in cell lines with *Apc* mutations. This discrepancy between *in vitro* and *in vivo* data suggests that counterregulatory mechanisms within hepatocytes or involving dialog with other cell types may occur *in vivo*, to limit activation of the Wnt/β-catenin pathway.

Our data confirmed the role of *Axin1* as a tumor suppressor gene in mouse liver, consistent with the reported presence of either LOH or a second *AXIN1* mutation in human HCC (15). However, HCCs arose after a significant latency period and in only 40% of *Axin1* mutant mice, indicating that *Axin1* loss of function alone is only mildly oncogenic. Moreover, the requirement of additional different molecular events for Axin1-induced hepatocarcinogenesis is highlighted by the high degree of morphological and molecular heterogeneity of the tumors. These findings indicate that HCC development following *Axin1*

For Peer Review

loss in mouse liver requires additional oncogenic events that may differ between tumors and suggest that *AXIN1* mutations are unlikely to initiate the development of human HCC.

GSEA identified oncogenic pathways that cooperate with the loss of *Axin1* to trigger HCC development. We focused on signaling pathways for which Axin1 is a known partner, the Notch, and Yap pathways (6, 8), for which crosstalk independent of the β-catenin pathway is known to occur in the liver and in HCC (43). We found that tumors with *Axin1* deletion displayed significant enrichment in a Notch-induced HCC signature. Notch pathway activation in human HCC is associated with poorer tumor cell differentiation, venous invasion, an advanced tumor stage and shorter overall survival (44, 45). In HCCs with *Axin1* deletion, two known Notch targets, Sox9 and Osteopontin (*Spp1*), which confer a cancer stem-like phenotype on human HCC cells (44, 45), were found to be upregulated. These findings raise the possibility that tumors with inactivating mutations of *Axin1* may respond to Notch inhibition.

In addition to enrichment in Notch and Yap pathway proteins, we also found a cholesterol biosynthesis signature in tumors with *Axin1* deletion. Various genes encoding mevalonate pathway proteins, such as Hmgcr (3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase) or Sqle (squalene epoxidase) were induced. Deregulation of the mevalonate pathway is associated with cell transformation (46-49) and a poor prognosis. Crosstalk between the Hippo/Yap and mevalonate pathways has recently been demonstrated, as the inhibition of Hmgcr by statins blocks the Yap/Taz-induced proliferation of breast cancer cells (31). In addition, *Hmmr* (also called *Rhamm,* for receptor of hyaluronan-mediated motility), a gene that promotes microtubule instability and is strongly expressed in aggressive human cancers (50) was found induced in tumors with *Axin1* deletion. Hmmr/Rhamm is known to be a direct transcriptional target of Yap downstream from the mevalonate pathway and to

For Peer Review

activate ERK (32, 50). These data suggest that statins may also be useful treatment targets for HCC with *AXIN1* mutations.

In conclusion, our results show that Axin1 loss in mouse liver induces HCC independently of Wnt/β-catenin, indicating that HCCs with *AXIN1* mutations in humans should not be classified in the same group as HCCs with *CTNNB1* mutations (Figure 7). We identified three oncogenic pathways, the Notch, Yap and mevalonate pathways, known to be interconnected and the interplay of which in cells with *Axin1* deletion induces tumorigenesis independently of Wnt/ β-catenin pathway activation, converging in an aggressive phenotype illustrated by the induction of ERK phosphorylation (40). Further investigations are required to improve our understanding of the functional crosstalk between Axin1 inhibition and mevalonate cascades and to identify crucial mediators involved in the interplay between these three oncogenic pathways. In the meantime, this genetic model in mice constitutes an ideal tool for evaluating new treatments preventing the sequence of tumor development at various stages of progression. Statins and GSI (gamma secretase inhibitors) would appear to be the best candidates for testing against tumors with *AXIN1* mutations.

For Peer Review

References

1. Zeng L, Fagotto F, Zhang T, Hsu W, Vasicek TJ, Perry WL, 3rd, Lee JJ, et al. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. Cell 1997;90:181-192.
2. Lee E, Salic A, Kruger R, Heinrich R, Kirschner MW. The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. PLoS Biol 2003;1:E10.
3. Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, et al. Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. Cell 2012;149:1245-1256.
4. Kim SE, Huang H, Zhao M, Zhang X, Zhang A, Semonov MV, MacDonald BT, et al. Wnt stabilization of beta-catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. Science 2013;340:867-870.
5. Hayward P, Balayo T, Martinez Arias A. Notch synergizes with axin to regulate the activity of armadillo in Drosophila. Dev Dyn 2006;235:2656-2666.
6. Munoz-Descalzo S, Tkocz K, Balayo T, Arias AM. Modulation of the ligand-independent traffic of Notch by Axin and Apc contributes to the activation of Armadillo in Drosophila. Development 2011;138:1501-1506.
7. Liu W, Rui H, Wang J, Lin S, He Y, Chen M, Li Q, et al. Axin is a scaffold protein in TGF-beta signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia. Embo J 2006;25:1646-1658.
8. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S, Bresolin S, et al. YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. Cell 2014;158:157-170.
9. Arnold HK, Zhang X, Daniel CJ, Tibbitts D, Escamilla-Powers J, Farrell A, Tokarz S, et al. The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc. Embo J 2009;28:500-512.
10. Rui Y, Xu Z, Xiong B, Cao Y, Lin S, Zhang M, Chan SC, et al. A beta-catenin-independent dorsalization pathway activated by Axin/JNK signaling and antagonized by aida. Dev Cell 2007;13:268-282.
11. Luo W, Ng WW, Jin LH, Ye Z, Han J, Lin SC. Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation. J Biol Chem 2003;278:37451-37458.
12. Li Q, Lin S, Wang X, Lian G, Lu Z, Guo H, Ruan K, et al. Axin determines cell fate by controlling the p53 activation threshold after DNA damage. Nat Cell Biol 2009;11:1128-1134.
13. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology 2007;132:2557-2576.
14. Rebouissou S, Franconi A, Calderaro J, Letouze E, Imbeaud S, Pilati C, Nault JC, et al. Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different ss-catenin activity associated with liver tumor progression. Hepatology 2016;64:2047-2061.
15. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology 2015;149:1226-1239 e1224.
16. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. Nat Genet 2015;47:505-511.

