



LKB1, gardien de la prolifération hépatocytaire et de l'intégrité génomique

Vanessa Maillet

► To cite this version:

Vanessa Maillet. LKB1, gardien de la prolifération hépatocytaire et de l'intégrité génomique. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB103 . tel-02134173

HAL Id: tel-02134173

<https://theses.hal.science/tel-02134173>

Submitted on 20 May 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.



Thèse de doctorat
de
l'Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

Département Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie, Physiopathologie

LKB1
Gardien de la prolifération hépatocytaire
et de l'intégrité génomique.

Par Vanessa Maillet

Présentée et soutenue publiquement le 28 Novembre 2017

Devant un jury composé de :

Présidente	Pr. Jessica Zucman-Rossi	PU – Université Paris Diderot
Rapporteur	Pr. Carmen Berasain	PU – Université de Navarre (Espagne)
Rapporteur	Dr. Thierry Tordjmann	DR – Université Paris Sud
Examineur	Dr. Michael Sebbagh	CR – Université de la Méditerranée
Directrice de thèse	Dr. Chantal Desdouets	DR – Université Paris Descartes

“Tout grand progrès scientifique est né d’une nouvelle audace de l’imagination.”

John Dewey

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de me faire l'honneur de juger mes travaux de thèse. Mes remerciements s'adressent à Madame Zucman-Rossi qui a accepté de présider ce jury. Je remercie très sincèrement mes rapporteurs Madame Carmen Berasain et Monsieur Thierry Tordjmann pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit. Plus particulièrement, je remercie Carmen Berasain pour son aide et ses précieux conseils sur l'étude de l'EGFR, mais également de faire le déplacement depuis l'Espagne pour assister à ma soutenance de thèse. Je souhaite également adresser ma reconnaissance à Thierry Tordjmann pour le temps qu'il m'a consacré, suite à sa lecture, afin de me prodiguer de précieux conseils. Enfin, je remercie Monsieur Michael Sebbagh d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail et fait le déplacement de Marseille afin d'être présent lors de ma soutenance.

Ce manuscrit vient conclure mon aventure à l'Institut, ainsi que mes quatre années de thèse. C'est également pour moi l'occasion de remercier toutes les personnes qui ont fait de cette aventure une expérience inoubliable.

Mes remerciements s'adressent naturellement à Madame Chantal DESDOUETS, ma directrice de thèse, sans qui tout cela n'aurait été possible.

Que de chemin parcouru depuis mon arrivée dans le « pink lab » et aujourd'hui, je tourne la dernière page de ce joli livre que nous avons écrit ensemble. Je te remercie sincèrement d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la chance de vivre cette formidable expérience. La communauté scientifique ne donnait pas cher du dossier « Maillet », pourtant tu n'as cessé de croire en moi et de te battre pour que je puisse poursuivre cette aventure. Plus d'un an de péripéties à frapper à toutes les portes, des laboratoires de Cochin, à l'ED, en passant par les hautes instances de l'institut et malgré les obstacles ton soutien est resté sans faille. Après une attente longue et fébrile, nous avons enfin réussi à initier cette thèse pour laquelle nous nous sommes tant battus et qui se termine aujourd'hui sous les meilleurs auspices. Je suis heureuse d'avoir partagée toutes ces années avec toi, pendant lesquelles nous avons fait exister ce projet pour qu'il devienne une belle histoire. Je te remercie pour ton optimisme inébranlable, ainsi que pour l'énergie que tu déploies afin de toujours voir le positif et aller de l'avant. Tu m'as appris à croire en mes résultats et à en être fière. Grâce à toi, je vais raconter « le fabuleux destin de la master kinase LKB1 » avec une grande fierté.

Mais avant tout c'est une expérience humaine que j'ai vécue à tes côtés, alors merci pour ta joie de vivre, ta gentillesse, pour cette complicité que nous avons eue, pour les rires, pour les réconforts, pour nos discussions scientifiques et toutes les autres (dédicace pour les Sargueil juniors et particulièrement la petite Lola), pour ton soutien pendant les moments de doute et de remise en question, d'avoir accepté ma personnalité un peu extravagante et surtout de m'avoir faite grandir.

Je pars pour de nouvelles aventures, mais les valises chargées de souvenirs, des fous rires, des plages de Miami aux couloirs des urgences de Cochin, des ballades dans les rues de Venise, des moments de complicité et de confiance.

Aujourd'hui, Pioupiou quitte le nid et va devoir voler de ses propres ailes...

Un très grand merci à Séverine, qui est présente depuis mon arrivée dans cette équipe et avec qui j'ai énormément partagé. De mes débuts à ces dernières semaines, tu m'as gratifiée d'un soutien indéfectible afin que j'avance plus sereinement dans les différentes étapes de cette aventure. Vous cherchez une référence biblio ? Un titre de chanson ? Un professionnel de santé ? Une solution à un problème ? N'hésitez plus faites le 3615 MOMO. Qu'importe le moment, dans les périodes fastes comme dans les plus difficiles, j'ai toujours pu compter sur ton aide et je me suis bien souvent reposée sur tes conseils et tes sages paroles. Pendant toutes ces années, tes nombreuses marques d'attention ont jalonné mon parcours, ainsi lors de ma première année tu as troqué tes heures de sommeil contre des échanges de mail approximativement entre 5 et 6h du matin, tu as aussi partagé quelques nocturnes avec moi à me nourrir exclusivement de graines pour que je tienne, tu as également calmé bien des maux notamment à coup de prontalgine et de tubes des années 80, mais pas que...

Je te remercie très sincèrement de m'avoir épaulée, appris le mot Relativiser (même si je ne sais pas encore bien m'en servir), consolée, mais aussi d'avoir calmé les doutes ainsi que les angoisses et d'être entrée dans mon univers bien déjanté.

Un énorme merci pour cette bienveillance et pour tous les moments de rire et de folie que nous avons vécus ensemble. Je n'emporte avec moi que le meilleur et je termine en te souhaitant beaucoup de bonheur pour l'avenir.

Ensuite, je souhaite dire un énorme merci à la team des parias : Manon et Nadia, qui ont partagé le bureau 5013 avec moi.

Ma petite Manonette, nous avons mis un certain temps à nous découvrir et à nous apprivoiser l'une l'autre, mais dans ce bureau du 5^{ème} nous avons trouvé notre équilibre. Un petit quelque chose entre folie et discrétion qui nous a permis de vivre de vrais moments de rire, mais aussi de nous soutenir parfois même sans dire un mot. Je suis très heureuse d'avoir fait ta connaissance et d'avoir partagé mon quotidien avec toi pendant ces quelques années. Je sais que la cohabitation avec moi n'est pas facile tous les jours, notamment à l'approche de Noël. Pour cette raison, je te dis un énorme merci pour ta patience, mais également d'être entrée dans mon univers et d'avoir partagé avec moi tous ces fous rires, ces chansons à tue-tête (même du Kendji Girac n'ayons pas honte), d'avoir supporté mes goûts musicaux et mon langage parfois fleuri... Merci d'avoir enrichi ma bibliothèque de souvenirs, je me souviendrais longtemps de notre Bachata, de nos midis « mariage », de nos diverses tentatives de décorations de Noël... Mais surtout, merci de m'avoir accordé ta confiance et de t'être ouverte à moi, parce que nous savons bien que la coquille de Madame Fortier n'est pas aisée à briser.

Après des années d'impatience, je te confie enfin le titre tant convoité de plus vieux thésard du Labo. Je te souhaite de vivre une très belle fin de thèse, riche de succès et de nouveaux souvenirs, mais surtout pleine de paillettes...

Et nous partons... (Je te laisse continuer la chanson)

Je remercie également mon binôme LKB1, Nadia, avec qui je partage ce projet depuis un moment. Je tiens à te dire un grand merci d'avoir gardé le moral et de ne jamais avoir baissé les bras face aux manip récalcitrantes (je pense notamment à ce PHH3 que tu maudis tant). Tu m'as suivi dans mes folles aventures, même lorsque mon esprit partait dans tous les sens, et toujours avec le sourire. Ton aide m'a été précieuse. Merci pour ta disponibilité, ton humour, ta gentillesse et ta bonne humeur. Je suis heureuse d'avoir travaillé à tes côtés et d'avoir appris à te connaître plus personnellement. J'ai adoré partager toutes nos conversations loufoques au rythme des chutes, des lapsus, des tests cosmétiques plus ou moins réussis, des blagues à l'humour douteux, des coins de portes impertinents, des danses endiablées (Sean Paul fait monter la Temperature), des génériques de pub et des musiques des années 90-2000.

Je marque un « alinéa » afin de te souhaiter le meilleur pour la suite.

Je tiens à remercier Jocelyne qui participe également au projet LKB1 et dont l'aide m'est très précieuse en cette période de « révision ». Depuis ton arrivée dans l'équipe, je t'ai pas mal taquiné, mais finalement je crois que ce petit jeu nous a bien amusé toutes les deux. Un grand merci pour ton soutien, tes précieux conseils et ton humour. Je te remercie pour toutes les attentions que tu as eu à mon égard, que ce soit un pull en hiver, des petits présents pour Maïa, un CD de Maxime Le Forestier ou des perles pour compléter ma collection. J'ai pris beaucoup de plaisir à discuter avec toi et je me souviendrais longtemps de tes mythiques « tu vois ce que je veux dire ».

Non, ne pleure pas Jocelyne, je sais que je vais énormément te manquer, mais ce n'est qu'un au revoir... (Mouhahahahaha) En tout cas, j'espère que tu vas profiter de ces prochaines années dans cette équipe un peu folle, mais tellement attachante.

Le p'tit chat Romain... Avec toi, la relève des thésards de Chantal est assurée et je suis persuadée que tu suivras, comme il se doit, la théorie de « La vague ». Je laisse à Chantal le soin de t'expliquer ce concept. Un grand merci pour ton aide et ton accompagnement, notamment lors de ma récente immersion dans le monde de la transcripto. Je suis heureuse d'avoir partagé ces quelques années avec toi, ponctuées d'énormément de rires et de chansons Disney bien évidemment... Merci pour ta bonne humeur, ton soutien et toutes tes gentilles attentions (ou presque), la vieille moule s'en souviendra longtemps. J'ai adoré partager avec toi les petites pauses café pour maronner et persifler de bon cœur, mais aussi pour retrouver de la motivation, lorsqu'elle commençait à nous faire défaut. Que de chutes à tes côtés, mais tu as toujours été là (ou presque) pour me relever. Merci d'avoir égayé mon quotidien de vieille thésarde avec ta gouaille et tes sous-entendus tendancieux, nous savons combien je les aime... Malgré notre misérabilité mutuelle, tu fais et feras partie (pour longtemps je l'espère) des copains de thèse qui restent. Je te souhaite de t'épanouir pleinement dans ta thèse, je sais que le succès sera au rendez-vous.

(Ce message a été sponsorisé par la BNP)

Un grand merci à Myriam qui ne cesse de voir la vie en rose, malgré toutes ses péripéties (glisser sur un pétale de rose à son mariage ce n'est pas banal...). Je te remercie pour ta gentillesse et ton sourire, un peu moins pour les chansons pour enfants que tu insinues régulièrement dans nos têtes. Quoi qu'il arrive tu restes de bonne humeur et tu n'hésites jamais à donner de ton temps pour aider l'équipe. Un grand merci d'avoir partagé avec nous les préparatifs du mariage et toute la culture libanaise. Je te souhaite le meilleur pour la fin de ton post-doc et pour cette nouvelle vie de femme mariée.

Je remercie particulièrement notre petit groupe « Immuno ».

Tout d'abord, un énorme merci à Jean-Pierre pour sa bienveillance, ses nombreux encouragements et ses précieux conseils. Je te remercie pour l'attention et l'intérêt que tu as prêté à cette histoire LKB1, ainsi que pour les diverses questions pertinentes que tu as soulevées. Lors de nos discussions, tu as toujours valorisé et eu un regard positif sur ce travail. Tu as su dédramatiser bien des situations et apaiser les angoisses de tes mythiques « Ça va le faire ». Merci pour ton humour, ta légèreté, ta générosité, tes petits messages de soutien dans les moments difficiles et pour tous les échanges « non-scientifiques » que nous avons partagés durant ces années.

Je pense que nous entendrons très prochainement parler des nouveaux succès de la team Couty... Que de belles aventures en perspective, j'en suis certaine.

Une spéciale dédicace à Cadoux avec qui je partage cet univers pailleté un peu fou ! Nous sommes un mélange de fée licorne un peu trash et tant pis si ça ne plaît pas... Merci pour nos discussions souvent improbables durant lesquelles nous avons pu établir des classements de toutes les créatures fantastiques, réussi à déterminer la pâte qui correspondait à chaque membre de l'équipe, hésité entre une réincarnation Vampire ou Elfe, décidé que donner des noms de pâte aux lignées de souris ce serait vraiment trop cool, fait la liste des meilleurs films de chevet, tergiversé entre une coloration rousse, blonde, rose et finalement confirmer que Ron met clairement une race à Harry. Merci pour ton humour et ton Modjo. Grâce à toi, j'ai clairement amélioré mon alcoolisme, mon Moonwalk, brûlé quelques calories sur du Elvis/LMFAO et énormément rigolé !

Who run the world ? La suite est pour toi, tu vas tout déchirer...

Je remercie également Sandrine, qui garde le sourire en toute circonstance, dont la gentillesse et la légèreté adoucissent les tempéraments volcaniques et sonores de certains membres de cette équipe. Bien que d'un calme Olympien, tu n'hésites pas à prendre part aux blagues et discussions plus ou moins distinguées, auxquelles tu apportes un soupçon d'élégance. Merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et de nous avoir régalié de toutes les petites douceurs dont tu as le secret. Bonne chance pour la suite de ton aventure Cochinoise.

Je tiens également à remercier tout ceux qui sont passés par là...

Mon chaton, à mon arrivée, tu m'as immédiatement prise sous ton aile pour faire mon initiation scientifique, mais surtout j'ai eu la chance que tu m'accordes ta confiance. Nous avons rapidement partagé de grands moments de complicité, je pense notamment aux recherches pour trouver LA musique manquante. Depuis notre rencontre, nous avons vécu de nombreuses aventures et traversé bien des épreuves, qui ont contribué à renforcer notre amitié. Je te remercie très sincèrement de me permettre de les vivre à tes côtés. Merci pour ton soutien permanent et tes encouragements. Toutes ces années, tu as cru en moi et tu as toujours cherché à ce que je prenne confiance en moi. Tu as été L'exemple à suivre. Je suis admirative de ta détermination, de ton courage et toujours aussi fascinée par tes capacités à être une brillante chercheuse, une femme forte, élégante et désormais une Super Maman. Tu as apporté le glamour à mes premières années à Cochin et la joie de mes premiers Noël.

De tout mon cœur, je t'adresse un énorme merci et ces derniers mots :

« All I want for Christmas is you »

DomDom, personnage emblématique de mes années à l'Institut. Tu as été mon maître vénéré de l'histologie. Malheureusement, je n'ai jamais réussi à atteindre ton niveau, c'est sûrement dans les vieux micro-ondes qu'on fait les meilleures immunos... Tu n'es jamais à court de remèdes maison pour panser les petits bobos du quotidien. J'ai adoré t'écouter me conter toutes les histoires et anecdotes de ta vie, des fameux plis de ta robe de mariée, aux voyages sur ce continent Amérique que tu aimes tant, en passant par tes débuts dans notre cher collège de France. Je n'oublierais jamais tes précieux conseils, distillés tout au long de mon parcours, qu'ils aient été scientifiques, botaniques ou encore photographiques, mais surtout pour ceux qui m'ont aidée à grandir et

évoluer. Tu n'as jamais cessé de me pousser à avancer dans la vie et à prendre mon indépendance, afin de m'épanouir pleinement dans ma vie d'adulte. Alors pour toutes ces raisons, je t'adresse un énorme merci.

Je n'oublie pas Mathieu, qui a partagé ce projet pendant quelques temps avec moi.

A la douce Anne-Marie, j'adresse un merci à la mesure de sa très grande gentillesse. Je te souhaite une retraite riche de voyages et de découvertes.

Je remercie également Antoine, qui est parti vers de nouvelles aventures dans les Etats d'Amérique et à qui je souhaite beaucoup de succès dans son post-doc.

A tous les petits qui sont passés par ici et qui repassent souvent par là...

Je pense à mon Gogo pour qui j'ai un énorme attachement et qui est arrivé avec ses 2 mètres de hauteur, mais avec son caractère d'ourson. J'ai adoré travailler à tes côtés, car tu es d'une gentillesse absolue et tu redoubles d'attentions pour tous les gens que tu rencontres. Tu as accepté de me faire confiance et su apprivoiser la princesse qui sommeille en moi. Je suis fière de ce que tu deviens et te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite.

Alex le corrosif, ton humour décapant, ton tempérament impétueux et ton franc parlé, dont tu as le secret, ont animé la vie du laboratoire pendant une année. Tu as apporté une énergie extravagante et la Queen Bey touch à notre équipe. J'ai beaucoup rigolé à tes côtés et j'ai adoré partager tous ces moments. Je suis toujours heureuse d'entendre à nouveau tes éclats de rire dans les couloirs de Cochin et je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

...Rendez-vous... Ha-Ha (bientôt pour de nouvelles aventures)

Sophie, tu as également partagé ce projet avec moi pendant un an et ce fut un réel plaisir. Je garde de très bon souvenir de ton passage parmi nous, de ta gentillesse et des quelques maladresses, dont on peut aujourd'hui rigoler (Nous ne parlerons pas de l'épisode Temed... Non non)

Un grand merci à Marion (futur éminent médecin), Julien, Méline, Emilie et Lisa que j'ai pu croiser pendant ma thèse.

Le projet LKB1 n'aurait pu se faire sans l'aide d'autres équipes de l'Institut.

C'est pourquoi j'adresse un très grand merci à Benoit Viollet et Marc Foretz pour leur aide et leurs précieux conseils sur le projet LKB1 et plus particulièrement pour les souris AMPK.

Je tiens également à remercier Christine Perret de nous avoir permis d'accéder au modèle LKB1, mais également d'avoir partagé avec nous ses connaissances et son expertise tout au long du projet. Tu nous as prodigué de nombreux conseils pertinents et avisés, notamment lors de nos tentatives β -caténine et lors de la soumission de l'article.

Pendant ces quelques années passées à Cochin, l'équipe de Christine a été une seconde maison pour moi et j'ai eu la chance d'y rencontrer de nombreuses personnes qui ont animé mon quotidien.

J'adresse un immense merci à la team « Intestin » de Beatrice Romagnolo, qui m'a tant apporté pendant mon aventure Cochinoise...

Je tiens à remercier Béatrice pour la bienveillance et la gentillesse qu'elle m'a témoignées durant toutes ces années. Merci pour ces discussions que nous avons pu avoir sur les projets d'avenir, d'avoir partagé avec moi les bonnes nouvelles (je pense notamment à la quatrième année et au Nat Cell Biol), pour tes précieux conseils lors de nos demandes de 3^{ème} et 4^{ème} année à l'ARC. Plus personnellement, je te remercie d'avoir accepté ma présence régulière au sein de ton équipe, mais également de m'avoir manifesté ta reconnaissance pour ma minuscule contribution lors de la publication de votre belle histoire.

Ma petite Marie, je ne sais par quoi commencer ces remerciements, tellement de souvenirs me reviennent. Après un démarrage un peu difficile, ah les histoires de filles, nous sommes pourtant devenues de vraies amies et presque des colocataires. Je tiens à te remercier très sincèrement pour tout le soutien que tu m'as apporté au cours de ces années, de m'avoir encouragé dans les moments de réussite, mais aussi dans les périodes plus difficiles, pour tous tes conseils justes et avisés et de me redonner de la confiance quand parfois je l'égare. Pendant cette thèse, ton bureau a souvent été un refuge pour calmer mes angoisses, me confier et surtout partager de nombreux moments de complicité ainsi que des rires à n'en plus finir. Merci pour tous ces souvenirs... Des tentatives d'ouverture de porte au film Western, en passant par les (trop) nombreuses pintes de

Grim, des graffitis bleus en bas de Cochin, de montage vidéo jusqu'à 4h du matin, de notre choix « rosé » lors de l'impression et de tous ces trajets de RER à parler de tout, de rien.

Je me souviens de ton arrivée timide au labo, dans l'ombre de John et aujourd'hui tu es devenue un atout inestimable pour Béa et une brillante ingénieure. Tu as pris ton envol et je ne doute pas que ton aventure à Cochin se finira en apothéose et auréolée de succès ! Tu es géniale alors crois en toi et fonce !

Ma juju, une fois encore, c'est une histoire qui a maladroitement commencé, ah la timidité... Pourtant, c'est une amitié sincère qui nous unit désormais. Je t'adresse du plus profond de mon cœur un énorme merci pour cet optimisme indéfectible que tu apportes à ma vie, pour ta gentillesse et ta bienveillance. Tu fais partie de ces personnes solaires, capables d'illuminer le quotidien juste par des éclats de rire. Tu es l'optimisme de mon pessimisme... Alors, merci de tempérer mon défaitisme et de dédramatiser mon catastrophisme.

Il est difficile de résumer en quelques lignes tous nos souvenirs, les pauses café sur le qui-vive, les démontages dangereux de palettes, les chansons douteuses sur des officiers que tu insinues dans mon esprit et toutes les autres sur lesquelles nous nous sommes époumonnées (Doc Gynéco, La rue kétanou et j'en passe), les plages de Saint-Malo, le dépose minute à St Jacques juste pour faire 5' de trajet ensemble, les « Nan mais Vaness » quand tu cherches à me raisonner, mais surtout grâce à toi j'entends les marteaux si souvent... si souvent... Merci pour tous ces fous rires que nous avons eus, à nous en tordre le ventre et même à en pleurer, et qui m'apportent tant. Julie la p'tite olive rêvait de voyager, c'est donc à Tours que nous l'avons retrouvée et où le meilleur l'attend... Mais n'oublie pas de revenir régulièrement faire un petit tour dans ton deuxième chez toi...

Je remercie également Coralie pour sa gentillesse, son sourire constant et son humour un peu à contre-courant, qui m'a fait beaucoup rire (parfois... mouhahaha). Coco, je te souhaite une très belle fin de thèse et je suis certaine que ton investissement sera justement récompensé.

Enfin, une petite pensée pour Mehdi, dont la gentillesse m'a beaucoup touchée.

Pascale (aka Pascalette), la reine du métabo, dont la culture scientifique m'a toujours fascinée. Tu n'es jamais en reste pour prodiguer tes conseils à la jeune génération qu'ils soient scientifiques ou non. Je te remercie d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, souvent naïves et pour la gentillesse que tu m'as témoignée. Je te souhaite plein de succès pour la suite.

Mes remerciements s'adressent également à Nadia avec qui j'ai partagé une bonne partie de ces années de thèse. Merci pour ton humour, qui me plaît tant et dans lequel je me retrouve très souvent... Merci pour les attentions que tu as eues pour moi, je pense notamment à mes petits cœurs en chocolat de St Valentin, mais aussi de penser à moi même à des milliers de kilomètres et de continuer à me faire rire à distance ! Nous sommes passées par des moments un peu compliqués, mais je suis heureuse d'avoir pu retrouver cette complicité que nous avons égarée un instant... Tu as été une très belle rencontre. Reviens nous vite...

(P.S : Si tu as trouvé le calendrier de l'Avent « Chaussettes Harry Potter » n'hésites pas à me le faire parvenir même pour Pâques...)

Merci à Mathilde, la digne héritière de ce groupe Métabo, pour sa gaité et nos discussions récentes qui m'ont permis de découvrir une très belle personne. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse.

Enfin je remercie également Sara, Shirley, Romain, les anciens Massiré et Valérie.

Un très grand merci à Sabine Colnot et toute son équipe.

Sabine, je te remercie pour ton soutien et tes encouragements. Pendant toutes ces années, tu nous as prodigué de nombreux et précieux conseils, qui nous ont permis de faire évoluer ce projet. Je tiens à te remercier pour tout le temps que tu m'as consacré lors des différentes demandes que nous avons écrites, notamment pour la quatrième année. Merci pour ta bonne humeur, ta tempérance et pour nos différents échanges, durant lesquels tu as bien cerné ma personnalité.

Notre Angé nationale, j'ai partagé avec toi beaucoup de moments marquants de mon aventure à Cochin, les congrès de l'AFEF (avec fameux Welsh de Lille ainsi que le bar à vin et notre promenade nocturne de Bordeaux) et de Venise, tous les repas de midi ponctués d'éclats de rire, le symposium Jecco (dont la soirée a marqué les esprits...), les pauses café/thé à potiner, les croziflettes entre copains et les nombreuses festoyades pour célébrer tous les événements qui rythment le quotidien du 4^{ème} et du 5^{ème}. Un grand merci pour le soutien que tu m'as

apporté dans les moments difficiles, pour ton humour percutant et pour toutes les attentions que tu as eues pour moi. Que te souhaiter après la réussite du concours chercheur et de l' HDR... Et bien tout simplement le meilleur pour l'avenir.

Merci à ma Roro, ta personnalité est unique. Tu es une personne exceptionnelle, dont la gentillesse et la générosité sont infaillibles et inégalables. Toutefois, il faudrait que tu apprennes à dire non de temps en temps. Je suis impressionnée par ta bonne humeur constante et par toutes les attentions que tu as pour chacun d'entre nous. Merci d'avoir adouci les jours un peu lourds, à coup de câlins et bisous d'amour. Merci d'aimer la vie et de rester optimiste à chaque instant. Je te souhaite beaucoup de succès pour la suite de ta thèse, ta persévérance et ta détermination seront largement récompensées.

Robin, l'homme de ces dames, je te remercie pour nos moments de franches rigolades. Avec Rozenn, vous avez souvent retardé mes départs de Cochin le soir, mais ce fut toujours un réel plaisir pour moi. Merci pour ton humour, nos conversations souvent décalées et toutes les pintes que nous avons partagées. Je suis persuadée que tu vas réaliser une brillante thèse.

Merci à Cécile pour ses conseils, notamment lors de mes tentatives de marquages β -Caténine.

Je tiens à remercier une personne qui est passée par ce labo et qui a beaucoup compté pour moi, la pétillante Anaïs. La jeunette ! Tu as animé mes journées avec les récits de toutes tes péripéties (la trottinette, le sac Ikea ou le AirBnB et j'en passe tellement d'autres). Je ris encore de nos fous rires et notamment de cette scène d'anthologie avec le casque de scooter aux pieds de Cochin. Mais oui... Ce fut un énorme plaisir pour moi de partager tous ces moments avec toi. J'ai adoré ta bonne humeur, ton enthousiasme, ta gentillesse et notre complicité. Merci d'avoir été présente dans les moments de joie et de m'avoir soutenue dans les plus compliqués. John te remercie également pour le soutien que tu lui as apporté pendant ma thèse 🐶. Un très grand merci de m'avoir offert ton amitié et ta confiance.

Je suis heureuse que cette amitié perdure, malgré ton départ de Cochin. Ton avenir s'annonce radieux à Curie et je n'ai aucun doute sur ta réussite dans ces nouveaux projets.

Enfin un grand merci à tous les gens que j'ai pu croiser au cours de ces années à Cochin, avec qui j'ai échangé ou rigolé au détour d'un couloir de ce bâtiment Faculté.

Merci à Pascal Maire et Nassia Sotiropoulos ainsi qu'à toute leur équipe, pour leur gentillesse et leur aide : Maud, Nathalie, Evelyne, Stéphanie, Philippe, Matthieu, Chiara, Laura, mais aussi à Francesc, Gaëlle et Morgane qui sont passés par là et avec qui j'ai également partagé quelques soirées JECCO et pots bien festifs.

Merci à l'équipe de Carole Peyssonnaud à la douce Sabine, l'énergique Mariangela, à Sylvain et cette condescendance que j'ai adoré partager, Cyril et sans oublier notre Jacques national.

Merci à Sophie Vaulton et Benoit Viollet et leur équipe.

Je commence évidemment par Jean-Christophe avec qui j'ai énormément ri et beaucoup échangé au cours de ces années, sur des sujets passionnants comme la richesse culturelle de notre chère Paris, le Japon, l'avenir ou bien de sujets plus légers, qui m'ont tant fait rire... Merci pour ton humour et la bienveillance que tu as eue à mon égard. Nous trinquerons au Mai Tai sinon rien, Pétard !

Merci à Marc pour son aide et ses précieux conseils, à Camille et Aya, qui poursuit maintenant son aventure au 3^{ème}, je te souhaite le meilleur pour la suite de ton aventure et surtout un après Cochin radieux.

Merci à Pierre Billuart, à Yoyo et Nico pour leur humour et leur sourire quotidien qui égaye le 5^{ème}, mais aussi à Rodrick, pour sa gentillesse et sa bonne humeur, à Laure-Elise et Chloé.

Un énorme merci à l'équipe des antillaises normandes, qui apporte tant de soleil et de joie dans le quotidien du 5^{ème}.

Ma Nanou, je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as adouci les matins difficiles et rendu le quotidien tellement plus drôle et fantaisiste. Un énorme merci pour ta bienveillance, ta gentillesse, ton amour de la vie et pour toutes les attentions que tu as eues pour moi. Nous avons partagé tellement de fous rires à en pleurer, de bobos que tu as pansés, de rêves de fleurs et de Vendée, de discussion pour se confier... Quoi qu'il arrive je sais que je peux compter sur toi, alors merci d'avoir remué ciel et terre pour m'aider à réaliser tous mes projets des plus sérieux (imprimer un manuscrit) aux plus fous (mes chères

palettes). Tu as été une magnifique rencontre que je ne suis pas prête d'oublier. De nombreuses aventures nous attendent encore dans le futur et je me languis de les vivre avec toi...

Merci pour tout.

Mimi, je te remercie pour ta gentillesse et ta gaité. Tu n'es jamais à court de sous-entendus ou de blagues polissantes pour amuser la galerie et tu contribues à la bonne humeur de tout ce petit monde. Tu resteras la reine incontestée du Punch made in Martinique, qui a arrosé et mis l'ambiance à de nombreux pots et repas de Noël !

Pour finir, la Sagesse, j'ai nommée Mme Holande. Jojo qui sait si bien tempérer le caractère volcanique de ses deux comparses... Tu es le socle de cette fine équipe. Un très grand merci pour ta gentillesse, ta douceur et pour tous ces petits moments partagés ensemble au quotidien. Je te souhaite une dernière année fabuleuse afin de terminer en apothéose et de profiter d'une retraite bien méritée.

Je tiens à remercier toute l'équipe des gestionnaires.

Un merci plus particulier à ma petite Maryse qui a toujours pris le temps pour moi. Tu es un vrai rayon de soleil, dont le rire égaye les couloirs du 4ème, et toujours partante pour s'enjailler avec la jeunesse. Je me souviens notamment d'une danse lors du pot de départ de Catherine qui restera dans les mémoires... J'ai pris beaucoup de plaisir à venir papoter avec toi et à rigoler de bon cœur. Merci pour ta joie de vivre et ta gentillesse.

Merci à l'homme de ces dames, Mister Yannig, pour sa bonhomie et sa bonne humeur.

Merci à Catherine notre gestionnaire bordelaise, mais également à Patricia et Christine.

Ce manuscrit est aussi une occasion pour moi de remercier toutes les personnes de l'ombre, qui me soutiennent dans chacune de mes aventures et sans qui tout cela n'aurait été possible.

Mouflette, « Tale as old as time », nous vivons cette aventure ensemble depuis notre rencontre sur les bancs de la fac, Jussieu Représente. J'ai trouvé en toi une véritable amie, un alter-égo, qui m'accompagne dans chacune des étapes de ma vie. Je suis heureuse de partager avec toi toutes ces choses qui nous unissent, de rêver et de construire un million de projets à tes côtés. Glitter is coming. L'avenir est à nous...

Sans oublier le Mouflon de toujours, notre Tristan national, je vous dis un énorme merci les copains !

Ma maman et mon papa, à qui j'adresse un énorme merci pour leur amour et leur éternel soutien. Vous m'avez donné toutes les cartes pour que je puisse réussir mes études, sans vous je n'aurais pu arriver là où je suis aujourd'hui. Mon parcours a été long et parfois déroutant, pourtant vous n'avez jamais cessé de croire en moi. Chaque jour, vous vous battez pour nous donner le meilleur et vous nous poussez à croire en nos capacités, afin que nous puissions réaliser tous nos projets. Je n'ai pas les mots pour vous exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude, alors aujourd'hui très simplement je vous dédie ce manuscrit.

Merci pour tout, je vous aime.

A mon frère dont j'admire la force et le courage. Je suis fière de toi et de tout ce que tu accomplis chaque jour. Merci d'être présent à chaque instant et de me soutenir, même si tout ça n'est pas très facile à comprendre. Notre complicité, ton humour et ta gentillesse embellissent ma vie, alors un immense merci pour tout. Merci aussi à la petite Candou qui a rejoint la team.

Enfin, je tiens à remercier de tout mon cœur celui qui me soutient chaque jour qui passe, Jonathan. Un changement de bac de révélation et une gamma tub plus tard, tu es rentré dans ma vie. Comme à ton habitude, tu n'as pas pu t'empêcher de tout chambouler et c'est tant mieux. Depuis, tu ne cesses de croire en moi et de me motiver pour que j'avance et prenne confiance en moi. Chaque jour, tu tentes de calmer mes angoisses et mes doutes, afin que j'appréhende la vie plus sereinement (j'ai encore du boulot...). Pour tout cela et pour tant d'autres choses, je te dis un énorme merci.

עדיין יש לי אלף דברים לספר לך, אבל יש לי את שארית חיי לעשות את זה.

תודה על כל האהבה שאתה נותן לי.

שיניית את חיי לעד.

אני אוהב אותך

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLE DES FIGURES.....	5
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	15
Préambule	17
Chapitre I : LE FOIE	21
1. La structure du parenchyme hépatique	23
2. La composition cellulaire.....	26
2.1 Les hépatocytes.....	26
2.2 Les cholangiocytes.....	26
2.3 Les cellules endothéliales	27
2.4 Les cellules immunitaires.....	27
2.5 Les cellules étoilées.....	28
3. Les fonctions hépatiques	28
3.1 La fonction métabolique	29
3.1.1 Le métabolisme glucidique	30
3.1.2 Le métabolisme lipidique	30
3.1.3 Le métabolisme protéique	30
3.2 La fonction de détoxification.....	31
3.3 La fonction d'excrétion	31
4. La régénération hépatique	32
4.1 La phase de « priming ».....	33
4.2 La phase de prolifération.....	35
4.3 La phase de terminaison	36
Chapitre II : POLYPLOÏDIE.....	39
1. La polyplœdie chez le mammifère	42
2. Les mécanismes de polyplœdisation	45
2.1 La fusion cellulaire.....	45
2.2 L'endoréplication	48
2.3 Le « Mitotic Slippage »	51
2.4 La cytodiérèse incomplète	54
3. La polyplœdisation du foie.....	57
3.1 La polyplœdie au cours du développement post natal	59
3.2 La polyplœdie : Vieillessement & Sénescence	60
3.3 La polyplœdie : Stress & Lésions hépatiques.....	62
4. Quel rôle pour la polyplœdie dans le foie ?	63
4.1 Première hypothèse : Etat de sénescence	63
4.2 Deuxième hypothèse : Gain de fonction	64
4.3 Troisième hypothèse : Economie d'énergie.....	64
4.4 Quatrième hypothèse : Maintien de l'intégrité génomique	65
Chapitre III : LA MASTER KINASE LKB1	67
1. La Liver Kinase B1	70
1.1 LKB1 : les origines	70

1.2	LKB1 et ses partenaires particuliers	73
1.3	Mais où est LKB1 ?	74
1.4	Les modifications post-traductionnelles	76
1.4.1	La phosphorylation	76
1.4.2	L'ubiquitinylation/SUMOylation	78
1.4.3	La prénylation	79
1.4.4	L'acétylation	80
2.	LKB1 : Master kinase	80
2.1	La polarité cellulaire	82
2.2	La croissance cellulaire	85
2.3	Le cycle cellulaire	87
2.4	L'intégrité génomique	90
3.	Les fonctions hépatiques de LKB1	95
3.1	Le métabolisme hépatique	95
3.2	La polarité hépatocytaire	99
3.3	La tumorigenèse hépatique	102
RESULTATS		107
Objectif de Recherche		109
Publication		113
DISCUSSION		169
1.	LKB1 : régulateur de la prolifération hépatocytaire	172
2.	LKB1 : sentinelle de la fidélité mitotique	178
3.	LKB1 : gardien de l'intégrité génomique hépatocytaire	180
REFERENCES		183
ANNEXES		207

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation anatomique du foie chez l'Homme	p23
Figure 2 : Représentation schématique de la structure du foie	p24
Figure 3 : Organisation des différents types cellulaires dans le parenchyme hépatique	p25
Figure 4 : Les trois principales voies métaboliques dans le foie	p29
Figure 5 : Cinétique de prolifération des cellules hépatiques après hépatectomie partielle	p33
Figure 6 : Voie de signalisation de la phase de « priming »	p34
Figure 7 : Principaux événements de la régénération hépatique après hépatectomie partielle	p36
Figure 8 : La ploïdie nucléaire et cellulaire	p41
Figure 9 : La polyploïdie physio-pathologique chez le mammifère	p44
Figure 10 : Les mécanismes de polyploïdisation chez le mammifère	p45
Figure 11 : La fusion cellulaire virale	p47
Figure 12 : Les signaux responsables de l'endoréplication physiologique et pathologique	p50
Figure 13 : Le « Spindle Assembly Checkpoint »	p53
Figure 14 : La cytoditérèse	p55
Figure 15 : Les mécanismes de ploïdisation hépatique	p58
Figure 16 : Principaux symptômes du syndrome de Peutz-Jeghers	p70
Figure 17 : Caractérisation des défauts développementaux des embryons <i>Lkb1</i> ^{-/-}	p72
Figure 18 : Modèle d'interaction entre STRAD/MO25 et LKB1	p73
Figure 19 : Schéma représentatif des différents mouvements nucléo-cytoplasmiques de LKB1, médiés par ses différents partenaires	p75
Figure 20 : Sites de phosphorylation et de farnésylation de la protéine LKB1	p77
Figure 21 : Modifications post-traductionnelles de LKB1 et ses différents régulateurs	p79
Figure 22 : LKB1 est une Master kinase	p82
Figure 23 : L'activation de LKB1/STRAD induit la polarisation de cellules épithéliales en contexte « cell autonomous »	p83
Figure 24 : Régulation de la signalisation mTOR	p87
Figure 25 : LKB1 contrôle la transition G1/S, via les inhibiteurs de kinases p21 et p16	p88
Figure 26 : Organisation du fuseau mitotique	p91
Figure 27 : Défauts de mitose et altérations de la ploïdie observés suite à la perte de LKB1 chez la drosophile	p93
Figure 28 : L'extinction de <i>Lkb1</i> engendre une désorganisation du fuseau mitotique conduisant à l'émergence d'une aneuploïdie	p94
Figure 29 : LKB1 contrôle le métabolisme glucidique et lipidique dans l'hépatocyte	p97
Figure 30 : La perte de LKB1 déstabilise la morphologie canaliculaire hépatocytaire	p100
Figure 31 : L'haploinsuffisance de <i>Lkb1</i> favorise le développement tumoral, en corrélation avec une prolifération hépatocytaire	p102
Figure 32 : L'activation de LKB1 est essentielle à la survie des cellules cancéreuses en conditions de stress énergétique	p103
Figure 33 : Les CHC de mauvais pronostic sont associés à une augmentation de la neddylation et de l'expression de LKB1	p104
Figure 34 : La signalisation Méthionine régule la survie/prolifération cellulaire, via la voie LKB1/AMPK	p106

Figure 35 : LKB1 : gardien de la prolifération hépatocytaire et de l'intégrité génomique	p171
Figure 36 : La perte de LKB1 n'altère pas la réponse proliférative induite par CCl4	p173
Figure 37 : LKB1 ne contrôle pas la prolifération hépatocytaire via la β -caténine	p174
Figure 38 : In vitro, la perte de LKB1 inhibe la prolifération hépatocytaire	p176
Figure 39 : Expression des ligands de l'EGFR dans les foies quiescents de souris contrôles et <i>Lkb1</i> ^{Δhep}	p177

ABREVIATIONS

- A -

ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) member 1
Acc1	Acetyl CoA carboxylase 1
Acetyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADAM12	ADAM Metallopeptidase Domain 12
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AHC	Adénomes Hépatocellulaire
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
AKT	Protéine kinase B
Ala	Alanine
AMPK	AMP-activated protein kinase
APC	Anaphase Promoting Complex
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A
ARID2	AT-Rich Interaction Domain 2
ARK	AMPK-related kinases
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related

- B -

BMD	Bone-marrow-derived cells
BMDH	Bone-marrow-derived hepatocytes
BRCA1	Breast cancer 1
BrdU	Bromodésoxyuridine
Bub3	Budding Uninhibited By Benzimidazoles 3
BubR1	Budding Uninhibited By Benzimidazole-Related 1

- C -

CAMKK2	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 2
CCl4	Tétrachlorure de carbone
CdC20	Cell Division Cycle 20
CDC37	Cell Division Cycle 37
CDH1	Cadherin 1
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CENP	Centromere Proteine
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CHIP	Carboxyl terminus of Hsc70-Interacting Protein
CIN	Chromosomal Instability
CKI	CDK Inhibitor
CPT1A	Carnitine Palmitoyltransferase 1A
CRD	C-terminal Regulatory Domain
CRM1	Chromosomal Maintenance 1
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
Ctgf	Connective Tissue Growth Factor
CTIC2	CREB regulated transducer of activity 2
CTNNB1	Catenin Beta 1
Cyr64	Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61

- D -

DDR	DNA Damage Response
dLKB1	Drosophila LKB1

- E -

E2F7	E2F Transcription Factor 7
E2F8	E2F Transcription Factor 8
Ect2	Epithelial Cell Transforming 2
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Eml1	Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 1
EREG	Epiregulin
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase

- F -

F2R	Fizzy And Cell Division Cycle 20 Related 1
Fah	Fumarylacetoacetate hydrolase
FGF19	Fibroblast Growth Factor 19
FGF4	Fibroblast Growth Factor 4

- G -

G6P	Glucose-6-Phosphate
G6pase	Glucose-6-phosphatase
GEF	Guanine Nucléotide Exchange Nucleotide Factor
Glu	Glutamate
GNMT	Glycine N-Méthyl-Transférerase
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis

- H -

H2AX	Histones H2A, membre X
HB-EGF	Heparin Binding EGF Like Growth Factor
HDL	High Density Lipoprotein
HERV-FRP	Human Endogenous Retrovirus Group FRP
HERV-W	Human Endogenous Retrovirus Group W
HFD	High Fat Diet
HGF	Hepatocyte Growth Factor
Hox	Homeobox containing gene
HP	Hépatectomie Partielle
HPV	Human Papiloma Viris
HSP 90	Heat shock protein 90
HUR	Human antigen R

- I -

IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IL6	Interleukine 6
Imp α	Importine α
Imp β	Importine β
IRF2	Interféron Regulatory Factor 2

- J -

JAK	Janus Kinase
-----	--------------

- K -

kDa	kiloDalton
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1

- L -

LATS	Large tumor suppressor kinase
LIP1	LKB1 interacting protein-1
LKB1	Liver Kinase B1 ou sérine thréonine kinase 11 (STK11)
LPS	Lipopolysaccharide
LSECs	Liver Sinusoid Endothelial Cells
Lys	Lysine

- M -

Mad2	Mitotic Arrest Deficient 2
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MARK	Microtubule-affinity-regulating kinase 1-4
MAT	Méthionine adénosyl-transférase
MC	Mégacaryocyte
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
mir-122	micro-ARN 122
MO25	Mouse Protein 25
MRLC	Myosin Regulatory Light Chain
MST	Mammalian STE20-like protein kinase
MTA	Microtubules Astraux
MTK	Microtubules Kinétochoriens
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1	mammalian Target Of Rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian Target Of Rapamycin complex 2
MTs	Microtubules

- N -

NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme Oxydée)
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NF-κB	Nuclear Factor κ B
NLS	Nuclear Localisation Signal
NRD	N-terminal regulatory domain
NRF2	Nuclear Factor erythroid-derived 2-like 2

- O -

ob/ob	Souris obèse, mutante pour le gène codant pour la leptine
-------	---

- P -

P53	Tumor Protein 53
P70s6k	70 kDa ribosomal Protein S6 kinase
P90RSK	90 kDa ribosomal Protein S6 kinase
Pak1	P21 (RAC1) Activated Kinase 1
PAR1b	Polarity-regulating kinase partitioning-defective 1b
Pepck	Phosphoenolpyruvate Carboxylase
Pgc1α	Peroxisome proliferator-activated receptor-g coactivator 1α
Phe	Phénylalanine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PJS	Peutz-Jeghers

PKA	Protein Kinase A
PKC-z	Protein Kinase C-zeta type
PLK1	Polo-like kinase 1
POT1a	Protection of telomeres 1A

- R -

Rac1	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
Rb	Rétinoblastome
RhoA	Ras homolog gene family, member A
Rock1	Rho-associated kinases 1
Rock2	Rho-associated kinases 2
RPS6KA	Ribosomal protein S6 kinase 2 alpha

- S -

SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SAMe	S-adenosyl-méthionine
Ser	Sérine
SIK2	Salt-inducible kinase 2
SIRT1	Sirtuin 1
Skp2-SCF	S-phase kinase-associated protein 2 - Skp1/Cullin/F-box
SMAD	Mothers Against Decapentaplegic Homolog
Snf1	Sucrose non-fermenting 1 protein kinase
Srebp-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STK11	Sérine Thréonine Kinase 11
STRAD	Ste-20 Related Adaptator Protein
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier

- T -

TCF	T-Cell Factor family protein
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TG	Triglycérides
TGC	Trophoblast Giant Cells
TGF α	Transforming Growth Factor α
TGF β	Transforming Growth Factor β
Thr	Thréonine
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TORC2	Transducer of regulated CREB activity 2
Tos3	Serine/threonine protein kinase TOS3
TP53	Tumor Protein 53
Trp	Tryptophane
TSC1	Tuberous sclerosis 1
TSC2	Tuberous sclerosis 2

- U - V - X - Y - Z -

uPA	Urokinase plasminogen activator
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
YAP	Yes-Associated Protein
ZO-1	Zonula occludens-1

Autres

4E-BP1	4E-Binding protein 1
--------	----------------------

INTRODUCTION

Préambule

Mon travail de thèse porte sur la caractérisation du rôle de la master kinase LKB1 dans la régulation de la prolifération hépatique et de l'intégrité génomique. Au cours de mes quatre années de thèse, je me suis majoritairement concentrée sur le développement de cette thématique de recherche. Par ailleurs, j'ai eu l'opportunité de participer à une seconde étude, reposant sur l'analyse des altérations de la ploïdie hépatocytaire lors du développement de syndromes métaboliques. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Géraldine Gentric, doctorante dans notre équipe.