For Peer Review

17. Fujimoto A, Furuta M, Totoki Y, Tsunoda T, Kato M, Shiraishi Y, Tanaka H, et al. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. Nat Genet 2016;48:500-509.
18. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:8847-8851.
19. Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, Giovannini M, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:17216-17221.
20. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. Nat Genet 2000;24:245-250.
21. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, Cunha AS, et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. Oncogene 2007;26:774-780.
22. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology 2007;45:42-52.
23. Feng GJ, Cotta W, Wei XQ, Poetz O, Evans R, Jarde T, Reed K, et al. Conditional disruption of Axin1 leads to development of liver tumors in mice. Gastroenterology 2012;143:1650-1659.
24. Kellendonk C, Opherk C, Anlag K, Schutz G, Tronche F. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. Genesis 2000;26:151-153.
25. Tannour-Louet M, Porteu A, Vaulont S, Kahn A, Vasseur-Cognet M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatology 2002;35:1072-1081.
26. Just PA, Poncy A, Charawi S, Dahmani R, Traore M, Dumontet T, Drouet V, et al. LKB1 and Notch Pathways Interact and Control Biliary Morphogenesis. PLoS One 2015;10:e0145400.
27. Zhang Y, Neo SY, Wang X, Han J, Lin SC. Axin forms a complex with MEKK1 and activates c-Jun NH(2)-terminal kinase/stress-activated protein kinase through domains distinct from Wnt signaling. J Biol Chem 1999;274:35247-35254.
28. Villanueva A, Alsinet C, Yanger K, Hoshida Y, Zong Y, Toffanin S, Rodriguez-Carunchio L, et al. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. Gastroenterology 2012;143:1660-1669 e1667.
29. Sulpice L, Rayar M, Desille M, Turlin B, Fautrel A, Boucher E, Llamas-Gutierrez F, et al. Molecular profiling of stroma identifies osteopontin as an independent predictor of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 2013;58:1992-2000.
30. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, Inui M, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. Cell 2011;147:759-772.
31. Sorrentino G, Ruggeri N, Specchia V, Cordenonsi M, Mano M, Dupont S, Manfrin A, et al. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. Nat Cell Biol 2014;16:357-366.
32. Wang Z, Wu Y, Wang H, Zhang Y, Mei L, Fang X, Zhang X, et al. Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:E89-98.
33. Wang D, Narula N, Azzopardi S, Smith RS, Nasar A, Altorki NK, Mittal V, et al. Expression of the receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM) is associated

For Peer Review

with poor prognosis and metastasis in non-small cell lung carcinoma. Oncotarget 2016;7:39957-39969.
34. Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. Hepatology 2008;47:2059-2067.
35. Hagiwara S, Kudo M, Nagai T, Inoue T, Ueshima K, Nishida N, Watanabe T, et al. Activation of JNK and high expression level of CD133 predict a poor response to sorafenib in hepatocellular carcinoma. Br J Cancer 2012;106:1997-2003.
36. Chen W, Xiao W, Zhang K, Yin X, Lai J, Liang L, Chen D. Activation of c-Jun predicts a poor response to sorafenib in hepatocellular carcinoma: Preliminary Clinical Evidence. Sci Rep 2016;6:22976.
37. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, Villanueva A, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2009;69:7385-7392.
38. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, LeBlanc AC, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2008;68:6779-6788.
39. Zhang H, Yao M, Wu W, Qiu L, Sai W, Yang J, Zheng W, et al. Up-regulation of annexin A2 expression predicates advanced clinicopathological features and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Tumour Biol 2015;36:9373-9383.
40. Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, et al. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. J Hepatol 2008;48:83-90.
41. Monga SP. beta-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. Gastroenterology 2015;148:1294-1310.
42. Lachenmayer A, Alsinet C, Savic R, Cabellos L, Toffanin S, Hoshida Y, Villanueva A, et al. Wnt-pathway activation in two molecular classes of hepatocellular carcinoma and experimental modulation by sorafenib. Clin Cancer Res 2012;18:4997-5007.
43. Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P, Malz M, Gaida MM, Felix K, Ladu S, et al. Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2013;144:1530-1542 e1512.
44. Leung CO, Mak WN, Kai AK, Chan KS, Lee TK, Ng IO, Lo RC. Sox9 confers stemness properties in hepatocellular carcinoma through Frizzled-7 mediated Wnt/beta-catenin signaling. Oncotarget 2016.
45. Cao L, Fan X, Jing W, Liang Y, Chen R, Liu Y, Zhu M, et al. Osteopontin promotes a cancer stem cell-like phenotype in hepatocellular carcinoma cells via an integrin-NF-kappaB-HIF-1alpha pathway. Oncotarget 2015;6:6627-6640.
46. Clendening JW, Pandyra A, Boutros PC, El Ghamrasni S, Khosravi F, Trentin GA, Martirosyan A, et al. Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:15051-15056.
47. Clendening JW, Penn LZ. Targeting tumor cell metabolism with statins. Oncogene 2012;31:4967-4978.
48. Brown DN, Caffa I, Cirmena G, Piras D, Garuti A, Gallo M, Alberti S, et al. Squalene epoxidase is a bona fide oncogene by amplification with clinical relevance in breast cancer. Sci Rep 2016;6:19435.
49. Mullen PJ, Yu R, Longo J, Archer MC, Penn LZ. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. Nat Rev Cancer 2016;16:718-731.

For Peer Review

50. Tolg C, Hamilton SR, Morningstar L, Zhang J, Zhang S, Esguerra KV, Telmer PG, et al. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. J Biol Chem 2010;285:26461-26474.

For Peer Review

Figure Legends

Figure 1. *Generation of Axin1$^{fl/fl}$ mice.* (A) Schematic representation of the wild-type (WT) and mutated *Axin1* alleles, with the localization of binding sites for APC, β-catenin and GSK3β. LoxP sequences are indicated by black triangles and FRT sites by gray rectangles. FLP recombinase was used to delete the hygromycin selection gene in ES cells. (B) Southern blot of WT and heterozygous wt/fl ES cells before the use of FLP recombinase, with probes 1, 2 and 3, as indicated in A. (C) Immunodetection of Axin1 in the liver of monogenic Axin1$^{fl/fl}$ mice (WT) and double-transgenic Axin1$^{fl/fl}$ mice expressing the Cre recombinase under the control of the Alfp promoter (KO LivEmb) or the TTR promoter (KO LivAd), 15 days after the injection of tamoxifen. Gapdh was used as a loading control.

Figure 2. *Absence of induction of the Wnt/β-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma (HCC) developing in KO LivEmb and KO LivAd mice*. (A) upper panel: macroscopic appearance of representative livers from *KO LivEmb and KO LivAd* mice at 12-14 months. Arrowheads indicate tumors; lower panel: Representative HE-stained sections showing tumors with steatosis (100x). (B) Immunostaining for β-catenin gene (*CTNNB1*) expression showing an absence of nuclear staining in the tumor (upper panels), and for glutamine synthase (GS), showing no staining or staining only in hepatocytes around the central vein in the periphery of the tumor (lower panels) (200x). (C) RT-qPCR analysis of target genes upregulated by β-catenin, in the tumors of *KO LivAd* mice (T) and in non-tumor samples from the same mice (NT) at 9 to 14 months after tamoxifen injection (*n*=6 NT/T pairs). Data are presented as the mean ± SEM, with a comparison between tumor (T) and non-tumor (NT) samples. (D) Immunoblot analysis of Axin2 levels in the liver of monogenic control Axin1$^{fl/fl}$ mice (WT) and KO LivEmb mice. Gapdh is used as a loading control.