Ma thèse a été dirigée par le Dr. Chantal Desdouets, dont le laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années au contrôle des mécanismes de polyploïdisation dans la physiopathologie hépatique. Physiologiquement, le foie est un organe quiescent et polyploïde (plusieurs jeux complets de chromosomes). Les travaux de notre équipe de recherche ont notamment montré que ces populations hépatocytaires polyploïdes prennent place lors du développement post-natal, sous-contrôle d'un signal insulinaire, hormone clé du métabolisme.

Aujourd'hui, il est clairement établi dans différents tissus que la polyploïdie est impliquée dans la transformation cellulaire, en association avec un hit oncogénique. Au regard de ce lien étroit entre polyploïdie et tumorigenèse, notre équipe cherche donc à comprendre dans le tissu hépatique, si le profil de polyploïdie physiologique est modifié lors d'une séquence de prolifération pathologique et si cet état peut contribuer à la carcinogenèse hépatique (CHC). L'une des pathologies hépatiques majeures associées au CHC est la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD), syndrome métabolique associé à une insulino-résistance. En lien avec ces projets de recherche, le laboratoire explore donc les modifications de la polyploïdie dans le syndrome métabolique. Cette relation entre métabolisme et modulation de la polyploïdie a conduit le laboratoire à s'intéresser également à l'implication de points de contrôle du métabolisme dans l'intégrité génomique. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la master kinase LKB1.

Ce manuscrit de thèse se compose d'une introduction bibliographique, divisée en trois parties. Dans la première, j'aborde tout d'abord des notions générales sur la physiologie du tissu hépatique et plus particulièrement sur ses propriétés de régénération. Le second chapitre est consacré aux mécanismes et aux fonctions de la polyploïdisation, chez les mammifères. Enfin, le troisième et dernier chapitre est centré sur la master kinase LKB1. Au regard des résultats de mes travaux de thèse, j'ai choisi de développer principalement le rôle de LKB1 dans la prolifération et la polarité cellulaire. Mes résultats seront ensuite présentés sous forme de

manuscrit en anglais (Introduction – Résultats – Discussion – Méthodes – Références – Figures – Informations supplémentaires). Ce travail est actuellement en révision à Cell Reports. Enfin, ce manuscrit s'achève sur une discussion de ces résultats et sur les perspectives envisagées pour la suite de ce projet.

Par soucis de clarté, j'ai choisi d'intégrer dans la partie Résultats uniquement mon travail sur le projet « LKB1 : gardien de la prolifération hépatocytaire et du maintien de l'intégrité génomique », qui a été mon sujet de recherche majeur au cours de mon doctorat. Toutefois, vous trouverez, en annexe de ce manuscrit, la publication scientifique du second projet auquel j'ai participé et dans lequel je suis second signataire :

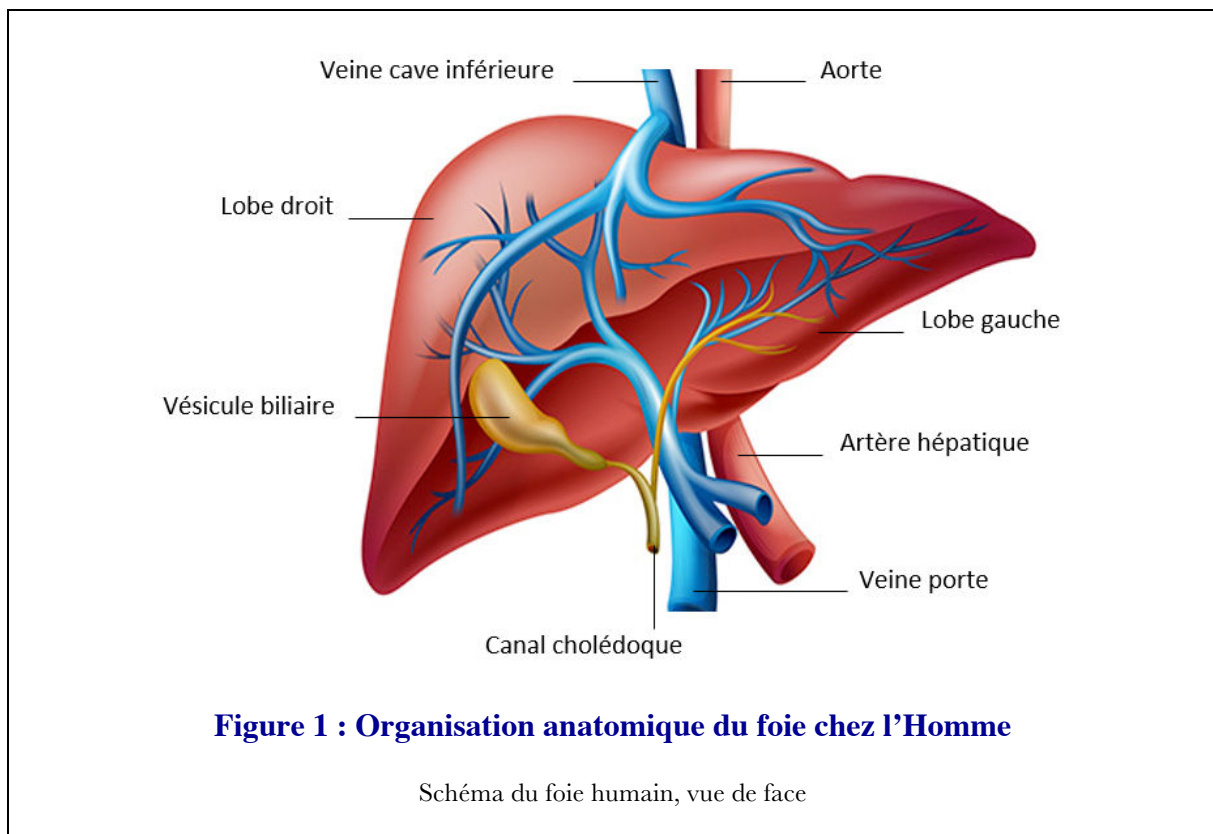
Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. Gentric G, **Maillet V**, Paradis V, Couton D, L'Hermitte A, Panasyuk G, Fromenty B, Celton-Morizur S, Desdouets C. **Journal of Clinical Investigation** (2015), 125(3):981-92.



Chapitre I : LE FOIE

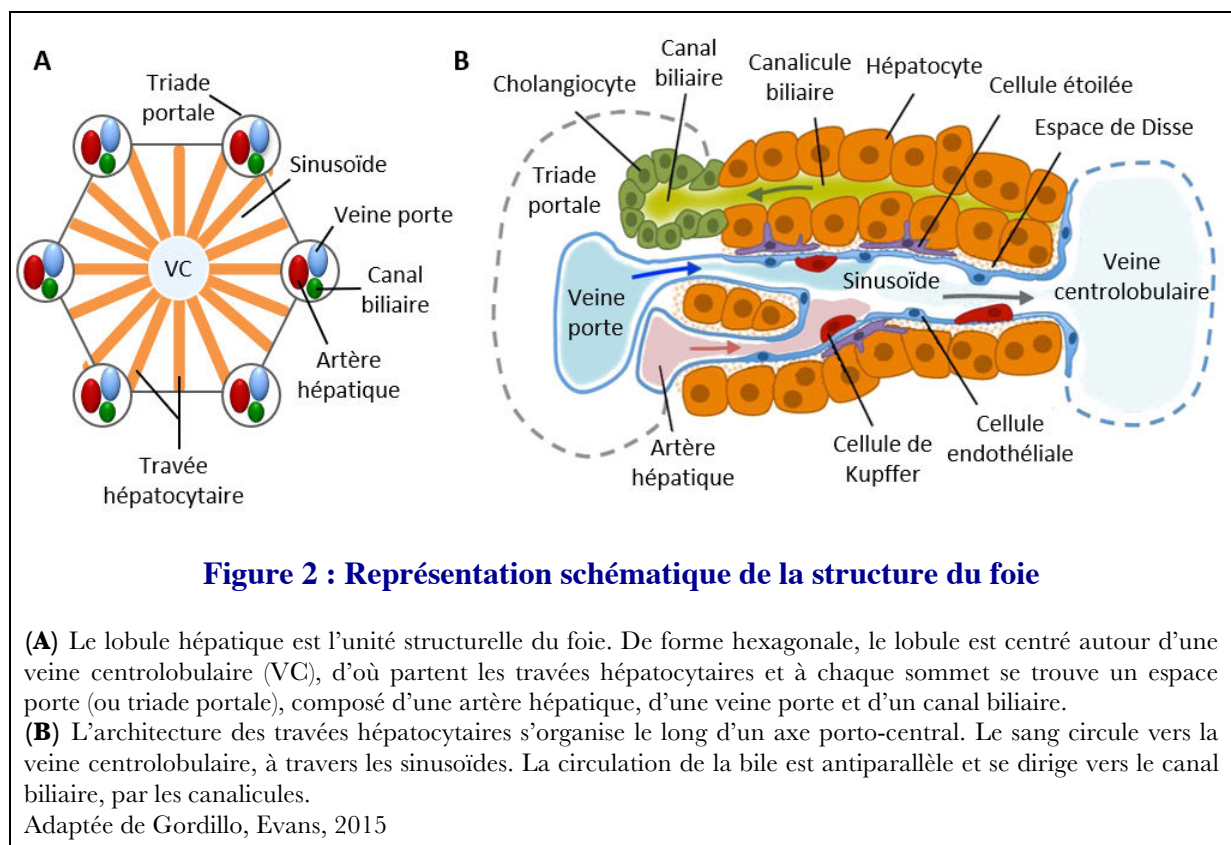
1. La structure du parenchyme hépatique

Chez le mammifère, le foie est l'organe interne le plus volumineux et le plus sophistiqué après le cerveau. Situé dans la partie inférieure droite de l'abdomen, sous le diaphragme, le foie humain atteint un poids d'environ 1,5 kg chez l'adulte. Cet organe est constitué de différents lobes, dont le nombre varie selon les espèces. Ainsi, chez l'Homme, le foie se compose de deux lobes : le gauche et le droit, alors que deux lobes supplémentaires sont présents chez la souris : le médian et le caudé. Le foie est également caractérisé par un système de double vascularisation complexe. L'organe est irrigué à la fois par l'artère hépatique, drainant le sang riche en oxygène, et par la veine porte, acheminant les nutriments absorbés par l'intestin ou encore les hormones pancréatiques. La veine centrolobulaire, quant à elle, reçoit le sang appauvri afin de le conduire jusqu'à la veine cave inférieure, via les veines sus-hépatiques (**Figure 1**).

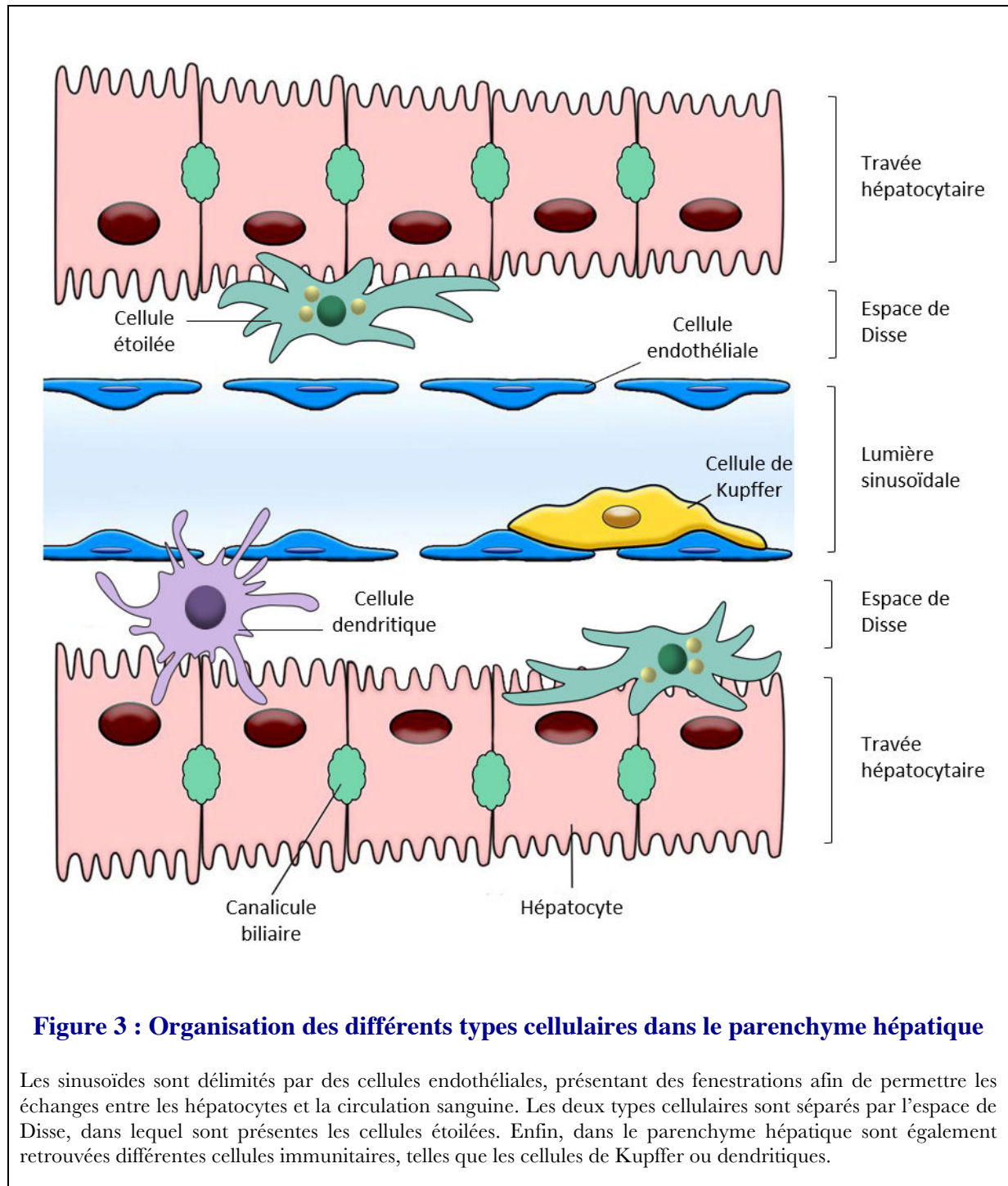


Anatomiquement, le foie est constitué d'une succession d'unités structurales, appelées : lobules hépatiques. De forme hexagonale, ces structures sont caractérisées par un regroupement de cellules hépatiques, dont l'organisation est déterminée par le positionnement des voies vasculaires et biliaires ([Rappaport et al., 1954](#)). Cette architecture spécifique favorise

une zonation anatomique et fonctionnelle. Ainsi, les lobules hépatiques sont centrés autour de la veine centrolobulaire (espace périveineux) et leurs sommets sont constitués par les espaces portes ou triades portales (espace périportal). Ces dernières sont des structures arrondies composées d'une veinule porte, d'une artériole hépatique ainsi que d'un canal biliaire. Au sein d'un lobule, les hépatocytes, cellules majoritaires du foie (*cf.* §I.2.), s'organisent en travées, rayonnant d'un espace porte à la veine centrolobulaire (**Figure 2A**). D'autre part, le sang, provenant de la double vascularisation, chemine le long de ces travées hépatocytaires, par des capillaires sinusoides. La délimitation des sinusoides par une monocouche de cellules endothéliales permet la mise en place d'une barrière entre le sang et les hépatocytes. Toutefois, les cellules endothéliales forment une barrière reste perméable à certaines cellules ou macromolécules et favorise ainsi les échanges entre l'espace sous-endothéliale et les hépatocytes (Malik et al., 2002; Wisse, 1970). Au sein du lobule hépatique, deux systèmes fluidiques cohabitent : sanguin et biliaire. Antiparallèlement au système vasculaire, la voie biliaire draine la bile, produite par les hépatocytes, grâce à un réseau de canalicules allant de l'espace péri-veineux en direction de la zone péri-portale. La transition entre canalicule et canal biliaire est réalisée au niveau de l'espace porte, via le canal de Hering. Par la suite, la bile sera acheminée par des canaux biliaires extra-hépatiques, pour être finalement stockée dans la vésicule biliaire, attenante au foie (**Figure 2B**).



Finalement, cette architecture complexe du foie est notamment permise par un agencement minutieux des différents types cellulaires composant cet organe, ces derniers feront l'objet du prochain paragraphe (**Figure 3**).



2. La composition cellulaire

Différents types cellulaires composent le foie, dont certains ont déjà été mentionnés dans la première partie de ce chapitre. Cette hétérogénéité est indispensable à l'exécution des différentes fonctions assurées par le tissu hépatique. Chez l'adulte, le foie est majoritairement composé d'hépatocytes. Le parenchyme hépatique est également constitué de cellules épithéliales biliaires. D'autres populations cellulaires non parenchymateuses résident dans le foie, telles que les cellules immunitaires, endothéliales ou étoilées.

2.1 Les hépatocytes

Majoritaires dans le foie, les hépatocytes représentent 60% de l'ensemble des cellules hépatiques et 80% du poids de l'organe (Blouin et al., 1977). Cette cellule hépatique, dont la taille varie de 25 à 30µm, adopte une forme polygonale. Les hépatocytes sont des cellules épithéliales polarisées (Musch, 2014; Treyer and Musch, 2013). Ainsi, leurs faces latérales sont au contact d'hépatocytes attenants, appartenant à la même travée. Le pôle basolatéral des hépatocytes, constitué de microvillosités, fait face à l'endothélium sinusoidal et constitue le lieu d'échanges bidirectionnels entre la cellule et le système vasculaire. Latéralement, la membrane plasmique de deux hépatocytes adjacents présente une légère dépression, formant le canalicule biliaire. Cette structure caractérise le pôle apical hépatocytaire et est délimitée par des jonctions serrées. Par ailleurs, l'hépatocyte présente plusieurs pôles apicaux, contrairement aux cellules ayant une polarité épithéliale classique qui n'en comporte qu'un. La polarité de l'hépatocyte est donc unique dans l'organisme et permet l'exécution de différentes fonctions hépatocytaires. Véritables usines biochimiques, ces cellules ont un volume occupé à 15% par le réticulum endoplasmique et présentent un nombre élevé d'organites tels que les mitochondries (environ 1000/hépatocyte), les péroxysomes (environ 300/hépatocyte) ou encore les appareils de Golgi (environ 50/hépatocyte) (Weibel et al., 1969). Ainsi, la majorité des fonctions hépatiques, notamment différentes activités métaboliques, est réalisée par le contingent hépatocytaire (cf. §I.3.).

2.2 Les cholangiocytes

Les canaux biliaires sont formés d'un revêtement de cellules épithéliales unistratifiées : les cholangiocytes. Ces cellules composent 1% de la totalité des cellules hépatiques (Benedetti et al., 1996). Fait intéressant, au cours du développement, les hépatocytes et les cholangiocytes dérivent d'un même précurseur : l'hépatoblaste. Fonctionnellement, les cholangiocytes jouent

un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire hépatique, grâce à la sécrétion de cytokines et autres médiateurs (Glaser et al., 2009). De plus, ces cellules des canaux biliaires peuvent interagir directement avec des cellules immunitaires, via l'expression de molécules d'adhésion à leur surface. Les cholangiocytes sont également responsables d'importantes modifications de la bile et impliqués dans la réabsorption de constituants biliaires comme le glucose ou le glutathion (Glaser et al., 2009; Strazzabosco and Fabris, 2008).

2.3 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales délimitent les sinusoides, c'est pourquoi elles sont également nommées LSECs pour Liver Sinusoid Endothelial Cells. Environ 20% des cellules du foie sont des LSECs. Comme précédemment évoqué, ces cellules présentent des fenestrations transcytoplasmiques, mesurant entre 100 à 170nm. Ce tamis cellulaire facilite ainsi les échanges entre le sang et les populations hépatocytaires (Smedsrod et al., 1994; Wisse, 1970). Différentes fonctions, essentielles à l'organisme, ont été attribuées aux LSECs. En effet, une perte des pores transcytoplasmiques ou encore des altérations du fonctionnement des LSECs participent au développement de maladies, telles que la cirrhose ou encore l'installation de métastases. L'un des rôles majeurs de ces cellules est le contrôle de la réponse immunitaire (Limmer et al., 2000). Les structures sinusoidales renferment diverses populations immunitaires, dont la diffusion à travers la barrière sinusoidale est permise un mécanisme appelé diapédèse.

2.4 Les cellules immunitaires

Le foie possède un système immunitaire qui lui est propre. Le contingent cellulaire immunitaire constitue 20% des cellules hépatiques et est représenté par un large éventail de types cellulaires (Bogdanos et al., 2013). Parmi ces cellules immunitaires hépatiques, des cellules dendritiques, myéloïdes (cellules de Kuppfer) ou des lymphocytes sont représentés. Notons que plus de la moitié de ces acteurs appartiennent aux cellules de l'immunité innée (55%) : les lymphocytes (Natural Killer T et Natural Killer), les cellules de Kuppfer ou les cellules dendritiques. La seconde partie est donc représentative de l'immunité adaptative (45%) : les lymphocytes T et B. Cette hétérogénéité cellulaire constitue le microenvironnement hépatique et contribue à l'homéostasie tissulaire, mais également à la modulation de la réponse immunitaire dans le tissu hépatique, suite à des agressions (Robinson et al., 2016).

2.5 Les cellules étoilées

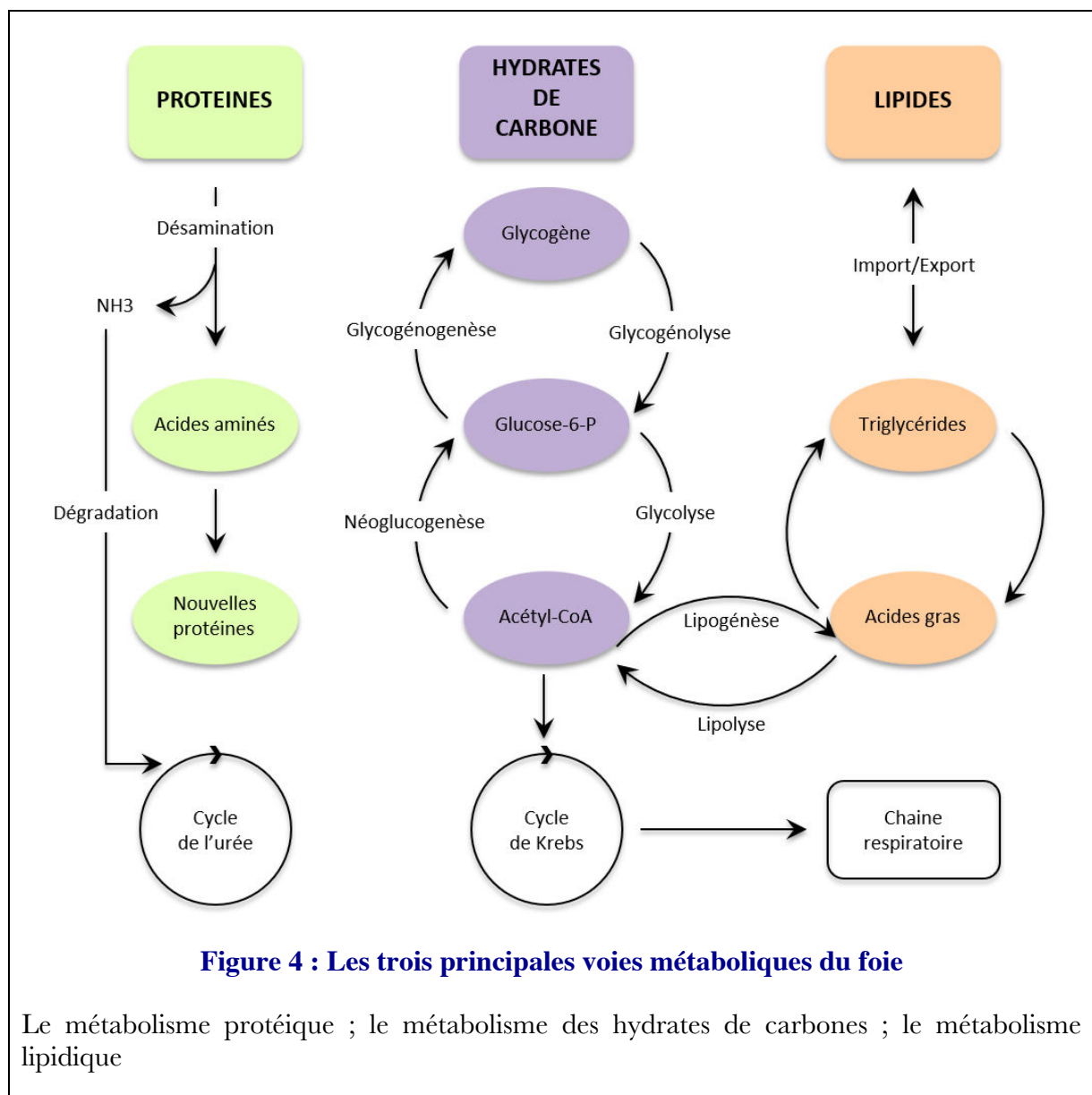
Aussi appelées cellules de Ito, les cellules étoilées se situent entre la couche de cellules endothéliales des sinusoides et les travées hépatocytaires. Cette zone entourant les sinusoides définit l'espace de Disse. Ces cellules représentent la plus petite population hépatique (1%) (Geerts, 2001). Bien qu'elles soient relativement peu représentées dans le foie, les cellules étoilées jouent un rôle primordial. Physiologiquement, ce contingent cellulaire participe notamment au stockage des gouttelettes lipidiques, riches en vitamine A. Pathologiquement, leur rôle est capital, puisqu'en interagissant avec le système immunitaire hépatique, les cellules étoilées contribuent à l'installation de la fibrose (Friedman, 2008; Ichikawa et al., 2011).

3. Les fonctions hépatiques

Le foie est un organe vital présentant un extraordinaire éventail de fonctions physiologiques, dont les trois principales sont : la synthèse, le stockage et la détoxification. Précédemment, nous avons abordé le concept de zonation hépatique. Anatomiquement, ce phénomène permet de délimiter deux espaces essentiels : périveineux et périportal, mais également de distinguer deux zones fonctionnellement différentes. En effet, le long de cet axe porto-centrolobulaire, les hépatocytes présentent une hétérogénéité importante et se spécialisent en fonction de leur localisation au sein du lobule hépatique (Jungermann and Katz, 1989). Aux alentours de l'espace porte, les hépatocytes sont au contact d'un sang riche en oxygène, en hormones et en nutriments, définissant les hépatocytes périportaux. *A contrario*, à proximité de la veine centrolobulaire, les hépatocytes sont irrigués par un sang appauvri, caractérisant les hépatocytes périveineux. On parle alors d'un phénomène de zonation métabolique (Jungermann and Kietzmann, 1996). Initialement associée au métabolisme glucidique, cette notion a finalement été imputée au métabolisme lipidique et glucidique, mais également aux fonctions d'épuration, réalisée par le foie (Haussinger et al., 1992; Jungermann and Thurman, 1992). Fait intéressant, certaines fonctions ne sont pas soumises à cette zonation et sont réalisées dans l'ensemble des hépatocytes, telles que la sécrétion de protéines sériques ou de lipoprotéines de basse densité VLDL (Very Low-Density Lipoprotein) (Kaestner, 2009). Dans la suite de ce paragraphe, nous détaillerons brièvement certaines de ces fonctions, comme l'homéostasie métabolique glucidique, lipidique et protéique ; la détoxification ; la sécrétion biliaire.

3.1 La fonction métabolique

Le foie exerce un rôle majeur dans l'homéostasie nutritionnelle. Doué de propriétés métaboliques considérables, cet organe intervient dans la synthèse, la dégradation et le métabolisme de tous les macronutriments. Le foie est également impliqué dans le stockage de divers composés, comme le glycogène ou la plupart des micronutriments (minéraux, vitamines, fer). Bien qu'il ne soit pas un organe de stockage lipidique (physiologiquement), le foie est cependant déterminant dans la régulation du devenir métabolique des lipides. Premier organe au contact des nutriments, suite à leur absorption par l'intestin, le foie est donc essentiel au métabolisme des carbohydrate, des acides gras et des protéines (pour revue **(Figure 4)** (Rui, 2014)).



3.1.1 Le métabolisme glucidique

Dans le métabolisme des carbohydrates, l'un des enjeux majeurs pour le foie est de maintenir la glycémie. En conditions d'hyperglycémie, suite à un signal insulinique, la population hépatocytaire est capable d'absorber le glucose circulant dans le sang. Le glucose est alors métabolisé dans le foie en G6P (Glucose-6-phosphate), pouvant être orienté vers deux voies distinctes : la glycogénogenèse ou la glycolyse. Ainsi, le G6P néoformé peut être stocké sous forme de glycogène ou être consommé immédiatement, générant alors du pyruvate afin d'alimenter le cycle de Krebs.

En revanche, dans un contexte d'hypoglycémie, un signal glucagon aura pour conséquence l'activation de deux voies dans l'hépatocyte : la glycogénolyse ou la néoglucogenèse. La première génère du glucose à partir des réserves en glycogène et la seconde synthétise une nouvelle molécule de glucose à partir d'une molécule non-glucidique, telle que le glycérol, les acides aminés ou encore le lactate.

3.1.2 Le métabolisme lipidique

Une fois arrivés dans le foie, les acides gras sont rapidement métabolisés en triglycérides ou TG, pouvant alors alimenter la β -oxydation. Ce processus de lipolyse permet de transformer ces TG en acétyl-CoenzymeA (ou acétyl-CoA), substrat énergétique du cycle de Krebs. L'exportation des triglycérides est également possible notamment afin d'être stockés dans les adipocytes. Ce transport est permis par un groupe de lipoprotéines constitué des VLDL, des HDL (High Density Lipoprotein), des LDL (Low Density Lipoprotein) et des chylomicrons. En cas d'excès de synthèse ou d'apport des acides gras, les hépatocytes peuvent également stocker les TG dans leur cytoplasme, de façon concomitante avec un ralentissement des mécanismes de dégradation et d'export. Pathologiquement, ce phénomène définit la stéatose.

A contrario, le foie a également la capacité d'utiliser l'acétyl-CoA afin de générer *de novo* des triglycérides ou du cholestérol, grâce à la voie de la lipogenèse.

3.1.3 Le métabolisme protéique

A l'inverse des carbohydrates ou des lipides, les hépatocytes ne peuvent pas stocker les protéines. Les acides aminés, rapidement produits suite à la dégradation des protéines, sont désaminés dans le tissu hépatique, générant alors de l'ammoniac. Ce composé chimique étant hautement toxique pour l'organisme, le foie métabolise l'ammoniac en urée afin de l'évacuer

via le cycle de l'urée (Yang and Bankir, 2005). Une fois désaminés, les acides aminés peuvent avoir différentes destinées. Ces molécules peuvent alimenter directement le cycle de Krebs ou participer à la synthèse de protéines, telles que l'albumine ou la transferrine, ou d'hormones comme l'IGF-1 (Insulin Growth Factor).

3.2 La fonction de détoxification

Organe filtre de l'organisme, le foie est soumis en permanence à des agressions par des toxines quelles soient endogènes ou non. Le foie met donc en place différents mécanismes afin d'éliminer ces composés toxiques pour l'organisme, tels que la bilirubine, l'alcool ou l'ammonium (Gebhardt et al., 1991; Guengerich, 1999; Morgan et al., 2002). Ainsi, le foie adresse les molécules hydrosolubles au rein, afin de les évacuer par le système urinaire. Concernant les molécules liposolubles, les hépatocytes ont un rôle clé dans leur biotransformation, essentielle à leur évacuation. Deux étapes régissent ce catabolisme. Dans un premier temps, une étape d'oxydo-réduction, catalysée par des cytochromes, augmente la polarité de ces substrats toxiques. La seconde étape permet d'associer les composés toxiques à des molécules endogènes, comme l'acide glucuronique, ou le glutathion, afin d'augmenter leurs propriétés hydrosolubles. Ces événements ont pour but ultime de faciliter leur élimination par la bile ou les urines.

3.3 La fonction d'excrétion

La présence de la double circulation (sang et bile), au sein de chaque lobule hépatique, permet aux hépatocytes d'assurer à la fois une fonction exocrine : sécrétion et excrétion de la bile, et une fonction endocrine : libération dans le sang de protéines ou d'hormones. Ces propriétés confèrent au foie la fonction de glande amphicrine homotypique.

Les voies biliaires permettent l'élimination d'un certain nombre de composés, tels que les lipides ou les xénobiotiques (Halilbasic et al., 2013). La synthèse de la bile est essentielle afin d'adresser ces substances vers le système intestinal et de les évacuer par les selles. La bile est notamment composée de substances organiques, comme les sels biliaires et les lipides, de bilirubine, de mucus et d'un certain nombre de xénobiotiques. Dans ce processus, les sels biliaires ont une importance capitale. En effet, ces molécules amphiphiles, aux propriétés détergentes, permettent le maintien des lipides et du cholestérol en solution dans la bile et assurent ainsi leur digestion par l'organisme.

4. La régénération hépatique

Le foie est un organe fascinant aux propriétés exceptionnelles, dont la plus remarquable est sans doute sa capacité à régénérer. Ce phénomène est connu de longue date, puisqu'il était déjà décrit dans la Grèce Antique dans le mythe de Prométhée. Prométhée, ayant volé le secret du feu sacré aux dieux de l'Olympe pour le livrer aux Hommes, fut condamné à avoir quotidiennement une partie du foie dévorée par un aigle. Chaque nuit, le foie régénérail, fournissant alors une nourriture continue à l'aigle.

Chez l'adulte, le foie est un organe physiologiquement quiescent, mais il est le seul dans l'organisme à pouvoir régénérer intégralement, suite à différents stimuli. En effet, en cas de stress ou d'agression, il conserve la capacité de proliférer, afin de réparer les lésions tissulaires. Différents modèles d'études *in vivo* ont été développés dans le but de décrypter les mécanismes intervenant dans le processus de régénération hépatique. (1) La régénération peut ainsi être induite chimiquement, par administration de composés hépatotoxiques, comme le tétrachlorure de carbone (CCl₄). Cette méthode repose sur l'induction d'une lyse massive du parenchyme hépatique et est associée à une forte réponse inflammatoire. Cette approche est plus comparable à un mécanisme pathologique. (2) La méthode la plus courante est la résection d'une partie du foie ou hépatectomie partielle (HP) (Fausto et al., 2006; Michalopoulos and DeFrances, 1997; Mitchell and Willenbring, 2008). L'hépatectomie aux deux tiers est la plus usuelle. Cette technique chirurgicale présente différents avantages non négligeables :

- très faible réponse inflammatoire,
- sans lésion tissulaire,
- prolifération successive des différents types cellulaires,
- prolifération synchrone des hépatocytes.

La cinétique de prolifération des différents types cellulaires hépatiques débute avec la prolifération des hépatocytes au cours des premières 48 heures, après HP. Puis successivement, les cholangiocytes, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées et enfin les cellules endothéliales prolifèrent à leur tour (**Figure 5**).

La régénération hépatique permet la restauration de la masse hépatique initiale ($\pm 10\%$) (Stocker and Heine, 1971) et repose sur l'activation séquentielle de différents signaux mitogéniques, médiés par divers cytokines et facteurs de croissance. Ce processus se divise en trois phases : la phase de priming, la phase de prolifération et la phase de terminaison.

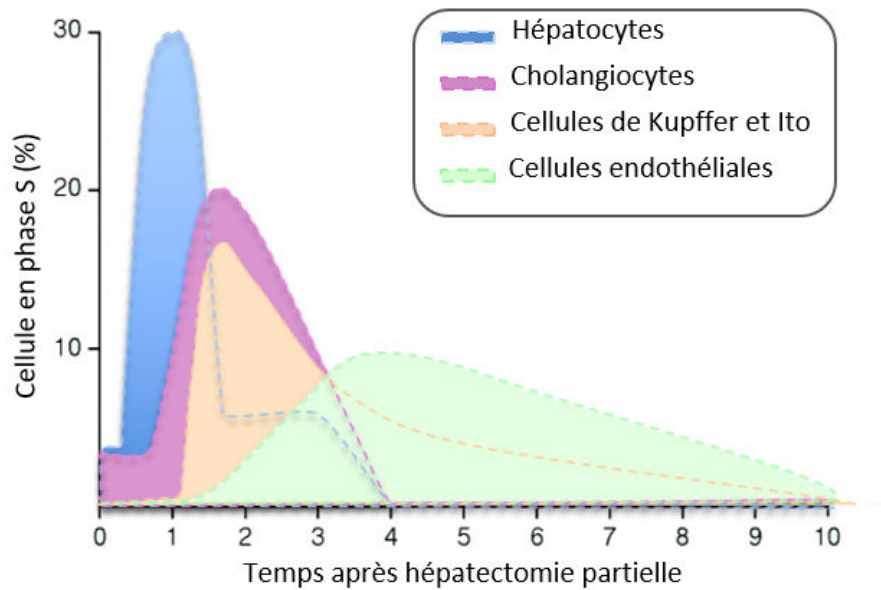
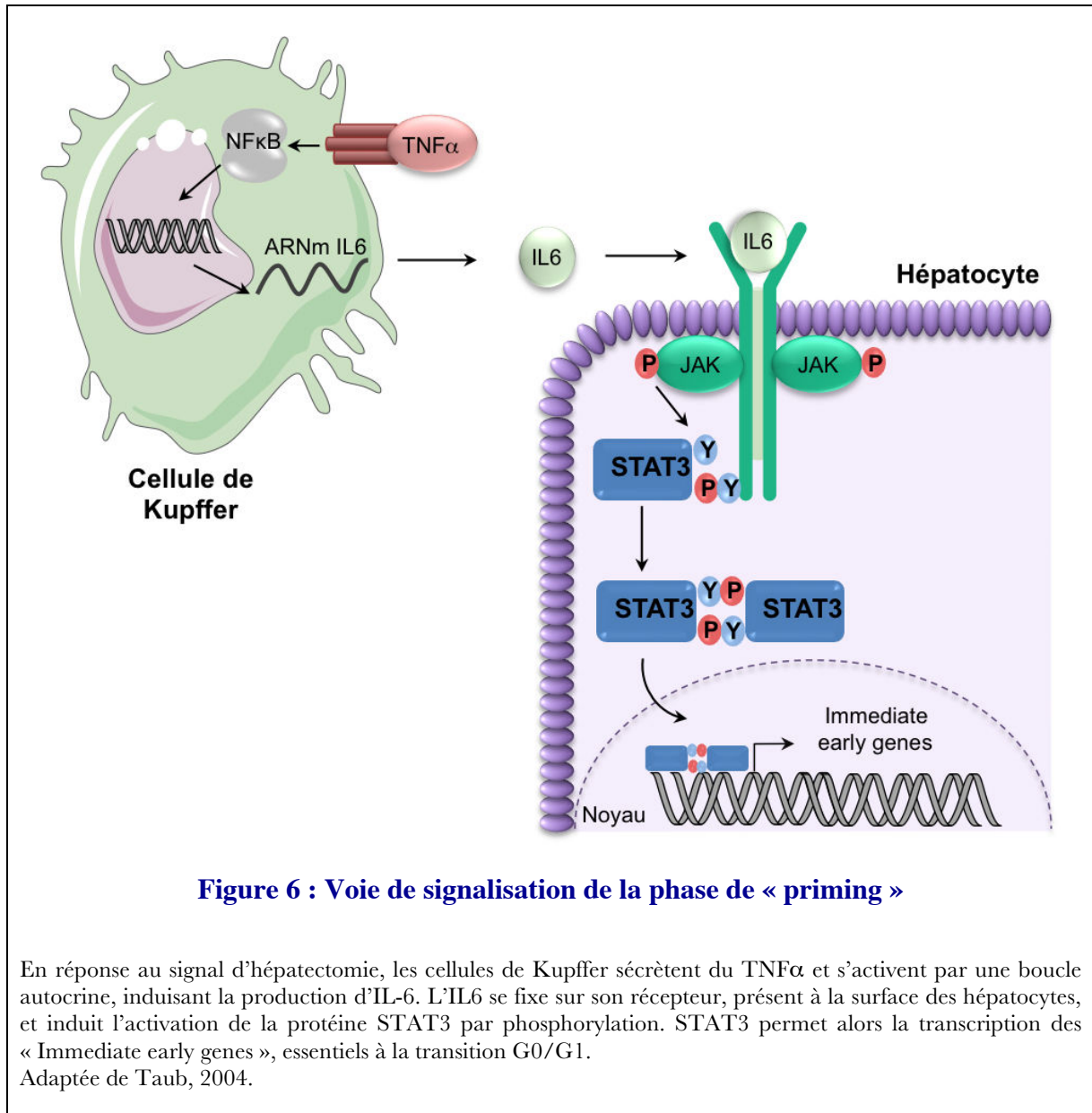


Figure 5 : Cinétique de prolifération des cellules hépatiques après hépatectomie partielle

Au cours des premières 48 heures de la régénération, les hépatocytes sont les premières cellules à proliférer. Puis, successivement, les cholangiocytes, les cellules de Kupffer et endothéliales prolifèrent à leur tour. La totalité de la masse hépatique est restaurée par hyperplasie compensatoire environ 7 jours post-HP chez la souris.

4.1 La phase de « priming »

Cette phase permet d'initier la réponse proliférative des hépatocytes et facilite leur sortie de quiescence. Cette étape est extrêmement rapide et démarre seulement quelques minutes après la résection. La modification du flux sanguin, suite à l'hépatectomie, induit une forte augmentation de la concentration de LPS (Lipopolysaccharide) arrivant par la veine porte, ayant pour conséquence l'activation des cellules de Kupffer (Cornell, 1985). Ces macrophages produisent en réponse du $\text{TNF}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor α), qui par une boucle d'activation autocrine induit la synthèse d'IL6 (Interleukine 6), via la signalisation NF- κ B (Nuclear Factor κ B). Au niveau de l'hépatocyte, la fixation de l'IL6 à son récepteur entraîne l'activation de la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) par une cascade de phosphorylations en chaîne, ayant pour finalité l'activation du facteur de transcription STAT3. Cet événement conduit à la transcription de gènes clés, appelés les « Immediate early genes » (Figure 6).



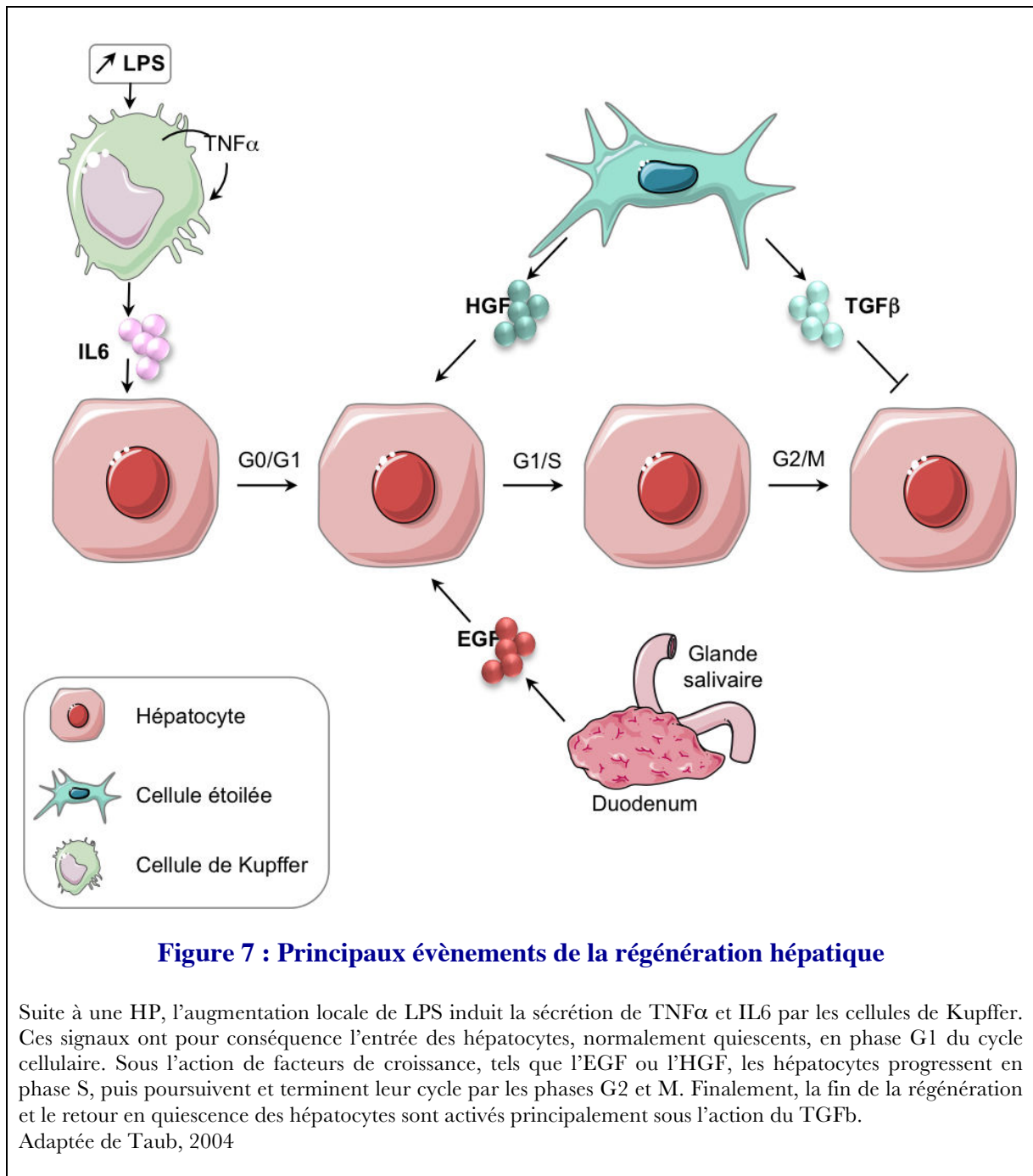
La principale mission de ces facteurs est d'activer la transition G0/G1 dans l'hépatocyte, mais ils sont également essentiels pour protéger les hépatocytes d'éventuels signaux nécrotiques ou apoptotiques (Fausto et al., 2006; Taub, 2004). Finalement, un autre événement intervient rapidement après l'hépatectomie : l'activation et la translocation nucléaire de la β-caténine. La β-caténine apparaît dans le noyau des hépatocytes dans les 15 minutes suivant la HP, où elle régule l'expression de l'*Egfr* (Epidermal Growth Factor Receptor) et initie la transcription de nombreux gènes, essentiels à la progression de la seconde phase : la prolifération hépatocytaire (Monga et al., 2001; Tan et al., 2005; Thompson and Monga, 2007; Torre et al., 2011).

4.2 La phase de prolifération

Une fois l'étape de priming effectuée, les hépatocytes sont propulsés en phase G1 du cycle cellulaire. Brièvement, le cycle cellulaire canonique se décompose en quatre phases successives : G1, S, G2, M. Son déroulement est gouverné par les couples Cyclines/CDK (Cyclin Dependant Kinase), variant en fonction des différentes phases du cycle cellulaire : G1 Cyclines D /Cdk4-6 et Cycline E/Cdk2 ; S Cycline A/Cdk2 ; G2 Cycline A/Cdk2 et Cycline B/Cdk1 ; M Cycline B/Cdk1. Nous reviendrons régulièrement sur ces acteurs tout au long de cette introduction. Toutefois, au cours de la régénération hépatique, d'autres signaux sont nécessaires à la progression du cycle cellulaire des hépatocytes. En effet, une seconde vague de signaux leur permet de réaliser la transition G1/S. Cette transition est notamment sous contrôle de facteurs de croissance, impliquant deux récepteurs majeurs : l'EGFR et cMET (Berasain and Avila, 2014; Borowiak et al., 2004; Collin de Lhortet et al., 2012; Paranjpe et al., 2016). Dans les premières heures suivant la HP, les facteurs de croissance, tels que l'EGF, l'amphiréguline ou le TGF α (Transforming Growth Factor α), sont sécrétés afin d'activer l'EGFR, tandis que l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) active cMET (Berasain and Avila, 2014; Berasain et al., 2005; Kiso et al., 1995; Komposch and Sibilias, 2015; Stolz et al., 1999; Webber et al., 1993). Ces différents facteurs de croissance sont sécrétés par divers types cellulaires et tissus : le duodénum ou les glandes salivaires pour l'EGF, les hépatocytes pour le TGF α , les cellules étoilées et endothéliales pour l'HGF. Une fois les récepteurs activés, ils induisent des voies de signalisation comme JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B/ mammalian Target Of Rapamycin) ou des MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/ Extracellular signal Regulated Kinase) (Haga et al., 2009; Li et al., 2002; Talarmin et al., 1999). L'ensemble de ces événements permet la réalisation de la transition G1/S dans les hépatocytes (**Figure 7**). Parallèlement à la voie des facteurs de croissance, une stéatose transitoire s'installe dans le parenchyme hépatique, définissant la phase dite métabolique (Delahunty and Rubinstein, 1970). Cette accumulation de triglycérides serait une réserve énergétique, importante pour suite de la régénération, mais également une source de phospholipides pour la formation des membranes plasmiques lors de la prolifération hépatocytaire à venir. Paradoxalement, la régénération ne peut avoir lieu sans cette stéatose physiologique, tandis qu'une stéatose pathologique, déjà installée, conduit à un défaut de régénération après HP (Rudnick and Davidson, 2012).

Après la transition G1/S, les hépatocytes progressent en phase S, G2 et mitose, indépendamment de cytokines ou de facteurs de croissance. Ainsi, le contingent hépatocytaire

effectue un à deux cycles de division (précisément 1,6), afin de restaurer la masse hépatique initiale.

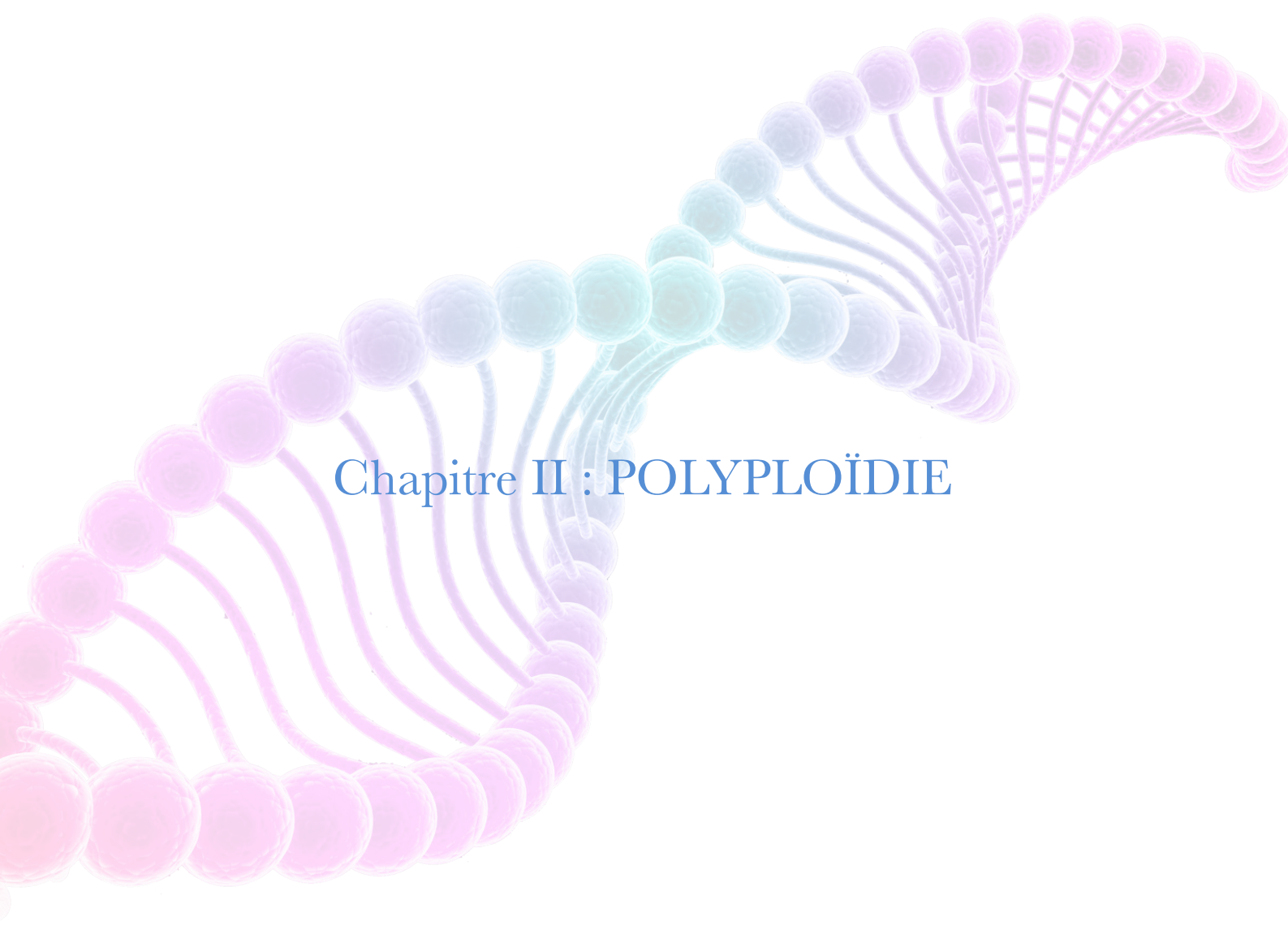


4.3 La phase de terminaison

Une fois la masse hépatique initiale atteinte, la prolifération doit s'arrêter rapidement et l'état de quiescence doit être restauré. Cette phase est donc régie par des voies de signalisations antiprolifératives, dont les deux majeures sont induites par le $\text{TGF}\beta$ et l'activine (Braun et al., 1988; Date et al., 2000). Le $\text{TGF}\beta$ est, principalement produit par les cellules

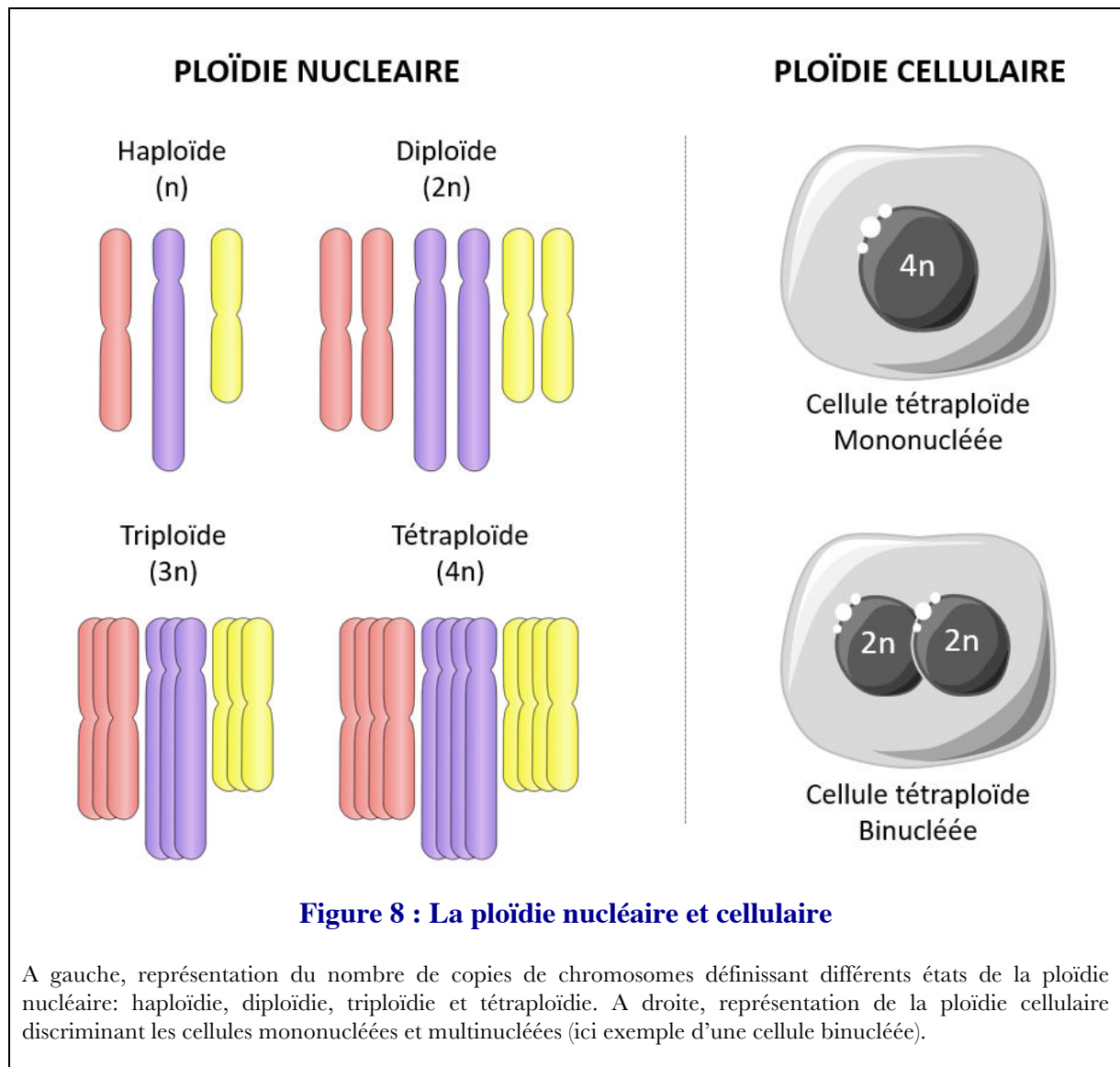
étoilées, et active en aval des protéines de la famille des SMADs (Mothers Against Decapentaplegic Homolog), permettant finalement la transcription de gènes, impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et d'activer le retour de la quiescence (**Figure 7**). L'arrêt de la prolifération est également médié par une autre voie de signalisation : la voie MST/YAP (Mammalian STE20-like protein kinase/Yes-Associated Protein) (Yimlamai et al., 2014; Zhao et al., 2011). La voie Hippo permet à la protéine Yap de pénétrer dans le noyau, où elle agit comme un facteur de transcription activant la prolifération cellulaire et régulant la taille de la cellule. Toutefois, son rôle précis au cours de la régénération reste encore énigmatique (Michalopoulos, 2017).

Ces dernières années, l'étude de la régénération hépatique s'est considérablement développée. Toutefois, les mécanismes contrôlant ce processus sont loin d'être entièrement élucidés. D'autres études seront donc essentielles pour étendre nos connaissances dans ce domaine. Comme nous l'avons décrit tout au long de ce chapitre, le foie est un organe doté de fonctions et de propriétés incroyables, l'une d'elles est sa polyploïdie physiologique. La polyploïdie fera donc l'objet de notre prochain chapitre.



Chapitre II : POLYPLOÏDIE

Découvert en 1882 par Walther Flemming, le chromosome est le support de l'information génétique, propre à tous les êtres vivants. Chaque espèce possède un nombre de chromosomes « n » spécifique. Ainsi, *Homo sapiens* possède $n=23$ chromosomes et *Mus musculus* $n=20$ (O'Brien et al., 2006). Généralement, les organismes eucaryotes contiennent deux jeux complets de chromosomes homologues, définissant l'état diploïde ($2n$). Cet état étant une norme pour la reproduction sexuelle des espèces.



Toutefois, le nombre d'exemplaires d'un jeu de chromosomes peut varier d'une cellule ou d'une espèce à une autre, c'est ce qui définit la ploïdie. Les cellules possédant une seule copie de chaque chromosome (n) sont dites haploïdes, deux copies ($2n$) diploïdes, trois copies ($3n$) triploïdes, quatre copies ($4n$) tétraploïdes, etc (Figure 8). La polypléidie définit donc un patrimoine chromosomique de plus de deux jeux complets de chromosomes.

Ces lots de chromosomes supplémentaires peuvent avoir différentes origines. En effet, ils peuvent provenir d'une même espèce, c'est ce que l'on nomme l'autopolyploïdie, ou d'espèces proches, mais différentes, c'est l'allopolyploïdie. Physiologiquement, on parle d'un état euploïde, où les variations quantitatives portent sur l'ensemble des chromosomes. En revanche, le gain ou la perte d'un ou plusieurs chromosomes au sein d'une cellule définit l'aneuploïdie, clairement établi comme étant un état pathologique. Enfin, il existe un dernier niveau de ploïdie, discriminant la ploïdie nucléaire de la ploïdie cellulaire. Les variations du nombre de chromosomes peuvent avoir lieu au sein d'un seul et unique noyau, définissant la ploïdie nucléaire et permettant l'émergence de populations mononucléées (**Figure 8**). Les cellules multinucléées présentent une répartition du matériel génétique dans deux noyaux ou plus, caractérisant la ploïdie cellulaire (Gentric and Desdouets, 2014).

Chez les eucaryotes, la polyploïdie n'est pas un phénomène rare et de nos jours, elle est considérée comme un mode de spéciation commun, ayant de grandes conséquences pour l'évolution des plantes, la biodiversité et l'écologie (Gallagher et al., 2016; Mable et al., 2011; Van de Peer et al., 2017). En effet, la polyploïdisation est très fréquente dans le règne végétal, particulièrement chez les angiospermes (Soltis and Soltis, 2016; Van de Peer et al., 2009). Des cas ont toutefois été rapportés chez certains insectes, poissons, amphibiens ou reptiles (Otto, 2007; Otto and Whitton, 2000). Néanmoins, la polyploïdie est clairement plus rare chez les animaux que chez les plantes (Orr, 1990). Cependant, chez le mammifère, l'émergence de populations polyploïdes peut être concomitante avec le développement physiologique de certains tissus, mais également être associée à un statut pathologique. La polyploïdie représente donc un équilibre fragile entre bénéfices et risques.

Ce phénomène est-il un enjeu pour l'évolution en conférant des avantages sélectifs et un rôle protecteur ? Ou à l'origine d'un contingent cellulaire pivot pouvant conduire à la tumorigénèse ? Cette dualité de la polyploïdie, ainsi que les mécanismes conduisant à son installation feront l'objet de ce chapitre.

1. La polyploïdie chez le mammifère

Chez les mammifères, la polyploïdisation d'un organisme entier est rare, car elle entraîne une létalité précoce, ainsi que des avortements spontanés ou des résorptions embryonnaires (Creasy et al., 1976; Kaufman, 1991). Rare n'est pas impossible, car en effet le rat viscacha (*Tympanoctomys barrerae*) et ses proches parents sont entièrement tétraploïdes, faisant ainsi exception à la règle (Gallardo et al., 1999). L'état diploïde est donc majoritaire

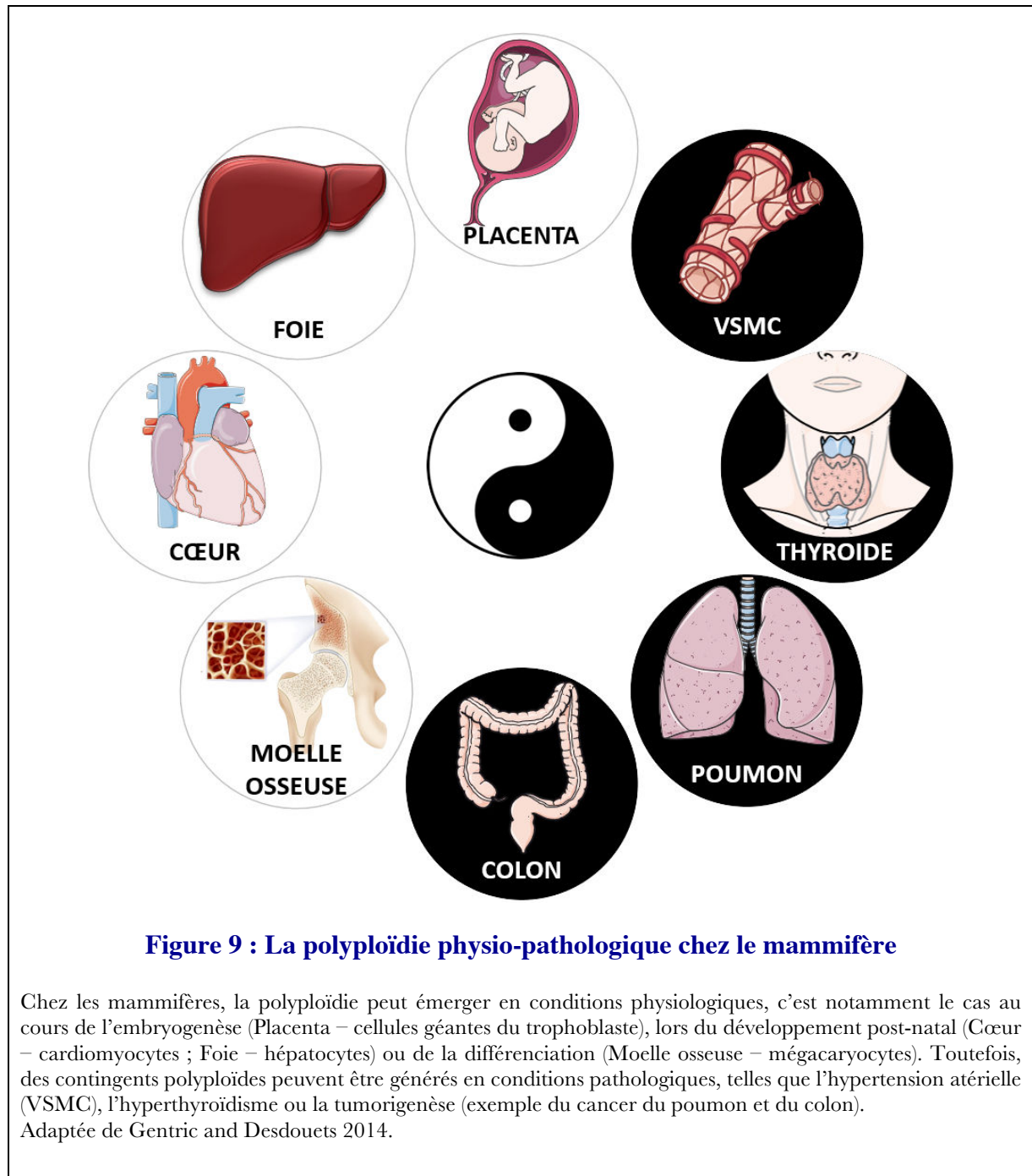
chez les mammifères. Cependant, il est intéressant de noter que les contingents diploïdes possèdent des stigmates d'une polyploïdie ancestrale. En effet, par deux fois, un événement de polyploïdisation est intervenu au cours de l'évolution des vertébrés (Kasahara, 2007; Ohno, 1970, 1999). Cette paléo-polyploïdie, présente dans le génome mammifère, pourrait d'ailleurs expliquer les nombreux paralogues de certains gènes, tels que Hox (Schughart et al., 1989), E2F ou Rb (protéine du rétinoblastome) (Cao et al., 2010). Chez l'Homme, il semblerait même que 74% des gènes de signalisation descendent de ces événements de duplication du génome complet (Huminiński and Heldin, 2010).

Bien que le phénomène de polyploidie soit rare, chez le mammifère, l'émergence de populations cellulaires polyploïdes est relative au développement et de la différenciation d'un certain nombre de tissus. Physiologiquement, ces contingents sont représentés notamment dans le cœur (cardiomyocytes : $4n$), le placenta (cellules géantes du trophoblaste : $8n$ à $64n$), la moelle osseuse (mégacaryocytes : $16n$ à $128n$) et le foie (hépatocytes : $4n$ à $8n$) (**Figure 9**).

Le vieillissement est également à l'origine de modifications de la ploïdie. C'est particulièrement le cas pour les hépatocytes ainsi que les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC : « Vascular Smooth Muscle Cells »), dont la polyploïdie augmente avec l'âge (Jones and Ravid, 2004; Wang et al., 2017). La polyploïdisation peut également intervenir en réponse à un stress mécanique, métabolique ou encore génotoxique. Au cours de la grossesse, les cellules des muscles lisses utérins sont effectivement soumises à un remaniement de leur ploïdie associé à la genèse d'un contingent polyploïde (van der Heijden and James, 1975). C'est également le cas pour les cellules thyroïdiennes, dans l'hyperthyroïdisme (Auer et al., 1985) ou les VSMC, dans l'hypertension (Hixon and Gualberto, 2003) (**Figure 9**). Toutefois, conserver un état polyploïde physiologique est un véritable challenge pour l'organisme. Outre l'augmentation du matériel génétique, la polyploïdie est également associée à une amplification du nombre de centrosomes. La gestion des chromosomes et centrosomes surnuméraires au cours de la mitose représente un enjeu majeur pour le maintien d'une ploïdie physiologique contrôlée. La cellule polyploïde met alors en place un mécanisme de regroupement des centrosomes afin de former un fuseau bipolaire et de générer deux cellules filles identiques.

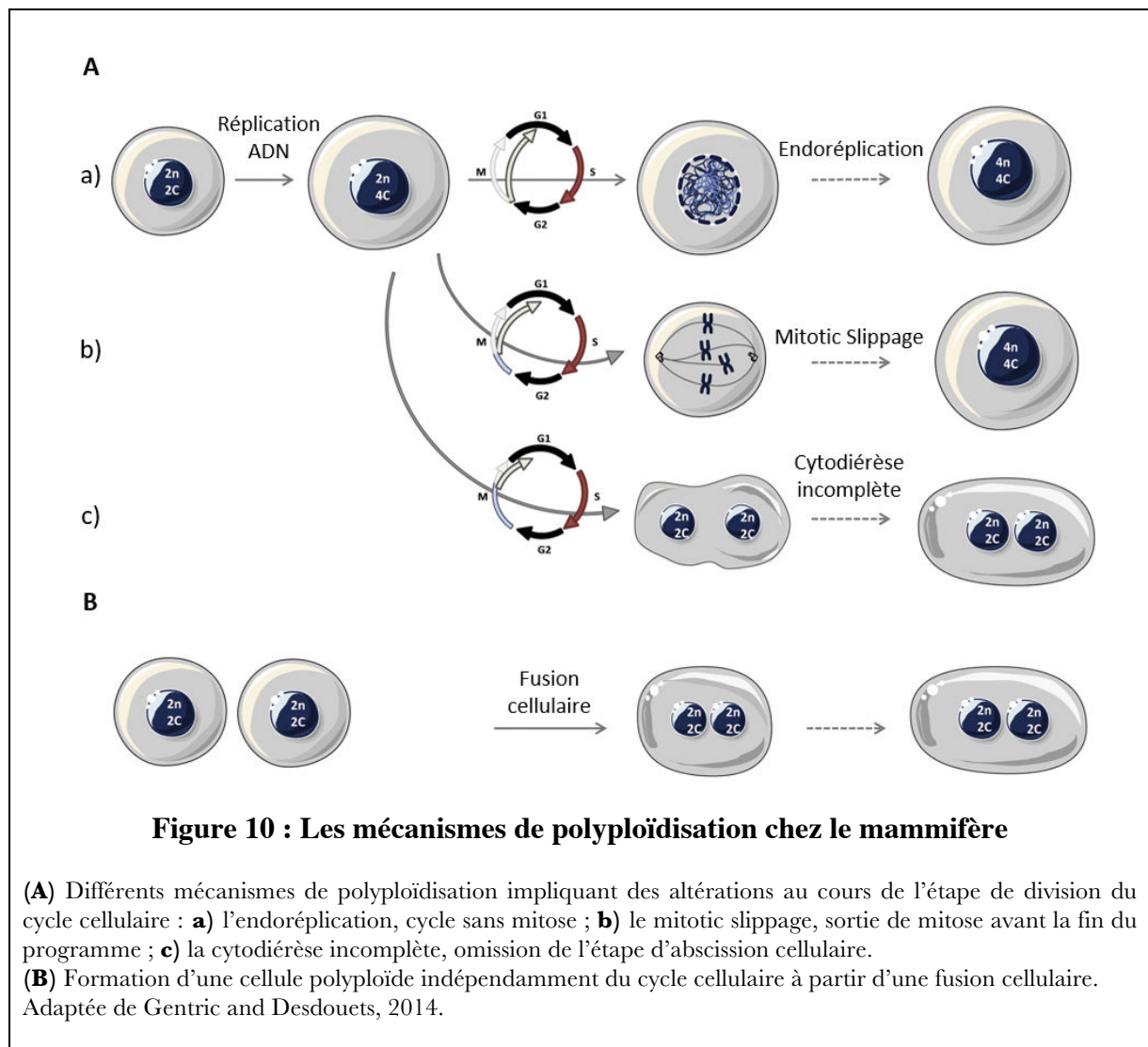
Cependant, ces mécanismes ne sont pas infaillibles et l'émergence de fuseaux multipolaires et/ou de défauts d'attachement des microtubules aux chromosomes peut être à l'origine de l'installation d'une instabilité chromosomique ou CIN (« chromosomal instability »). Aujourd'hui, la CIN, représentative d'une aneuploïdie, est un stigmate connu de nombreuses tumeurs. Il y a presque cent ans, Théodore Boveri décrivait l'existence d'une polyploïdie

pathologique et émettait déjà l'hypothèse que l'émergence de cellules tétraploïdes participait au développement tumoral dans certains tissus (Boveri, 2008) (pour exemples : cancers du côlon, du poumon, de l'œsophage, du sein ou de l'utérus (**Figure 9**) (Davoli and de Lange, 2011)). Depuis, cette hypothèse a été confirmée et a donné lieu à de nombreuses autres études. Il est maintenant établi que l'émergence d'un intermédiaire tétraploïde instable permet le passage d'une diploïdie physiologique à une aneuploïdie néoplasique (Ganem et al., 2007).



2. Les mécanismes de polypléidisation

Qu'ils soient physiologiques ou pathologiques, les mécanismes de polypléidisation sont majoritairement associés à des altérations de certaines étapes du cycle cellulaire. Ces événements sont l'Endoréplication, le « Mitotic Slippage » ainsi que la Cytodiérèse incomplète et seront présentés dans la suite de ce paragraphe (**Figure 10A**). Toutefois, il existe un mécanisme de polypléidisation ne faisant pas intervenir une étape du cycle cellulaire : la fusion cellulaire (**Figure 10B**).



2.1 La fusion cellulaire

L'événement majeur de fusion cellulaire modifiant la ploïdie cellulaire est la fertilisation. Ce mécanisme dépend de la fusion membranaire de deux cellules haploïdes, le spermatozoïde et l'oocyte, donnant ainsi naissance à la première cellule diploïde d'un

organisme, le zygote (Yanagimachi and Noda, 1970). Par la suite, des événements de fusion interviennent au cours du programme développemental de différents tissus. Ce phénomène est notamment crucial pour la fusion membranaire : des myoblastes pour former des myotubes dans les muscles, des macrophages pour former des ostéoclastes dans les os ou des cytotrophoblastes pour former des syncytiotrophoblastes dans les placentas (Huppertz et al., 1998; Loutit and Nisbet, 1982; Taylor, 2000).

D'autre part, dans certains cas de lésions tissulaires, la fusion cellulaire peut contribuer à la régénération du tissu. C'est notamment le cas de la régénération du muscle squelettique, permise par la fusion des fibres musculaires avec les cellules satellites (Bischoff and Heintz, 1994). Les macrophages fusionnent également afin de former des cellules géantes multinucléées aux capacités phagocytaires améliorées en réponse à des dommages (Vignery, 2005). D'autres études ont également mis en évidence le potentiel des cellules dérivées de la moelle osseuse (Bone-marrow-derived cells - BMD), pouvant fusionner avec des cellules nerveuses, gastro-intestinales ou hépatiques, afin de réparer des cellules endommagées (Alvarez-Dolado et al., 2003; Rizvi et al., 2006; Wang et al., 2003). Dans ces différents systèmes, des cellules allopolyploïdes sont ainsi générées, mettant en lumière la notion de reprogrammation génomique. Les travaux du groupe de Markus Grompe illustrent parfaitement ce processus. En effet, suite à la transplantation de cellules BMD, dans un modèle murin de tyrosinémie (souris *Fah*^{-/-} - Fumarylacetoacetate hydrolase), les hépatocytes dérivés de la moelle osseuse (Bone-marrow-derived hepatocytes - BMDH) ont la capacité de repeupler le foie et ainsi corriger l'hépatopathie (Vassilopoulos et al., 2003).

D'un point de vue mécanistique, la fusion cellulaire requiert l'intervention d'un certain nombre de protéines aux propriétés fusogéniques (Podbilewicz, 2014; Willkomm and Bloch, 2015). Toutefois, il est important de noter qu'à ce jour peu d'entre elles ont été clairement identifiées. Certaines protéines régulent des processus (adhésion cellulaire, différenciation, réarrangement cytosquelettique, etc.) requis pour la médiation de la fusion cellulaire, mais ne sont pas directement impliquées dans le mécanisme de fusion des membranes cellulaires. Ces protéines sont généralement transmembranaires, telles que CD9 (tétraspanine) essentielle à la fusion sperme-oocyte et des myoblastes (Le Naour et al., 2000; Tachibana and Hemler, 1999) ou ADAM12 (désintégrine et métalloprotéase) qui participe à la formation des fibres musculaires squelettiques et des ostéoclastes (Abe et al., 1999; Yagami-Hiromasa et al., 1995). Chez les vertébrés, les protéines de fusion les mieux caractérisées sont les protéines de fusion virale, notamment la famille des syncytines, impliquée dans le développement placentaire. En effet, chez l'homme, les glycoprotéines d'enveloppe syncytine-1 et 2 sont respectivement codées par

des éléments de la famille HERV (human endogenous retrovirus) -W et -FRD (Blaise et al., 2003; Blond et al., 2000; Mi et al., 2000). Cependant, au delà de la compréhension des mécanismes de fusion, l'un des enjeux majeurs est également de comprendre comment l'intégrité chromosomique est maintenue dans ces cellules issues d'évènements de fusion. Cette question est d'autant plus importante que le lien entre infection virale, polyploïdie et cancer a notamment été fondé sur les capacités fusogéniques de certains virus. En effet, il existe deux types d'infections virales conduisant à des événements de fusion cellulaire. Tout d'abord, le virus peut infecter la cellule et induire l'expression de protéines fusogènes, conduisant la cellule hôte à fusionner avec d'autres. Cet événement génère une cellule tétraploïde binucléée ($2 \times 2n$) ou hétérocaryon, définissant une cellule polynucléée dont les noyaux sont génétiquement différents (Duelli and Lazebnik, 2007; Harris and Watkins, 1965; Ogle et al., 2005) (**Figure 11A**).

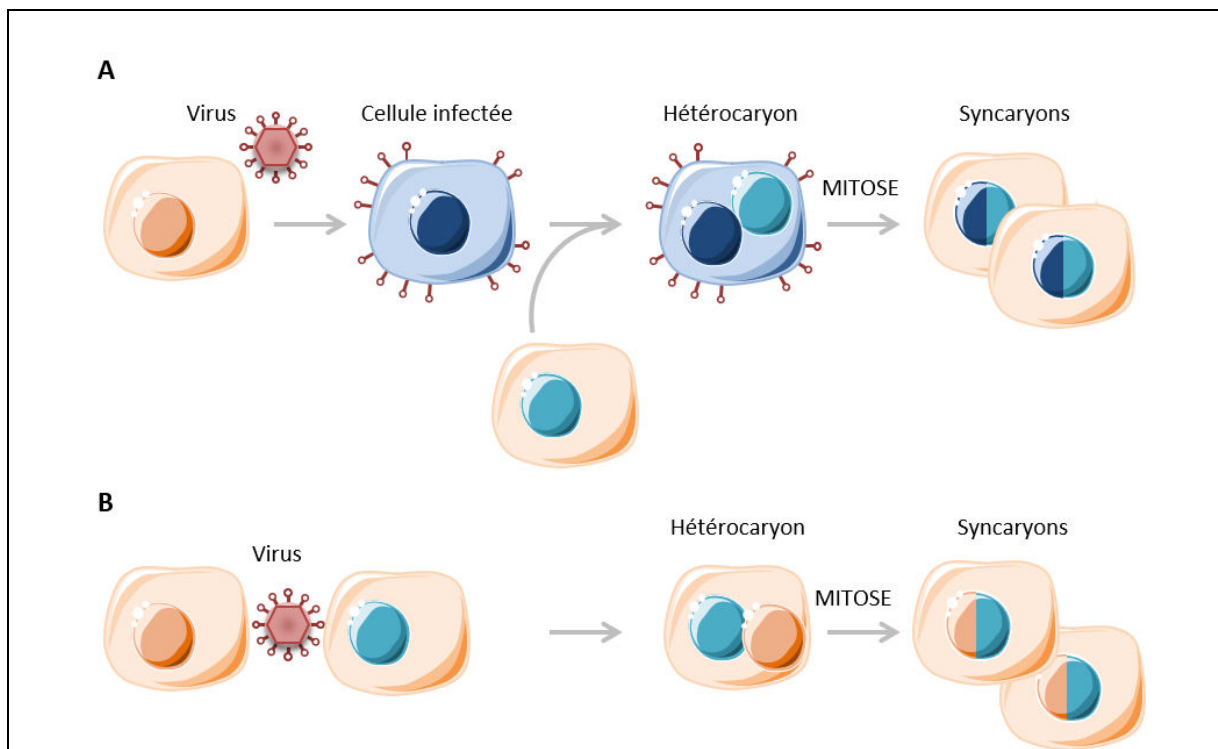


Figure 11 : La fusion cellulaire virale

(A) L'infection virale confère des propriétés fusogéniques à la cellule infectée. La cellule peut alors fusionner avec une seconde cellule exprimant un récepteur aux protéines de fusion, formant ainsi un hétérocaryon. Après un cycle de division, cet hétérocaryon peut alors générer deux cellules filles mononucléées hybrides, ou syncaryons, dont les caryotypes sont un mélange du patrimoine génomique des deux cellules parentales.

(B) Le virus peut servir de « pont » entre deux cellules et entraîner leur fusion, sans les infecter. Ce mécanisme permet également la formation d'un hétérocaryon et de deux syncaryons, suite à un cycle de division. Adaptée de Duelli, 2007.

Cet hétérocaryon peut alors entrer dans un état quiescent ou dans un nouveau cycle de division, générant ainsi deux cellules hybrides tétraploïdes mononucléées ($4n$) ou syncaryons, dont les caryotypes sont différents des cellules fusionnées parentales (**Figure 11A**) (Duelli and Lazebnik, 2007; Ogle et al., 2005; Sottile et al., 2016). Ensuite, un second mécanisme a été décrit dans lequel le virus fait office de « pont » entre deux cellules, sans infecter aucune des cellules, mais pouvant également conduire à l'apparition de deux syncaryons (**Figure 11B**) (Duelli and Lazebnik, 2007).

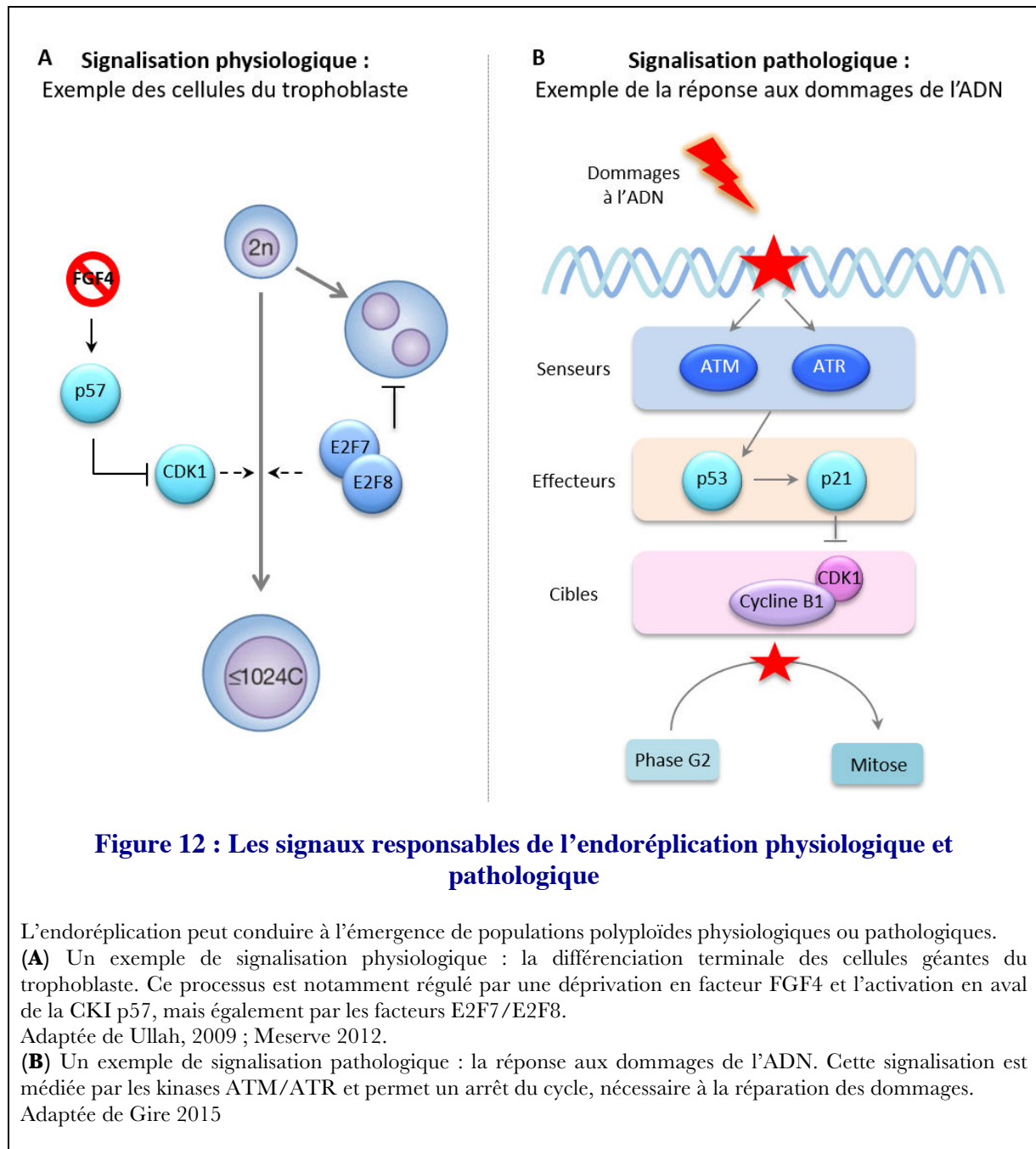
L'émergence de ces populations cellulaires hybrides est cruciale, car elles présentent un fort potentiel oncogénique. En effet, l'injection de ces populations (uniquement hybrides), dans des souris immunodéprimées, favorise le développement tumoral (Duelli et al., 2007). Par ailleurs, de nombreux virus sont aujourd'hui connus pour avoir une activité fusogénique, tels que le virus du papillome humain (HPV), le virus de l'hépatite B ou C, et un potentiel oncogénique (Duelli and Lazebnik, 2007; Gao and Zheng, 2011; Hu et al., 2009; Somiya et al., 2015; Takikawa et al., 2000). Dans le cas du cancer du col de l'utérus, la majorité des patientes présente une infection par le virus HPV. L'expression de l'oncoprotéine HPV-16 E5 est suffisante pour la formation d'une cellule binucléée, issue de la fusion de deux cellules épithéliales du col de l'utérus (Hu et al., 2009). Cet événement est caractéristique de lésions précoces dans le cancer du col de l'utérus, associé à HPV. De plus, l'expression de HPV-16 E6 et E7 provoque une dérégulation majeure du cycle cellulaire et de l'apoptose, via l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur *p53* et *Rb* (Heilman et al., 2009; Incassati et al., 2006). L'expression séquentielle de ces trois oncogènes (HPV-16 E5, E6, E7) participe à l'émergence d'une instabilité chromosomique, hautement associée au processus de carcinogénèse (Gao and Zheng, 2010; Moody and Laimins, 2010; White et al., 1994; Zhao et al., 2016).