For Peer Review

Figure 3. *Absence of induction of the Wnt/ β-catenin pathway in pretumoral livers displaying Axin1 deletion.* (A) Liver sections immuno-stained for GS (100x except for the APC KO, 200x) and β-catenin (200x) in monogenic control mice (WT), KO LivEmb mice with *Axin1* deletion at the age of four months, adult KO LivAd mice four months after tamoxifen injection and APC KO mice after *Apc* deletion. (B) RT-qPCR analysis of target genes upregulated by β–catenin, in the livers of WT (n=6), KO LivEmb (n=6), KO LivAd (n=6) mice and mice with *Apc* deletion (APC KO n=3). Data are presented as the mean ± SEM, with comparisons to WT mice. Only APC KO livers displayed significant gene induction relative to WT livers (p<0.001).

Figure 4. *The Notch and Yap/Taz oncogenic pathways are activated in tumors with Axin1 deletion*

(A) GSEA showed that the gene expression profiles of tumors with *Axin1* deletions (T) and adjacent non-tumor tissues (NT) were significantly enriched in gene signatures corresponding to genes up- and downregulated, respectively, in NICD-induced tumors (28) (p<0.001). (B) Relative RNA levels, as determined by RT-qPCR, for Notch pathway target genes in tumors with *Axin1* deletion (T) (n=7) and in non-tumor tissues (NT) (n=9) from KO LivAd mouse livers (* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001). (C) Sections from a KO LivEmb liver tumor (T) and the corresponding non–tumor sample (NT), immunostained for Sox9. Note the intense nuclear staining in the tumor sample. (D) GSEA demonstrating specific enrichment for a Yap oncogenic signature in the gene expression profile of tumors with *Axin1* deletion (p<0.05). (E) RT-qPCR analysis of target genes upregulated by Yap, in T (n=7) and NT (n=9) samples from KO LivAd livers (* p<0.05, ***p<0.001). (F) Immunoblot analysis of Yap and Taz levels in T and NT samples from livers with *Axin1* deletion from KO LivEmb mice.

Figure 5. *The mevalonate/cholesterol and TGFβ pathways are induced in tumors with Axin1*

For Peer Review

deletion and in pretumoral livers

(A) GSEA demonstrating specific enrichment for the expression of genes involved in cholesterol homeostasis in the gene expression profiles of tumors with *Axin1* deletion ($p<0.0001$). (B) RT-qPCR analysis of genes involved in cholesterol biosynthesis in tumors with *Axin1* deletion (T) ($n= 5$); comparison with NT samples ($n=5$) from KO LivAd livers. Data are presented as the mean ± SEM, with comparison to NT samples (* $p<0.05$). (C) Cholesterol flux from tumor (T) and non-tumor (NT) corresponding explants. [^{14}C] incorporated in cholesterol products was counted and expressed in nmole/g of tissue. White boxes: non-tumor tissues, black boxes: tumor explants displaying *Axin1* deletion. Four tumor samples and the corresponding non-tumor samples were analyzed in three independent experiments (2 KO LivEmb and 2 KO LivAd mice). The results shown are the means ±SEM of triplicate flasks. **$P<0.01$ (unpaired or paired *t* tests). (D) Immunoblot of proteins from the TGFβ pathway in paired T and NT samples from KO LivEmb and KO LivAd mice. Gapdh was used as a loading control. (E) GSEA validation of the specific enrichment in a TGFβ oncogenic signature of the gene expression profile of tumors with *Axin1* deletion (34).

Figure 6. *Tumors with Axin1 deletion recapitulate the characteristics of human HCCs of the G1-G3 subgroup with no beta-catenin mutations and features associated with a poor prognosis.*

(A) GSEA revealing significant enrichment in various human oncogenic gene signatures. NES: the normalized enrichment score for GSEA algorithm. (B) Relative expression, as assessed by RT-qPCR, of fetal genes in tumors with Axin1 deletion (T) ($n=7$) and the corresponding non-tumor (NT) samples ($n=9$) from KO LivAd livers. Data are presented as the mean ± SEM, with comparison to the corresponding NT samples (** $p<0.01$, ***$p<0.001$). (C) Immunoblot analysis of control Axin1$^{fl/fl}$ Cre- mouse livers (WT), tumors

For Peer Review

(T) corresponding non-tumor (NT) samples for Anxa2, ERK and p-ERK. γ-tubulin was used as a loading control.

Figure 7. *Integration of tumors with Axin1 deletion into the current molecular classification of human HCC*

For Peer Review

Suppl. Fig. 1.

(A) Macroscopic and microscopic (x40) views of lung metastases of HCCs with *Axin1* deletion. (B) Sections of tumors with *Axin1* deletions (200x) displaying micro- and macrosteatosis (upper left), trabecular (upper right), and pseudoalveolar (lower right) growth patterns and mitotic activity (arrows, lower left).

(C) Detection of hepatocytes with DNA damage by γH2AX immunostaining of control (WT) and KO LivEmb tumoral liver samples (200x). (D) RT-qPCR analysis of genes encoding proteins of the Wnt/β-catenin signaling pathway in KO LivAd tumors (T) (*n*= 6) and corresponding NT (*n*=6) samples. Data are presented as the mean ± SEM.

Suppl. Fig. 2.

(A,B) RT-qPCR analysis of target genes upregulated by β-catenin, in WT (*n*=7) and KO LivAd livers (A) 4 days (*n*=8) and (B) 15 days (*n*=5) after tamoxifen injection. Data are presented as the mean ± SEM, with comparison to monogenic Axin $^{fl/fl}$ mice (WT). (C,D) Western-blot analysis of Axin2 levels in the livers of monogenic control Axin1$^{fl/fl}$ mice (WT) and KO LivAd mice 4 days (C) and 15 days (D) after tamoxifen injection. γ-tubulin was used as a loading control.

Suppl. Fig. 3

Western-blot analysis of liver tumors with *Axin1* deletion (T) and corresponding non-tumor (NT) samples for (A) osteopontin and (B) c-jun and phosphorylated c-jun, in two KO LivEmb mice and two KO LivAd mice.

Supplementary Tables

For Peer Review

Suppl. Table 1: Sequence of the oligonucleotides used

Suppl. Table 2: Genes differentially expressed in liver tumors with Axin1 deletion and the adjacent non-tumor tissue. Fold-change > 1.5 or <-1.5 and *p*-value < 0.05 Genes are ordered according to fold-change in expression.

Suppl. Table 3: Gene ontology analysis of the transcriptomic signature of tumors with *Axin1* deletion.