2.2 L'endoréplication

L'endoréplication est un cycle cellulaire avorté, sans caryodiérèse (division des chromosomes) ou cytotiérèse (séparation des cellules filles). La mise en place de ces cycles particuliers conduit à la genèse de cellules tétraploïdes mononucléées ($4n$), par omission de la mitose. Deux événements sont essentiels à la mise en place de cycles d'endoréplication : (1) l'inhibition de la transition G2/M, afin d'abolir la mitose et (2) l'oscillation de l'activité des CDK, afin d'initier une nouvelle duplication du génome en l'absence de division cellulaire. Différents mécanismes d'inhibition de la mitose sont d'ores et déjà connus pour favoriser l'endoréplication. L'un des mécanismes est la régulation négative de l'activité mitotique des

complexes Cyclines/CDK par protéolyse, réalisée par l'ubiquitine ligase E3 « Anaphase Promoting Complex/Cyclosome » (APC/C) (Foley and Kapoor, 2013; Lara-Gonzalez et al., 2012; Pines, 2011). Classiquement, le complexe Fizzy-related/Cdh1 (Fzr/Cdh1), régule et dirige l'activité d'APC/C vers les cyclines A et B, en mitose tardive et jusqu'à la phase G1 suivante, ce qui permet d'assurer une sortie de mitose irréversible (Raff et al., 2002; Sigrist and Lehner, 1997; Sudakin et al., 1995). Cependant, certaines cellules retournent ce mécanisme de protection afin de générer des cycles d'endoréplication. En effet, chez la drosophile, d'anciennes études ont montré que le complexe Cycline E/Cdk2 régulait négativement l'activité d'APC/C, via l'inhibition de Fzr/Cdh1 (Sigrist and Lehner, 1997). Ces travaux précurseurs ont permis à Narbonne-Reveau et ses collaborateurs de confirmer par la suite que l'activité cyclique du complexe Cycline E/Cdk2 induit une activité anti-parallèle d'APC/C (Narbonne-Reveau et al., 2008). Ce phénomène permettant d'une part l'inhibition de la mitose et d'autre part de réactiver les origines de réplication au cycle suivant, conduisant à des cycles d'endoréplication successifs (Narbonne-Reveau et al., 2008). Les CDK peuvent également être inhibées par liaison directe aux inhibiteurs de kinase (CKI : CDK inhibitor), certains types cellulaires polyploïdes utilisent ces CKI pour inhiber la mitose et déclencher des cycles d'endoréplication (Ullah et al., 2009). Chez le mammifère, ce mécanisme participe notamment à la genèse des cellules géantes du trophoblaste (TGC). Au cours de la différenciation des cellules, une carence en facteur de croissance fibroblastique 4 (FGF4) induit l'expression de la CKI p57, conduisant notamment à l'inhibition de CDK1 (**Figure 12A**) (Ullah et al., 2008).

Cet événement conduit à l'assemblage du complexe de pré-réplication et par conséquent à une nouvelle activation des origines de réplication (Ullah et al., 2008). Par ailleurs, l'oscillation de p57 permet une alternance entre phase S et phase G, caractéristique de l'endoréplication (Hattori et al., 2000). L'enchaînement des cycles suivants est également contrôlé grâce à l'expression périodique du complexe Cycline E/CDK2 (Parisi et al., 2003). Enfin, des membres de la famille des facteurs de transcription E2F sont également impliqués dans le processus de polyplôidisation des TGC. Les facteurs E2F7 et E2F8 sont requis pour le développement correct du trophoblaste et l'établissement de l'architecture placentaire. Par conséquent, dans un modèle murin transgénique, les placentas déficients pour *E2f7/E2f8* présentent une ploïdie réduite, conduisant à une létalité fœtale (**Figure 12A**) (Chen et al., 2012; Ouseph et al., 2012).



Concernant le rôle du contingent polyploïde dans le trophoblaste, l'étude du groupe de Leone a démontré qu'un trophoblaste polyploïde optimise l'implantation embryonnaire (Chen et al., 2012). Dans la suite de ce chapitre, nous reviendrons sur ces facteurs dont le rôle dans les mécanismes de polyploïdisation ne se limite pas à l'exemple des TGC et s'étend également aux hépatocytes (Meserve and Duronio, 2012).

Au delà de son rôle physiologique, l'endoréplication peut elle participer à la polyploïdisation pathologique ? L'endoréplication pourrait être un mécanisme alternatif à une prolifération délétère, mise en place suite à l'émergence d'une instabilité génomique (Fox and Duronio, 2013). Ainsi ces dernières années, ces mécanismes ont particulièrement été explorés au cours

du cycle de division de lignées transformées, présentant des altérations de la réplication de l'ADN (stress de la réplication) ou de l'intégrité des télomères (Davoli et al., 2010). Des travaux, majoritairement conduits dans des lignées fibroblastiques, ont démontré que des lésions de l'ADN (cassure simple et double-brin), mais également l'attrition des télomères induisent l'activation du programme de « Réponses aux dommages de l'ADN » ou DDR (« DNA Damage Response ») (Ciccina and Elledge, 2010; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Smith et al., 2010). Dans ces systèmes, les dommages sont provoqués *in vitro* notamment par des agents chimiques, tels que la camptothécine et l'étoposide, induisant la formation de cassures simples et doubles brins (Ciccina and Elledge, 2010). L'altération des télomères est, quant à elle, exacerbée par l'inhibition *in vitro* de la protéine POT1a (Protection of telomeres 1A), qui habituellement se lie directement aux télomères afin de les protéger (Davoli and de Lange, 2012; Davoli et al., 2010). Le DDR se caractérise par l'activation de deux kinases senseurs des dommages de l'ADN : Ataxia telangiectasia mutated (ATM) et Ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR). L'activation du DDR provoque un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M, suite à l'activation des protéines p53 et p21 par le couple ATM/ATR, inhibant alors le complexe Cycline B/CDK1 (**Figure 12B**) (Gire and Dulic, 2015; Goldstone et al., 2001; Kim et al., 2015). Cet arrêt du cycle doit permettre la réparation de l'ADN et ainsi la poursuite correcte du cycle de division. Lorsque les dommages sont irréparables, la persistance du DDR finit par induire un arrêt irréversible et la cellule sort finalement du cycle cellulaire en omettant l'étape de mitose (d'Adda di Fagagna, 2008; Herbig et al., 2004; Yosef et al., 2017). La cellule tétraploïde générée a la capacité de ré-entrer dans un nouveau cycle de division, conduisant alors à une polypléidisation par répétition d'événements d'endoréplication (Davoli et al., 2010). Cet état polypléide est considéré comme protecteur, la cellule mononucléée ne réalisant ni caryodiérèse ni cytodiérèse (titration des dommages). Cependant, la perte du point de contrôle du DDR conduira la cellule polypléide à diviser ses chromosomes et dans ce contexte induira de la CIN (Fox and Duronio, 2013).

2.3 Le « Mitotic Slippage »

Durant la mitose, un contrôle précis de la ségrégation des chromosomes est crucial pour le maintien de la stabilité génomique. En effet, une répartition inégale des chromatides sœurs durant l'anaphase, conduit à l'émergence d'une population aneuploïde (Gordon et al., 2012). La séparation correcte des chromosomes dépend de l'interaction dynamique entre les microtubules et les kinétochores, large structure protéique mise en place en mitose au niveau des centromères (Lara-Gonzalez et al., 2012). L'intégrité de cette étape de la mitose est

maintenue grâce au point de contrôle du Spindle Assembly Checkpoint (SAC) (**Figure 13**). Le mécanisme du SAC permet de contrôler l'attachement correct et avec une tension suffisante des microtubules aux kinétochores des chromatides sœurs (Musacchio and Salmon, 2007). Le non-alignement de l'ensemble des chromosomes à la plaque métaphasique déclenche l'activation du SAC, conduisant à un arrêt du cycle en métaphase. Son activation induit la formation d'un complexe protéique appelé : Mitotic Checkpoint Complex (MCC), composé des protéines suivantes BubR1, Bub3, Mad2 et Cdc20 (Sudakin et al., 2001). Conjointement BubR1, Bub3, Mad2 séquestrent Cdc20, inhibant ainsi APC/C, essentiel à la sortie de mitose comme décrit précédemment (*cf.* §II.2.2). L'alignement de l'intégralité des chromosomes entraîne l'extinction du SAC, libérant alors Cdc20 du MCC. Une fois libre, Cdc20 se fixe et active APC/C (**Figure 13**) (Izawa and Pines, 2011). Cet événement a pour conséquence la dégradation par APC/C de : (1) la Cycline B1, induisant la reformation de la membrane nucléaire, (2) la Sécurine, libérant à son tour la Séparase, responsable du clivage des complexes de Cohésine, essentiels au maintien des chromatides sœurs entre elles (**Figure 13**) (Izawa and Pines, 2015; Meadows and Millar, 2015; van Leuken et al., 2008). Il est maintenant clairement établi que dans différents types de lignées cancéreuses une altération de l'attachement des microtubules aux kinétochores conduit à l'activation du SAC.

Le maintien de l'activation du SAC, conduit majoritairement à une mort cellulaire, par un mécanisme appelé catastrophe mitotique (Erenpreisa et al., 2000; Gholkar et al., 2016; McGee, 2015; Nakayama and Inoue, 2016). Toutefois, dans un certain nombre de cas, les cellules contournent le point de contrôle et finissent par sortir de mitose, via le processus de « Mitotic Slippage », générant alors une cellule tétraploïde mononucléée (Dikovskaya et al., 2007). Les événements de « Mitotic Slippage » ont particulièrement été décrits dans le cancer colorectal. Lors de ce processus de tumorigenèse, des cellules tétraploïdes mononuclées apparaissent à des stades précoces de la transformation (Dikovskaya et al., 2007). Il est maintenant clairement établi que les mutations du gène Adenomatous Polyposis Coli (APC) sont responsables de l'émergence de ce contingent polypléide pathologique. La mutation d'APC est la plus fréquente dans le cancer colorectal humain et contribue à la mise en place d'une instabilité génomique requise pour la progression d'un polype bénin vers un carcinome (Green and Kaplan, 2003). La protéine APC est connue pour ses interactions avec les microtubules, notamment avec leurs extrémités « plus », qui interagissent avec les kinétochores (Deka et al., 1998; Juwana et al., 1999; Su et al., 1995; Zumbunn et al., 2001). Dikovskaya et ses collaborateurs ont montré par vidéomicroscopie en temps réel qu'une cellule mutée pour APC quitte le cycle cellulaire à la transition métaphase-anaphase en

reconstituant une enveloppe nucléaire autour du matériel chromosomique tétraploïde. La caractérisation de ce phénotype a démontré : 1) la diminution des protéines du MCC, Bub1 et BubR1, aux kinetochores, 2) une dégradation de la Cycline B1 et 3) un défaut majeur de l'apoptose dans les cellules APC^{-/-} (Dikovskaya et al., 2007).

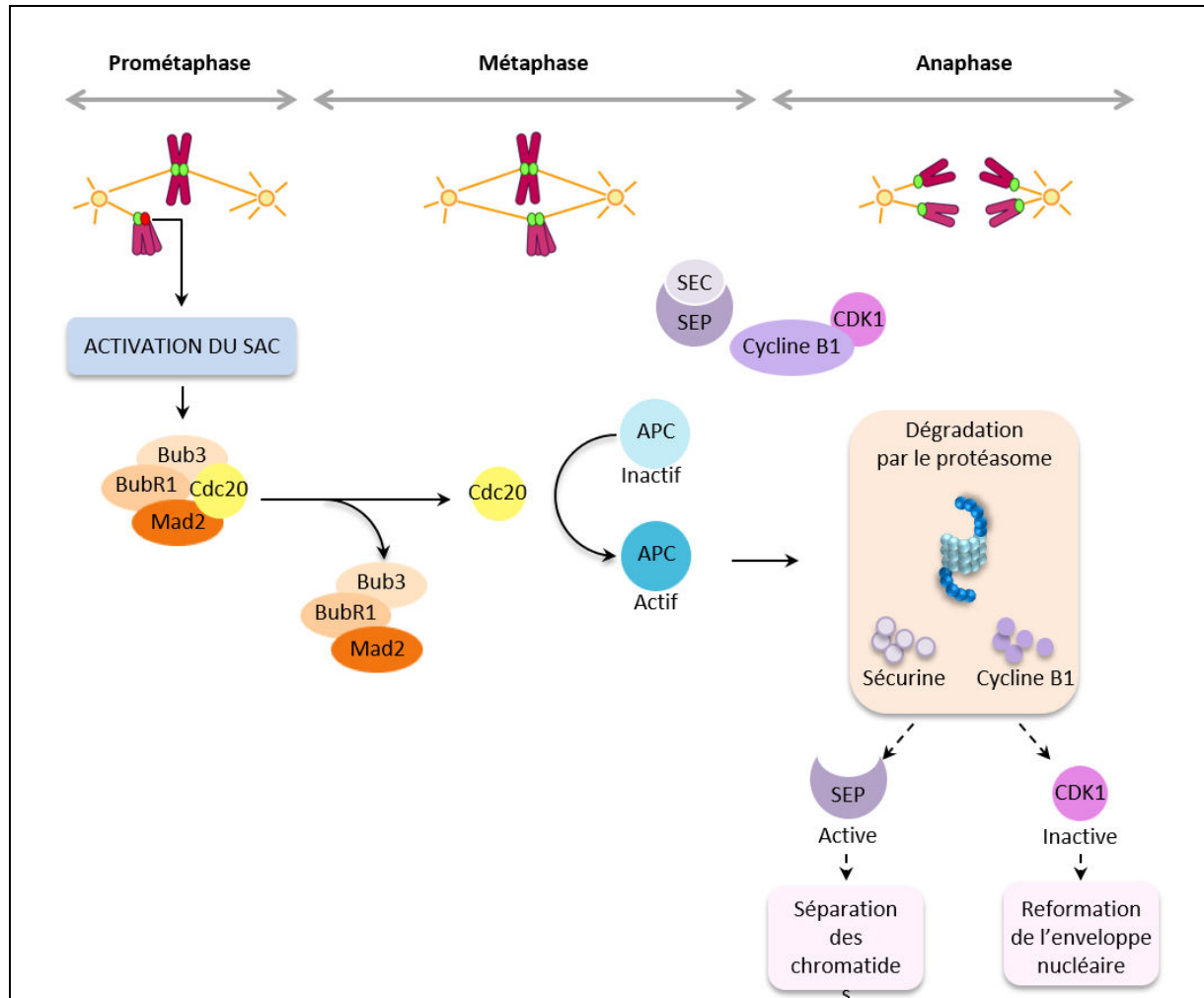


Figure 13 : Le « Spindle Assembly Checkpoint »

L'activation du Spindle Assembly Checkpoint entraîne un arrêt de la mitose transitoire, permettant d'aligner l'ensemble des chromosomes. Ce point de contrôle est initié par l'inactivation d'APC/C. Une fois les chromosomes alignés, l'activation d'APC permet la dégradation de la cycline B et de la sécurine, événements nécessaires à la complétion et la sortie de mitose.

SEC : sécurine ; SEP : séparase

Adaptée de Musacchio 2007.

Paradoxalement, la genèse de cellules tétraploïdes a également été observée suite au traitement par des drogues anti cancéreuses ciblant la dynamique des microtubules (Andreassen and Margolis, 1994; Chamla et al., 1980; Kung et al., 1990; Lee et al., 2010). Ces drogues, telles que les taxanes ou les vinca-alcaloïdes, sont utilisées afin d'empêcher la

prolifération de cellules tumorales, en bloquant leur programme mitotique via l'activation du SAC. Le but ultime de ces traitements est d'éliminer ces cellules en les orientant vers une mort par apoptose (Dumontet and Jordan, 2010; Weaver and Cleveland, 2005). Malheureusement, dans certains cas, le processus de « Mitotic Slippage » prend place et entraîne l'émergence d'un contingent tétraploïde (Cheng and Crasta, 2017). Dans un système où les mécanismes d'apoptose sont endommagés (exemple : mutation p53), ces populations polyploïdes peuvent alors proliférer et contribuer à l'installation d'une l'instabilité chromosomique. Ces événements remettent donc en cause l'efficacité totale de certains traitements (He et al., 2016; Sudo et al., 2004). Fait intéressant, une étude très récente a également montré que l'expression de l'oncoprotéine HPV-16 E6, dans une lignée cellulaire humaine, provoque un arrêt prolongé en mitose, dû à une mauvaise ségrégation des chromosomes. Ces cellules finissent par échapper à cet arrêt par un mécanisme de « Mitotic Slippage » et générer des cellules polyploïdes et aneuploïdes (Shirnekhi et al., 2017).

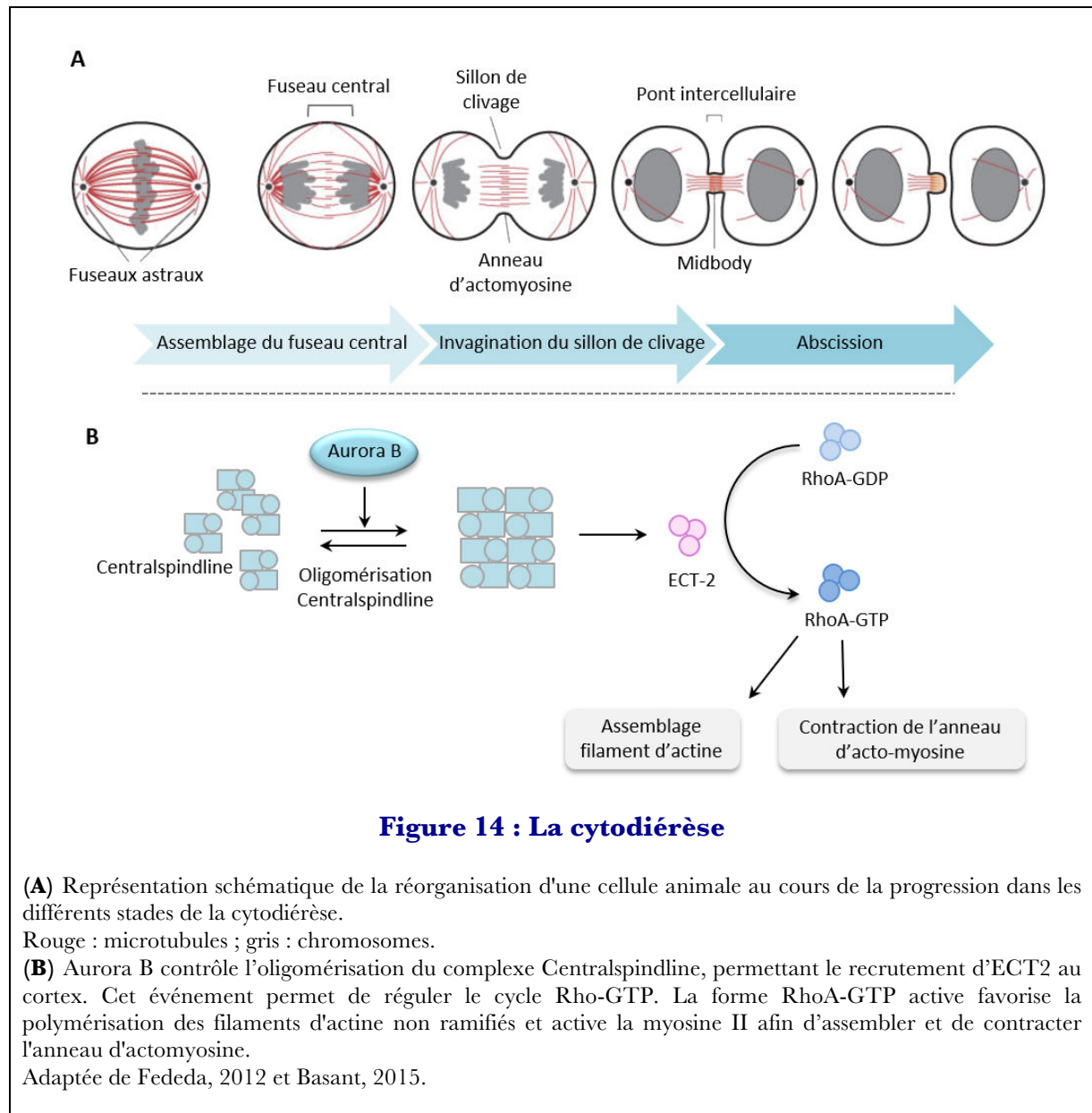
2.4 La cytotiérèse incomplète

La cytotiérèse est l'étape finale de la division cellulaire, conduisant à la séparation physique des deux cellules filles. Ce processus, initié en anaphase, est finement régulé par des mécanismes moléculaires stricts, afin de permettre la séparation en deux cellules filles identiques. Quatre étapes régissent le déroulement correct de la cytotiérèse : (1) positionnement du plan de division, (2) formation de l'anneau contractile, (3) formation du « Midbody » et (4) abscission (**Figure 14A**) (D'Avino et al., 2015; Schwyer et al., 2016).

Un nombre important de facteurs régit ces étapes et une défaillance de l'une d'entre elles conduit à la genèse d'une cellule tétraploïde binucléée ($2 \times 2n$) (Fujiwara et al., 2005; Lacroix and Maddox, 2012).

La cytotiérèse repose sur une réorganisation majeure du cytosquelette d'actine et notamment l'assemblage d'un fuseau central, induit par l'oligomérisation du complexe « Centralspindlin », contrôlée par Aurora B (Basant et al., 2015; Hutterer et al., 2009). Le complexe peut alors recruter au cortex la protéine Ect2 (Guanine Nucléotide Exchange Nucleotide Factor ou GEF), permettant l'activation de la GTPase RhoA (Ras homolog gene family, member A) (**Figure 14B**) (Kim et al., 2005; Tatsumoto et al., 1999; Yuce et al., 2005). L'apparition de RhoA activée au cortex déclenche la formation de l'anneau, par assemblage de filaments d'actine, mais également la contraction de cet anneau, suite à l'activation du moteur moléculaire Myosine II (Fededa and Gerlich, 2012; Glotzer, 2005). Cette contraction engendre la formation d'un pont intercellulaire et du « Midbody », riche en

microtubules issus de la compaction du fuseau central. L'étape d'abscission finalise la cytotiérèse et constitue également un enjeu pour la polypléidisation (**Figure 14A**).



Physiologiquement, la cytotiérèse incomplète contribue au développement de certains tissus, notamment le cœur, la moelle osseuse ou le foie (Li et al., 1997b; Margall-Ducos et al., 2007; Zimmet and Ravid, 2000). Dans le cœur, ce programme de polypléidisation permet la binucléation des cardiomyocytes au cours du développement post-natal (Clubb and Bishop, 1984). Durant l'embryogenèse, le développement du cœur entraîne une prolifération des cardiomyocytes, phase d'hyperplasie. Puis, après la naissance, une amplification du flux sanguin induit une réponse adaptative du volume, phase d'hypertrophie (Li et al., 1997a; Oparil et al., 1984). Cette transition de l'hyperplasie à l'hypertrophie est clairement associée à

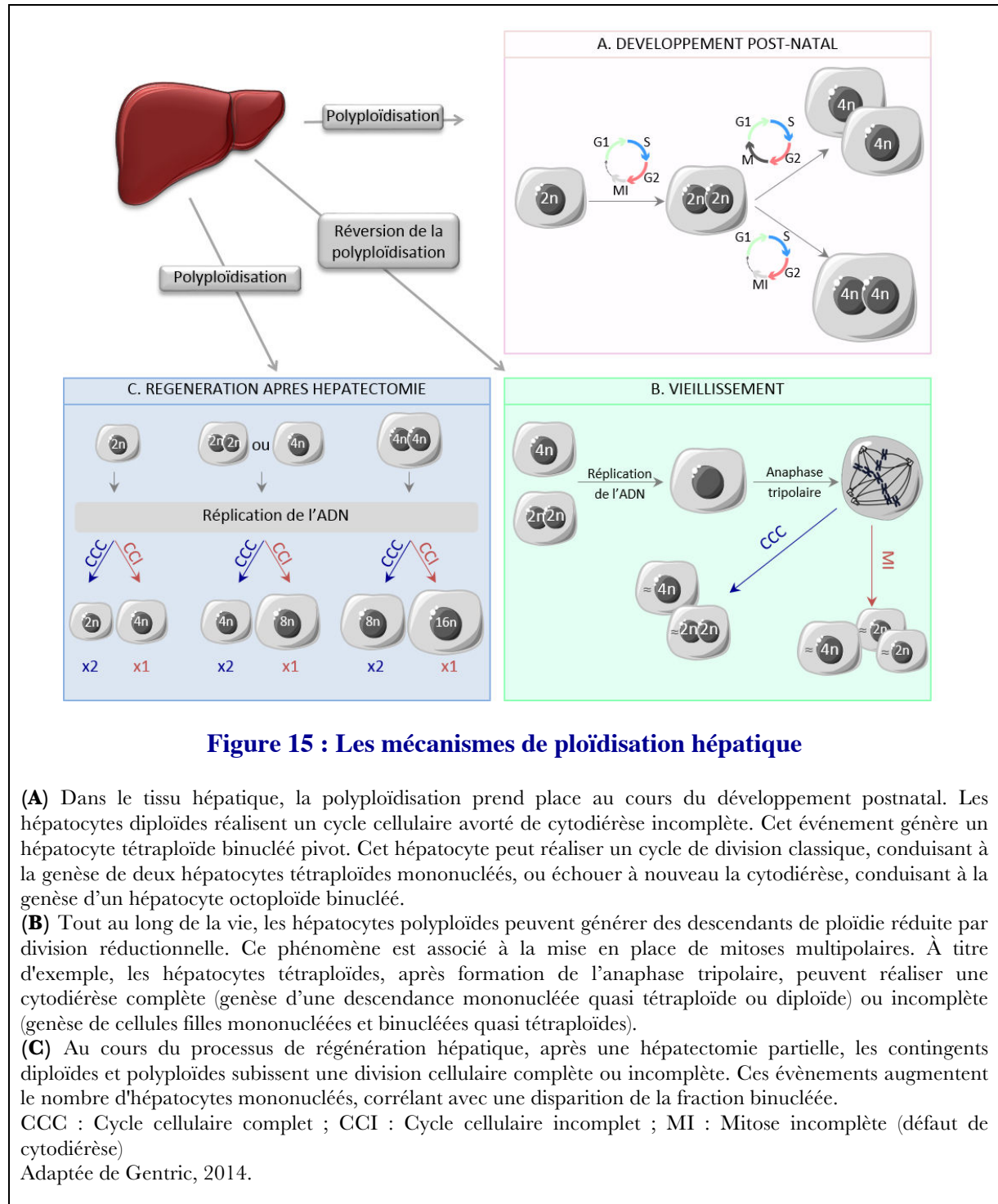
la tétraploïdisation des cardiomyocytes (Clubb and Bishop, 1984). Il y a vingt ans, ce phénomène a été relié à des événements de cytotdiérèse incomplète, dus notamment au maintien du « Midbody » (Li et al., 1997b; Li et al., 1997c). Bien que l'anneau d'actomyosine soit correctement formé, le désassemblage incomplet du « Midbody » et la présence de microtubules dans le sillon de clivage entravent physiquement la contraction efficace de l'anneau (Li et al., 1997b; Li et al., 1997c). D'autres études ont permis de compléter la mécanistique de ce processus. En effet, des facteurs, notamment impliqués dans la formation de l'anneau, sont drastiquement réduits dans ces cardiomyocytes, tels que RhoA, Rac1 ou encore les Rho-associated kinases (ROCK I et II) (Ahuja et al., 2007). Plus récemment, la Cycline G1 a été identifiée comme un élément important de la machinerie moléculaire contrôlant ce processus. Liu et ses collaborateurs ont montré, dans des cardiomyocytes néonataux de rat, que la surexpression de la Cycline G1 accélère la transition G1/S, mais retarde la mitose et finalement réprime la cytotdiérèse (Liu et al., 2010b). De façon intéressante, il a été montré que la polyplôidisation cardiaque facilite la contraction du cœur suite à un infarctus du myocarde (Pandit et al., 2013). Un second exemple de polyplôidisation physiologique, par cytotdiérèse incomplète, est le mégacaryocyte (MC). Durant leurs cycles de division, les MC progressent en anaphase et en télophase, mais échappent à la cytotdiérèse. Ce phénotype fait suite à une absence de recrutement de la Myosine II et donc à un défaut de l'anneau contractile (Lordier et al., 2008; Roy et al., 2016). La ploïdie des MC peut atteindre 128n, ces cellules enchainent donc plusieurs cycles de cytotdiérèse incomplète. Initialement, leur polyplôidisation s'installe suite à une activation partielle de RhoA. Plus tard, lorsque la ploïdie est plus importante, une défaillance sévère de l'activité focale de RhoA inhibe la formation du sillon de clivage (Lordier et al., 2008). Enfin, une surexpression de la Cycline E promeut l'entrée des mégacaryocytes en phase S, permettant l'augmentation du nombre de cycles aberrants et donc de la ploïdie (Eliades et al., 2010). Mais finalement, quel intérêt pour les mégacaryocytes d'acquies cet état de polyplôidie ? Ces cellules hématopoïétiques sont à l'origine de la production de plaquettes par fragmentation de leur cytoplasme. La polyplôidie étant également associée à une augmentation de la taille cellulaire, son amplification dans les MC est corrélée avec une formation accrue de plaquette (Chagraoui et al., 2011; Raslova et al., 2007). D'autre part, l'analyse différentielle des profils d'expression géniques, en fonction des diverses populations polyplôides des MC (2N à 16N), a mis en évidence la surexpression d'une cinquantaine de gènes, majoritairement impliqués dans les mécanismes de formation des plaquettes (Raslova et al., 2007). La polyplôidie physiologique de ces cellules est donc clairement associée à un gain de fonction.

A contrario, une cytodierèse incomplète « pathologique » peut être provoquée par une mauvaise ségrégation chromosomique, telle que la présence de chromosomes trainants (« lagging chromosomes ») ou de ponts chromosomiques au site de clivage (Mullins and Biesele, 1977; Nakayama et al., 2017; Shi and King, 2005; Vinciguerra et al., 2010). Au cours de la contraction de l'anneau, un chromosome piégé aura pour conséquence l'inhibition de l'abscission et ainsi la création d'une cellule tétraploïde ($2 \times 2n$) (Nakayama et al., 2017; Shi and King, 2005). Aurora B est un régulateur clé de l'« Abscission Checkpoint » et rythme la progression du processus afin d'éviter une tétraploïdisation. Dans le cas où un lagging chromosome s'attarde au site de clivage, Aurora B reste active afin de retarder l'abscission et de stabiliser le pont intercellulaire (Steigemann and Gerlich, 2009; Steigemann et al., 2009). Fait intéressant, la surexpression d'Aurora B corrèle avec un mauvais pronostic dans un nombre important de cancers, tels que le cancer du sein, du poumon, de l'ovaire ou du foie (Chen et al., 2009; Tanaka et al., 2008; Xia et al., 2015; Zhang et al., 2015). Toutefois, ces cellules tétraploïdes, formées suite à une cytodierèse incomplète, sont généralement éliminées par apoptose (Castedo et al., 2006; Ganem and Pellman, 2007; Vinciguerra et al., 2010). Comme nous l'avons précédemment décrit, ces systèmes de protection ne sont pas infaillibles et finalement certaines cellules peuvent échapper à cette mort programmée. La polyploïdie peut alors dériver vers une aneuploïdie, dont le potentiel oncogénique a largement été décrit (Davoli and de Lange, 2011; Fujiwara et al., 2005; Ganem et al., 2007).

3. La polyploïdisation du foie

La polyploïdie est l'une des caractéristiques particulières du tissu hépatique (Epstein, 1967; Wilson and Leduc, 1948). Au cours du développement post-natal, le parenchyme hépatique subit des changements majeurs notamment caractérisés par une polyploïdisation graduelle (Epstein, 1967; Gerlyng et al., 1993; Naora, 1957). Ce processus entraîne l'émergence de populations hépatocytaires de différentes classes de ploïdie, suite à la mise en place de cycles de division modifiés (Guidotti et al., 2003; Nadal and Zajdela, 1967). Majoritairement, le foie est composé d'hépatocytes tétraploïdes et octoploïdes, avec un noyau (mononucléés $2n$ ou $4n$) ou deux noyaux (binucléés $2 \times 2n$ ou $2 \times 4n$) (Epstein, 1967; Gerlyng et al., 1993; Naora, 1957). Les hépatocytes, chez l'adulte humain ou rongeur, ont une durée de vie longue, de 200 à 300 jours, et se divisent rarement en conditions optimales (Bucher and Malt, 1971; Wang et al., 2017). Toutefois, ces cellules conservent un potentiel de prolifération en réponse à certains stimuli ou lésions tissulaires (résection, repopulation, toxine, infection

virale). Dans ces conditions le profil de ploïdie hépatocytaire est largement modifié (Madra et al., 1995; Toyoda et al., 2005; Wang et al., 2017; Wang et al., 2014a). Bien que la polyplôidie des hépatocytes soit décrite depuis bientôt un siècle, la signification de cet état polyplôïde dans l'homéostasie, la régénération ou la pathologie hépatique demeure aujourd'hui peu comprise. Dans cette partie, nous explorerons les mécanismes à l'origine de la polyplôidie hépatocytaire durant le développement physiologique ainsi que ses modulations au cours du vieillissement et de processus pathologiques (Figure 15).



3.1 La polyplœdie au cours du développement post natal

Le degré de polyplœdisation du parenchyme hépatique varie d'un mammifère à l'autre. En effet, les hépatocytes de rat sont polyplœides à 70-80% et chez la souris à 80-90% (Margall-Ducos et al., 2007; Wang et al., 2014a). Chez l'Homme adulte, 40% des hépatocytes sont polyplœides et le processus de polyplœdisation prend place au cours des 5 premières années de vie (Kudryavtsev et al., 1993; Seglen, 1997). A la naissance, chez le rat, tous les hépatocytes sont également diploïdes et la polyplœdisation débute à partir de la 3^{ème} semaine de vie. Pour la première fois, notre équipe a décrit que le mécanisme principal de polyplœdisation au cours du développement post-natal du foie est la cytotièrèse incomplète (Guidotti et al., 2003). A cette étape du développement, un hépatocyte diploïde ($2n$) peut engendrer deux hépatocytes diploïdes ($2n$) suite à une cytotièrèse complète ou un seul hépatocyte tétraploïde binucléé ($2 \times 2n$) résultant d'un événement de cytotièrèse incomplète (Guidotti et al., 2003). Cet hépatocyte pivot ($2 \times 2n$) est à l'origine de la polyplœdisation de l'ensemble du tissu (**Figure 15A**). Cette cellule binucléée tétraploïde conserve la capacité de ré-entrer dans un cycle de division et peut ainsi générer : soit (1) deux cellules filles tétraploïdes mononucléées ($4n$) au cours d'un cycle conventionnel, avec une cytotièrèse complète ; soit (2) une cellule unique octoploïde binucléée ($2 \times 4n$) suite à un second événement de cytotièrèse incomplète (**Figure 15A**) (Gentric and Desdouets, 2014). Notons que dans le foie lors de la division des contingents polyplœides, le regroupement des centrosomes permet de maintenir l'intégrité génomique (cf. §II.1.) (Guidotti et al., 2003). De cette façon, la polyplœdisation apparaît progressivement dans le parenchyme hépatique avec la formation d'hépatocytes tétraploïdes et octoploïdes avec un ou deux noyaux. Les travaux menés par notre équipe ont également établi que ce phénomène de cytotièrèse incomplète prend place au cours de la transition allaitement/sevrage, dû à une augmentation du taux d'insuline (Celton-Morizur et al., 2009). Cette étude a notamment montré, chez le rat, que l'injection répétée d'insuline à la transition allaitement/sevrage augmente la population hépatocytaire tétraploïde binucléée. A l'inverse, l'injection de streptozotocine (cytotoxique pour les cellules β du pancréas), avant le sevrage, conduit à une réduction drastique du taux d'insuline circulante, associée à une diminution de ce contingent (Celton-Morizur et al., 2009). Notre équipe a également établi que la signalisation insulinique contrôle ce processus en régulant la voie Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Protein kinase B (AKT) (Celton-Morizur et al., 2009). *In vitro*, en culture primaire d'hépatocytes de rat, l'activation de la voie PI3K/AKT contrecarre la formation de l'anneau contractile, notamment par une absence de réorganisation du cytosquelette dans le

plan de division (Margall-Ducos et al., 2007). En parallèle, les microtubules sont également incapables de contacter le cortex. Par conséquent, les signaux moléculaires, tels qu'Aurora B, ne sont pas transmis, compromettant l'activation de RhoA au cortex et donc la cytodierèse (Margall-Ducos et al., 2007). D'autres signaux peuvent également participer à la polyplôidisation du foie, notamment les facteurs E2F (Chen et al., 2012; Pandit et al., 2012). La polyplôidie hépatique est contrôlée de façon antagoniste par E2F1 (activateur) et E2F8 (répresseur). En effet, la délétion d'E2F8, spécifiquement dans le foie au cours du développement post-natal murin, empêche la polyplôidisation du tissu hépatique en provoquant la cytodierèse. Le tissu hépatique de ces souris présente une diminution du contingent binucléé et demeure majoritairement diploïde. En revanche, la délétion d'E2F1 favorise la polyplôidisation en inhibant drastiquement la cytodierèse (Chen et al., 2012; Pandit et al., 2012). Ainsi, ces deux facteurs régulent de façon antagoniste des programmes transcriptionnels impliquant des gènes de la cytodierèse, intervenant particulièrement dans le contrôle du réseau d'actine et de microtubules (Pandit et al., 2012). Plus récemment, une étude a révélé l'importance du micro-ARN, miR-122, dans le processus de polyplôidisation post-natal (Hsu et al., 2016). Dans un modèle murin, la perte de miR-122, spécifiquement dans le foie, conduit à une réduction drastique du contingent binucléé au 28^{ème} jour de vie et ce tout au long de la vie (Hsu et al., 2016). Par ailleurs, la réexpression de miR-122 dans ces souris suffit à restaurer le défaut de binucléation, de même, *in vitro*, la surexpression de miR-122 stimule la binucléation d'hépatocytes contrôles diploïdes (Hsu et al., 2016). Fait intéressant, différentes cibles de miR-122 sont impliquées dans la progression de la cytodierèse, ce dernier inhibe notamment RhoA (cible directe) (Hsu et al., 2016; Wang et al., 2014b) et le complexe Centralspindlin (cible indirecte) (Hsu et al., 2016; Xu et al., 2010). De façon surprenante, un lien entre miR-122 et cancer du foie a été mis en évidence dans différentes études (Burchard et al., 2010; Kutay et al., 2006; Qiao et al., 2017; Tsai et al., 2009; Tsai et al., 2012). Finalement, différents signaux (insuline, facteurs E2F, miR122) sont indispensables à l'établissement de la polyplôidie au cours du développement hépatique. Toutefois, de nouvelles études seront nécessaires pour comprendre comment ces acteurs interagissent entre eux afin de contrôler le programme de cytodierèse incomplète dans les hépatocytes.

3.2 La polyplôidie : Vieillesse & Sénescence

Une seconde vague de polyplôidisation a lieu au cours du vieillissement. La fraction polyplôïde passe chez l'humain de 15% à l'âge de 20 ans à 42% à 80 ans (Kudryavtsev et al.,

1993). Par ailleurs, le pourcentage d'hépatocytes octoploïdes murins est de 17% à deux mois et s'élève à 34% à 18 mois (Wang et al., 2014a). La polyploïdie hépatocytaire liée à l'âge est considérée comme une manifestation d'un état de sénescence. En effet, la capacité de régénération est largement diminuée au cours du vieillissement (Beyer et al., 1991; Fry et al., 1984). Par le passé, une étude a montré que les hépatocytes polyploïdes, générés suite à une HP, présentent une capacité proliférative restreinte ainsi que des marques de sénescence, telles que l'expression de p21 et de la β -galactosidase (Gupta, 2000; Sigal et al., 1999). Les auteurs de ces études ont alors fait le lien entre polyploïdie et sénescence. Toutefois, cette théorie a été remise en question suite à différentes études réalisées dans des modèles murins de repopulation hépatique (Duncan et al., 2010; Wang et al., 2014a; Weglarz et al., 2000). Ces systèmes reposent sur la transplantation d'hépatocytes sains dans des modèles de souris transgéniques, dans lesquels les hépatocytes résidents sont continuellement détruits, par un transgène toxique (souris uPA - Urokinase plasminogen activator) ou par un défaut constitutif d'une enzyme du cycle de l'urée (souris *Fah*^{-/-}). Cette cytolyse induit donc un stimulus de prolifération, conférant un avantage prolifératif aux hépatocytes transplantés. Les premiers résultats, obtenus indépendamment de l'âge, ont établi que les hépatocytes diploïdes et octoploïdes prolifèrent de façon équivalente et permettent le repeuplement du foie de souris uPA (Weglarz et al., 2000) et *Fah*^{-/-} (Duncan et al., 2010). Plus récemment, ces données ont été complétées grâce à une étude réalisée sur des hépatocytes de souris âgées (18 mois) (Wang et al., 2014a). Ainsi, Wang et ses collaborateurs ont constaté que ces hépatocytes accumulent des marqueurs de sénescence, tels que p16, p21 ou des dommages de l'ADN, particulièrement dans le contingent octoploïde (Wang et al., 2014a). La transplantation d'hépatocytes « âgés », dans des souris *Fah*^{-/-}, entraîne le même degré de repeuplement du foie, comparativement à la transplantation d'hépatocytes « jeunes » (2 mois). Par ailleurs, les hépatocytes octoploïdes « âgés » seuls, bien qu'ayant un taux de prolifération initiale plus faible, ont la capacité de repeupler le foie de souris *Fah*^{-/-}, de la même façon qu'un contingent octoploïde « jeune » (Wang et al., 2014a). Finalement, l'analyse des hépatocytes repeuplés a montré que les cellules octoploïdes génèrent des cellules filles diploïdes et tétraploïdes, suite à la formation de fuseaux multipolaires en mitose (**Figure 15B**). Ce phénomène démontre l'existence d'un mécanisme de réversion de la polyploïdie, permettant à des hépatocytes sénescents de « rajeunir » et d'augmenter leur capacité de prolifération (Wang et al., 2014a). De façon intéressante, la réversion de la polyploïdie avait déjà été décrite dans d'autres études (Duncan et al., 2009; Duncan et al., 2010). A ce jour, aucune étude n'a pu clairement établir si la polyploïdisation est à l'origine de cet état de sénescence, ou à l'inverse si l'acquisition de marqueurs de

sénescence permet l'installation de cette seconde polyplôidie, liée à l'âge. Finalement, l'idée que la polyplôidie est associée à un état sénescence ne paraît donc pas si simple. Au regard de la littérature, la capacité proliférative de ce contingent semblerait dépendre de la nature du signal de prolifération et du type de dommages infligés au tissu hépatique, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

3.3 La polyplôidie : Stress & Lésions hépatiques

Comme précédemment évoqué, chez le rongeur et l'Homme adulte, les hépatocytes ont une longue durée de vie et se divisent rarement en conditions physiologiques. Cependant, ces cellules conservent une capacité remarquable à proliférer en réponse à une lésion tissulaire massive, induite par une résection chirurgicale, une exposition à des toxines ou encore une infection virale. Dans ces circonstances, le profil de polyplôidie du foie est largement modifié. Chez la souris et le rat, la régénération hépatique, induite par une hépatéctomie partielle, est associée à une disparition des contingents diploïdes et binucléés. A l'inverse, les populations d'hépatocytes polyplôïdes mononucléés sont drastiquement augmentées (**Figure 15C**) (Gerlyng et al., 1993; Sigal et al., 1999). Récemment, l'équipe de Miyajima s'est intéressée aux modifications de la ploïdie suite à des résections hépatiques de 30% et 70%. Dans cette étude, des approches de lignage cellulaire et un système d'imagerie à haut débit ont permis de tracer les populations en fonction de leur ploïdie au cours de la division (Miyaoaka et al., 2012). Durant la régénération hépatique, après HP de 70%, l'ensemble des hépatocytes (mononucléés et binucléés) entre dans le cycle cellulaire. Cependant, tous les hépatocytes ne finalisent pas leur division, suggérant la mise en place de cycles cellulaires avortés, suite à l'hépatéctomie. Les auteurs suggéraient que seule une fraction d'hépatocytes initie la mitose (**Figure 15C**). Plus important encore, le contingent binucléé réalise un cycle de division complet, avec cytodierèse, générant ainsi des hépatocytes mononucléés et pouvant expliquer la disparition du contingent binucléé (Miyaoaka et al., 2012) Remarquablement, après HP de 30%, la régénération est réalisée uniquement par hypertrophie cellulaire sans prolifération. Dans ce cas, la ploïdie hépatocytaire n'est pas modifiée (Miyaoaka et al., 2012). Chez l'adulte, la polyplôidie hépatique est également bouleversée par différents stress cellulaires, comme la surcharge métabolique (fer ou cuivre) (Madra et al., 1995; Muramatsu et al., 2000; Yamada et al., 1998), l'attrition des télomères (Lazzerini Denchi et al., 2006) et l'infection chronique par l'hépatite B et C (Toyoda et al., 2005; Toyoda et al., 2006). Les lésions oxydatives peuvent également jouer un rôle dans la polyplôidie hépatocytaire. En effet, Gupta et ses collègues ont démontré, au cours de la régénération après HP, que les variations de la polyplôidie sont

associées à des lésions oxydatives de l'ADN (Gorla et al., 2001). Il est intéressant de noter que les souris transgéniques, sur-exprimant des enzymes anti-oxydantes, présentent une diminution de la polyplœdisation induite par HP (Nakatani et al., 1997). En conclusion, il existe, dans le foie adulte, une corrélation entre des modulations de la polyplœdie et une variété de stress cellulaires. Cependant, les mécanismes conduisant à la genèse d'hépatocytes polyplœides et les conséquences sur la fonction du parenchyme hépatique restent, à ce jour, inconnus.

4. Quel rôle pour la polyplœdie dans le foie ?

Au cours des paragraphes précédents, nous nous sommes attachés à démontrer que le tissu hépatique modifie son profil de ploïdie au cours d'évènements physiologiques et pathologiques. Toutefois, ces modifications ne sont-elles que la manifestation d'une croissance physiologique sinon d'agressions du tissu hépatique, ou ces cellules ont-elles une véritable fonction ? A ce jour, la signification biologique de la polyplœdisation du foie demeure encore énigmatique. Différentes hypothèses ont cependant été proposées, dont certaines ont d'ores et déjà été en partie validées.

4.1 Première hypothèse : Etat de sénescence

La première hypothèse suggère que la polyplœdie hépatique est associée à la maturité des hépatocytes et l'acquisition d'un état de différenciation terminale. La sénescence des hépatocytes polyplœides serait alors un mécanisme cellulaire protecteur. Ainsi, ces hépatocytes conservent leurs propriétés biologiques, mais demeurent dans un état non prolifératif. Ce phénomène peut être un enjeu majeur notamment en conditions pathologiques, suite à un stress ou à des lésions tissulaires, évitant alors une prolifération non contrôlée de ces cellules. Toutefois, comme décrit précédemment (*cf.* §II.3.2), différentes études ont déjà démontré que la polyplœdisation dans un foie sain « jeune » ne serait pas un marqueur de différenciation terminale. En effet, les hépatocytes polyplœides conservent les mêmes propriétés prolifératives que des hépatocytes diploïdes, que ce soit dans un processus de régénération suite à une hépatectomie (Pandit et al., 2012) ou au cours d'expériences de repopulation (Duncan et al., 2010; Wang et al., 2014a). Ces hépatocytes polyplœides ne présentent donc aucun signe de sénescence. Wang et ses collaborateurs suggèrent que des stigmates de la sénescence apparaissent dans des hépatocytes plus « vieux ». Les auteurs ont également rapporté que ce phénotype était exacerbé dans le contingent hépatocytaire octoploïde, associé à une

diminution de leur capacité proliférative (Wang et al., 2014a). L'ensemble de ces travaux a donc permis de suggérer que dans un état physiologique, la sénescence des hépatocytes polyploïdes est associée au vieillissement. La question reste ouverte en conditions pathologiques.

4.2 Deuxième hypothèse : Gain de fonction

La seconde hypothèse reposait sur le fait que la polyploïdisation du foie pourrait accroître les capacités fonctionnelles des hépatocytes. Cet organe participe à un large éventail d'activités liées à la synthèse et la sécrétion de protéines, au métabolisme et la détoxification. La polyploïdie pourrait permettre une amplification de deux à quatre fois de l'expression de gènes/protéines et développer particulièrement certaines fonctions métaboliques, créant ainsi un « super hépatocyte ». Initialement, les travaux de Lu et ses collaborateurs semblaient réfuter cette hypothèse. En effet, l'analyse différentielle de profils d'expression d'hépatocytes diploïdes et polyploïdes (4n et 8n) a mis en évidence seulement 50 gènes candidats différemment exprimés. Ces derniers étant impliqués dans une variété de processus biologiques (Lu et al., 2007). Toutefois, l'analyse des génomes de tissus hépatiques, présentant différents niveaux de polyploïdie, a mis en évidence un lien entre polyploïdie et expression génique associée à la survie cellulaire, la réparation de l'ADN, l'hypoxie ou le stress oxydatif (Anatskaya and Vinogradov, 2007, 2010). Ces deux études d'Anatskaya ont donc permis de confirmer que le statut polyploïde du foie permet d'augmenter et de spécifier les capacités fonctionnelles du tissu. Ces travaux soutiennent l'idée qu'un tissu polyploïde peut moduler ses fonctions, ceci ayant déjà été démontré notamment dans le cœur et la moelle osseuse, respectivement avec les contingents polyploïdes des cardiomyocytes et des mégacaryocytes.

4.3 Troisième hypothèse : Economie d'énergie

Cette théorie repose sur l'idée qu'un cycle de division court permet un gain d'énergie pour la cellule. En effet, les événements de cytodierèse incomplète (développement post-natal) ou d'endoréplication (régénération après HP) permettent potentiellement une économie en ressources énergétiques, en échappant à la mitose. Ce phénomène peut être particulièrement bénéfique notamment lors d'une croissance tissulaire importante et rapide. Dans le cas du tissu hépatique, la transition allaitement/sevrage est une période de forte consommation énergétique, associée à d'importantes modifications du métabolisme lipidique, glucidique, hormonal et du taux de prolifération (Celton-Morizur et al., 2009). Pandit et ses

collaborateurs ont ainsi suggéré que la polypléidisation hépatique permettrait de maintenir la balance énergétique (Pandit et al., 2013). Les travaux d'Anatskaya étayent cette idée et suggèrent que la polypléidie permettrait au foie de passer en « mode économie d'énergie ». Au cours de l'étude transcriptomique différentielle, comparant des tissus hépatiques de pléidie différente, Anatskaya et ses collaborateurs ont démontré que la signature polypléide est associée à une production d'énergie anaérobie et à une production d'ATP provenant plutôt des glucides que des acides gras (Anatskaya and Vinogradov, 2010). Ces résultats ont été soutenus par les travaux plus récents du groupe Mikael Björklund. Afin d'étudier *in vivo* les effets d'une augmentation globale de la polypléidie hépatocytaire, cette équipe a généré un modèle murin d'extinction de la kinase mitotique Cdk1, spécifiquement dans les hépatocytes (Miettinen et al., 2014). Ces souris présentent une augmentation de la taille des hépatocytes, ainsi que du contenu génomique suite à un phénotype d'endoréplication. Ce phénotype est fortement exacerbé au cours de la régénération, suite à une hépatectomie partielle. L'augmentation de la polypléidie, après HP, est fortement associée à une réduction de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des lipides et à une glycolyse accrue. D'autre part, ces foies hautement polypléides arborent une forte diminution de l'expression de gènes mitochondriaux, qu'ils soient codés par le génome mitochondrial ou nucléaire (Miettinen et al., 2014). Dans les hépatocytes polypléides, l'activité mitochondriale est réduite et la production d'ATP est donc compensée par une activité glycolytique améliorée, entraînant un remodelage métabolique substantiel. Finalement, cette reprogrammation est également associée à une limitation de la prolifération hépatocytaire (Miettinen et al., 2014).

4.4 Quatrième hypothèse : Maintien de l'intégrité génomique

Finalement, la quatrième hypothèse suggère que la polypléidie serait protectrice contre le stress oxydatif ainsi que des dommages génomiques. Le foie étant responsable de la métabolisation et l'élimination de composés toxiques, une telle fonction serait particulièrement bénéfique pour cet organe. L'acquisition de plusieurs lots de chromosomes, au cours de la polypléidisation, pourrait atténuer l'effet de mutations inactivatrices, induites par des agents causant des dommages à l'ADN. Lors de l'élimination de xénobiotiques ou suite à une consommation excessive d'alcool, le foie peut effectivement subir des mutations ponctuelles de l'ADN (Seitz and Stickel, 2007). Ces dernières pourraient alors toucher aléatoirement des gènes suppresseurs de tumeurs, tels que *p53* ou *Rb*. Les conséquences de ces événements pourraient être délétère pour la cellule, mais également pour l'organisme. Toutefois, une cellule tétraploïde ou octoploïde, ayant deux à quatre allèles supplémentaires,

pourrait alors entretenir les fonctions cellulaires associées. Fait intéressant, les cellules tumorales diploïdes, se divisant rapidement, sont plus facilement mutées et augmentent la malignité (Seglen, 1997; Tormos et al., 2015). D'autre part, l'étude d'Anatskaya a également montré que les tissus hépatiques polyploïdes présentent une induction de gènes impliqués dans la lutte contre les pathogènes, les lésions à l'ADN ainsi que le stress oxydatif (Anatskaya and Vinogradov, 2007, 2010). En outre, la polyploïdisation progressive au cours du vieillissement pourrait permettre au foie de s'adapter aux lésions liées à l'âge, telles que l'accumulation de dommages à l'ADN.

Aujourd'hui, la polyploïdie hépatique est donc considérée comme un statut bénéfique pour l'hépatocyte, lui conférant des propriétés spécifiques notamment essentielles afin de résister à diverses agressions. Ainsi, ces « supers hépatocytes » présentent un « pattern » d'expression génique différent de celui d'hépatocytes diploïdes, améliorant leurs capacités de survie cellulaire ou encore de réparation de l'ADN. D'autre part, cet état polyploïde contribue également à l'adaptation et la réorientation du métabolisme hépatique, permettant alors un gain énergétique, mais également une limitation de la prolifération hépatocytaire. D'autres fonctions de la polyploïdie ont été suggérées, mais restent à ce jour non avérées et requerront dans le futur de nouvelles investigations.

Toutefois, alors quelle pourrait être protectrice et tamponner les effets de l'exposition à des toxines ou encore des dommages liés à l'âge, ce contingent présente néanmoins un potentiel pathologique important. Dans ce chapitre nous avons discuté cette ambivalence de la polyploïdie et évoqué sa propension à participer notamment à la tumorigenèse, en générant un intermédiaire aneuploïde. Cet état polyploïde représente donc un équilibre fragile, sans que l'on ne puisse encore comprendre complètement les raisons de se renversement.



Chapitre III : LA MASTER KINASE LKB1

Tous les organismes possèdent des points de contrôle métaboliques, conservés au cours de l'évolution, afin de coordonner la croissance et la survie cellulaire avec une disponibilité suffisante en énergie. La sérine-thréonine kinase LKB1 (Liver Kinase B1 ou sérine thréonine kinase 11, STK11) est la protéine clé responsable du maintien de la balance énergétique cellulaire (Shaw et al., 2004). LKB1 contrôle le métabolisme énergétique associé notamment à la croissance cellulaire et la polarité. Initialement, *LKB1* a été identifié lors d'études réalisées chez des patients atteints du syndrome de Peutz-Jeghers (PJS) (Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998). En effet, ce syndrome est fortement lié à une invalidation germinale de *LKB1*. Les patients atteints de PJS présentent un risque important de développer des cancers. Dans ce contexte, *LKB1* a rapidement été considéré comme un gène suppresseur de tumeur (Hearle et al., 2006; Mehenni et al., 2006; van Lier et al., 2010). Cette hypothèse a été largement soutenue par différentes études ayant mis en évidence des mutations somatiques de *LKB1* dans différents cancers sporadiques, tels que le cancer du poumon (Ding et al., 2008; Sanchez-Cespedes, 2011; Sanchez-Cespedes et al., 2002), du pancréas (Morton et al., 2010; Su et al., 1999) ou du col de l'utérus (Wingo et al., 2009). D'autre part, des diminutions de l'expression protéique de LKB1 ainsi que l'hyperméthylation de son promoteur ont également été recensées dans différents cancers (Esteller et al., 2000; Li et al., 2014 ; Presneau et al., 2017). Cependant, ces modalités d'inactivation de LKB1 n'ont pas été étudiées de manière extensive. Toutefois, ce rôle de gène suppresseur de tumeur a été tempéré par d'autres travaux ayant suggérés que *LKB1* peut également, dans certaines situations, agir comme un oncogène. En conditions de stress énergétique, il semble que LKB1 puisse être requis pour l'adaptation du métabolisme des tumeurs et la survie de la cellule tumorale (Lee et al., 2015; Shaw et al., 2004; Trapp et al., 2017).

Ce rôle dual de LKB1 pourrait s'expliquer par son implication dans un nombre important de processus cellulaires, dont certains peuvent être régulés différemment en fonction de la spécificité tissulaire. En effet, LKB1 est une master kinase capable de phosphoryler au moins 14 cibles distinctes, étendant ainsi ses rôles pléiotropes dans la physiologie cellulaire (Shackelford and Shaw, 2009; Shorning and Clarke, 2011). Outre sa fonction de senseur métabolique, cette kinase contrôle donc un large éventail de processus allant de l'angiogenèse et l'apoptose à la croissance cellulaire et la polarité. Au regard de l'orientation de mes travaux de thèse, dans ce chapitre je détaillerai particulièrement les rôles de LKB1 dans le contrôle de la polarité, de la division cellulaire et du maintien de l'intégrité génomique.

1. La Liver Kinase B1

1.1 LKB1 : les origines

Comme introduit précédemment, l'intérêt pour LKB1 est apparu lorsque des mutations germinales de l'un des allèles de LKB1 ont été associées au syndrome de Peutz-Jeghers.

En 1921, Johannes Peutz découvre les premiers symptômes du syndrome chez un patient âgé de 15 ans et ses proches parents. Il caractérise la présence de polypes rectaux ainsi qu'une hyperpigmentation péri-buccale (Peutz, 1921). Ces travaux sont complétés par Harold Jeghers, en 1949, qui émet l'hypothèse qu'un gène pléiotrope unique est responsable de l'ensemble de ces symptômes (Jeghers et al., 1949). Le syndrome Peutz-Jeghers était né. Presque cinquante ans plus tard, l'analyse CGH (Comparative Genomic Hybridization) de polypes de patients PJS a permis d'identifier des mutations sur le locus chromosomique 19p13.3 comme premières causes du syndrome (Hemminki et al., 1997). Par la suite, une analyse approfondie de cette région génomique a révélé des mutations perte de fonction du gène codant pour la protéine kinase LKB1 (Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998). Depuis cette découverte, d'intenses recherches ont permis d'affiner nos connaissances sur ce syndrome rare. Le PJS est une maladie à transmission autosomique dominante ayant une prévalence estimée entre 1/50000 et 1/200000 (Beggs et al., 2010). Ses principaux symptômes sont le développement de polypes gastro-intestinaux bénins, particulièrement présents dans l'intestin grêle, ainsi qu'une pigmentation mucocutanée (**Figure 16**).

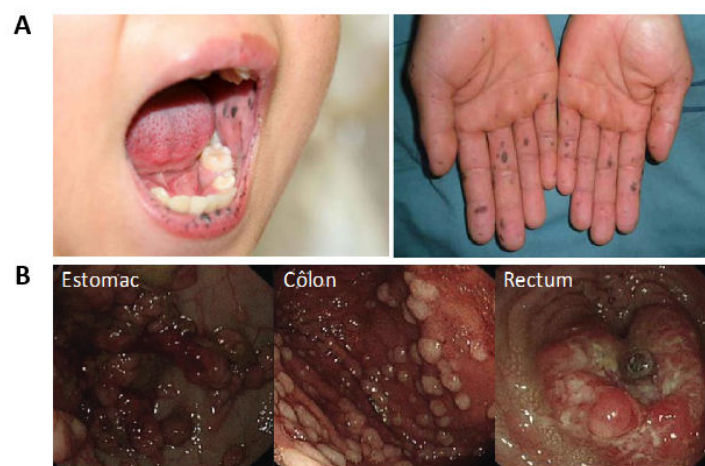


Figure 16 : Principaux symptômes du syndrome de Peutz-Jeghers

- (A) Le PJS est caractérisé par une hyperpigmentation de la muqueuse buccale, et des doigts.
 (B) Les patients présentent des polypes le long du tractus gastro-intestinal.

Par ailleurs, les patients présentent un risque élevé de développer des tumeurs malignes après 30 ans et à partir de 65 ans la probabilité atteint 93% (Hearle et al., 2006). Les cancers associés au PJS sont majoritairement d'origine gastro-intestinale : cancer de l'estomac, de l'intestin grêle, colorectal, pancréatique ou parfois de l'œsophage (Gammon et al., 2009; Giardiello et al., 1987). Il est intéressant de noter que ces tumeurs sont majoritairement dues à l'instabilité de la muqueuse, plus qu'à la progression des polypes. Ainsi, la suppression des polypes ne conduit pas à la diminution du risque de cancer (Jansen et al., 2006). En dehors du tractus intestinal, d'autres cancers ont également été recensés chez les patients, tels que des cancers du poumon, du sein, de l'utérus, de l'ovaire ou des testicules (Gammon et al., 2009). Près de 90% des familles souffrant de ce syndrome présentent des altérations génétiques hétérozygotes de *LKB1*. Comme évoqué précédemment, d'autres mutations de ce gène ont également été découvertes dans certains cancers sporadiques. Ces mutations sont prédites pour entraîner une perte de l'activité kinase de la protéine. Majoritairement, il s'agit de mutations non-sens, faux sens ou de délétion conduisant à un décalage du cadre de lecture. En 2006, une revue d'Alessi faisait état de 144 mutations différentes identifiées chez les patients atteints de PJS et de cancers sporadiques, sans qu'aucun *hot spot* n'ait été mis en évidence (Alessi et al., 2006). Au vu de cet intérêt grandissant pour la kinase LKB1 et afin d'étudier son fonctionnement, des modèles murins d'inactivation constitutive de *Lkb1* ont été générés. Deux stratégies indépendantes de ciblage génique ont été utilisées afin d'altérer le fonctionnement de LKB1 dans les lignées germinales murines. La première repose sur l'invalidation des deux allèles de *Lkb1* (souris *Lkb1*^{-/-}) et entraîne une létalité embryonnaire (E8.5 - 9.5), suite à des défauts de développement majeurs. En effet, ces souris présentent notamment une altération de la fermeture du tube neural ainsi qu'une désorganisation importante du réseau vasculaire, associée à une atrophie aortique (**Figure 17**) (Ylikorkala et al., 2001).

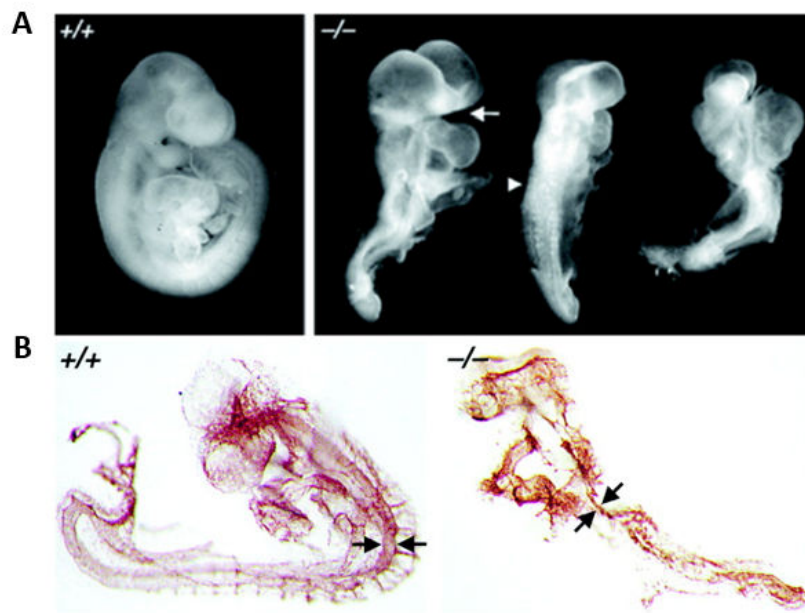


Figure 17 : Caractérisation des défauts développementaux des embryons *Lkb1*^{-/-}

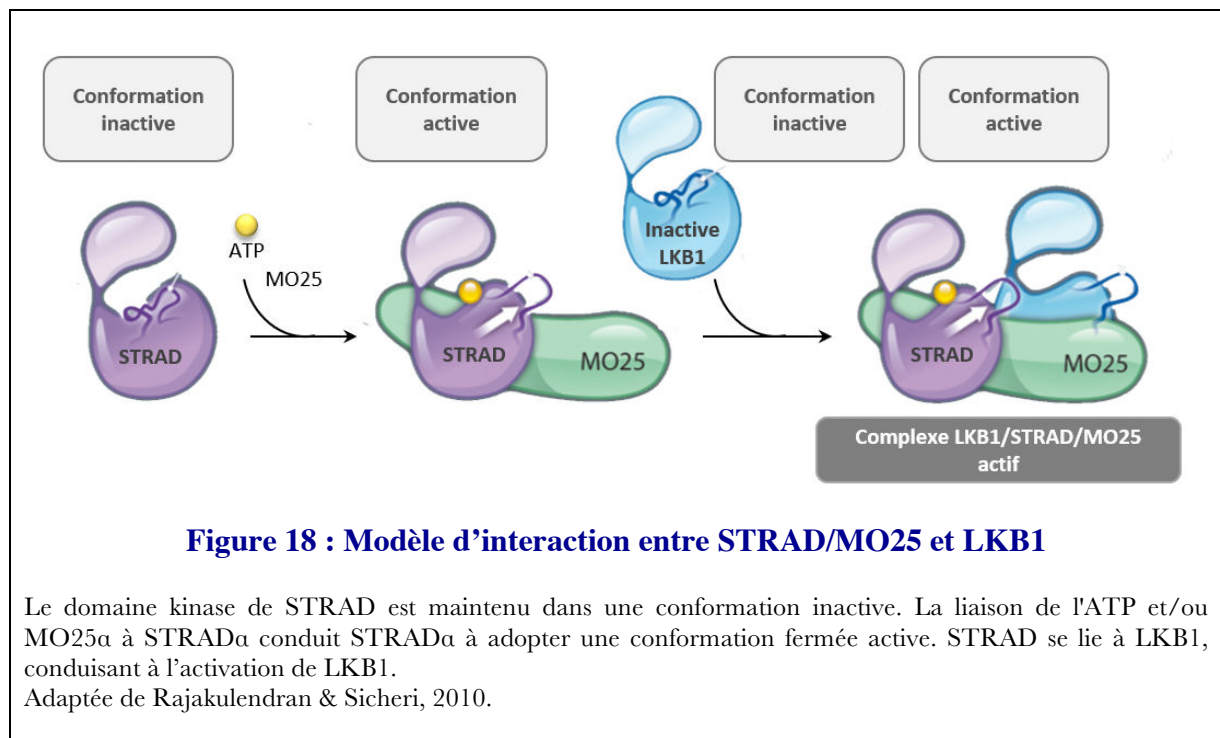
(A) Images de microscopie d'embryons E9.25 *Lkb1*^{+/+} et *Lkb1*^{-/-}. Les embryons *Lkb1*^{-/-} présentent des défauts importants du système neural, tels qu'une ouverture du tube neural, des arcs branchiaux manquants (flèche) et des somites aberrants (tête de flèche).

(B) Les embryons *Lkb1*^{-/-} présentent une discontinuité des vaisseaux et de la lumière de l'aorte dorsale (flèches). Ylikorkala, 2010

Dans le second modèle, un seul des allèles de *Lkb1* est invalidé (souris *Lkb1*^{+/-}) permettant de mimer le syndrome du Peutz-Jeghers. Les souris *Lkb1*^{+/-} naissent viables et développent progressivement des polypes intestinaux, morphologiquement proches des polypes de patients PJS (Bardeesy et al., 2002; Jishage et al., 2002; Rossi et al., 2002). Cependant, l'incidence accrue de cancers, observée chez les patients, semble être moins importante dans ce modèle murin. En effet, les souris *Lkb1*^{+/-} peuvent mourir avant l'installation de carcinomes ou de métastases, suite à des obstructions intestinales et/ou des hémorragies causées par la présence importante de polypes (Jishage et al., 2002; Rossi et al., 2002). Bien qu'aucun adénome intestinal n'ait été observé, les souris *Lkb1*^{+/-} peuvent présenter des lésions néoplasiques dans le foie, conduisant à l'émergence de nombreux adénomes, mais également carcinomes hépatocellulaires (Nakau et al., 2002; Rossi et al., 2002). Depuis, d'autres modèles d'inactivation conditionnelle et tissu spécifique de *Lkb1* ont permis d'étendre nos connaissances sur les fonctions et les mécanismes moléculaires contrôlés par LKB1 (Shorning and Clarke, 2011).

1.2 LKB1 et ses partenaires particuliers

Le gène *LKB1* est conservé au cours de l'évolution et s'exprime de façon ubiquitaire. *LKB1* se compose de 10 exons, dont un non codant, et code pour une protéine de 50 kDa comportant 433 résidus chez l'homme et 436 chez la souris. L'activation de LKB1 est dépendante de la formation d'un large complexe protéique comprenant les partenaires : STRAD (Ste-20 Related Adaptator Protein) et MO25 (Mouse Protein 25). Il existe deux isoformes de STRAD (STRAD α et β) et de MO25 (MO25 α et β), qui interagissent similairement avec LKB1 (Boudeau et al., 2003a). Cet hétérotrimère (1 : 1 : 1) adopte une forme globulaire compacte associée à de nombreuses interactions entre ses différentes sous-unités (Zeqiraj et al., 2009a). STRAD est une pseudokinase, dont l'absence de certains résidus essentiels la rend catalytiquement inactive (Baas et al., 2003). Toutefois, cette pseudokinase adopte une conformation fermée, spécifique de protéines kinases totalement actives et maintenue grâce à la liaison coopérative de STRAD à l'ATP et MO25 (Figure 18) (Zeqiraj et al., 2009b).



Cette étude a également permis d'établir que le maintien de STRAD dans cette conformation fermée "active" est requis pour l'activation de LKB1 (Zeqiraj et al., 2009b). En effet, STRAD interagit avec LKB1, via leur domaine pseudokinase et kinase respectif, conduisant à l'établissement d'une conformation active de LKB1 et ainsi à l'augmentation de son activité catalytique (Baas et al., 2003). Dans un second temps, la protéine d'échafaudage MO25

permet de stabiliser cette structure. Seule, MO25 est connue pour ne pas former un complexe stable avec LKB1 (Boudeau et al., 2003a; Boudeau et al., 2004). En revanche, celle-ci reconnaît les trois derniers résidus Trp-Glu-Phe (motif WEF) de la queue C-terminale de STRAD (Boudeau et al., 2003a). Par cette interaction, MO25 joue un rôle crucial dans la stabilisation du complexe LKB1/STRAD, en générant des sites de liaison additionnels à MO25 sur STRAD et/ou LKB1 (**Figure 18**) (Boudeau et al., 2003a). Par ailleurs, LKB1 peut également former un hétérotrimère avec un complexe chaperon formé de deux autres partenaires : la protéine HSP90 (Heat shock protein 90) et sa co-chaperonne CDC37 (Cell division cycle 37) (Boudeau et al., 2003b; Nony et al., 2003). Il est important de noter que les deux types de complexes sont deux formes distinctes, n'interagissant pas entre elles. En effet, l'immunoprécipitation de STRAD ou de MO25 résulte en la co-immunoprécipitation de LKB1, mais jamais de CDC37 ou HSP90 (Alessi et al., 2006). De plus, CDC37 et HSP90 se lient spécifiquement au domaine kinase de LKB1 et entrent ainsi en compétition avec STRAD (Gaude et al., 2012). La formation de ce second complexe semble protéger LKB1 d'une dégradation via le protéasome (Boudeau et al., 2003b; Nony et al., 2003). Ces premières études ont effectivement été renforcées par les travaux de Gaude, démontrant que la dissociation du complexe LKB1-HSP90 conduit au recrutement de HSP/HSC70 et de l'ubiquitine ligase E3 CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) initiant ainsi la dégradation de LKB1 (Gaude et al., 2012). Par ailleurs, lors de cette dissociation, l'activité kinase de LKB1 est stimulée de manière transitoire, soulignant l'état catalytiquement inactif du complexe LKB1-HSP90-CDC37. Gaude et ses collaborateurs ont spéculé que la liaison aux protéines chaperonnes favoriserait la maturation et le repliement de LKB1 afin d'adopter une conformation optimale pour son interaction avec STRAD-MO25 (Gaude et al., 2012).

1.3 Mais où est LKB1 ?

L'activité de LKB1 est également dépendante de sa localisation cellulaire. Seule, cette kinase est majoritairement localisée dans le noyau (Smith et al., 1999), mais son export cytoplasmique est requis pour que LKB1 devienne une kinase active (Tiainen et al., 2002). Dans sa région N-terminale non catalytique, LKB1 présente une séquence NLS (Nuclear Localisation Signal), qui permet sa translocation dans le noyau. Une fois synthétisée, la protéine LKB1 est importée dans le noyau par les importines α et β (Imp α , Imp β), reconnaissant cette séquence NLS (**Figure 19**). D'autre part, STRAD et MO25 diffusent passivement ou sont activement transportées dans le cytoplasme par deux karyophérines CRM1 (Chromosomal Maintenance 1) et Exportine 7. En 2003, Baas et ses collaborateurs

décrivent pour la première fois le rôle de STRAD dans l'adressage de LKB1 au cytoplasme (Baas et al., 2003). Plus tard, deux mécanismes distincts, régulés par STRAD et requis pour la localisation de LKB1, ont été décrits. Tout d'abord, STRAD sert d'adaptateur pour coupler LKB1 à CRM1 et Exportine 7, aboutissant à l'export de LKB1 du noyau (**Figure 19**) (Dorfman and Macara, 2008).

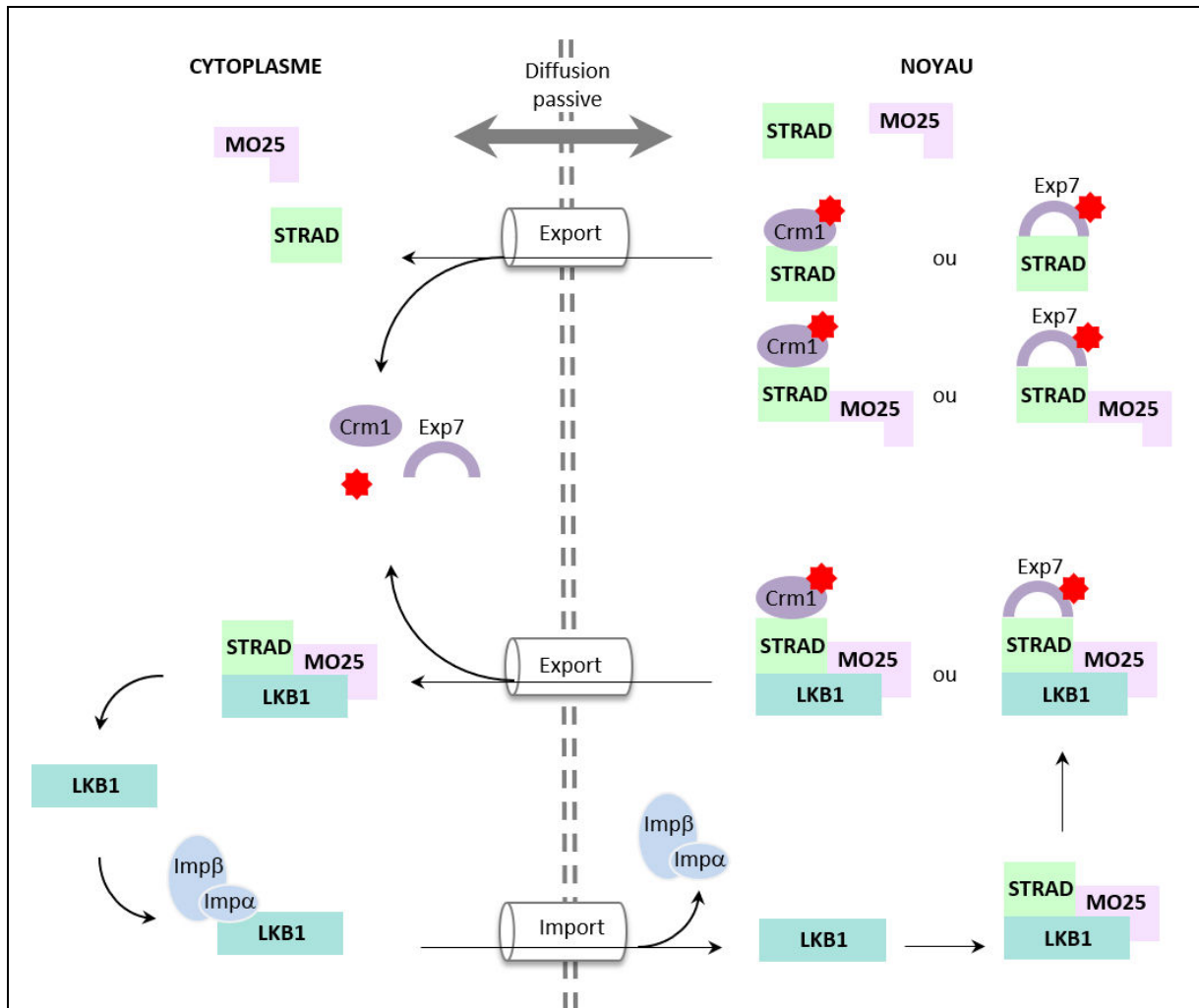


Figure 19 : Schéma représentatif des différents mouvements nucléo-cytoplasmiques

LKB1 est activée par sa translocation nucléo-cytoplasmique. Classiquement, LKB1 est nucléaire, dans un état inactif et importée activement via les importines α/β (Imp α , Imp β). Son activation est dépendante de sa liaison avec le complexe STRAD α /MO25. Ces partenaires entrent dans le noyau soit par diffusion passive, soit par export via l'exportine 7 (Exp7) et Crm1. Le complexe stable LKB1/STRAD α /MO25 est exporté hors du noyau par l'Exp7 et Crm1, associés au cofacteur RanGTP (étoile rouge).
Adaptée de van Veelen, 2011 ; Dorfman, 2008.

Dans un second temps, STRAD associée à LKB1 bloque son ré-import dans le noyau, par inhibition compétitive de la liaison de LKB1 aux Imp α/β (Dorfman and Macara, 2008). De façon intéressante, cet effet est potentialisé lorsque le complexe LKB1/STRAD est associé à

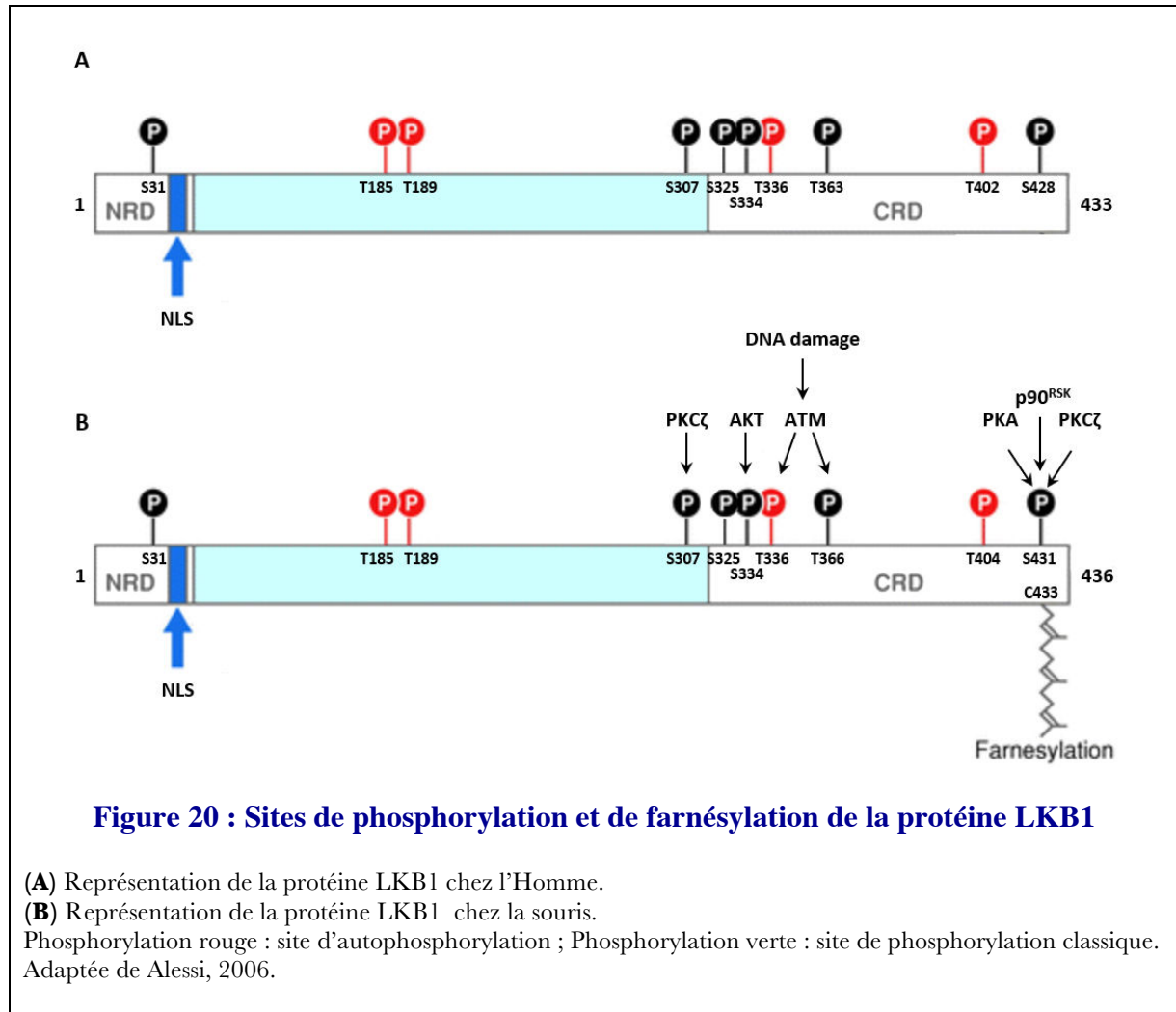
MO25 (Dorfman and Macara, 2008). Précédemment à la découverte de Baas, la protéine LIP1 (LKB1 interacting protein-1) avait été décrite pour induire une localisation cytoplasmique de LKB1 (Smith et al., 2001). Toutefois, l'étude de Baas a démontré que les deux protéines (LIP1 et STRAD) avaient des effets différents. En effet, LIP1 entraîne la relocalisation de LKB1 à différents foci cytoplasmiques, tandis que STRAD permet une localisation cytoplasmique diffuse. De plus, l'adressage cytoplasmique de LKB1 est observé dans 30% des cellules co-transfectées par LIP1/LKB1, tandis que la translocation dépendante de STRAD est observée plus fréquemment (Baas et al., 2003; Smith et al., 2001). Enfin, lors de processus apoptotique, LKB1 peut également être transloquée dans la mitochondrie (Karuman et al., 2001). D'autres mécanismes peuvent également participer au maintien de LKB1 dans le cytoplasme et sont dépendants de modifications post-traductionnelles de la kinase, décrites dans le paragraphe suivant.

1.4 Les modifications post-traductionnelles

LKB1 subit différents types de modifications post-traductionnelles, comprenant des phosphorylations, ubiquitinations, prénylations ou encore acétylations.

1.4.1 La phosphorylation

La protéine LKB1 est constituée d'un domaine kinase, flanqué de part et d'autre de deux domaines régulateurs : NRD (N-terminal regulatory domain) et CRD (C-terminal regulatory domain). Dans le domaine CRD, plusieurs sites de modifications post-traductionnelles ont été identifiés. Chez l'homme, quatre sites d'autophosphorylation ont été décrits sur les thréonines (Thr) 185, 189, 336, 402, ainsi que six autres sites de phosphorylation sur les sérines (Ser) 31, 307, 325, 334, 428 et sur la thréonine 363 (**Figure 20A**) (Alessi et al., 2006; Baas et al., 2003; Liu et al., 2012; Sapkota et al., 2002a; Sapkota et al., 2001; Xie et al., 2009). Les résidus Thr363, Thr402 et Ser428 correspondent respectivement aux résidus Thr366, Ser404 et Ser431 chez la souris (**Figure 20B**) (Alessi et al., 2006).



Le site majeur d'autophosphorylation de LKB1 est localisé sur la Thr336, car seules des modifications de ce site conduisent à des altérations des fonctions de LKB1. En effet, la mutation de ce résidu en Glutamate (Glu) [mime la phosphorylation], mais pas en Alanine (Ala) [abolit la phosphorylation], empêche LKB1 d'inhiber la croissance des cellules de mélanome G361. Ainsi, cette phosphorylation est inhibitrice de l'activité suppresseur de tumeur de LKB1 (Sapkota et al., 2002a). Concernant les autres sites d'autophosphorylation, à ce jour aucun rôle fonctionnel ne leur a encore été attribué. Leur mutation en Ala ou Glu ne semble affecter ni l'activité, ni la localisation de LKB1 (Alessi et al., 2006). Concernant les sites de phosphorylations classiques, leur implication dans l'adressage ainsi que dans la fonctionnalité de LKB1 a fait l'objet de différentes études. A ce jour, seuls les résidus Ser31 et 325 n'ont pas encore été clairement caractérisés, mais leur phosphorylation ne semble pas avoir de rôle majeur dans la localisation de LKB1 ou l'inhibition de la croissance cellulaire contrôlée par la kinase (Sapkota et al., 2002a). En revanche, la phosphorylation par PKC-ζ (Protein kinase C-zeta type) sur la Ser307 induit l'exportation nucléo-cytoplasmique de LKB1

et stimule son activité kinase. Cette phosphorylation favorise notamment les effets anti-angiogéniques et anti-apoptotiques, dépendants de LKB1 (Xie et al., 2009). De même, la phosphorylation de la Ser334, par la kinase AKT, permet le recrutement de la protéine 14-3-3 (Liu et al., 2012). Cette dernière est majoritairement connue pour interagir avec des protéines clés du cycle cellulaire, telles que la CKI p27 ou encore la cycline D1, contribuant à leur séquestration cytoplasmique. En revanche, ici, l'interaction avec 14-3-3 diminue l'association de LKB1/STRAD et contribue à l'accumulation nucléaire de LKB1. Cet événement a pour conséquence une diminution du contact entre LKB1 et ses substrats, ainsi que l'inhibition de la fonction de gène suppresseur de tumeur de LKB1 (Liu et al., 2012). Dans le cas de la Thr363/366, la phosphorylation est régulée par la kinase ATM. Ce statut de LKB1 est associé à une localisation majoritairement nucléaire et à sa participation dans le mécanisme de réponse aux dommages de l'ADN (Fernandes et al., 2005; Sapkota et al., 2002b; Wang et al., 2016). Enfin, concernant la Ser428/431, son rôle soulève encore des controverses. Cette phosphorylation est contrôlée par différentes kinases, telles que PKC- ζ , PKA (protein kinase A) ou p90^{RSK} (p90 Ribosomal s6 kinase) (Sapkota et al., 2001; Xie et al., 2008). Cependant, certaines études ont mis en évidence l'implication de cette phosphorylation dans la translocation cytoplasmique et l'activité catalytique de LKB1 (Song et al., 2008; Xie et al., 2008), alors que d'autres démontrent qu'une altération de cette modification post-traductionnelle n'a d'effet significatif ni sur la localisation, ni sur l'activité de LKB1 (Houde et al., 2014; Sapkota et al., 2001). Toutefois, il semble tout de même que le résidu Ser428/431 soit d'intérêt, puisque la mutation de ce site (Ala ou Glu) contrecarre l'inhibition de la croissance de cellules tumorales, normalement contrôlée par LKB1 (Sapkota et al., 2002a).

1.4.2 L'ubiquitinylation/SUMOylation

L'activité de LKB1 peut également être régulée par ubiquitinylation, comme précédemment évoqué. Bien que cette modification post-traductionnelle entraîne la dégradation par le protéasome de LKB1 (HSP/HSC-CHIP) (**Figure 21**), l'intégrité et l'activité du complexe LKB1/STRAD/MO25 peuvent être renforcées par polyubiquitinylation de LKB1. En effet, le complexe ubiquitine ligase Skp2-SCF (S-phase kinase-associated protein 2 - Skp1/Cullin/F-box) soutient l'activation de LKB1, en maintenant l'intégrité du complexe LKB1/STRAD/MO25 en condition de stress énergétique (**Figure 21**) (Lee et al., 2015). Sous contrôle de l'oncogène Ras, cette signalisation promeut la survie cellulaire, participant ainsi au processus de tumorigénèse et particulièrement aux étapes tardives du carcinome hépatocellulaire (Lee et al., 2015). Par

ailleurs, un autre type de modification peut être induit en cas de stress énergétique, la SUMOylation. Cette modification est relativement proche, biochimiquement, de l'ubiquitinylation et repose sur l'ajout d'un groupement SUMO (Small ubiquitin-like modifier) sur une lysine (Lys) acceptrice d'une protéine cible. La Lys178 de LKB1 est un site de conjugaison critique pour SUMO1 (**Figure 21**) (Ritho et al., 2015). L'addition de ce groupement est stimulée en conditions de stress et soutient l'activité kinase de LKB1, lui permettant ainsi de protéger les cellules privées d'énergie de l'apoptose (Ritho et al., 2015).