Suppl. Table 4: List of gene signatures from the C2 cgp collection displaying significant enrichment in HCCs (A): $p<0.05$, (B): $p<0.01$

Suppl. Table 5: List of gene signatures from the C6 oncogenic collection displaying significant enrichment in HCCs (A): $p<0.05$, (B): $p<0.01$. Ordered according to FDR.

Suppl. Table 6: Common genes differentially expressed genes in Notch NICD-induced liver tumors and in tumors with *Axin1* deletion in mice. Genes are in alphabetical order.

Suppl. Table 7: Set of genes from the cholesterol biosynthesis pathway displaying significant enrichment in tumors with *Axin1* deletion.

For Peer Review

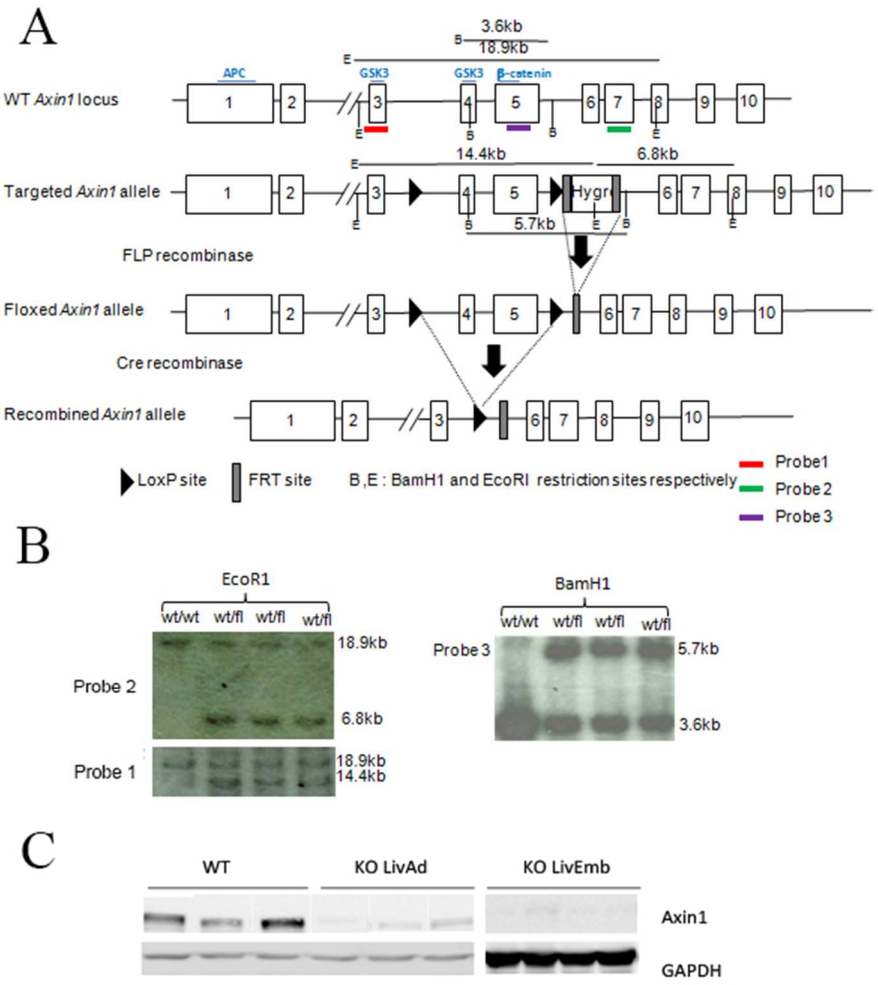


Figure 1. Generation of Axin1fl/fl mice. (A) Schematic representation of the wild-type (WT) and mutated Axin1 alleles, with the localization of binding sites for APC, β-catenin and GSK3β. LoxP sequences are indicated by black triangles and FRT sites by gray rectangles. FLP recombinase was used to delete the hygromycin selection gene in ES cells. (B) Southern blot of WT and heterozygous wt/fl ES cells before the use of FLP recombinase, with probes 1, 2 and 3, as indicated in A. (C) Immunodetection of Axin1 in the liver of monogenic Axin1fl/fl mice (WT) and double-transgenic Axin1fl/fl mice expressing the Cre recombinase under the control of the Alfp promoter (KO LivEmb) or the TTR promoter (KO LivAd), 15 days after the injection of tamoxifen. Gapdh was used as a loading control.

208x282mm (72 x 72 DPI)