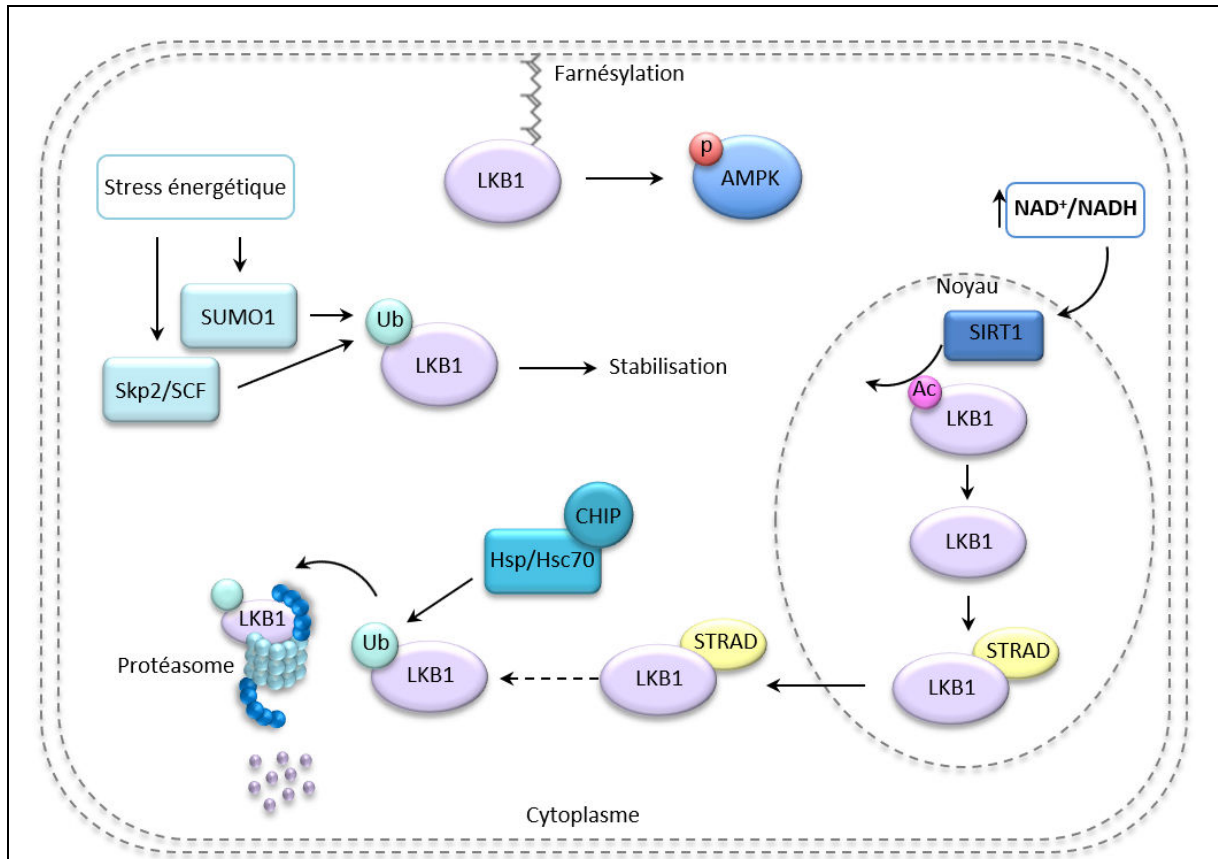


Figure 21 : Modifications post-traductionnelles de LKB1 et ses différents régulateurs

L'activité de LKB1 peut être modulée par différentes modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, la sumoylation, l'ubiquitinylation, réalisées par divers partenaires. Adaptée de Shorning, 2016.

1.4.3 La prénylation

La protéine LKB1 présente un motif de prénylation Cys-Lys-Gln-Gln relativement conservé, sur les derniers résidus de sa queue C-terminal (Alessi et al., 2006; Collins et al., 2000). La prénylation est l'ajout d'un farnésyl ou géranyl-géranyl sur un acide aminé cystéine en position C-terminale. Cette modification post-traductionnelle permet l'ancrage d'une

protéine sur la face interne de la membrane plasmique. Concernant LKB1, la forme de prénylation correspond à une farnésylation et permet l'adressage de LKB1 à la membrane (**Figure 21**) (Collins et al., 2000; Sapkota et al., 2001; Sebbagh et al., 2009). Ce mécanisme favorise la co-localisation et ainsi l'interaction de LKB1 avec ses substrats, notamment le plus connu l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (Houde et al., 2014; Sebbagh et al., 2009). Toutefois, l'importance de cette farnésylation a été remise en question par une récente étude, réalisée dans le modèle de drosophile. En effet, LKB1 peut s'ancrer à la membrane indépendamment de sa farnésylation, en se liant directement aux phospholipides (Dogliotti et al., 2017).

1.4.4 L'acétylation

L'acétylation de LKB1, notamment sur la Lys48, a été rapportée dans différentes études, mais à ce jour l'enzyme responsable de ce mécanisme demeure inconnue (Hou et al., 2008; Lan et al., 2008; Zu et al., 2010). Toutefois, SIRT1 (Sirtuin 1) régule la dé-acétylation de LKB1, stimulant ainsi son interaction avec STRAD et sa relocalisation cytoplasmique (**Figure 21**) (Lan et al., 2008). LKB1 est alors phosphorylée sur ces résidus Ser-428 et Thr-336 et active différentes cibles en aval (Lan et al., 2008). Cette signalisation peut être induite par une restriction calorique conduisant à une augmentation du ratio NAD^+/NADH , connue pour stimuler l'expression et l'activité dé-acétylase de SIRT1 (Lan et al., 2008; Rodgers et al., 2005). Cependant, les conséquences d'une dé-acétylation dépendante de SIRT1 varient en fonction du tissu étudié. En effet, SIRT1 régule positivement l'activité de LKB1 dans les cellules rénales embryonnaires ou les hépatocytes (culture primaire ou lignée d'hépatome) (Hou et al., 2008; Lan et al., 2008). En revanche, dans les cellules endothéliales, la dé-acétylation de LKB1, via SIRT1, est suivie par une ubiquitinylation de la kinase, conduisant à sa dégradation par le protéasome (Zu et al., 2010).

2. LKB1 : Master kinase

En 2003, des travaux, réalisés chez *Saccharomyces Cerevisiae*, ont permis d'identifier la première cible de LKB1 : l'AMPK (Hong et al., 2003; Woods et al., 2003). L'AMPK est un senseur énergétique capable de détecter les oscillations à la fois du rapport ADP/ATP, mais également AMP/ATP. Suite à un stress énergétique, l'AMPK orchestre la réponse cellulaire, afin de restaurer l'homéostasie énergétique. Cette kinase contrôle alors l'activation des voies cataboliques, ainsi que l'inhibition concomitante des signalisations anaboliques (Garcia and

Shaw, 2017; Hardie et al., 2012). L'activation de l'AMPK est dépendante de la fixation dans son domaine régulateur d'un ADP ou AMP, induisant un changement de conformation de la protéine et permettant ainsi la phosphorylation (Thr172) de sa sous unité catalytique (Hawley et al., 1996; Mitchelhill et al., 1997; Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011). Chez *S. Cerevisiae*, il a été montré que Snf1, un homologue de l'AMPK, est phosphorylée et activée par trois kinases : Eml1, Pak1 et Tos3 (Hong et al., 2003). L'étude de Hong et ses collaborateurs a également mis en évidence une forte homologie de séquence entre le domaine catalytique de ces kinases et la protéine LKB1, exprimée chez les mammifères (Hong et al., 2003). Enfin, dans la continuité de ces observations, les auteurs ont également confirmé *in vitro* l'activation de l'AMPK par LKB1, en incubant LKB1 (purifiée à partir de cellules mammifères) avec des bactéries exprimant l'AMPK (Hong et al., 2003). Depuis, ces résultats ont été largement confortés par de nombreuses publications réalisées dans différents organismes et tissus, faisant de l'AMPK la principale cible de LKB1, comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre.

Suite à la publication du dendrogramme du kinome humain (Manning et al., 2002), une étude approfondie a permis d'identifier un groupe de protéines kinases relativement proche de l'AMPK, appelé AMPK-related kinases (ARK). Ces kinases présentent une homologie de séquence de leur boucle d'activation avec l'AMPK (Alessi et al., 2006; Lizcano et al., 2004). Cette similitude a soulevé l'hypothèse que LKB1 pourrait également phosphoryler et contrôler l'activité de ces enzymes. En effet, l'activité catalytique de ces différentes kinases est 50 fois supérieure suite à leur phosphorylation par LKB1, alors que ces enzymes sont considérablement moins actives quand elles sont exprimées dans des cellules n'exprimant pas LKB1 (Jaleel et al., 2005; Lizcano et al., 2004). A ce jour, il a été démontré que cette protéine peut phosphoryler, outre l'AMPK, au moins 12 autres kinases appartenant à la famille ARK (**Figure 22**).

Depuis, LKB1 est reconnue comme une « master kinase », positionnée au sommet d'un large réseau d'enzymes contrôlant de nombreuses fonctions physiologiques. Depuis plus d'une décennie, ces fonctions ont fait l'objet de nombreuses études, ayant permis d'impliquer LKB1 dans la régulation de voies biologiques majeures, telles que le métabolisme, la croissance ou la polarité cellulaire.

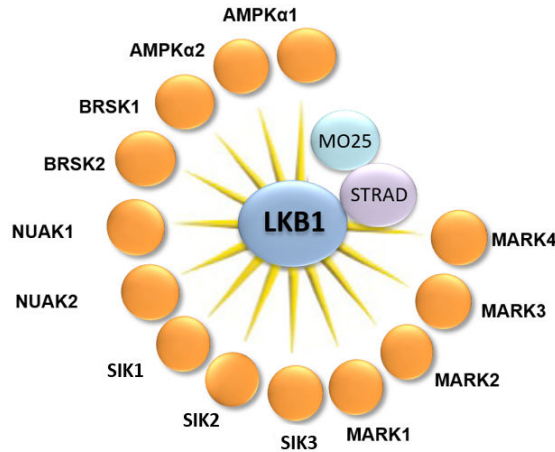


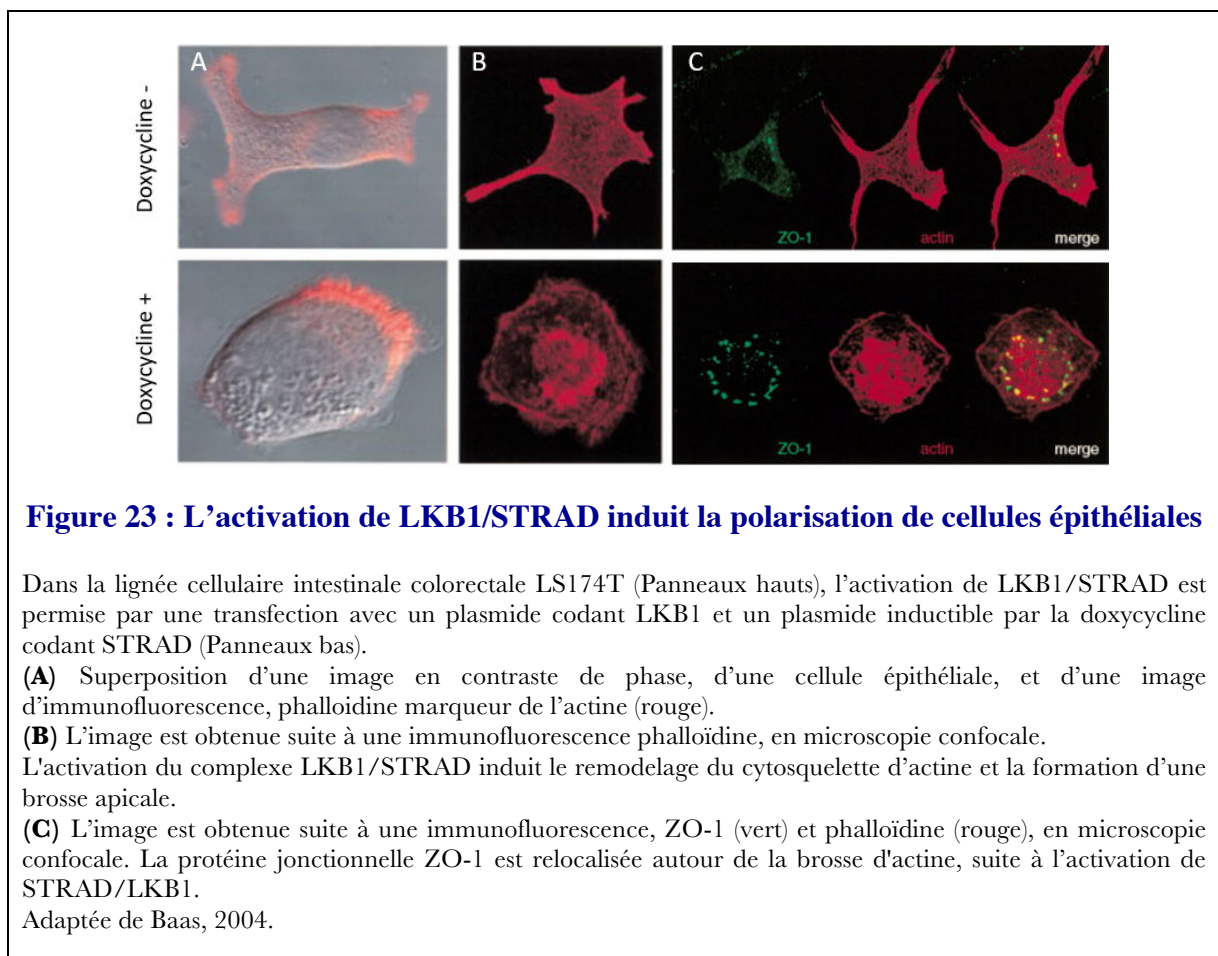
Figure 22 : LKB1 est une Master kinase

LKB1 contrôle l'activité d'au moins 14 kinases, faisant partie de la famille des ARKs (AMPK-Related Kinases), comprenant les AMPK α 1 et 2, les BRSK (Brain-specific kinase) 1 et 2, les NUA1 (SNF1-like kinase) 1 et 2, les SIK (Salt-inducible kinase) 1 à 3, ainsi que les MARK (Microtubule-affinity-regulating kinase) 1 à 4. Ces cibles sont impliquées dans divers processus cellulaires, comme la prolifération, le métabolisme, l'apoptose ou encore l'angiogenèse. Ce large éventail de cibles confère à LKB1 la fonction de Master kinase. Adaptée de Hardie & Alessi, 2013.

2.1 La polarité cellulaire

Avant la découverte de son lien étroit avec l'AMPK et la balance énergétique, LKB1 était surtout connue pour être un régulateur important de la polarité cellulaire dans différents organismes. L'acquisition ainsi que le maintien de la polarité cellulaire est un processus fondamental au cours du développement, mais également durant l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Initialement, l'implication de LKB1 dans la régulation de la polarité a été mise en évidence au cours du développement chez *C. Elegans* (homologue PAR-4) et *Drosophila Melanogaster* (homologue dLKB1) (Martin and St Johnston, 2003; Watts et al., 2000). L'étude préliminaire de mutants *C.elegans*, présentant des défauts au cours de la division asymétrique du zygote, a permis d'identifier 4 gènes appartenant à la famille *Par* (*Par-1*, *Par-2*, *Par-3* et *Par-4*) (Kemphues et al., 1988). Par la suite, Watts et ses collaborateurs ont démontré que le gène *Par-4* code pour une sérine thréonine kinase, PAR-4, indispensable à l'établissement correct de l'axe antéro-postérieur embryonnaire (Watts et al., 2000). Cette polarité permet le positionnement asymétrique du sillon de clivage et par conséquent la mise en place de cycles cellulaires asymétriques, décisifs pour le destin cellulaire différentiel. Plus récemment, une étude a établi que PAR-4 régule ce processus en contrôlant notamment la relocalisation asymétrique du « pool » de myosine (Pacquelet et al., 2015). Ces résultats ont été soutenus par une seconde publication, décrivant également l'importance de LKB1 dans la formation de

l'axe antéro-postérieur de l'oocyte de drosophile (Martin and St Johnston, 2003). De plus, les auteurs ont constaté une perturbation de la polarité apico-basale épithéliale, chez les mutants *Lkb1*, suggérant un rôle général dans la polarisation cellulaire (Martin and St Johnston, 2003). Fait intéressant, quatre des quatorze kinases cibles de LKB1 sont des membres de la famille MARK (Microtubule-affinity-regulating kinase 1-4), dont l'homologue chez *C. Elegans* est la kinase PAR-1 (Wu and Griffin, 2017). En outre, le rôle de PAR-1 est aussi essentiel à la polarité durant les stades embryonnaires précoces de *C. Elegans* et *D. Melanogaster* (Guo and Kemphues, 1995; Kemphues et al., 1988; Shulman et al., 2000; Tomancak et al., 2000). Dans ce contexte, PAR-1 agit en coopération avec LKB1/PAR-4 dans la mise en place de la polarité cellulaire chez ces organismes (Benkemoun et al., 2014; Martin and St Johnston, 2003). Les résultats prometteurs obtenus dans ces deux modèles ont ouvert le champ des possibles et différentes études ont ensuite été conduites, afin d'établir si cette fonction de LKB1 était transposable chez le mammifère. En 2004, les travaux princeps de l'équipe de Clevers ont démontré que l'activation de LKB1 induit la polarisation de cellules épithéliales intestinales humaines, en absence de contact cellule-cellule ("cell autonomous") (Figure 23) (Baas et al., 2004).



Ce type cellulaire, issu de carcinomes coliques, ne présente ni expression de LKB1, ni polarisation épithéliale en condition basale. Toutefois, l'expression conjointe de LKB1 et de STRAD entraîne l'exécution rapide d'un programme complet de polarisation. Ce dernier repose notamment sur une réorganisation du cytosquelette d'actine, via la régulation des Rho GTPases, afin de former une brosse apicale (**Figure 23A-B**). Par la suite, les protéines de jonction cellulaire (ex : ZO-1, p120) sont relocalisées autour de cette structure (**Figure 23C**) (Baas et al., 2004). L'existence des différentes jonctions cellulaires, telles que les jonctions serrées, adhérentes ou les desmosomes, est essentielle au maintien de l'intégrité épithéliale et de la polarité cellulaire apico-basale (Coopman and Djiane, 2016; Nelson et al., 2013; Shin et al., 2006). Suite aux travaux de Baas, une seconde équipe de recherche a confirmé l'importance de LKB1 dans l'intégrité de l'épithélium mammaire de souris. En effet, la perte de LKB1 induit notamment une délocalisation de différents marqueurs de polarité, ainsi qu'une altération des desmosomes et de l'orientation des jonctions serrées (Partanen et al., 2012). En revanche, LKB1 ne semble pas indispensable à l'établissement de la polarité et à la formation de l'épithélium aux stades précoces embryonnaires chez la souris (Krawchuk et al., 2015). Toutefois, cette dernière étude souligne également l'importance de la kinase dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium du blastocyste. Ainsi, LKB1 participe à la régulation des jonctions adhérentes, en collaboration avec la E-cadhérine, afin de prévenir une extrusion cellulaire aberrante du blastocyste (Krawchuk et al., 2015). La E-cadhérine est l'un des composants majeurs des jonctions adhérentes et son lien étroit avec LKB1 avait déjà été décrit dans une précédente publication. *In vitro*, dans des cellules épithéliales humaines, le complexe LKB1/STRAD est localisé au niveau des jonctions adhérentes matures permettant ainsi la phosphorylation de l'AMPK (Sebbagh et al., 2009). La E-cadhérine participe au processus de maturation de ces jonctions et favorise cette relocalisation membranaire de LKB1, également dépendante de sa prénylation (Sebbagh et al., 2009). Dans la continuité de ces travaux, une très récente étude a démontré que l'application d'une contrainte mécanique sur la E-cadhérine stimule LKB1, contribuant ainsi au recrutement et à l'activation de l'AMPK. En conséquence, les cellules présentent une exacerbation de la contractilité de l'acto-myosine, de l'absorption du glucose et de la production d'ATP (Bays et al., 2017). Cet apport énergétique renforce les complexes d'adhésion et le cytosquelette d'actine afin d'augmenter la résistance cellulaire suite à un stress physique (Bays et al., 2017). Ces travaux soutiennent l'existence d'une interaction entre E-Cadhérine/LKB1/AMPK et leur implication dans le maintien de l'intégrité cellulaire. D'autre part, l'ensemble de ces résultats soulève deux points essentiels:

l'implication de l'AMPK dans ces mécanismes, ainsi que l'importance de la relocalisation membranaire de LKB1. En effet, deux études ont préalablement démontré que LKB1 contrôle, via la phosphorylation de l'AMPK, l'assemblage des jonctions serrées de cellules épithéliales, maintenant ainsi la polarité cellulaire (Zhang et al., 2006; Zheng and Cantley, 2007). Enfin, un travail, récemment publié, a confirmé l'enjeu de la relocalisation membranaire de LKB1 dans les mécanismes de polarisation neuronale (Dogliotti et al., 2017). Précédemment, différentes études ont permis d'établir le rôle clé de LKB1 dans la polarité des axones, essentielle à leur migration et leur différenciation en neurones (Huang et al., 2014; Shelly et al., 2007; Shelly and Poo, 2011). Ainsi, des mutants LKB1, présentant une incapacité d'ancrage membranaire, ne parviennent pas à induire la multiplication d'axones, relativement à la perte de polarité (Dogliotti et al., 2017).

Finalement, chez les mammifères, LKB1 est également impliqué dans le maintien ou l'établissement d'une polarité dans les cellules b pancréatiques (Granot et al., 2009; Hezel et al., 2008), les testicules (Tanwar et al., 2012) ou les hépatocytes (Fu et al., 2010; Just et al., 2015). Le rôle de LKB1 dans la polarité hépatocytaire sera plus particulièrement détaillé dans le paragraphe : *Les fonctions hépatiques de LKB1* (cf. §III.3.).

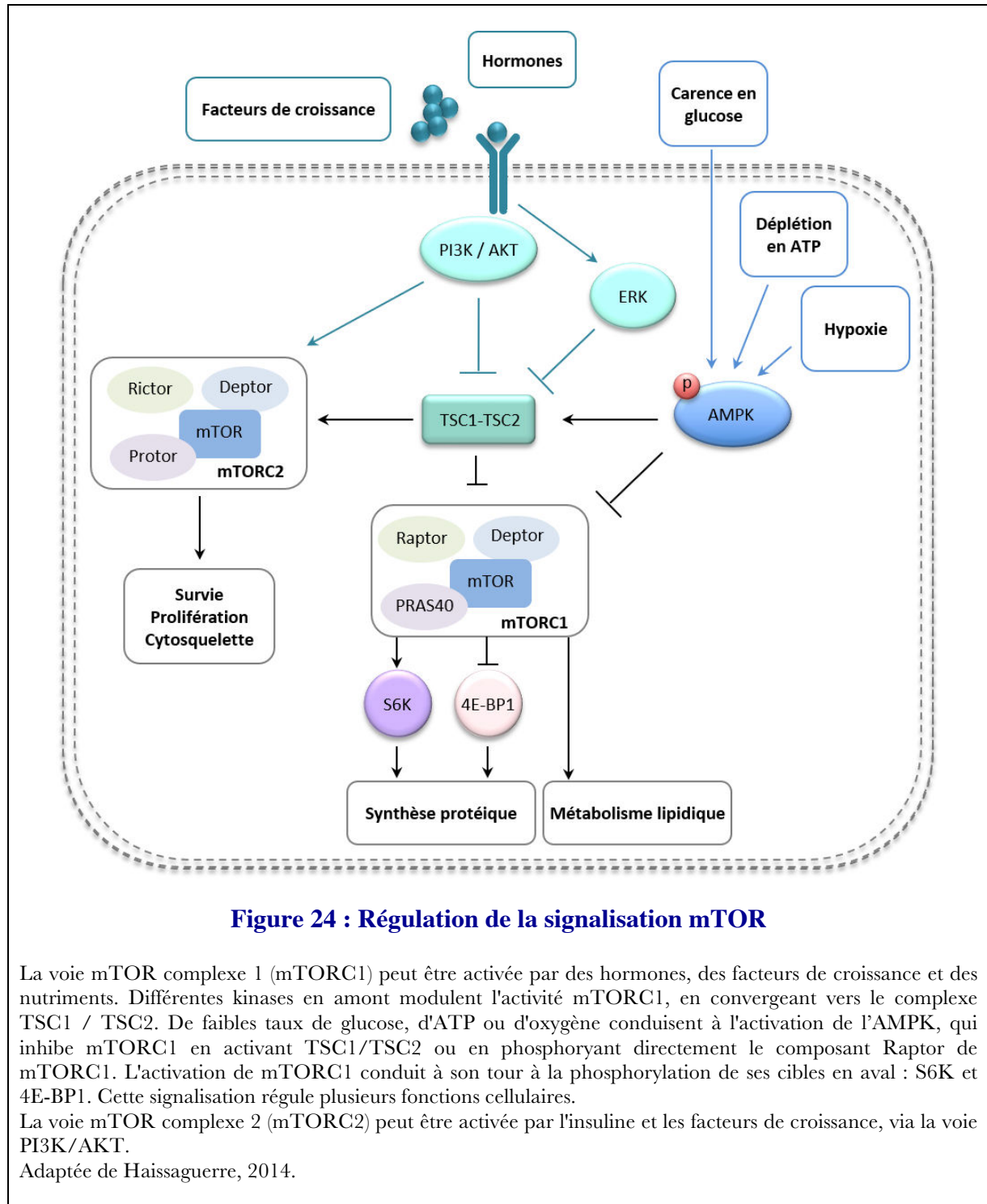
2.2 La croissance cellulaire

En cas de déprivation énergétique suite à des signaux, tels que la carence en nutriments ou l'augmentation du ratio ADP/ATP, un arrêt de la croissance et de la division cellulaire, processus consommateurs d'énergie, doit avoir lieu de façon concomitante. Afin de coupler le statut métabolique de la cellule à la régulation de la croissance et de la prolifération, des liens moléculaires doivent exister entre les voies de signalisation contrôlant ces deux processus.

La master kinase LKB1 est donc apparue comme une candidate d'intérêt majeur. Cette hypothèse est largement soutenue par son rôle de gène suppresseur de tumeur, ainsi que par son lien étroit avec l'AMPK, senseur clé du statut métabolique cellulaire. Tout d'abord, les fonctions d'inhibiteur de la croissance et de la prolifération cellulaire de LKB1 ont été décrites dans la régulation négative de la voie mTOR (Mammalian target of rapamycin) (Corradetti et al., 2004; Dogliotti et al., 2017; Shackelford and Shaw, 2009). La protéine kinase mTOR fonctionne comme un senseur environnemental essentiel, répondant et intégrant différents signaux environnementaux (facteurs de croissance, mitogènes, nutriments, énergie, acides aminés) pour réguler la physiologie cellulaire de façon appropriée (Haissaguerre et al., 2014). Cette sérine/thréonine kinase est présente au sein de deux complexes protéiques

cytoplasmiques : mTORC1 et mTORC2 (Mammalian target of rapamycin complex 1 et 2) (**Figure 24**). En conditions favorables, mTORC1 régule la synthèse protéique, lipidique et d'acide nucléique, essentielles au déroulement de la croissance et de la prolifération (Howell et al., 2013; Kim et al., 2017). mTORC2, moins bien caractérisé, semble jouer sur la survie cellulaire et la prolifération, via une boucle de rétrocontrôle positive dépendante de la phosphorylation d'AKT (Kim et al., 2017). Suite à son activation, mTORC1 phosphoryle deux cibles majeures, impliquées dans la traduction des ARNs, la protéine p70 S6 kinase et le facteur 4E-BP1 (4E-Binding protein 1). Ces phosphorylations, respectivement activatrices et inhibitrices, jouent un rôle essentiel dans la synthèse protéique, notamment de protéines pro-prolifératives comme MYC ou la cycline D1 (Csibi et al., 2014; Ng et al., 2012). En amont, mTORC1 est régulé négativement par le complexe TSC1/TSC2 (Tuberous sclerosis 1/2). Sous un signal dépendant des facteurs de croissance, l'inactivation de TSC1/2, par les protéines AKT ou ERK, permet l'activation de mTORC1 (**Figure 24**) (Laplane and Sabatini, 2012). A l'inverse, en conditions de stress énergétique, l'AMPK active TSC1/TSC2 empêchant ainsi l'activation de mTORC1 (Inoki et al., 2003; Laplane and Sabatini, 2012). Par ailleurs, l'AMPK peut également inhiber directement mTORC1 en phosphorylant RAPTOR, l'une des sous-unités du complexe (**Figure 24**) (Gwinn et al., 2008).

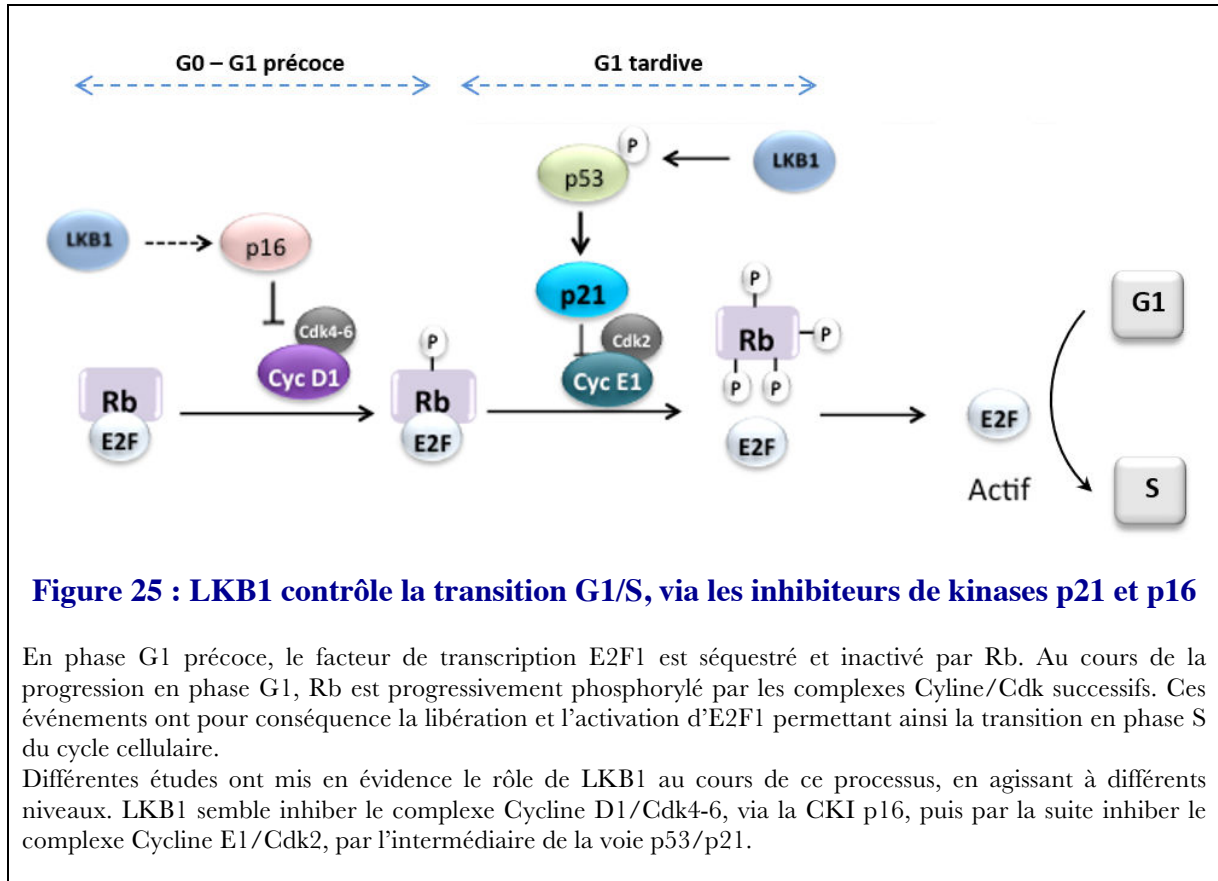
De façon intéressante, dans des cellules de rein humaines, il a été montré que LKB1 induit l'inhibition de mTORC1, via une signalisation AMPK dépendante (Corradetti et al., 2004). De plus, la délétion de *Lkb1* dans le pancréas de souris s'accompagne d'une augmentation de la taille des cellules β et ce phénotype est inversé suite au traitement à la rapamycine (inhibiteur de mTORC1) (Fu et al., 2009; Granot et al., 2009). De même, suite à la délétion de *Lkb1* dans le cœur, une hypertrophie myocardique prend place et est corrigée après un traitement identique (Ikeda et al., 2009). D'autre part, les souris, ayant une délétion de *Lkb1* spécifiquement dans les lignées myogéniques, présentent une réduction drastique de la taille des muscles squelettiques (Shan et al., 2014). Ce phénotype est clairement associé à la réduction de la taille des myofibres et à un défaut majeur de la croissance post-natale. Dans cette même étude, les auteurs ont démontré que LKB1 limite la prolifération des cellules satellites, via la signalisation AMPK/mTOR et la régulation en aval de la p70S6 kinase (Shan et al., 2014). Finalement, il est intéressant de noter que mTORC1 est activée dans les polypes de patients PJS ainsi que dans les cancers du poumon, en corrélation avec une inactivation de *LKB1* (Ji et al., 2007; Kuwada and Burt, 2011).



2.3 Le cycle cellulaire

Dans un second temps, LKB1 peut également contrôler négativement la prolifération en ciblant directement des acteurs du cycle cellulaire. Précédemment, nous avons évoqué l'importance de limiter la prolifération en conditions délétères pour la cellule. En effet, la privation en nutriments est connue pour inhiber le cycle cellulaire afin d'éviter toute erreur de division et maintenir l'intégrité génomique (Alberghina et al., 1998; Hartwell et al., 1974; Ishii

et al., 2004). Cette carence énergétique entraîne un arrêt du cycle à la transition G1/S, suite à l'activation de la protéine p53 et de sa cible en aval p21, qui inhibe alors les complexes cyclines/CDKs (**Figure 25**) (Chae et al., 2012; Jones et al., 2005; Tran et al., 2017). Cette réponse p53 dépendante est notamment régulée par l'intermédiaire de l'AMPK (Chae et al., 2012; Jones et al., 2005).



Le lien entre LKB1 et ce point de contrôle a été mis en évidence par Tiainen et ses collaborateurs dès 1999, avant même la découverte de l'interaction LKB1/AMPK. Dans une lignée de mélanome, n'exprimant pas LKB1 endogène, forcer l'expression de la kinase induit l'arrêt du cycle en phase G1 (Tiainen et al., 1999). Les auteurs émettaient alors l'hypothèse d'une implication de LKB1 dans un point de contrôle en G0/G1 du cycle cellulaire (Tiainen et al., 1999). Dans une seconde étude, l'équipe a complété ces résultats et démontré que l'induction de l'expression cytoplasmique de LKB1 induit un arrêt en phase G1, suite à l'augmentation de l'expression de p21 et de l'activité de son promoteur. Par ailleurs, dans ce modèle, LKB1 contrôle l'activité p21 via une signalisation p53 dépendante (Tiainen et al., 2002). Il est intéressant de noter que le phénotype peut être restauré par la co-expression des cyclines D1 et E (Tiainen et al., 2002). En 2006, les travaux de Zeng ont caractérisé un arrêt en phase G1, dépendant d'une fonction nucléaire de LKB1 en association avec p53. En effet,

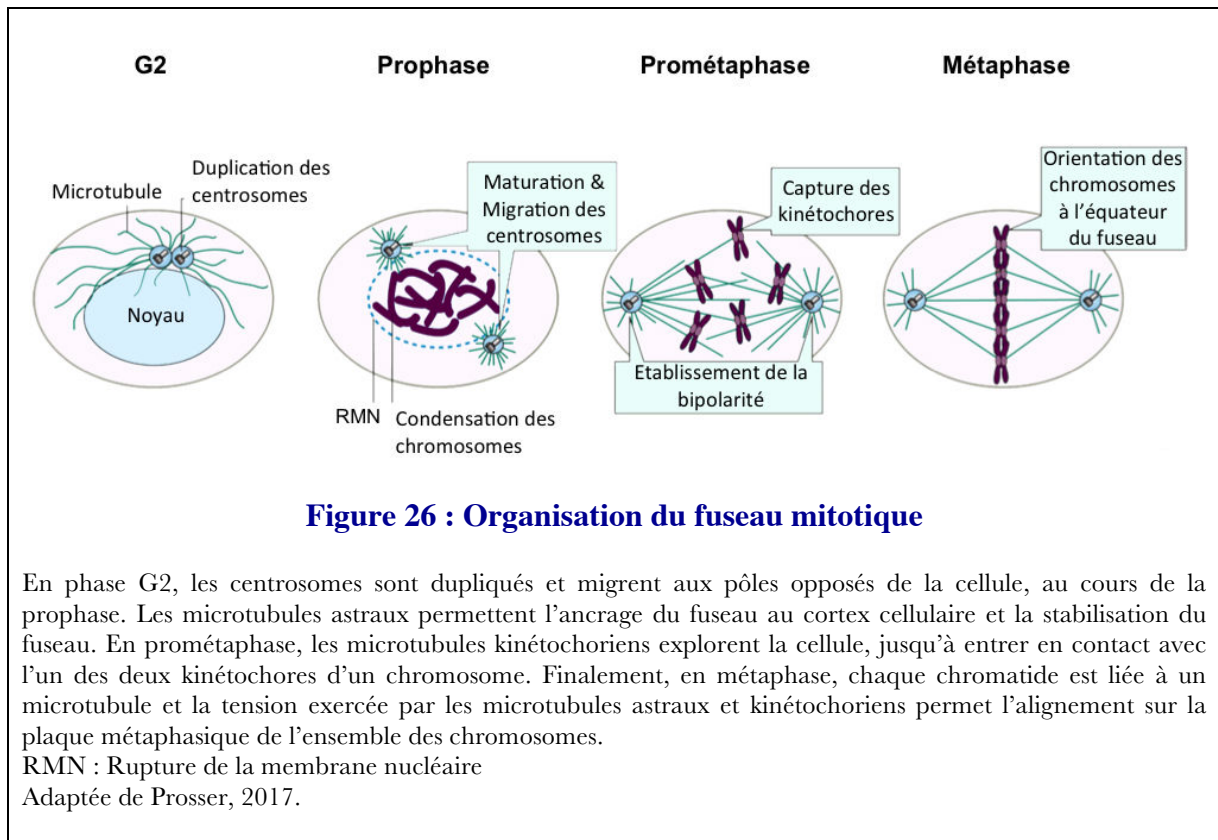
LKB1 phosphoryle p53 sur les sérines 15 et 392, la seconde augmentant la stabilité de la protéine p53 (Zeng and Berger, 2006). Ces deux phosphorylations sont essentielles pour l'arrêt p53-dépendant en phase G1. Finalement, en s'associant physiquement avec p53, LKB1 peut renforcer l'activation du point de contrôle en se fixant directement sur le promoteur de p21 et ainsi réguler son expression (Zeng and Berger, 2006). Une étude parue un an auparavant avait décrit un arrêt en phase G1, suite à la phosphorylation de p53 sur le résidu Ser15 par l'AMPK (Jones et al., 2005). Zeng et ses collaborateurs ont alors émis l'hypothèse que LKB1 pourrait agir de concert avec l'AMPK afin de phosphoryler p53 (Zeng and Berger, 2006). Par ailleurs, dans des lignées rénales et endothéliales humaines, l'absence de LKB1 endogène entraîne une accélération de la transition G1/S (Liang et al., 2010). La délétion de LKB1 semble corrélée à une augmentation de l'hyperphosphorylation de Rb, sans qu'une interaction directe entre ces deux protéines n'ait été démontrée. En revanche, les auteurs de cette étude constatent un lien entre LKB1 et les voies de signalisation p53 et p16. Cette étude montre, en effet, que LKB1 active ces inhibiteurs, qui agissent alors conjointement afin de réguler la transition G1/S, via des voies de signalisation cycline D et E indépendantes (**Figure 25**) (Liang et al., 2010). Un an plus tôt, cette équipe avait également montré que la surexpression de LKB1, dans des lignées de carcinomes pulmonaires humaines, induisait un arrêt à la transition G1/S suite à l'inhibition de ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et de l'oncogène MYC en aval (Liang et al., 2009). Finalement, des travaux récents ont confirmé l'importance du couple LKB1/AMPK dans la régulation de la transition G1/S (Fogarty et al., 2016). Les auteurs ont mis en évidence que la prolifération importante des cellules de mélanome, présentant une perte de LKB1, est causée par une réduction de l'activité de l'AMPK. Outre LKB1, l'AMPK peut également être activée par la kinase CAMKK2 (Ca²⁺/calmodulin- dependent kinase), suivant un signal calcique (Hurley et al., 2005; Woods et al., 2005). Le traitement des cellules de mélanome avec un mutant constitutif de CAMKK2 ou un agent pharmacologique augmentant le Ca²⁺ intracellulaire induit un arrêt en phase G1, similaire à celui causé par l'expression de LKB1 (Fogarty et al., 2016). Ces résultats suggèrent une nouvelle approche thérapeutique pour limiter la prolifération de cellules déficientes pour LKB1 et son enjeu dans le cas de cancers humains. Finalement, l'ensemble de ces études a permis de démontrer que LKB1 participe à la progression du cycle cellulaire jusqu'à l'initiation de la phase S. Cette étape de réplication de l'ADN requiert un suivi minutieux pour éviter toutes lésions de l'ADN, pouvant être délétères pour la cellule. Afin de prévenir ces événements, différents mécanismes sont alors mis en jeu, tels que la réponse aux dommages de l'ADN (DDR). Le DDR est un point de contrôle essentiel du cycle cellulaire permettant la

progression en phases G2/M (*cf.* §II.2.2). Nous avons précédemment évoqué l'implication de LKB1 dans le DDR, notamment établie suite à la découverte de sa phosphorylation par le senseur des dommages de l'ADN : ATM (*cf.* §III.1.4.1) (Fernandes et al., 2005; Sapkota et al., 2002b). Plus récemment, ces résultats ont été confirmés et complétés par une étude de Wang et ses collaborateurs (Wang et al., 2016). Dans différentes lignées cellulaires, les auteurs ont démontré que la forme phosphorylée de LKB1 (Thr363/366) co-localise aux foci des dommages de l'ADN avec ATM et avec la phospho-histone H2AX, marqueur des cassures double brin. LKB1 interagit et co-localise également avec BRCA1 (Breast cancer 1), autre acteur essentiel du DDR. D'autre part, l'extinction de LKB1 dans ces cellules entraîne un délai de la réponse aux dommages de l'ADN, dû à une diminution importante des recombinaisons homologues (Wang et al., 2016). Cette nouvelle étude a donc confirmé le rôle essentiel de LKB1 dans le DDR et par conséquent dans la progression du cycle cellulaire au delà de la transition G1/S. Aujourd'hui, il est admis dans la communauté scientifique que les mutations de gènes du DDR peuvent entraîner un certain nombre de syndromes, liés à une instabilité génomique et notamment associée à une prédisposition accrue au cancer (Jeggo et al., 2016). Outre son rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire, LKB1 est donc un gardien de l'intégrité génomique et cette fonction fera l'objet du prochain paragraphe.

2.4 L'intégrité génomique

L'implication de la protéine PAR-4 dans les premières divisions asymétriques, chez *C. Elegans* et *D. Melanogaster*, a initialement suggéré la possibilité d'un rôle de LKB1 au cours du processus de mitose. La division cellulaire est un mécanisme minutieusement régulé, dont le positionnement de chaque acteur est un enjeu majeur pour la création de deux cellules filles identiques (division symétrique) ou deux cellules ayant une destinée différente (division asymétrique). Afin de permettre une ségrégation chromosomique fidèle, trois événements majeurs interviennent au cours de la mitose, dont le premier est : la migration des centrosomes (Cross and McAinsh, 2014). Une fois dupliqués, ces structures migrent à chaque pôle de la cellule pendant l'étape de prophase. Durant ce cheminement, les centrosomes acquièrent leur maturité et permettent ainsi la réalisation du second événement : la pousse des microtubules (**Figure 26**) (Prosser and Pelletier, 2017). Les centrosomes sont, en effet, les centres organisateurs des microtubules (MTs). Ces organites permettent la polymérisation de MTs astraux, dont l'ancrage au cortex cellulaire est essentiel au positionnement correct et au maintien du fuseau (**Figure 26**). C'est également le lieu d'origine des MTs kinétochoriens. Au cours des étapes de pro-métaphase et métaphase, ces derniers prospectent dans la cellule,

par un phénomène de polymérisation-dépolymérisation, jusqu'à entrer en contact avec le centromère d'un chromosome (**Figure 26**).



Durant l'anaphase, la tension des MTs astraux au cortex, ainsi que la dépolymérisation des MTs kinétochoriens contribuent à la séparation des chromatides sœurs et à leur attraction aux pôles de la cellule. Enfin, le dernier évènement incontournable est réalisé pendant la télophase : l'étape finale d'abscission ([Chircop, 2014](#)). Ce phénomène est dépendant de la formation et de la contraction d'un anneau d'acto-myosine à l'équateur de la cellule, permettant ainsi une scission de la cellule mère et la genèse de deux cellules filles. Ces différents phénomènes sont notamment liés à la polarité cellulaire. En effet, l'orientation de la division nécessite l'alignement du fuseau mitotique sur l'axe de polarité de la cellule ([Ahringer, 2003](#); [Vorhagen and Niessen, 2014](#)). En outre, les contacts cellule-cellule et cellule-matrice fournissent également des signaux importants pour le positionnement des fuseaux mitotiques ([den Elzen et al., 2009](#); [Lechler and Fuchs, 2005](#); [Thery et al., 2005](#)). Ces mécanismes sont donc essentiels à la destinée cellulaire et au maintien de l'intégrité génomique. D'autre part, les microtubules, connus largement pour leur rôle au cours de la mitose, sont également des acteurs importants de la polarité cellulaire ([Ahringer, 2003](#); [Siegrist and Doe, 2005](#); [Zhang et al., 2014](#)). Fait intéressant, il existe un « cross-talk » entre les protéines PAR et les

microtubules. Les protéines PAR sont impliquées dans l'organisation et la dynamique des microtubules (Drewes et al., 1997; Lazaro-Dieiguez et al., 2013) et inversement les microtubules peuvent participer au « pattern » d'expression des protéines PAR (Cuenca et al., 2003). Ce dialogue entre polarité et division cellulaire a poussé différents groupes de recherche à étudier de façon plus extensive le rôle des protéines PAR dans le contrôle de la mitose. Leurs résultats ont confirmé l'importance de ces protéines dans le processus de division (Ahringer, 2003; Lazaro-Dieiguez et al., 2013; Vorhagen and Niessen, 2014). Au regard de toutes ces données et de son implication dans la polarité et la prolifération, il était judicieux de penser que LKB1, outre son rôle dans la transition G1/S du cycle cellulaire, pouvait également réguler la progression mitotique.

En 2007, Lee et ses collaborateurs publient une étude princeps, démontrant pour la première fois le rôle de LKB1 dans le processus de mitose (**Figure 27**) (Lee et al., 2007). Les auteurs ont montré que l'altération de la voie LKB1 entraîne d'importants défauts mitotiques. En effet, l'absence de la kinase dans les neuroblastes larvaires de drosophile, conduit à une ségrégation chromosomique aberrante. Parmi ces altérations, il a notamment été identifié la présence de « lagging chromosomes » en métaphase et anaphase, ainsi que des ponts chromosomiques au sillon de clivage en anaphase (**Figure 27A-B**) (Lee et al., 2007). Par ailleurs, dans ce modèle, il a également été mis en évidence des défauts majeurs de la polarité, liés à une désorganisation du cytosquelette d'actine. Ces événements ont pour conséquences la genèse d'un contingent polyploïde (**Figure 27C**).

D'un point de vu moléculaire, les auteurs décrivent un modèle dans lequel LKB1 phosphoryle l'AMPK, qui en aval phosphoryle la chaîne légère régulatrice de la myosine (MRLC), induisant ainsi sa fixation à l'actine (Lee et al., 2007). En effet, l'expression d'une forme constitutivement active de l'AMPK ou de MRLC restaure l'ensemble du phénotype chez les mutants déficients pour *Lkb1*. LKB1 joue donc un rôle central dans la progression en mitose afin de préserver l'intégrité génomique.

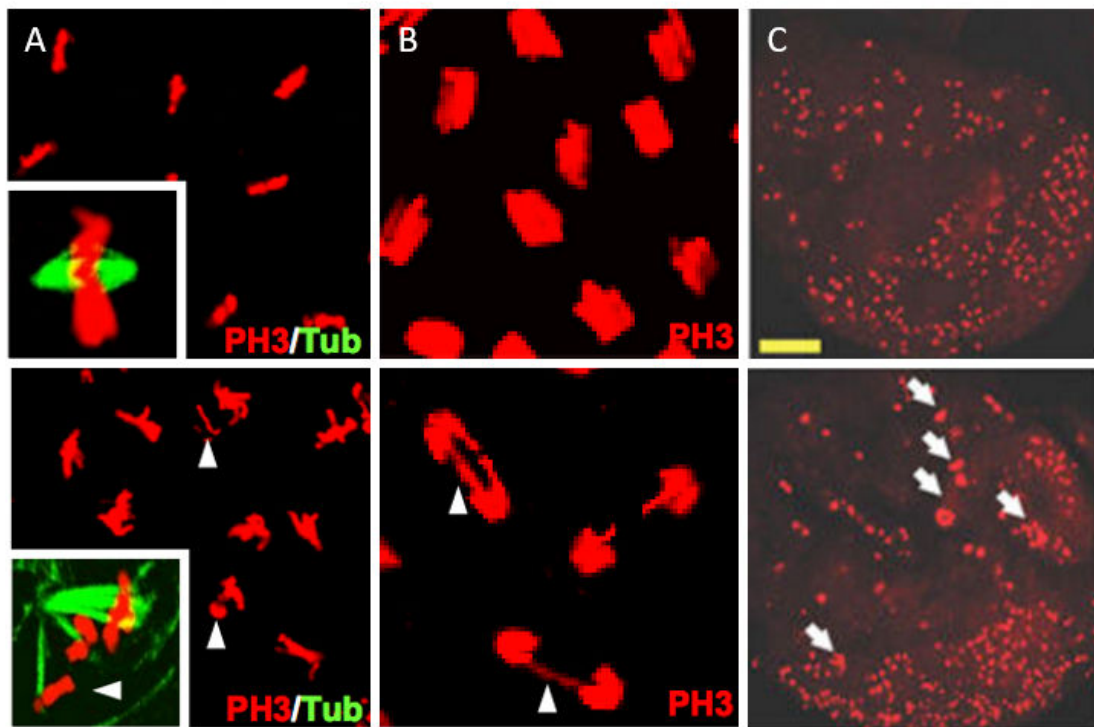


Figure 27 : Défauts de mitose et altérations de la ploïdie observées suite à la perte de LKB1 chez la drosophile

Panneaux hauts : embryons contrôles / Panneaux bas : embryons *Lkb1*^{-/-}

(A) Immunofluorescence phospho-Histone 3 (PH3 – rouge), marquage des chromosomes en mitose, et tubuline (Tub – vert), marquage des microtubules. Les embryons déficients pour *Lkb1* présentent des défauts dans l'alignement des chromosomes en métaphase (pointes de flèches).

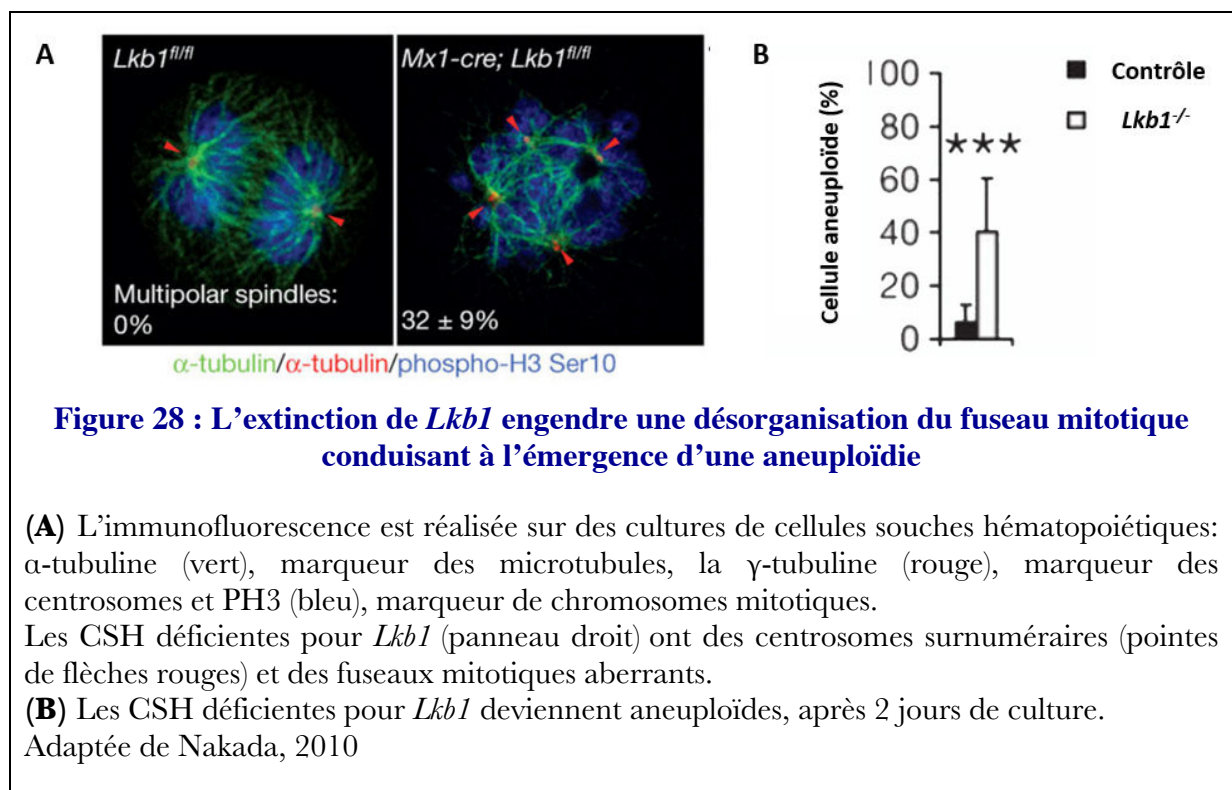
(B) Immunofluorescence phospho-Histone 3 (PH3 – rouge), marquage des chromosomes en mitose. Les embryons déficients pour *Lkb1* présentent des chromosomes retardés, pendant l'anaphase (pointes de flèche).

(C) Immunofluorescence phospho-Histone 3 (PH3 – rouge), réalisée sur des neuroblastes de drosophiles contrôles ou déficientes pour *Lkb1*. Dans les embryons déficients pour LKB1, les flèches indiquent des chromosomes mitotiques avec une polyploïdie importante.

Adaptée de Lee, 2007

LKB1 participe également à la dynamique du réseau de microtubules. Deux études ont ainsi établi que cette protéine kinase pouvait empêcher leur élongation, en inhibant la polymérisation de la tubuline. Dans la première étude, réalisée *in vitro* dans différentes lignées cellulaires, LKB1 contrôle ce processus en phosphorylant la protéine MARK2, qui a son tour phosphoryle la « microtubule-associated protein » Tau. Cette dernière interagit avec la tubuline, afin de stabiliser les microtubules, et sa phosphorylation conduit à sa dégradation via le protéasome. Cette signalisation, dépendante de LKB1, conduit donc à la déstabilisation des microtubules et par conséquent à leur dépolymérisation (Kojima et al., 2007). Dans des cultures cellulaires de myoblastes, la seconde étude a démontré que la déstabilisation des microtubules, induite par LKB1, est consécutive à la phosphorylation des protéines AMPK et

MARKs (Mian et al., 2012). Les auteurs de ces deux publications n'ayant pas spécifiquement investigué ce lien entre LKB1/microtubules au cours de la mitose, Wei et ses collaborateurs se sont intéressés à l'intégrité du réseau de microtubules lors de la division. Leurs travaux ont mis en évidence une désorientation majeure du fuseau mitotique en absence de LKB1, ainsi qu'une localisation aberrante de l'AMPK, dans des cultures de cellules épithéliales (Wei et al., 2012). Au cours de la mitose, l'AMPK s'associe à différentes structures essentielles à la mitose, telles que le centrosome ou le midbody, faisant de sa localisation un événement important pour la progression de la division (Vazquez-Martin et al., 2009). Ces résultats semblaient indiquer l'existence d'une interaction entre LKB1 et AMPK au cours de la mitose. Cette hypothèse a été confortée par une autre étude ayant montré que la déficience de l'AMPK entraîne des défauts de l'orientation du fuseau mitotique, similaires à ceux retrouvés en l'absence de LKB1 (Thaiparambil et al., 2012). Toutefois, il semble que la master kinase peut également contrôler la progression de la mitose indépendamment de l'AMPK. Dans un modèle murin de délétion de *Lkb1*, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont souvent incapables d'entrer en mitose ou n'arrivent pas à terminer le programme mitotique (Nakada et al., 2010). D'autre part, les CSH présentent un nombre de centrosomes surnuméraires, associé à des fuseaux mitotiques anormaux (Figure 28A). L'ensemble de ces événements conduit à l'émergence de cellules aneuploïdes (Figure 28B) (Nakada et al., 2010).



En revanche, phénotypiquement, l'absence de l'AMPK dans le CSH ne présente aucune similitude avec la délétion de LKB1. Les auteurs ont donc suggéré un rôle de LKB1, indépendant de l'AMPK, durant la mitose (Nakada et al., 2010).

Finalement, LKB1 peut aussi réguler la formation et l'orientation du fuseau en déphosphorylant la Polo-like kinase 1 (PLK1). L'absence de LKB1, dans différentes lignées humaines et murines, conduit à une augmentation du nombre de centrosomes et de cellules binucléées, mais également à un retard de mitose (Werle et al., 2014). Ce phénotype est associé à une augmentation importante de la phosphorylation de PLK1 et une diminution minime de la phosphorylation de l'AMPK. Werle et ses collaborateurs ont donc également décrit un mécanisme contrôlé par LKB1, indépendamment de l'AMPK (Werle et al., 2014). L'ensemble de ces études a permis de souligner l'enjeu de l'expression de LKB1 au cours de la mitose, notamment dans la formation du fuseau. LKB1 est donc un gardien essentiel de l'intégrité génomique.

3. Les fonctions hépatiques de LKB1

3.1 Le métabolisme hépatique

Comme précédemment introduit, le foie est un organe métabolique essentiel responsable de l'homéostasie glucidolipidique corporelle, dont l'un des acteurs majeurs est l'AMPK. Au vu de l'incidence croissante des maladies métaboliques, l'étude approfondie de ce processus est devenue un enjeu majeur de santé publique. Ainsi, un nombre important d'études a permis de caractériser les différentes fonctions contrôlées par l'AMPK dans le tissu hépatique (Day et al., 2017; Fullerton, 2016; Hasenour et al., 2013; Steinberg, 2009). Afin de maintenir la balance énergétique, l'AMPK est connue pour contrôler différentes voies biochimiques. Initialement, différentes publications avaient suggéré un rôle important de l'AMPK dans le contrôle de la gluconéogenèse hépatique, notamment en traitant des cellules avec deux activateurs pharmacologiques de la kinase (Lochhead et al., 2000; Zhou et al., 2001). Le premier composé est appelé : AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide) et le second est un agent antidiabétique : la Metformine. Cette molécule possède, parmi ces différentes fonctions, des propriétés hypoglycémiantes, notamment en diminuant la production de glucose hépatique (Hundal et al., 2000). Plus particulièrement, l'étude de Zhou avait permis de montrer que le traitement d'hépatocytes primaires de rat à la metformine ou l'AICAR stimule l'AMPK et conduit à l'inhibition de la production de glucose hépatique (Zhou et al., 2001). Toutefois, il a été suspecté que l'activation de la kinase n'était

pas directement contrôlée par la metformine. Ce phénomène serait secondaire et dû à la réduction de l'ATP intracellulaire, suite à l'inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire par l'antidiabétique (Stephenne et al., 2011). Par ailleurs, depuis maintenant vingt ans, l'AMPK est également connue pour inhiber la synthèse des acides gras et favoriser leur oxydation (Merrill et al., 1997). Au regard de ces divers résultats et connaissant le lien étroit entre LKB1 et AMPK, il semblait logique d'investiguer le rôle de LKB1 dans ces différentes voies métaboliques, au sein du tissu hépatique. Ainsi, en 2005, Shaw et ses collaborateurs étudient les effets de la délétion de *Lkb1* dans un modèle murin, grâce à l'utilisation d'un adénovirus exprimant une Cre recombinase (souris *Lkb1*^{-/-}). Cet adénovirus ayant un tropisme élevé pour les hépatocytes, les souris traitées présentent une extinction de LKB1 uniquement dans le foie (Shaw et al., 2005). L'absence de la master kinase conduit à l'inhibition de l'activité AMPK, ainsi qu'à une hyperglycémie. Notons que dans cette étude, Shaw et ces collaborateurs n'ont pas montré de lien direct entre ces deux phénotypes. Toutefois, ces souris répondent à l'injection d'insuline et sont capables d'ajuster le niveau de glucose sanguin. Ce résultat démontre que la consommation du glucose périphérique n'est pas altérée (Shaw et al., 2005). D'autre part, ces souris arborent une augmentation générale du patron d'expression génique de la gluconéogenèse (*G6pase* ; glucose-6-phosphatase / *Pepck* ; phosphoenolpyruvate carboxylase) et de la lipogenèse (*Srebp-1* ; sterol regulatory element-binding protein 1 / *Acc1* ; acetyl CoA carboxylase) (Shaw et al., 2005).

Concernant la gluconéogenèse, chez la souris, l'un des régulateurs importants est TORC2 (Transducer of regulated CREB activity 2), maintenant connu sous le nom CRTC2 (CREB regulated transducer of activity 2) (Koo et al., 2005). Ce régulateur favorise la transcription de *Pgc1a* (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α) dont les cibles sont *Pepck* et *G6pase*. Dans l'étude de Shaw, l'augmentation de la néoglucogenèse, dans les foies *Lkb1*^{-/-}, est induite suite à l'activation et la relocalisation nucléaire de la forme active de CRTC2 (Shaw et al., 2005). Il est intéressant de noter que CRTC2 est une cible négative de l'AMPK et de SIK2 (Salt-inducible kinase 2) (Koo et al., 2005; Sreton et al., 2004). Cette dernière fait partie de la famille des ARKs et est une des 14 kinases régulées par LKB1 (Lizcano et al., 2004). Ces résultats semblaient alors fournir deux cibles de choix pour LKB1, dans le contrôle de la néoglucogenèse hépatique. C'est pourquoi il fût surprenant de constater qu'une invalidation de *Ampk*, spécifiquement dans le foie de souris, n'induit pas le même phénotype que celle de *Lkb1*. Effectivement, ces souris présentent une glycémie normale à l'inverse des animaux *Lkb1*^{-/-} (Foretz et al., 2010). De plus, différents travaux ont montré que les effets de l'AICAR et de la metformine, sur la production de glucose hépatique, sont indépendants de

l'activation de l'AMPK. En effet, l'inhibition de la néoglucogenèse, obtenue suite à ces deux traitements, est également observée en absence de l'AMPK dans le tissu hépatique (Foretz et al., 2010; Hasenour et al., 2014). Ces résultats ont permis de démontrer que l'AMPK n'est pas indispensable à la régulation de ce processus dans le foie. Les différents rôles de LKB1 dans le métabolisme hépatique ne semblent donc pas tous être relayés par l'AMPK. Ainsi, plus récemment, une étude a confirmé que LKB1 inhibe la néoglucogenèse par l'intermédiaire des protéines SIKs (Patel et al., 2014). Les souris avec une triple invalidation (SIK2 et AMPK α 1/ α 2 (sous-unités catalytiques)), spécifiquement dans le foie, présentent une gluconéogenèse intacte. En revanche, le traitement d'hépatocytes primaires avec un inhibiteur global des protéines SIKs, ne ciblant pas l'AMPK, induit la production de glucose (Figure 29) (Patel et al., 2014).

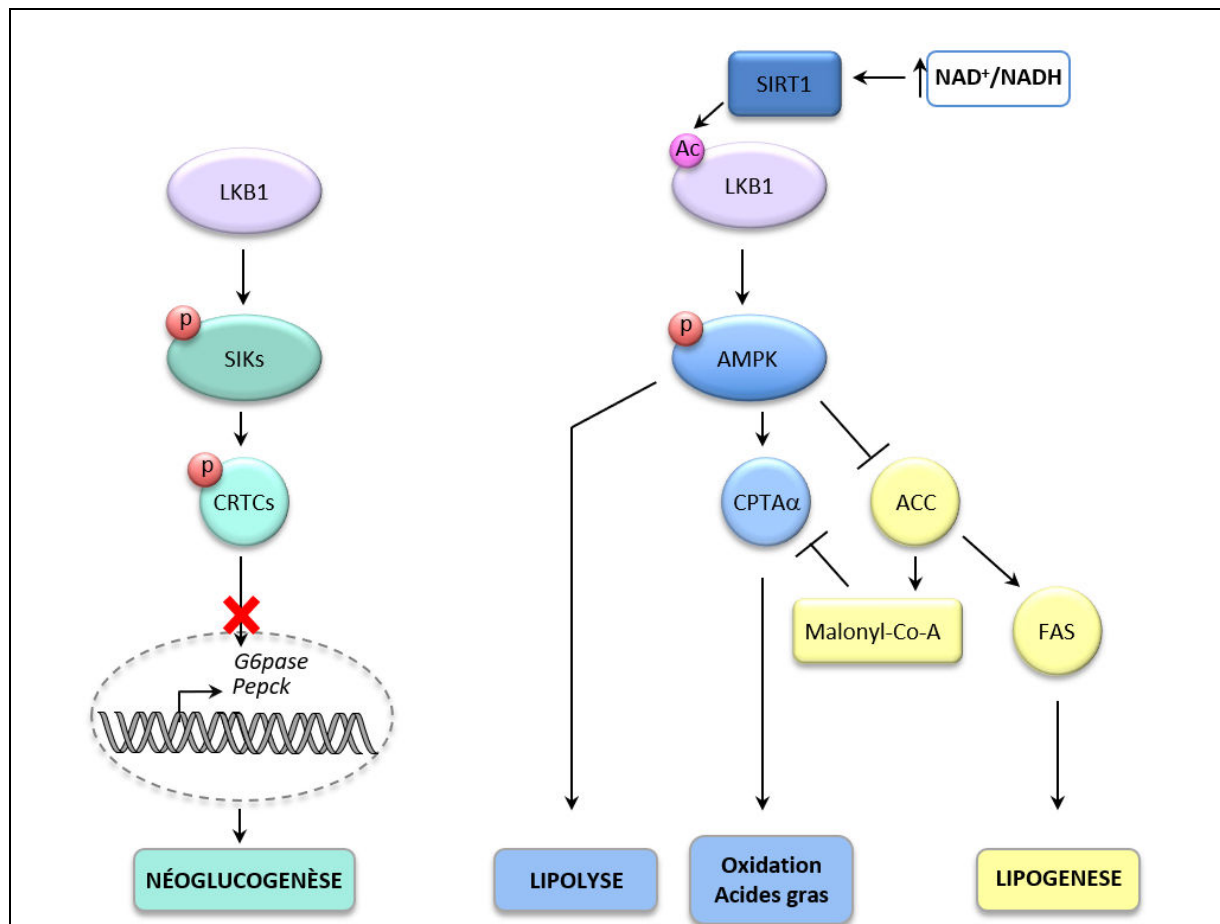


Figure 29 : LKB1 contrôle le métabolisme glucidique et lipidique dans l'hépatocyte

L'activité des protéines SIKs influence la phosphorylation du co-activateur de transcription : CRTCs. LKB1 contrôle donc son transport nucléo-cytoplasmique et par conséquent l'expression de gènes de la gluconéogenèse dans le foie. D'autre part, LKB1 contrôle également le métabolisme lipidique, en étant une cible de l'activité déacétylase de SIRT1.

Adaptée de Patel, 2014, Jia, 2016 et Ruderman, 2010.

D'autre part, les auteurs de cette étude suggèrent que la présence d'au moins une des isoformes de SIK peut être suffisante pour activer la gluconéogenèse dans les hépatocytes, indépendamment de l'AMPK (Patel et al., 2014). Finalement, les hépatocytes de souris, ayant une invalidation totale de SIK3, arborent un phénotype semblable à celui observé dans les hépatocytes de souris *Lkb1*^{-/-} (Itoh et al., 2015). Ces résultats suggèrent donc que SIK3 pourrait être le principal régulateur de la gluconéogenèse, sous le contrôle de LKB1, dans les hépatocytes.

Concernant le métabolisme lipidique, l'activation de la voie LKB1/AMPK semble dépendante de l'activité déacétylase de SIRT1, précédemment détaillée (**Figure 29**) (Hou et al., 2008).

En effet, la surexpression de SIRT1, dans des lignées cellulaires de CHC humains, induit l'activation de LKB1, via sa phosphorylation sur le résidu Ser428. L'AMPK est alors activée et phosphoryle à son tour ACC (Hou et al., 2008). Cette phosphorylation inhibitrice a deux conséquences majeures, tout d'abord l'arrêt de la biosynthèse des acides-gras et ensuite une activation de CPT1A (Carnitine palmitoyltransferase). CPT1A favorise l'import mitochondrial des acides gras, permettant ainsi l'activation de la β -oxydation (Davies et al., 1992; Merrill et al., 1997). La surexpression de SIRT1 dans ces hépatocytes conduit effectivement à une diminution importante de l'accumulation des lipides (Hou et al., 2008). Plus récemment, une étude a été conduite, *in vivo*, dans des souris ayant une extinction totale de l'activité catalytique de SIRT1 (*SIRT1*^{y/y}) (Cheng et al., 2017). Ces animaux sont traités avec un régime gras (HFD : High Fat Diet), connu pour favoriser l'installation d'une stéatose et mimer le développement de maladies du « foie gras » non alcoolique ou NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease). Les souris *SIRT1*^{y/y} présentent une forte diminution des phosphorylations de LKB1, AMPK et ACC, associée à une augmentation drastique des triglycérides hépatiques (Cheng et al., 2017). Plus généralement, la perte de l'activité désacétylase SIRT1 aggrave le développement de NAFLD, induite par le régime HFD (Cheng et al., 2017). Fait notable, différents groupes de recherche indépendants ont montré que l'activité SIRT1 augmente en réponse à l'activation de l'AMPK. Ces résultats ont été obtenus dans des myoblastes de muscles squelettiques, des myocytes ainsi que des fibroblastes embryonnaires de souris (Canto et al., 2009; Fulco et al., 2008). Récemment, une autre étude a également montré que le traitement à la metformine de souris sous régime HFD ou *ob/ob* conduisait à une régulation mutuelle de l'AMPK et de SIRT1 dans le foie (Kang et al., 2016). Ces études suggèrent donc l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positive de la voie SIRT1/LKB1/AMPK, dans les mécanismes du métabolisme lipidique. Toutefois, cette

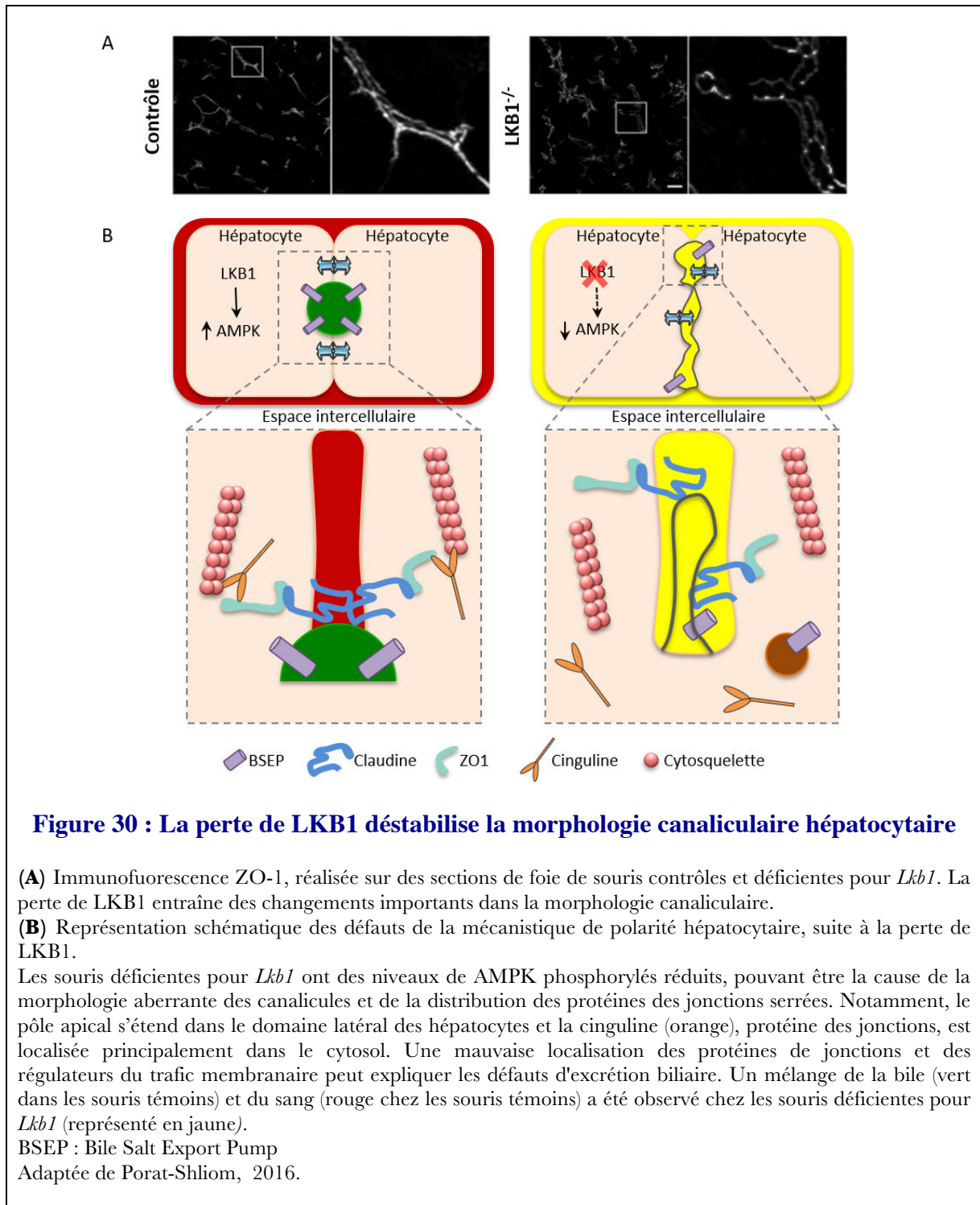
hypothèse reste aujourd'hui à confirmer suite à différentes publications ayant montré des effets antagonistes de l'AMPK et de SIRT1, notamment dans les hépatocytes primaires de rat et dans des lignées d'hépatomes et de CHC humains (Lee et al., 2012; Yang et al., 2017).

L'ensemble de ces études a confirmé l'importance de LKB1 dans le métabolisme hépatique, mais nécessite encore d'être approfondi. Ce thème de recherche étant un enjeu majeur, au vu de la pandémie des syndromes métaboliques, il sera particulièrement important de caractériser pleinement les mécanismes en aval de LKB1 et d'identifier ses cibles directes.

3.2 La polarité hépatocytaire

Dans le foie, les hépatocytes sont polarisés. Les protéines des jonctions serrées, telles que l'occludine, la claudine ou ZO-1, permettent la séparation entre les domaines membranaires apicaux et basolatéraux, la formation des canalicules biliaires ainsi que l'étanchéité de la lumière canaliculaire (Kojima et al., 2003; Vinken et al., 2006). Nous avons précédemment évoqué le rôle essentiel de la polarisation des hépatocytes dans la sécrétion de la bile canaliculaire. Il a notamment été montré que la perte de la polarité hépatocytaire conduisait à des défauts de la sécrétion de bile, entraînant une cholestase, ainsi que des lésions du tissu hépatique (Arias et al., 1993; Gissen and Arias, 2015; Houwen et al., 1994). Une première étude a été réalisée *in vitro*, sur des hépatocytes primaires de rat, dans le but d'identifier une éventuelle participation de LKB1 dans le processus de polarisation hépatocytaire (Fu et al., 2010). Afin de suivre la formation, l'élongation ainsi que le maintien des canalicules biliaires, reflet de la polarité, les auteurs ont utilisé un système de culture d'hépatocytes entre une bicouche de collagène. En effet, ce système particulier de culture en « sandwich » permet à des hépatocytes ne se divisant pas de former un réseau multicellulaire canaliculaire, similaire à la structure observée *in vivo* et capable de persister quarante jours (Dunn et al., 1991; Dunn et al., 1989; LeCluyse et al., 1994). Dans ce système, l'activité des protéines LKB1 et AMPK est progressivement augmentée au cours de la formation du réseau, avant d'être diminuée durant la phase d'élongation (Fu et al., 2010). Classiquement, après six jours de culture, le réseau est complètement ramifié. Les auteurs ont donc testé l'inhibition à différents stades de la formation du réseau. Ainsi, cette étude a permis de démontrer que l'expression de LKB1 est associée à la présence de marqueurs spécifiques, tels que ABCB1 (ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1), marqueur apical, et l'occludine, marqueur jonctionnel. Fait intéressant, l'inhibition précoce de LKB1, suite à une transfection adénovirale, entraîne un blocage de la formation du réseau (Fu et al., 2010). Fu et ses collaborateurs ont donc étudié l'effet d'une inhibition tardive et ont constaté que cet

évènement conduit à une désorganisation majeure de la structure canaliculaire. Ces travaux ont permis d'établir que LKB1 participe à la formation et au maintien du réseau canaliculaire hépatique, mais pas à son élongation (Fu et al., 2010). Un an plus tard, ces résultats ont été confirmés dans une étude réalisée *in vivo* (Woods et al., 2011). En effet, l'absence de LKB1, spécifiquement dans le foie, entraîne une insuffisance des voies biliaires et une altération de la formation, post-natale, des ramifications des canalicules (**Figure 30A**).

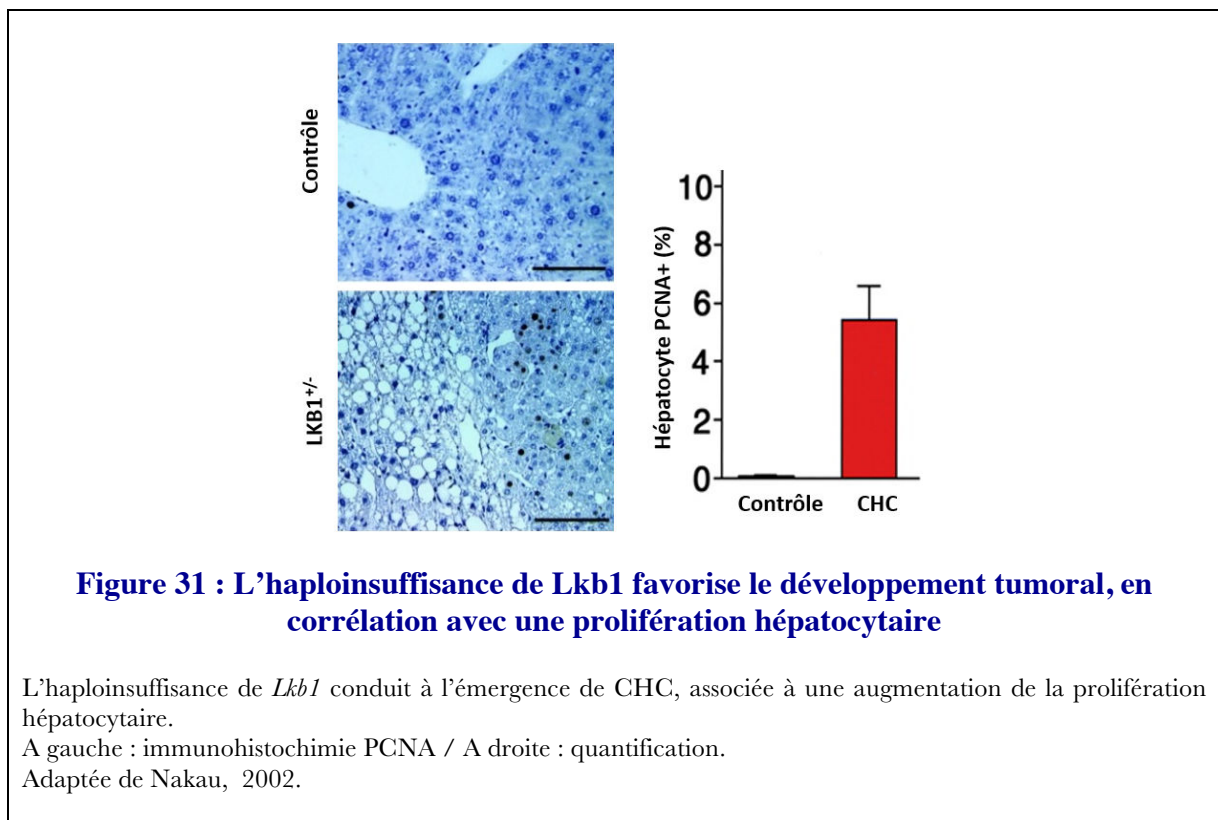


Ces défauts conduisent notamment à une perte de clairance des acides biliaires. En outre, ces souris manifestent également d'importantes modifications du métabolisme lipidique, telles qu'une augmentation des lipoprotéines de basse densité, transporteurs du cholestérol, ainsi que du taux de cholestérol non-estérifié (Woods et al., 2011). LKB1 joue donc un rôle critique dans l'homéostasie des acides biliaires et son absence conduit à l'installation d'une hyperbilirubinémie et d'une cholestase. Ces différents événements sont délétères et provoquent finalement la mort de ces souris, dans les 4 semaines suivant leur naissance (Woods et al., 2011). Par ailleurs, au regard de l'importance des jonctions cellulaires dans la polarité, une équipe de recherche s'est intéressée à la régulation des jonctions serrées dans ce même modèle murin déficient pour LKB1 (Porat-Shliom et al., 2016). Ces souris présentent, comme attendu, un réseau canaliculaire fortement perturbé, avec des canaux plus longs et plus larges que les souris contrôles. Cette morphologie aberrante est corrélée à une distribution anormale des jonctions serrées, mise en évidence par une localisation particulière de leurs composants, tels que les protéines claudines ou ZO-1 (Zonula occludens-1) (**Figure 30B**) (Porat-Shliom et al., 2016). Grâce à une technique de microscopie intra-vitale et à l'aide de traceurs, les auteurs ont également montré un retard de la sécrétion biliaire en absence de LKB1. Enfin, ce phénotype corrèle avec une perméabilité accrue des jonctions serrées, suggérant un rôle pour LKB1 également dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire (Porat-Shliom et al., 2016). Dans d'autres organismes, il est établi que le contrôle de la polarité par LKB1 présente une importance majeure au cours du développement embryonnaire (*cf.* §III.2.1). Cette question n'ayant pas encore été adressée dans le tissu hépatique murin et au regard des précédents résultats, l'équipe de Christine Perret s'est alors penchée sur l'étude phénotypique de souris invalidées pour *Lkb1* spécifiquement dans les hépatoblastes (Just et al., 2015). Les auteurs ont ainsi démontré que l'absence de LKB1 n'impacte pas la différenciation des hépatoblastes en précurseurs cholangyocytaires, mais empêche la maturation des canaux (Just et al., 2015). Cet événement corrèle avec une dérégulation de la voie Notch, *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, les souris invalidées pour Notch présentent une diminution de l'activité LKB1, soulignant l'existence d'un dialogue entre ces deux voies (Just et al., 2015). Il est intéressant de noter que Notch intervient également dans l'homéostasie glucidique et lipidique dans le parenchyme hépatique (Pajvani et al., 2013; Pajvani et al., 2011). Toutefois, le mécanisme précis régulant l'interaction entre les voies LKB1 et Notch reste encore inconnu et nécessite de nouvelles investigations. Outre ses fonctions dans le développement et la physiologie hépatique, différentes études ont également révélé l'implication de LKB1 dans la pathologie, plus

particulièrement dans le développement de carcinomes hépatocellulaires. Ce rôle fera l'objet de notre dernier paragraphe.

3.3 La tumorigénèse hépatique

Les premières preuves de l'existence d'un lien entre des dérégulations de LKB1 et le développement de CHC ont été découvertes dans un modèle murin haplo-insuffisant pour *Lkb1* (souris *Lkb1*^{+/-}). En 2002, Nakau et ses collaborateurs ont en effet mis en évidence l'émergence de carcinomes hépatocellulaires chez des souris *Lkb1*^{+/-} de plus de 50 semaines (Nakau et al., 2002). Ce phénotype est également corrélé à une augmentation globale de la prolifération hépatocytaire (Nakau et al., 2002). Une immunohistochimie PCNA (proliferating cell nuclear antigen) a révélé un index de prolifération élevé dans les adénomes hépatocellulaire (AHC), mais également dans les carcinomes, dans une moindre mesure (Figure 31).



Les auteurs ont envisagé que cette prolifération inférieure dans les CHC, en comparaison des AHC, pouvait être due à une disponibilité en oxygène moins importante dans les larges tumeurs. Le parenchyme non-tumoral présente aussi une prolifération hépatocytaire légèrement supérieure, comparativement au tissu hépatique quiescent des animaux contrôles. Ces résultats suggéraient donc un rôle de gène suppresseur de tumeur de LKB1 dans le CHC.

Dans la continuité de cette étude, l'extinction de LKB1, spécifiquement dans le foie, grâce à un adénovirus Cre, est corrélée avec une augmentation de la prolifération hépatocytaire (Mohseni et al., 2014). Dans ce modèle, cet effet pro-prolifératif serait médié par l'activation du régulateur transcriptionnel YAP (Yes-activated protein), notamment connu pour cibler des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. En effet, l'inhibition concomitante de LKB1 et de YAP restaure le phénotype (Mohseni et al., 2014). Toutefois, LKB1 semble aussi avoir des effets pro-oncogéniques et pouvoir participer à la progression de carcinomes hépatocellulaires. Précédemment, nous avons évoqué l'implication de la polyubiquitinylation de LKB1, par le complexe Skp2-SCF, dans la croissance de CHC murins (*cf.* §III.1.4) (Lee et al., 2015). Dans une cohorte de patients, cette équipe de recherche a également mis en évidence une surexpression de Skp2 et LKB1 au cours des étapes tardives du CHC, associé à un mauvais pronostic (Lee et al., 2015). D'autre part, les auteurs ont complétés ces résultats *in vitro*. En effet, suite à un stress énergétique, tel qu'une carence en glucose, l'activation de l'oncogène Ras a pour conséquence la stabilisation de LKB1, par ubiquitinylation Skp2-dépendante (**Figure 32**). En aval, la phosphorylation de l'AMPK conduit à l'inhibition de la mort cellulaire (Lee et al., 2015). Cette cascade de signalisation serait donc à l'origine des effets pro-oncogéniques de LKB1 dans le foie.