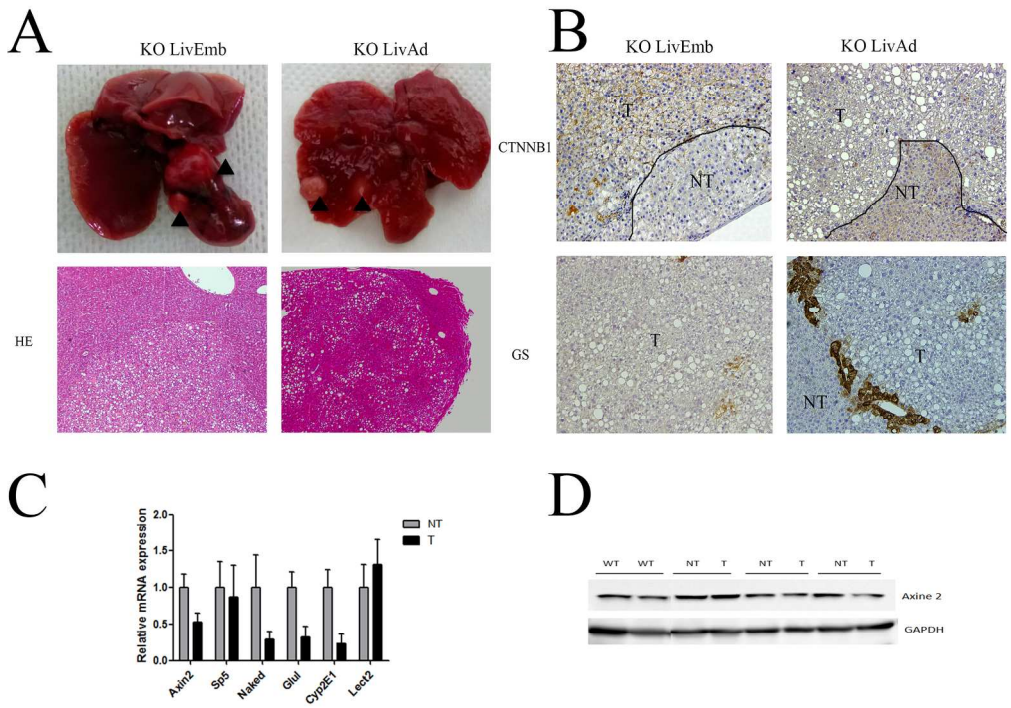


Figure 2. Absence of induction of the Wnt/β-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma (HCC) developing in KO LivEmb and KO LivAd mice. (A) upper panel: macroscopic appearance of representative livers from KO LivEmb and KO LivAd mice at 12-14 months. Arrowheads indicate tumors; lower panel: Representative HE-stained sections showing tumors with steatosis (100x). (B) Immunostaining for β-catenin gene (CTNNB1) expression showing an absence of nuclear staining in the tumor (upper panels), and for glutamine synthase (GS), showing no staining or staining only in hepatocytes around the central vein in the periphery of the tumor (lower panels) (200x). (C) RT-qPCR analysis of target genes upregulated by β-catenin, in the tumors of KO LivAd mice (T) and in non-tumor samples from the same mice (NT) at 9 to 14 months after tamoxifen injection (n=6 NT/T pairs). Data are presented as the mean + SEM, with a comparison between tumor (T) and non-tumor (NT) samples. (D) Immunoblot analysis of Axin2 levels in the liver of monogenic control Axin1fl/fl mice (WT) and KO LivEmb mice. Gapdh is used as a loading control.

199x150mm (300 x 300 DPI)

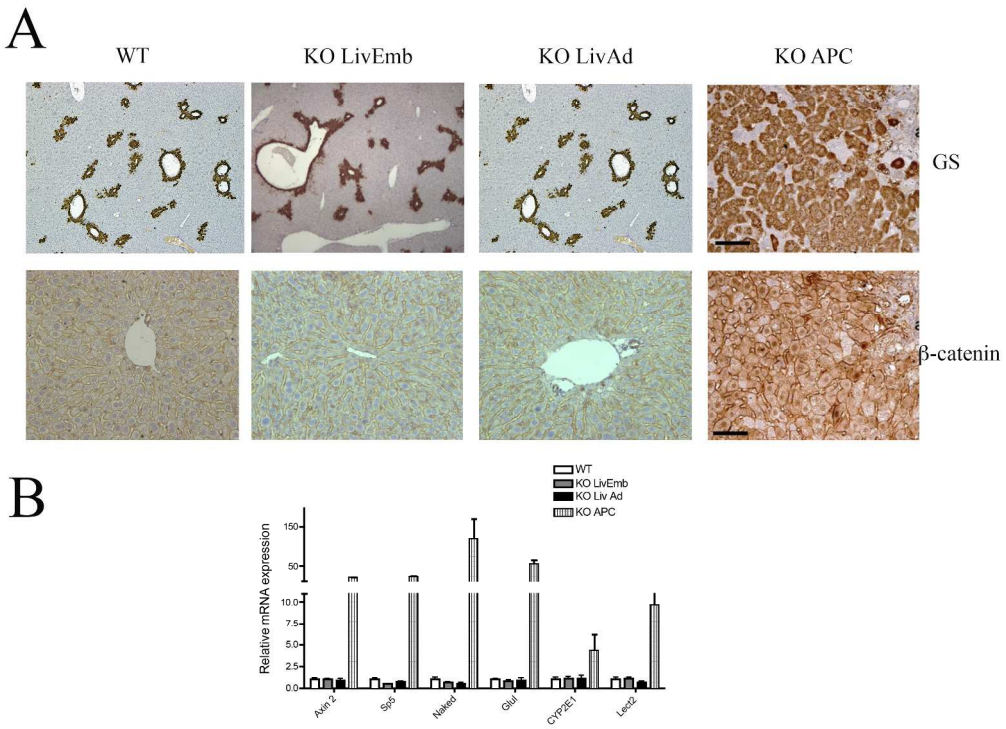


Figure 3. Absence of induction of the Wnt/ β-catenin pathway in pretumoral livers displaying Axin1 deletion. (A) Liver sections immuno-stained for GS (100x except for the APC KO, 200x) and β-catenin (200x) in monogenic control mice (WT), KO LivEmb mice with Axin1 deletion at the age of four months, adult KO LivAd mice four months after tamoxifen injection and APC KO mice after Apc deletion. (B) RT-qPCR analysis of target genes upregulated by β−catenin, in the livers of WT (n=6), KO LivEmb (n=6), KO LivAd (n=6) mice and mice with Apc deletion (APC KO n=3). Data are presented as the mean + SEM, with comparisons to WT mice. Only APC KO livers displayed significant gene induction relative to WT livers ($p<0.001$).

289x209mm (300 x 300 DPI)

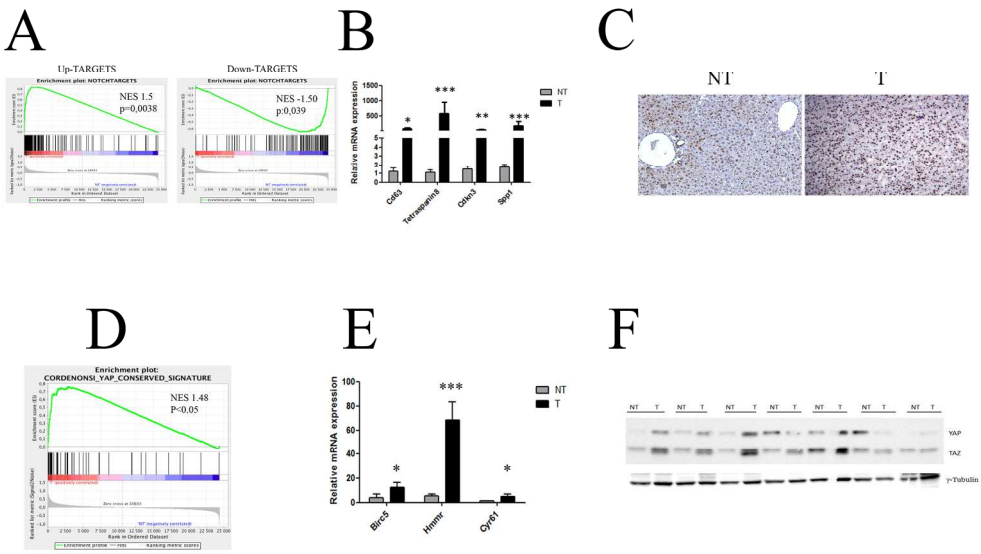


Figure 4. The Notch and Yap/Taz oncogenic pathways are activated in tumors with Axin1 deletion (A) GSEA showed that the gene expression profiles of tumors with Axin1 deletions (T) and adjacent non-tumor tissues (NT) were significantly enriched in gene signatures corresponding to genes up- and downregulated, respectively, in NICD-induced tumors (28) ($p<0.001$). (B) Relative RNA levels, as determined by RT-qPCR, for Notch pathway target genes in tumors with Axin1 deletion (T) (n=7) and in non-tumor tissues (NT) (n=9) from KO LivAd mouse livers (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, ***$p<0.001$). (C) Sections from a KO LivEmb liver tumor (T) and the corresponding non–tumor sample (NT), immunostained for Sox9. Note the intense nuclear staining in the tumor sample. (D) GSEA demonstrating specific enrichment for a Yap oncogenic signature in the gene expression profile of tumors with Axin1 deletion ($p<0.05$). (E) RT-qPCR analysis of target genes upregulated by Yap, in T (n=7) and NT (n=9) samples from KO LivAd livers (* $p<0.05$, ***$p<0.001$). (F) Immunoblot analysis of Yap and Taz levels in T and NT samples from livers with Axin1 deletion from KO LivEmb mice.

199x132mm (300 x 300 DPI)

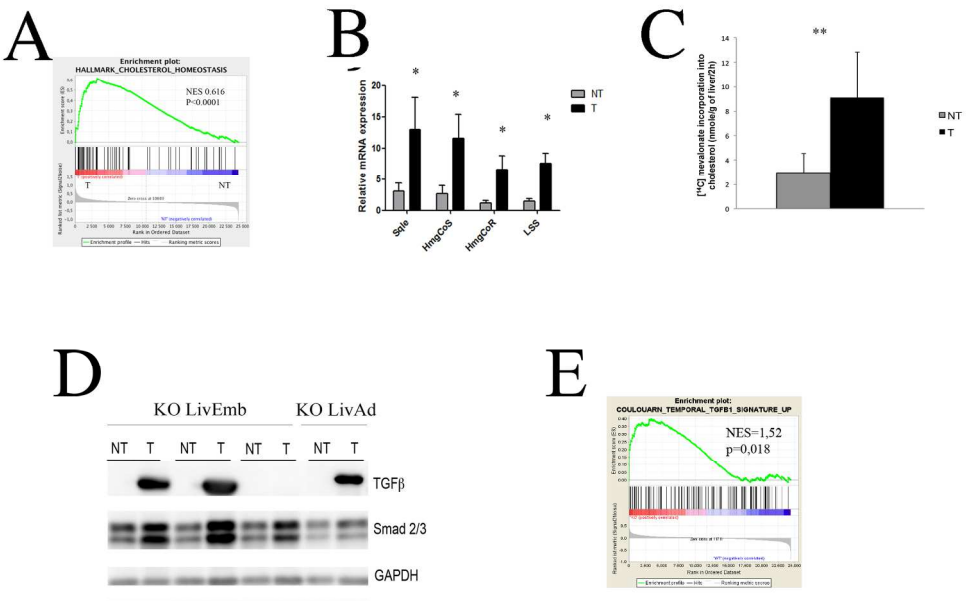


Figure 5. The mevalonate/cholesterol and TGFβ pathways are induced in tumors with Axin1 deletion and in pretumoral livers

(A) GSEA demonstrating specific enrichment for the expression of genes involved in cholesterol homeostasis in the gene expression profiles of tumors with Axin1 deletion ($p<0.0001$). (B) RT-qPCR analysis of genes involved in cholesterol biosynthesis in tumors with Axin1 deletion (T) (n= 5); comparison with NT samples (n=5) from KO LivAd livers. Data are presented as the mean + SEM, with comparison to NT samples (* $p<0.05$). (C) Cholesterol flux from tumor (T) and non-tumor (NT) corresponding explants. [14C] incorporated in cholesterol products was counted and expressed in nmole/g of tissue. White boxes: non-tumor tissues, black boxes: tumor explants displaying Axin1 deletion. Four tumor samples and the corresponding non-tumor samples were analyzed in three independent experiments (2 KO LivEmb and 2 KO LivAd mice). The results shown are the means ±SEM of triplicate flasks. **$P<0.01$ (unpaired or paired t tests). (D) Immunoblot of proteins from the TGFβ pathway in paired T and NT samples from KO LivEmb and KO LivAd mice. Gapdh was used as a loading control. (E) GSEA validation of the specific enrichment in a TGFβ oncogenic signature of the gene expression profile of tumors with Axin1 deletion (34).

199x152mm (300 x 300 DPI)

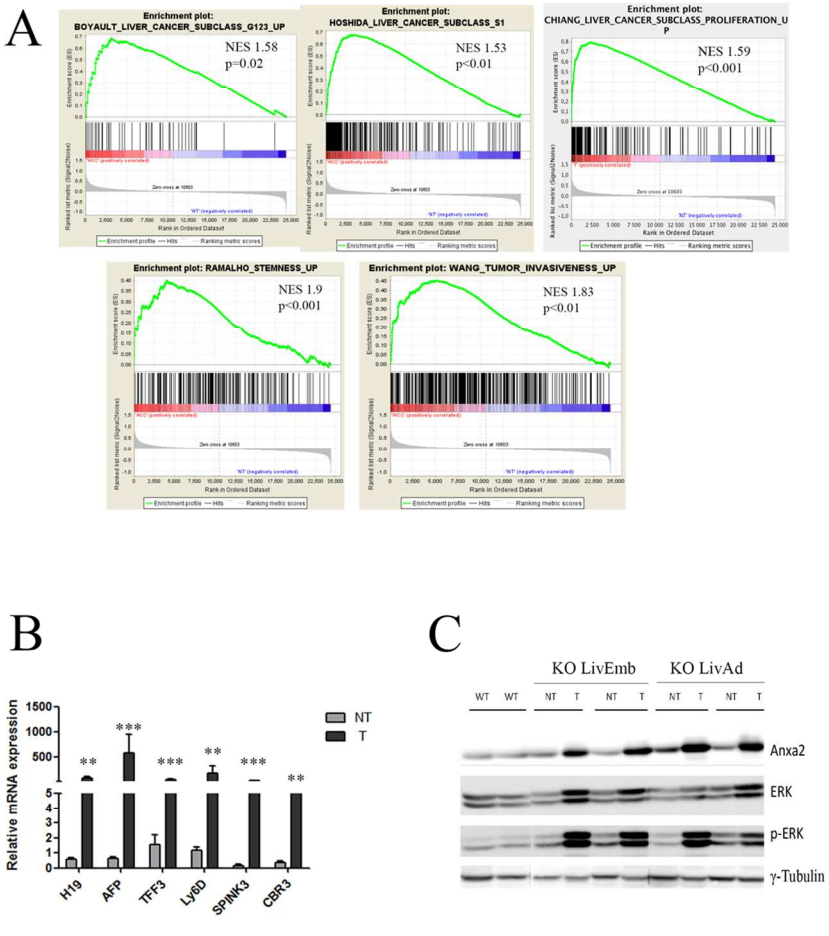


Figure 6. Tumors with Axin1 deletion recapitulate the characteristics of human HCCs of the G1-G3 subgroup with no beta-catenin mutations and features associated with a poor prognosis.
(A) GSEA revealing significant enrichment in various human oncogenic gene signatures. NES: the normalized enrichment score for GSEA algorithm. (B) Relative expression, as assessed by RT-qPCR, of fetal genes in tumors with Axin1 deletion (T) (n=7) and the corresponding non-tumor (NT) samples (n=9) from KO LivAd livers. Data are presented as the mean + SEM, with comparison to the corresponding NT samples (** p<0.01, ***p<0.001). (C) Immunoblot analysis of control Axin1fl/fl Cre- mouse livers (WT), tumors (T) corresponding non-tumor (NT) samples for Anxa2, ERK and p-ERK. γ-tubulin was used as a loading control.

99x138mm (300 x 300 DPI)

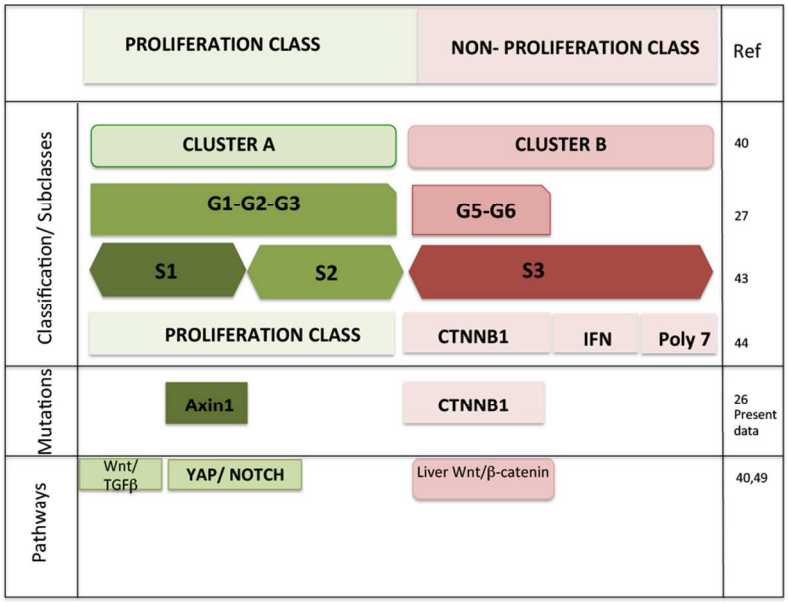
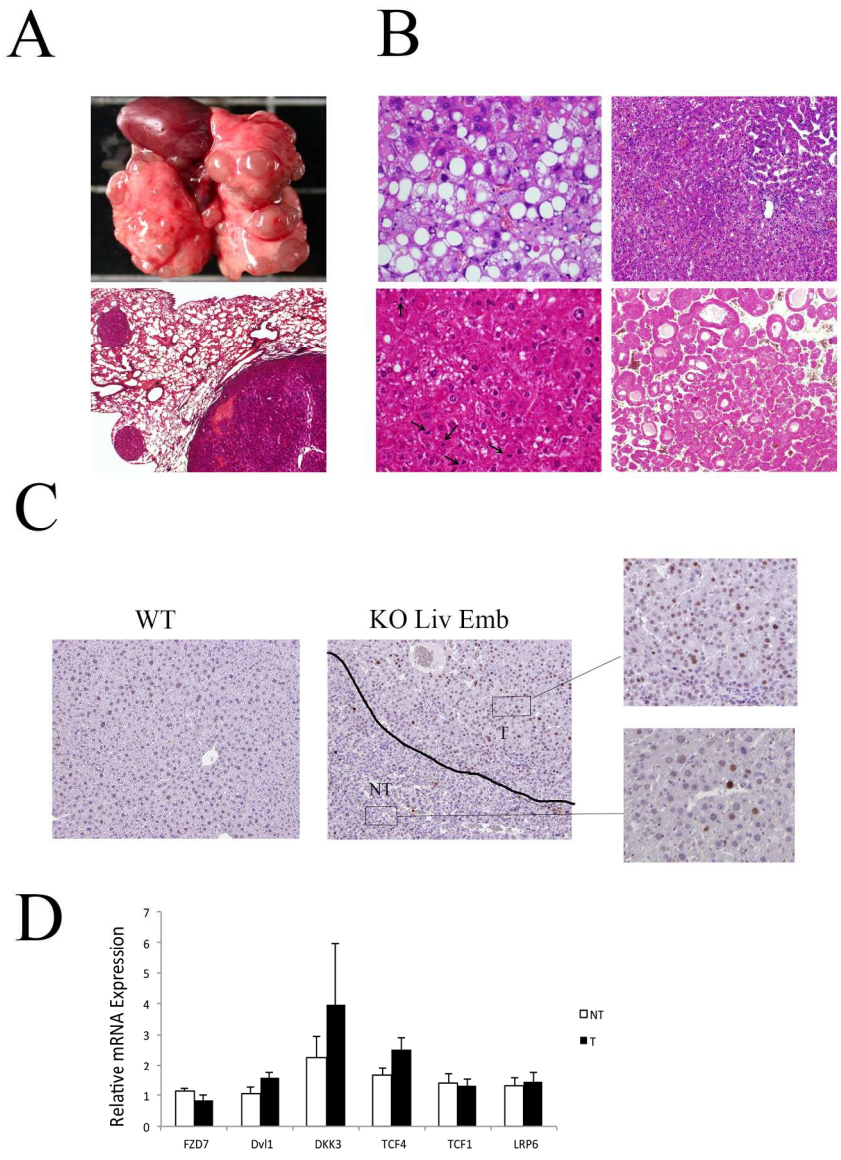


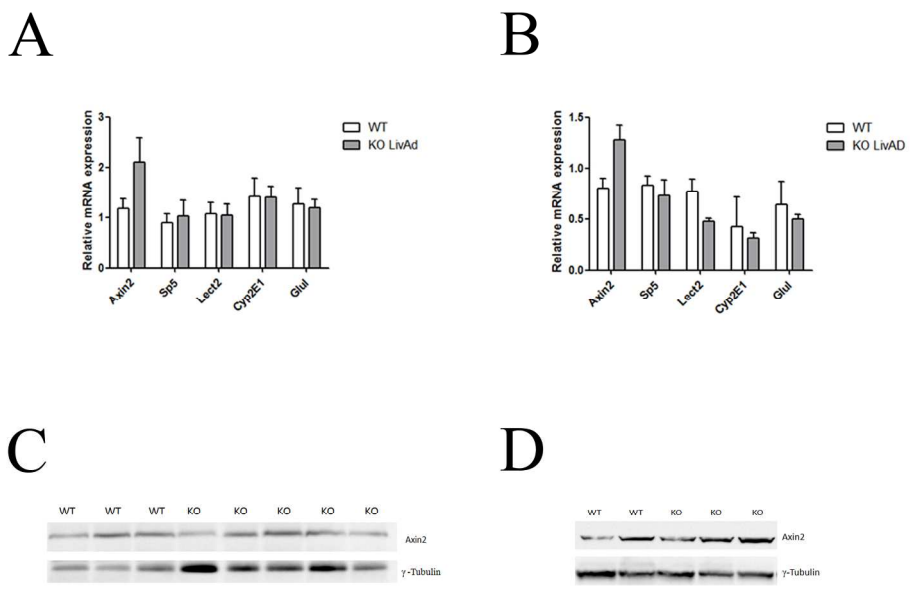
Figure 7. Integration of tumors with Axin1 deletion into the current molecular classification of human HCC

99x60mm (300 x 300 DPI)

Review

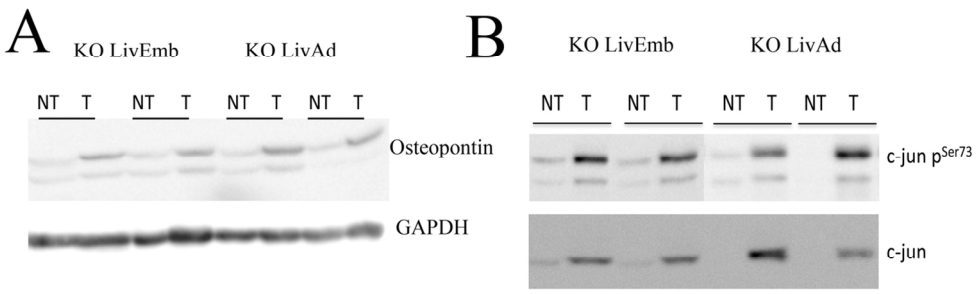


160x220mm (300 x 300 DPI)



199x150mm (300 x 300 DPI)

For Review



119x96mm (300 x 300 DPI)

view

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

Titre : Reprogrammation métabolique des carcinomes hépatocellulaires présentant une activation aberrante de la β-caténine

Mots clés : Cancer, métabolisme, foie

Le carcinome hépatocellulaire constitue la 3ème cause de décès par cancer dans le monde. Il a été montré que des mutations activatrices du gène CTNNB1, codant la β-caténine, étaient à l'origine de 20 à 40% des CHC humains. Ces CHC sont peu prolifératifs et présentent un phénotype métabolique particulier associé notamment au développement d'une cholestase et à une absence de stéatose. De nombreuses tumeurs présentent un effet Warburg, c'est-à-dire une addiction au glucose et à la glutamine avec une hyperproduction de lactate, or il a été mis en évidence par l'équipe que les CHC activés pour la β-caténine étaient négatifs en PET-scan FDG et donc ne présentaient pas d'utilisation accrue du glucose.L'objectif de ce travail a été d'analyser la reprogrammation métabolique accompagnant la tumorigenèse β-caténine dans le foie. Nous disposons d'un modèle murin de tumorigenèse β-caténine, les souris TTR-Cre-Apclox/lox inductible au tamoxifène, dans lequel la perte d'Apc dans quelques hépatocytes conduit au développement de tumeurs β-caténine activée après quelques mois. Je dispose aussi d'un modèle dit « prénéoplasique » dans lequel la β-caténine est constitutivement active dans tout le lobule hépatique. Des analyses de flux métaboliques sur ces hépatocytes β-caténine activée a permis de mettre en évidence une absence d'effet Warburg : pas d'altération de la glycolyse ni de la production de lactate lors d'une activation anormale de la voie β-caténine. En revanche, le glucose est réorienté vers une hyperproduction de glutamine, qui n'est pas réutilisée par le cycle de Krebs. Ces hépatocytes présentent aussi une diminution de la lipogenèse avec une réorientation des acides gras produits dans la synthèse de phospholipides. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence sur les hépatocytes et les tumeurs murines présentant une activation anormale de la β-caténine, une très forte augmentation de l'oxydation des acides gras et de la production de corps cétoniques. Cette augmentation de l'oxydation des acides gras est spécifique à la reprogrammation métabolique des CHC avec une activation anormale de la β-caténine, puisque nous ne l'avons pas retrouvée dans des CHC ne présentant pas d'hyperactivation de la β-caténine. De plus, l'invalidation d'Apc dans un modèle murin présentant un défaut d'oxydation des acides gras ne conduit pas au développement de tumeurs montrant ainsi que la β-oxydation des acides gras serait primordiale pour la tumorigenèse associée à une suractivation de la β-caténine. La β-caténine activerait donc un programme génique conduisant à une augmentation de l'oxydation des acides gras et cette reprogrammation métabolique est indispensable à la l'initiation tumorale.

Title : Metabolic reprogramming of β-catenin activated hepatocellular carcinomas

Keywords : Cancer, metabolism, liver

Cancer cells are characterized by uncontrolled and rapid proliferation requiring metabolic adjustments to provide macromolecules and energy to fuel cell growth and division. Most tumors are characterized by a "Warburg effect" consisting in an addiction to glucose, at the basis for detecting them by fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) imaging. Twenty to 40% of Hepatocellular carcinomas (HCC) are caused by activating mutations in the CTNNB1 gene coding for β-catenin. They present a specific metabolic phenotype as they are cholestatic and never steatotic. But our group has observed that β-catenin activated livers were negative in FDG-PET imaging, indicating that they do not have an increased glucose consumption. The aim of this study was to determine the metabolic alterations leading to this distinctive metabolic phenotype in HCC where β-catenin is over-activated. In a mouse model, we have either activated constitutively β-catenin in the whole hepatic lobule to mimic a "preneoplasic" situation or we have abnormally activated β-catenin in few hepatocytes that will then generate tumors after 6 months. Using these two approaches, we analyzed metabolic fluxes to determine the carbon fate from different potential substrates in order to identify the source of energy and cellular components of β-catenin activated hepatocytes or tumors.Our results confirm the absence of a Warburg effect in β-catenin overactivated hepatocytes with no difference in glycolysis nor in lactate production. However, glucose is rerouted into glutamine overproduction and this glutamine is not reused in the Krebs cycle. These hepatocytes also show a decreased lipogenesis with a rerouting of neo-synthetized fatty acids into phospholipids.On the other hand, both the preneoplasic and the tumoral models displayed a sharp increase in fatty acid oxidation and ketone body production. We did not find this in HCC with no β-catenin activation, showing that this increased fatty acid oxidation is specific to β-catenin dependent metabolic reprogramming. Strikingly, β-catenin activation in the β-oxidation defective mouse model, does not lead to tumor development. The increased fatty oxidation observed in the β-catenin activated models is mandatory for β-catenin dependent tumorigenesis. We thus propose that lipids are the main source of energy that fuels β-catenin tumors. These results pave the way for treatments against β-catenin activated HCC by targeting fatty acid oxidation.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France