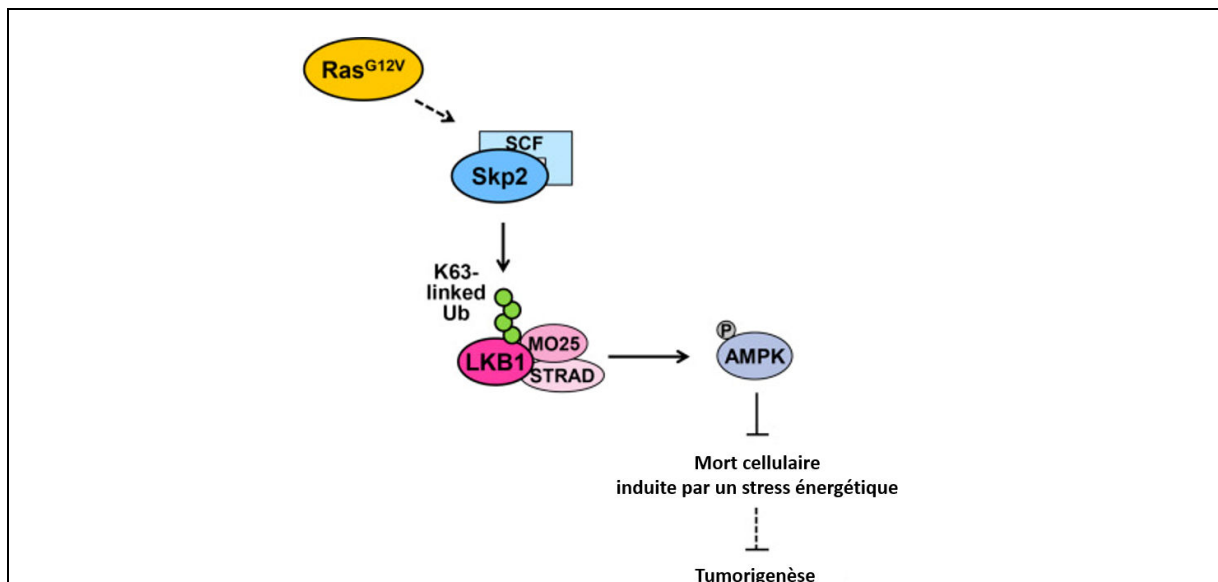
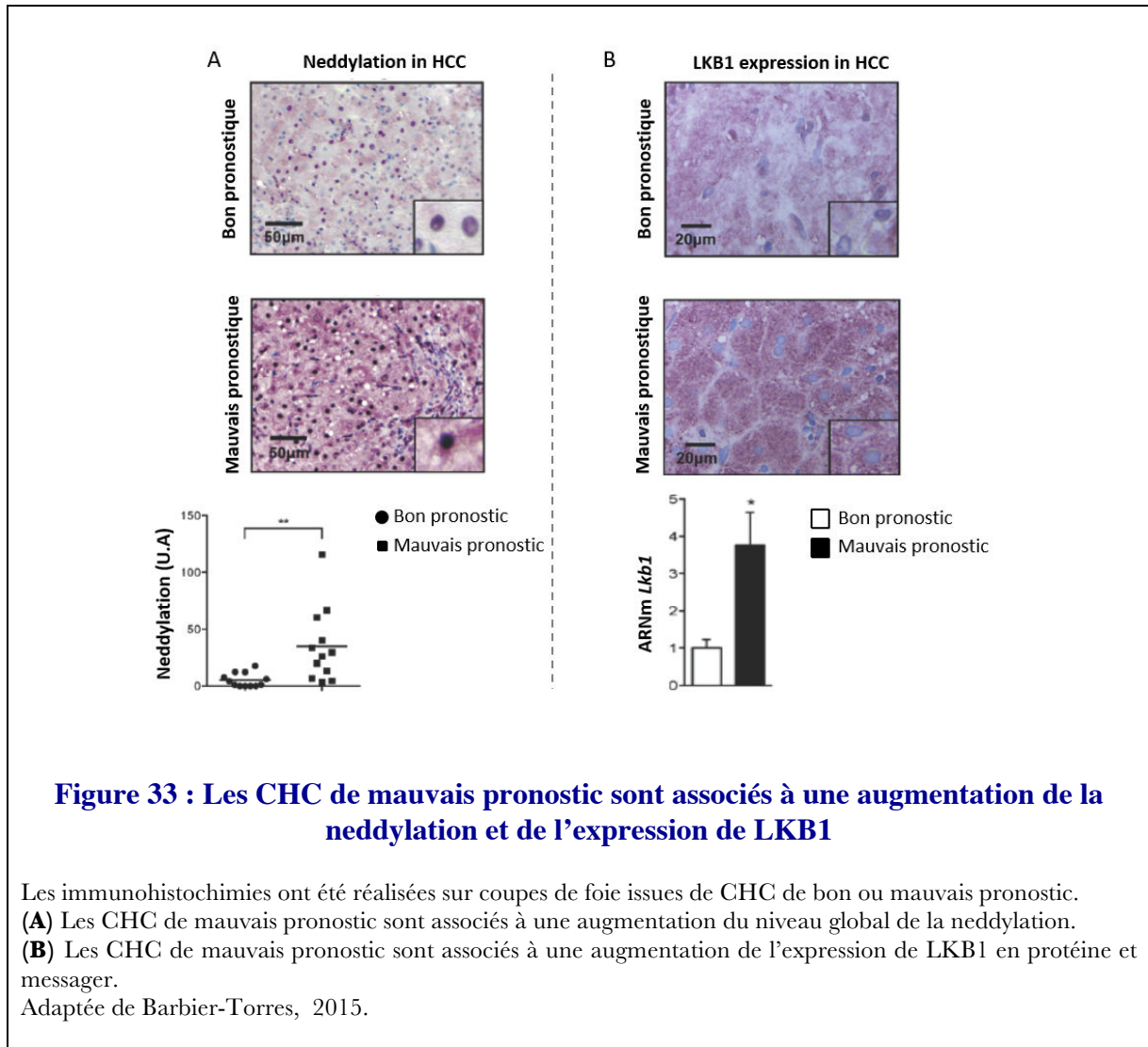


Figure 32 : L'activation de LKB1 est essentielle à la survie des cellules cancéreuses en conditions de stress énergétique

Dans un contexte de stress énergétique, sous un signal Ras, LKB1 est stabilisée grâce à l'activation du complexe Skp2-SCF. Cette signalisation a pour conséquence l'activation de l'AMPK et en aval la survie de cellules tumorales.

Lee, 2010.

Cependant, LKB1 peut également participer à la progression du CHC indépendamment de l'AMPK. La découverte d'une élévation globale du profil de neddylation, dans les CHC humains de mauvais pronostics, a offert une nouvelle preuve du potentiel pro-oncogénique de LKB1 (**Figure 33A**) (Barbier-Torres et al., 2015).



Cette modification post-traductionnelle permet la stabilisation de protéines cibles. Le groupe de Martinez-Chantar a récemment analysé l'effet d'une inhibition de la neddylation sur la progression tumorale hépatique. Cette étude a été réalisée sur un modèle murin de CHC, associé à une signature de stress oxydatif. L'inhibition de la neddylation, par un agent pharmacologique, a pour conséquences une réduction de la taille des tumeurs, de la fibrose ainsi qu'une induction de l'apoptose, mais également une reprogrammation métabolique des tumeurs, favorisant notamment la glycolyse (Barbier-Torres et al., 2015). De nombreux oncogènes étant connus pour altérer le métabolisme tumoral, cette équipe a donc cherché des

acteurs de ces voies biochimiques pouvant être neddylysés. Les niveaux de LKB1, messenger et protéine, sont significativement plus élevés dans les CHC humains de mauvais pronostics et corrélient avec une augmentation conjointe de la neddylation (**Figure 33B**). Cette surexpression de LKB1 est également observée dans le modèle de CHC murin, précédemment évoqué. Fait intéressant, le traitement de ces souris avec l'inhibiteur de la neddylation conduit à une diminution de l'expression protéique de LKB1, sans pour autant influencer l'état d'activation de l'AMPK ([Barbier-Torres et al., 2015](#)). Dans ce contexte, cette étude a prouvé que LKB1 est donc une cible préférentielle de la neddylation, soutenant ainsi son rôle pro-oncogénique, indépendamment de l'AMPK.

Depuis de nombreuses années, l'équipe de Martinez-Chantar cherche aussi à établir un lien direct entre la signalisation LKB1/AMPK et le contrôle de la prolifération/survie hépatocytaire. Dans ce but, cette équipe a analysé les altérations de la croissance hépatocytaire dans divers modèles murins transgéniques, impactant sur signalisation de la méthionine. Notons que cette voie de signalisation est souvent retrouvée altérée dans le processus de carcinogenèse humaine ([Mato et al., 2013](#)). Tout d'abord, un premier modèle dépourvu de méthionine adénosyl-transférase (MAT), enzyme catalysant la synthèse de SAME (S-adénosyl-méthionine), a été utilisé (**Figure 34**).

Chez ces souris, la diminution drastique de SAME conduit à une phosphorylation accrue de LKB1 et de l'AMPK ([Varela-Rey et al., 2009](#); [Vazquez-Chantada et al., 2009](#)). L'activation de ces kinases impacte notamment sur la relocalisation cytoplasmique de HuR (Human antigen R), protéine impliquée dans la stabilisation des ARNm, notamment les messagers codant pour les cyclines D1 et A2 (**Figure 34**) ([Vazquez-Chantada et al., 2009](#)). Ces souris déficientes en MAT présentent une prolifération hépatocytaire incontrôlée et finissent ainsi par développer des CHC ([Varela-Rey et al., 2009](#); [Vazquez-Chantada et al., 2009](#)). L'isolation de cellules provenant de ces carcinomes a permis de confirmer la participation de LKB1 dans la progression tumorale hépatique à la fois en phosphorylant p53, mais également en contrôlant le transfert cytoplasmique de HuR, stabilisant ainsi phospho-p53 (**Figure 34**).

Ces événements ont pour principale conséquence une augmentation de la survie de ces cellules ([Martinez-Lopez et al., 2010](#)). Les mêmes expériences ont été réalisées dans un modèle déficient pour la glycine N-méthyl-transférase (GNMT), impliquée dans l'élimination de l'excès de SAME (**Figure 34**) ([Varela-Rey et al., 2009](#)). A l'inverse du précédent modèle, ces souris présentent une augmentation du niveau de SAME hépatique ainsi qu'une mortalité accrue suite à une hépatectomie partielle. Ce phénotype est corrélé avec une inhibition importante de la voie LKB1/AMPK/HuR ([Varela-Rey et al., 2009](#)). Ces travaux ont permis

de montrer que dans un contexte d'altérations métaboliques (signalisation méthionine), les kinases LKB1 et AMPK sont des acteurs clé de la croissance cellulaire.

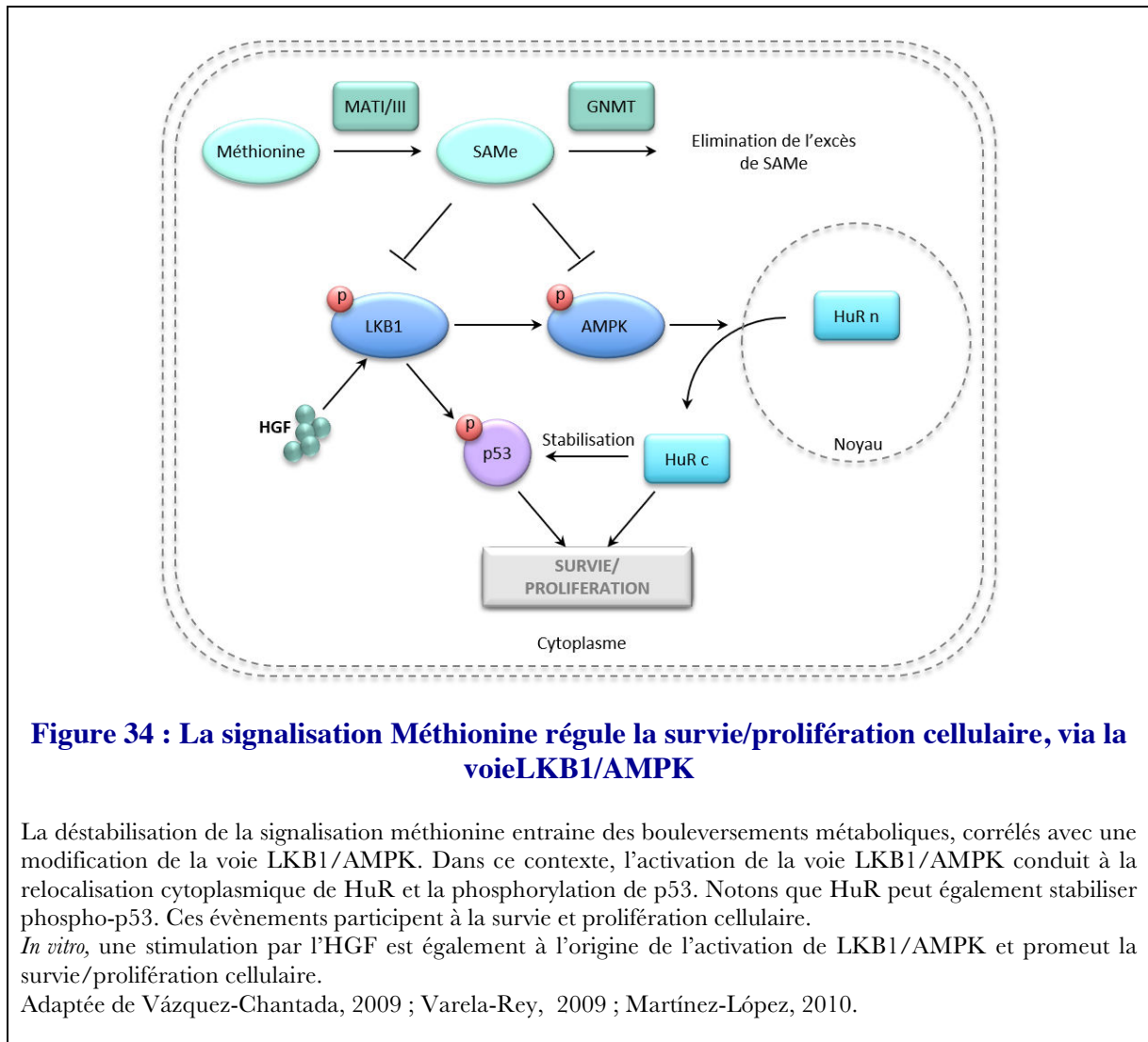


Figure 34 : La signalisation Méthionine régule la survie/prolifération cellulaire, via la voie LKB1/AMPK

La déstabilisation de la signalisation méthionine entraîne des bouleversements métaboliques, corrélés avec une modification de la voie LKB1/AMPK. Dans ce contexte, l'activation de la voie LKB1/AMPK conduit à la relocalisation cytoplasmique de HuR et la phosphorylation de p53. Notons que HuR peut également stabiliser phospho-p53. Ces événements participent à la survie et prolifération cellulaire.

In vitro, une stimulation par l'HGF est également à l'origine de l'activation de LKB1/AMPK et promeut la survie/prolifération cellulaire.

Adaptée de Vázquez-Chantada, 2009 ; Varela-Rey, 2009 ; Martínez-López, 2010.

RESULTATS

Objectif de Recherche

Au cours de l'introduction, nous nous sommes attachés à démontrer que la polyploïdisation est l'un des changements les plus spectaculaires et drastiques pouvant survenir au sein du génome. C'est également l'une des caractéristiques du tissu hépatique, chez le mammifère. Notre équipe de recherche s'intéresse depuis de nombreuses années au contrôle des mécanismes de polyploïdisation dans la physiopathologie hépatique. Les travaux du laboratoire ont notamment permis de démontrer que la polyploïdisation du tissu hépatique est initiée au cours du développement post-natal du foie, suite à la mise en place d'évènements de cytotidérèse incomplète ([Margall-Ducos et al., 2007](#)). Notre équipe a également découvert que la genèse de ce contingent hépatocytaire polyploïde est contrôlée par un signal insulinique ([Celton-Morizur et al., 2009](#)). L'insuline est une hormone connue pour son rôle métabolique. Dans un contexte pathologique, la résistance à l'insuline associée à l'obésité est un nouveau facteur de risque favorisant les hépatopathies stéatosiques non-alcooliques (NAFLD). Au vu de la pandémie des syndromes métaboliques et de leur propension à favoriser le développement de CHC, notre équipe s'est naturellement intéressée aux modifications et aux mécanismes de la polyploïdisation du tissu hépatique dans ce contexte pathologique. Ces travaux, réalisés par Géraldine Gentric, ont donné lieu à une publication dans *Journal of Clinical Investigation*. Au cours de mon doctorat, j'ai eu la chance de contribuer à cette étude, que vous trouverez en annexe de ce manuscrit. Les résultats de ce travail ont mis en évidence l'émergence d'une polyploïdie pathologique dans le tissu hépatique au cours de la NAFLD ([Gentric et al., 2015](#)). La genèse de ces populations hautement polyploïdes est associée à l'installation de cycles d'endoréplication, consécutive à l'activation persistante du DDR, induite par une augmentation du stress oxydatif dans les hépatocytes NAFLD ([Gentric et al., 2015](#)).

Ce lien entre métabolisme et modulations de la polyploïdie a poussé le laboratoire à s'intéresser à l'implication de points de contrôle du métabolisme dans l'intégrité génomique. Dans ce cadre, notre équipe s'est penchée, il y a quelques années, sur le rôle de l'AMPK, protéine clé du métabolisme, dans la prolifération et la polyploïdisation hépatocytaire ([Merlen et al., 2014](#)). Cette étude a permis de montrer que la perte de l'AMPK entraîne un retard de la régénération hépatique (modèle HP). Ce phénotype est corrélé à une dérégulation de la transition G1/S, suite à un délai de l'expression de la Cycline A2. C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés à la master kinase LKB1, régulateur majeur de l'AMPK. Au regard des effets pléiotropiques de LKB1, nous avons développé une collaboration avec deux autres équipes de l'institut Cochin, afin d'élucider ses différentes fonctions dans la physiopathologie hépatique. Ainsi, le groupe de Benoit Viollet avait pour mission d'étudier le rôle de LKB1 dans le métabolisme hépatique et l'équipe du Dr Christine Perret était en

charge de la caractérisation de LKB1 au cours de la carcinogenèse hépatique. Notre équipe, quand à elle, a analysé l'implication de LKB1 dans la prolifération et la polyploïdisation hépatocytaire. Au vu de l'ensemble des travaux déjà publiés, le rôle de la master kinase dans le contrôle de la prolifération hépatocytaire semble complexe. Son rôle est largement dépendant du statut du tissu hépatique : état inflammatoire, métabolique ou transformé. Au cours de mon doctorat, nous avons donc investigué les effets d'une délétion hépato-spécifique de *Lkb1* dans un modèle physiologique de prolifération hépatocytaire contrôlée, l'hépatectomie partielle.

Nos travaux ont permis d'établir que LKB1 est un senseur négatif de la prolifération hépatocytaire. Ainsi, LKB1 contrôle la sortie de quiescence des hépatocytes, en régulant la signalisation EGFR. Nous avons montré que la perte de LKB1 est associée à l'installation d'un statut « pré-primé » des hépatocytes, leur permettant de répondre plus rapidement aux signaux induits par l'hépatectomie et d'augmenter drastiquement la prolifération hépatocytaire. De façon inattendue, LKB1 agit en tant que médiateur de la prolifération indépendamment de son rôle de senseur du statut métabolique et de l'activité de l'AMPK. Nous avons également confirmé le rôle primordial de la signalisation EGFR, grâce à la réalisation d'expériences de sauvetage phénotypique. En effet, le traitement avec un inhibiteur pharmacologique de l'EGFR permet la restauration d'un état de quiescence, dans les hépatocytes déficients pour *Lkb1*. Par ailleurs, LKB1 intervient également dans les étapes tardives de la division hépatocytaire, en permettant notamment la coordination de la formation du fuseau mitotique avec l'axe de polarité de l'hépatocyte. La perte de LKB1 entraîne effectivement d'importants défauts de l'organisation du fuseau, sans altérer l'activité de l'AMPK en mitose. Ces événements ont pour conséquence l'émergence de contingents hépatocytaires hautement polyploïdes et aneuploïdes, en fin de régénération hépatique.

L'ensemble de notre étude illustre le double rôle de LKB1 en tant que gardien de la prolifération des hépatocytes et de l'intégrité génomique, au cours de la régénération du foie.

Publication

LKB1 as a gatekeeper of hepatocyte proliferation and genomic integrity during liver regeneration.

Vanessa Maillet^{1,2,3}, Nadia Boussetta^{1,2,3}, Jocelyne Leclerc^{1,2,3}, Véronique Fauveau^{1,2,3}, Marc Foretz^{1,2,3}, Benoit Viollet^{1,2,3}, Jean-Pierre Couty^{1,2,3,4}, Séverine Celton-Morizur^{1,2,3}, Christine Perret^{1,2,3}, Chantal Desdouets^{1,2,3,5,*}.

¹INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

²CNRS, UMR8104, Paris, France

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

⁴Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

⁵Lead Contact

*Correspondence: chantal.desdouets@inserm.fr

SUMMARY

Liver Kinase B1 (LKB1) is involved in pleiotropic biological processes and known to be a key regulator of hepatic metabolism and polarity. Here, we investigated the contribution of LKB1 in hepatocyte proliferation and liver regeneration process. We demonstrated that loss of hepatic *Lkb1* promotes liver mass recovery by impacting on hepatocytes proliferation independently on metabolic/energetic balance. LKB1 regulates G0/G1 progression, specifically by controlling Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) signaling. In addition, later during regeneration, LKB1 controls mitotic fidelity. Deletion of *Lkb1* results in major alterations of mitotic spindle formation along the polarity axis, independently of AMP-activated protein kinase (AMPK) activity, a key target of LKB1. Consequently, LKB1 deficiency leads to an alteration of ploidy profile, at late stage of regenerative process. Overall our study highlights the dual role of LKB1, during liver regeneration, as a guardian of hepatocyte proliferation and genomic integrity.

KEYWORDS: LKB1, Hepatocytes, Liver regeneration, EGFR, Mitosis Fidelity, Microtubule Spindle, Polyploidy.

HIGHLIGHTS AND eTOC BLURB

HIGHLIGHTS

- LKB1 inactivation promotes mass recovery during liver regeneration.
- LKB1 regulates hepatocytes proliferation via EGFR signaling.
- LKB1 regulates spindle orientation independently of AMPK during mitosis progression.
- LKB1 controls hepatocytes genomic integrity during liver regenerative process.

eTOC BLURB

Maillet et al demonstrate that the master kinase LKB1 plays a dual role during liver regeneration independently of its major target AMPK. LKB1 acts as a guardian of hepatocytes proliferation through the control of G0/G1 transition by controlling EGFR activation. Their results also highlight that LKB1 is a gatekeeper of mitotic fidelity and hepatocyte ploidy integrity.

INTRODUCTION

Lkb1 (Liver Kinase B1) encodes an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase that was originally identified as the causal mutation in the familial Peutz-Jeghers syndrome (PJS) (Hemminki et al., 1998). Nowadays, *Lkb1* is considered as a tumor suppressor gene that is frequently mutated in a wide range of human cancers (Momcilovic and Shackelford, 2015). LKB1 has been shown to act upstream of 14 kinases related to AMP-activated protein kinase (AMPK) comprising at least AMPK, BRSK (brain selective kinase), MARK (microtubule affinity regulating kinase), NUA1 (SNF1-like kinase 1), and SIK (salt-inducible kinase) (Lizcano et al., 2004; Shackelford and Shaw, 2009). Subsequent studies have shown that LKB1 is involved in pleiotropic biological processes such as cellular metabolism, cell polarity, growth control, genomic integrity and stem cell maintenance (Shackelford and Shaw, 2009; Williams and Brenman, 2008).

Generations of knockout mouse models has confirmed that lack of LKB1 is detrimental for pleiotropic physiological functions. Germ-line deletion of *Lkb1* causes severe developmental defects (e.g. vascular and placental defects), with knockout embryos dying at E8.5-11 (Ylikorkala et al., 2001). In adult mice, deletion of *Lkb1* impacts the maintenance of body weight, liver and adipose tissue function, blood glucose homeostasis and survival (Shan et al., 2016). Tissue-specific deletion of *Lkb1* has revealed that this master kinase has specific organ functions (Ollila and Makela, 2011; Shorning and Clarke, 2011). In liver parenchyma, numerous studies have clearly shown that LKB1 plays a major role during development and acts as a central metabolic sensor in adult quiescent tissue. Deletion of *Lkb1* during liver development demonstrated that this master kinase is essential for hepatocyte polarity establishment, maintenance of functional hepatocyte tight junctions and bile duct and canalicular networks formation (Fu et al., 2010; Homolya et al., 2014; Just et al., 2015; Porat-Shliom et al., 2016; Woods et al., 2011). In adult mice, hepatocyte-specific disruption of *Lkb1*

demonstrated its critical role in the control of glucose and lipid homeostasis (Foretz et al., 2010; Patel et al., 2014; Shaw et al., 2005). Interestingly, LKB1 acts as a key gluconeogenic suppressor independently of AMPK through SIK signaling (Foretz et al., 2010; Patel et al., 2014).

The liver is not only an essential organ for metabolic functions; it also has a unique capacity to regulate its growth and mass. Interestingly, in adult resting liver, less than 0.1% of hepatocytes are cycling at any given time (Fausto and Campbell, 2003). Importantly, these cells harbor tremendous regenerative potential after resection of liver mass (Bucher, 1991; Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2013, 2017). Liver regeneration after partial hepatectomy in rodents has been studied extensively. A particularly fascinating point about this process is that near all quiescent and differentiated hepatocytes quit the G0 phase in a tightly synchronous manner and restore the initial hepatocyte mass after 1 to 2 rounds of replication (Michalopoulos, 2017). In addition to its regenerative capacity, the liver is also characterized by variations in ploidy content (Celton-Morizur and Desdouets, 2010; Celton-Morizur et al., 2010; Duncan, 2013; Gentric and Desdouets, 2014; Pandit et al., 2013). Unlike most tissues, the liver is a mixture of hepatocytes that contain either one or two nuclei, each with either 2, 4, 8 or more haploid chromosome sets. In rodent livers, hepatocytes polyploidization is initiated during weaning (Celton-Morizur et al., 2009; Margall-Ducos et al., 2007). In adult livers, polyploidy increases with age but it is also induced after partial hepatectomy, during the regeneration process (Kudryavtsev et al., 1993; Miyaoka et al., 2012; Toyoda et al., 2005). Interestingly, polyploidization, which leads to increased cell size and genetic diversity, has been shown to promote better adaptation to chronic injury or stress (Duncan et al., 2012; Pandit et al., 2013). In different organisms (*e.g. Drosophila*, *C. elegans*, mammals), it is now well established that LKB1 is a key actor of cell growth and genomic integrity. In view of the unique specific properties of liver parenchyma, we elucidated in this study the implication of LKB1 in liver regeneration and ploidy integrity. We showed that LKB1 plays a dual role during liver

regeneration independently of its major target AMPK. First, LKB1 acts as a novel regulator of hepatocytes proliferation by controlling EGFR signaling. Second, LKB1 is a gatekeeper of mitotic fidelity and thus controls hepatocytes ploidy integrity.

RESULTS

Lkb1 deficiency in mouse liver accelerates hepatocyte proliferation during regeneration process.

To investigate *in vivo* the contribution of LKB1 on hepatocytes proliferation during liver tissue growth, we performed 2/3 partial hepatectomy (PHx) on age- and gender-matched *Lkb1* hepatocyte-specific knockout mice (*Lkb1*^{Δhep}) and littermate control adult mice (CTR) (Figure 1A). PHx of mouse liver elicits a synchronized wave of cell cycle, proliferation, mitosis and growth in the remnant liver, to restore the size of the liver to its pre-surgical set point (Bucher, 1991; Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2013). Interestingly, near all hepatocytes are the first cells to divide rapidly after PHx (between 0-48 hours). First, western blot analysis confirmed a constant expression of LKB1 in CTR mice and validated the efficient deletion of *Lkb1* in liver parenchyma of *Lkb1*^{Δhep} mice after withdrawing tamoxifen diet and during regeneration process (Figure S1A). Deletion of *Lkb1* in resting liver induced a marked increase of the liver to body weight ratio in *Lkb1*^{Δhep} mice compared to CTR (Figure 1B). Next, hepatic regenerative rate was calculated at different time point after PHx. In CTR mice, the liver mass recovered to 100% 96 hours after PHx and slightly increased at 13 days (Figure 1B); this increase being described to be related to the reestablishment of tissue homeostasis (Fausto, 2000). Importantly, in *Lkb1*^{Δhep} mice, liver mass recovered to 114 % at 96 hours and reached 150% at 13 days (Figure 1B). This data indicated that LKB1 impacts mass recovery during liver regeneration. To go further, hepatocyte proliferation was next assessed by BrdU incorporation (Figure 1C). In CTR livers, BrdU positive hepatocytes were first detected 30 h after PHx and peaked at 40 h (Figure 1C and Figure 1D). In *Lkb1*^{Δhep} livers, BrdU positive hepatocytes were already detected 24 hours after PHx (Figure 1C and Figure 1D) with a maximal percentage of BrdU-positive hepatocytes at 30 h (Figure 1D). In line with these results, we observed that entry into G2/M was also accelerated. In fact, *Lkb1*^{Δhep} hepatocytes

are already accumulated in G2/M phases 30 hours after PHx with PHH3 labeling being barely present in control groups (Figure 1E and Figure 1F). Accordingly, drivers of cell cycle progression were strikingly increased after *Lkb1* deletion. *Ccna2*, a key actor of S phase progression, was already up-regulated both at the mRNA and protein levels in *Lkb1*^{Δhep} livers, twenty-four hours after hepatectomy (Figure 1G and Figure S1B). Moreover, while CTR hepatocytes enter S-phase (30 hours after PHx), *Ccnb1*, a crucial actor for G2/M transition, was already expressed in *Lkb1*^{Δhep} livers (Figure 1G and Figure S1B). Taken together, our results demonstrated that LKB1 is a key regulator of hepatocytes proliferation and mass recovery during liver regeneration.

LKB1 impacts liver mass recovery independently of metabolic signals.

Given the essential role of LKB1 in the control of liver metabolic balance and to gain insight into the mechanisms underlying the acceleration of hepatocyte proliferation in *Lkb1*^{Δhep} livers, we investigated the metabolic response after PHx known to be an important source of pro-regenerative signals (Huang and Rudnick, 2014). Lipid metabolism, an important determinant of liver regeneration (Rudnick and Davidson, 2012), was first analyzed. As illustrated in Figure 2A, a significant triglyceride (TG) accumulation was observed in CTR livers at early time points after PHx with a reduction when hepatocytes proceed through S phase (40 hours after PHx, Figure 2A and 1D). Surprisingly, we observed that fat accumulation in *Lkb1*^{Δhep} livers was not significantly affected (Figure 2A). Quantitative PCR analysis confirmed that the expression of key enzymes associated with fatty acid synthesis (acetyl-CoA carboxylase 1 [*Acc1*], sterol regulatory element-binding protein 1c [*Srebp-1c*]) was similar between both groups during liver regeneration (Figure 2B). Considering the key implication of LKB1 in the control of glucose homeostasis, glycogen content and the expression of gluconeogenic genes were measured. Of note, high glucose concentration in liver parenchyma is more described to act as a brake of regeneration (Weymann et al., 2009).

As expected (Huang and Rudnick, 2014), glycogen storage diminished drastically in CTR livers after hepatectomy (Figure 2C). In accordance with previous observations (Shaw et al., 2005), we observed that hepatic glycogen content was more abundant in *Lkb1*^{Δhep} resting livers (Figure 2C). However, after PHx, as in CTR livers, a clear depletion of glycogen content was observed in *Lkb1*^{Δhep} livers (Figure 2C). The expression of *Ppargc1a* and *G6pc*, key genes of gluconeogenesis, was increased in *Lkb1*^{Δhep} resting livers (Figure 2D). This up-regulation was maintained at early time points after PHx (Figure 2D). In regenerative *Lkb1*^{Δhep} livers, the increase of gluconeogenesis did not impact on pro-proliferative signaling. Finally, given that LKB1, through its control of AMPK, is an important regulator of cell energy, we assessed the level of AMPK activation. It has been already been described that AMPK is activated before S phase entry (Merlen et al., 2014; Paranjpe et al., 2016). Even if lower level of AMPK phosphorylation was detected in *Lkb1*^{Δhep} hepatocytes compared to CTR, we observed a clear activation of this master kinase at 24 and 30 hours after PHx in both genotypes (Figure 2E). Collectively, our data indicate that loss of *Lkb1* during liver regeneration has a moderate impact on metabolic and energetic responses.

Loss of LKB1 in mouse quiescent liver enhances EGFR activation.

To further understand how LKB1 regulates the hepatocyte cell cycle, we investigated key pro-proliferative signals of liver regeneration. First, we observed that cytokine signaling (IL6/TNFα/STAT3), a key actor to exit G0, was activated in *Lkb1*^{Δhep} livers at early time points during regeneration as in CTR (Figure S2A, S2B and S2C). We next focus on the major growth factor signaling pathways in hepatocytes: the MET receptor, which is activated by hepatocyte growth factor (HGF) and the epidermal growth factor receptor (EGFR), which is activated by EGF and related ligands. We first observed that *Lkb1*^{Δhep} resting livers present a down regulation of MET mRNA expression and activity compared to CTR (Figure S2D and S2E). Conversely, we observed an up-regulation of EGFR expression and activity.

Indeed, *Egfr* mRNA was significantly increased in $Lkb1^{\Delta hep}$ resting liver tissues compared to CTR (Figure 3A). Furthermore, EGFR protein, content as well as its activity (measured by its phosphorylation), was also significantly enhanced in $Lkb1^{\Delta hep}$ resting livers compared to CTR livers (Figure 3B). Consistent with an activation of EGFR signaling, the downstream targets AKT, ERK and GSK3 showed increased phosphorylation levels in early G1 phase (8 and 24 hours after PHx) in $Lkb1^{\Delta hep}$ livers compared to CTR livers (Figure 3C). Based on these results, we next determined whether the specific activation of EGFR in $Lkb1^{\Delta hep}$ resting liver could be sufficient to induce hepatocyte proliferation. Ki67 labeling revealed that hepatocyte proliferation is already enhanced in resting $Lkb1^{\Delta hep}$ liver tissues compared to CTR (Figure 3D and 3E). Furthermore, our data revealed that beyond an exit of quiescence, the $Lkb1^{\Delta hep}$ hepatocytes are also able to progress into mitosis reflected by PHH3 labeling (Figure 3D and 3E). Altogether this data illustrates that $Lkb1^{\Delta hep}$ resting liver is not in a quiescent stage, attributable at least to activation of EGFR. To confirm these results, we investigated whether the inhibition of EGFR activity in $Lkb1^{\Delta hep}$ resting livers is sufficient to impair hepatocyte proliferation. $Lkb1^{\Delta hep}$ mice were injected with canertinib, an irreversible tyrosine-kinase inhibitor with a specific activity against EGFR (Figure 3F) (Paranjpe et al., 2016). The impact on proliferative index was analyzed 48 hours after the first injection. As expected, phosphorylation of both Tyrosine residues (Tyr^{1068/1173}) of EGFR was drastically reduced in $Lkb1^{\Delta hep}$ treated livers (Figure 3G). Importantly, inactivation of EGFR in $Lkb1^{\Delta hep}$ livers impaired hepatocyte proliferation (Figure 3H). Altogether, our results demonstrated that LKB1 acts as a guardian of hepatocytes proliferation through the control of G0/G1 transition by a strong targeting of EGFR signaling (Figure 3I).

***Lkb1* deletion leads to increased mitotic errors and alteration of ploidy integrity.**

As LKB1 has shown to be critical for the maintenance of genomic integrity (Jansen et al., 2009), we next investigated whether it could also impact mitotic surveillance during liver regeneration. As previously described, deletion of *Lkb1* induces an early entry into G2 phase and mitosis (Figure 1E and 1F). In addition, *Lkb1*^{Δhep} hepatocytes left earlier the G2 phase than CTRL hepatocytes (Figure 1E and S3A). Intriguingly, this was not observed for hepatocytes in M phase, mitotic index being still equal in both groups 48 hours after PHx (Figure S3B). In fact, we observed at the same timing that the ratio of metaphase to anaphase was more elevated in *Lkb1*^{Δhep} liver than in CTRL (Figure 4A). This data strongly suggested that deletion of *Lkb1* impacts on the activation of the spindle assembly checkpoint (SAC). The SAC ensures proper chromosome segregation by delaying the onset of anaphase in response to unattached kinetochores. To probe for the underlying mechanism, transcriptomic analysis was performed on liver samples 48 hours after PHx. We conducted pathway profiling of genes differentially expressed between *Lkb1*^{Δhep} and CTRL livers (Table S1). Strikingly, the top genes upregulated in *Lkb1*^{Δhep} were involved in metaphase control (Figure 4B) including genes coding for mitotic kinases (Aurka, Aurkb, Plk1), kinetochore (Mad2l1, Bub1, Cenpa, Cenpb, Cenpe) and microtubules proteins (Kif15, Kif22) (Table S2). Consistently, quantitative PCR analysis showed a strong up regulation of these major players of metaphase control (Figure S3C). Furthermore, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) confirmed the association between the metaphase gene signature and the upregulated genes in *Lkb1*^{Δhep} model (Figure 4C). In order to explain this specific signature, we next sought to determine in *Lkb1*^{Δhep} regenerative liver how the microtubule spindle is formed and polarized in mitotic hepatocytes. Importantly, hepatocytes display a unique polarized architecture and elegant studies have previously shown that these cells predominantly orient their mitotic spindle axis towards the

apicolateral subdomain (Slim et al., 2013; Slim et al., 2014) (Figure 5F). Immunofluorescence analysis of the microtubule network showed that CTR hepatocytes build a normal bipolar spindle during metaphase (Figure 4D and 4E) and that the mitotic spindle was correctly orientated toward apico-lateral domain (Figure 4E). Strikingly, *Lkb1*-depleted metaphase did not present a mitotic spindle axis due to the loss of division polarity (Figure 4E and 4F). Consequently, spindle microtubules in *Lkb1*^{Δhep} hepatocytes appeared disorganized (Figure 4D and 4E). Interestingly, in other cellular systems, LKB1 was shown to be imperative for mitotic spindle formation and orientation through the activation of AMPK (Mirouse and Billaud; Nakano and Takashima, 2012; Shackelford and Shaw, 2009). We therefore assessed the implication of AMPK into division polarity during liver regeneration. Partial hepatectomy were performed on AMPK α 1/ α 2^{Δhep} mice. First, we observed a drastic reduction of AMPK phosphorylation in AMPK α 1/ α 2^{Δhep} livers compared to *Lkb1*^{Δhep} and CTRL livers (Figure S3D). Importantly, we found no alteration of mitotic spindle formation and orientation in AMPK α 1/ α 2^{Δhep} hepatocytes (Figure 4D and 4E). Altogether, this data underlines, during liver regeneration, that LKB1 controls hepatocytes mitotic spindle orientation and organization independently of AMPK activation.

One main consequence of a damaged mitotic checkpoint is the improper exit of cells from mitosis. First, the cells can escape mitosis and “slip” into interphase without chromosome segregation and cytokinesis; this process called mitotic slippage leads to the genesis of mononucleate polyploid cells (Figure 5A). Second, the cell can bypass the mitotic checkpoint and progress into anaphase with a high risk of abnormal chromosome migration (e.g. lagging chromosome, tripolar anaphase) and the genesis of aneuploid contingent (Figure 5A). We therefore analyzed the impact of *Lkb1* deletion on hepatocyte ploidy integrity at the end of regeneration. Interestingly, mitotic slippage events are associated with the modification of nuclear ploidy. To characterize the impact of *Lkb1* deletion on nuclear ploidy, we measured

nuclear size 2 weeks after PHx. The diploid (2n) hepatocyte population was substantially lower in *Lkb1*^{Δhep} livers than in CTR livers (Figure 5B). By contrast, mononuclear tetraploid and octoploid hepatocytes were enriched in *Lkb1*^{Δhep} livers (Figure 5B). In addition, we found that at the end of regeneration, *Lkb1*^{Δhep} hepatocytes exhibited markedly enlarged cells compared to CTR (Figure 5C). These results demonstrate that LKB1 plays a critical role in ploidy regulation during liver regeneration. Interestingly, we also found that regenerating *Lkb1*^{Δhep} livers had abnormal anaphase figures, lagging chromosome and the presence of trinucleate hepatocytes (Figure S3E and Figure 5D). Consistent with these observations, a CGH analysis revealed many chromosomal aberrations in *Lkb1*^{Δhep} livers, either losses or gains of chromosomal regions (Figure 5E). Taken together these data highlight that LKB1 during liver regeneration controls hepatocytes genomic integrity.

DISCUSSION

Unlike other organs, the liver is unique in its capacity to recover from injury by regeneration instead of scar formation (Huang and Rudnick, 2014). Liver regeneration has been studied extensively over the past years in an effort to translate treatment strategies into clinic. During this process, different intracellular and extracellular signals are stimulated, which in turn activates quiescent hepatocytes to re-enter the cell cycle and proliferate, restoring the liver-to-body mass ratio (Bucher, 1991; Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2013, 2017). Here, we demonstrate that the master kinase LKB1 has a dual role during liver regeneration independently of its major target AMPK. LKB1 is a guardian of hepatocytes proliferation and acts on G0/G1 transition by controlling EGFR activation. Our results also highlight that LKB1 is a gatekeeper of mitotic fidelity and hepatocyte ploidy integrity at the end of liver regeneration.

To date, there has been limited investigation on the role of LKB1 in liver growth. This role seems to depend on the type of lesion undergone and thus the proliferative signal received by hepatocytes. In a context of metabolic disorders, activation of HGF-LKB1/AMPK signaling has been shown to promote hepatocyte proliferation and viability (Varela-Rey et al., 2009; Vazquez-Chantada et al., 2009). Conversely, Nakau and collaborators have observed, in a *Lkb1* haploinsufficiency murine model, the emergence of hepatic lesions with high proliferative rates. In this animal model, the incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) development was increased suggesting a tumor suppressor role of LKB1 in mouse liver (Nakau et al., 2002). Our current study demonstrates that specific hepatocyte deletion of *Lkb1* induces a drastic increase in hepatocytes proliferation during liver regeneration. In this context, *Lkb1*^{Δhep} hepatocytes initiate DNA replication 10 hours before CTR hepatocytes. Importantly, several studies over the years have demonstrated an indispensable role of EGFR in liver regeneration (Berasain and Avila, 2014; Komposch and Sibilia, 2015). In our model,

we demonstrated that $Lkb1^{\Delta hep}$ resting liver is not in a quiescent state due to EGFR activation. In fact, due to this “pre-primed” state, $Lkb1^{\Delta hep}$ liver responds more quickly to stimuli induced by PHx. Remarkably, we observed that the prevention of EGFR activation in $Lkb1^{\Delta hep}$ resting liver was sufficient to restore a quiescent status. Further experiments will decipher how LKB1 and EGFR crosstalk to control hepatocyte proliferation and whether it is mediated by intrinsic or extrinsic signals. Among the intrinsic signals, YAP is a good candidate, as it is a key actor in liver regeneration process as well as regulators of EGFR expression (Tao et al., 2014). Interestingly, it has been previously shown that YAP is a downstream target of LKB1 in particular by controlling liver growth (Mohseni et al., 2014). However, in our model, we do not observe the activation of the YAP pathway. Indeed, in resting livers and during early regeneration process, the level of unphosphorylated YAP (activated form) was similar in $Lkb1^{\Delta hep}$ and CTRL tissues (Figure S4A). In correlation, we do not observed an up-regulation of known YAP target genes, such as *Cyr61* and *Ctgf* (Figure S4B). Finally, concerning extrinsic signals and in view of the large number of EGFR ligands (Komposch and Sibilio, 2015), we cannot exclude the possibility that LKB1 regulates the activity of one of these ligands and consequently the activation of the EGFR pathway.

Our findings demonstrate also that LKB1 is a safeguard of hepatocyte genomic integrity during liver regeneration. Loss of *Lkb1* in proliferating hepatocytes induces during mitosis the activation of the Spindle Assembly Checkpoint (SAC). The SAC acts to maintain genome stability by delaying cell division until the accurate chromosome segregation can be guaranteed (Nezi and Musacchio, 2009). Either unattached or untensioned kinetochores provoke the SAC, leading to cell cycle arrest at metaphase, preventing the mis-segregation of chromosomes by hindering the onset of anaphase. Importantly, we observed that $Lkb1^{\Delta hep}$ hepatocytes present abnormal mitotic spindle orientation and organization during metaphase. These results suggest that microtubule disorganization induces untensioned kinetochores in $Lkb1^{\Delta hep}$ hepatocytes, leading to SAC activation. Previous studies have demonstrated in

different systems that LKB1/AMPK signaling is detrimental for cell polarity and cell division notably by controlling the spindle orientation (Brenman, 2007; Jansen et al., 2009; Nakano and Takashima, 2012; Sebbagh et al., 2011). In a kidney epithelial model, Wei and collaborators demonstrated that *Lkb1* mutations caused dramatic mislocalization of activated AMPK on mitotic spindle (Wei et al., 2012). Importantly, we observed that deletion of AMPK in liver parenchyma has no impact on mitotic spindle formation and orientation. Hence, in the liver, LKB1 controls cell division polarity independently of AMPK. Which key targets of LKB1 can control hepatocytes cell division integrity? Of note, during mitosis, hepatocytes have a specific polarity (Slim et al., 2014). Hepatocytes orient their mitotic spindle poles toward an area near the apical plasma membrane domain. Interestingly, spindle orientation depends on the local positioning of two cortical cues that capture the two sets of astral microtubules at opposite lateral cell membranes in equal-distance from the basal domain (Slim et al., 2014). Different studies have showed a conserved function of the MARK family members in regulating aspects of cellular polarity (Jansen et al., 2009; Nakano and Takashima, 2012; Sebbagh et al., 2011). Among these kinases, Par1b also known as MARK2 could be a potential candidate. Interestingly, it has been shown in kidney and hepatocyte cell lines that Par1b controls mitotic spindle orientation by acting on the attachment of astral microtubules to the cortex (Lazaro-Diequez et al., 2013; Slim et al., 2013). Additional work will be necessary to elucidate how LKB1 could control MARK2 and/or other MARK isoforms activities during liver regeneration.

Finally, our work highlights that LKB1 controls hepatocyte ploidy integrity during liver regeneration. In the adult liver, normal hepatocyte ploidy ranges from 2n, 4n and 8n (Duncan, 2013; Gentric and Desdouets, 2014). Following acute liver injury, polyploid hepatocytes re-enter into the cell cycle and contribute to the recovery of the injured liver (Melchiorri et al., 1993; Miyaoka et al., 2012). Under pathological conditions, hepatocytes polyploidization is well correlated to the severity of the damage: the higher the rate of

polyploidization the greater the injury was ([Gentric and Desdouets, 2014](#); [Gentric et al., 2015](#); [Wang et al., 2017](#)). Genome integrity is protected in normal tissue by various means, including cell cycle checkpoints, and DNA repairs mechanisms. Our results highlight that LKB1 might act as a gatekeeper of hepatocyte proliferation and genomic integrity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals, partial hepatectomy and tissue harvesting

Mice carrying two alleles on the exons II to IV of the *Lkb1* gene (*STK11*^{lox/lox}) (Bardeesy et al., 2002) were interbred with TTR-Cre-Tam mice expressing a tamoxifen-inducible Cre recombinase under the control of the hepatocyte-specific transthyretin promoter (Tannour-Louet et al., 2002) to generate *Lkb1*^{Δhep} (*Lkb1*^{LoxP/loxP}, TTR-Cre-Tam) and control mice (CTRL: *Lkb1*^{LoxP/loxP}, Cre negative). All mice were on the C57Bl6J/FVB mixed background. Liver-specific AMPK double knockout mice (AMPK α 1/ α 2^{Δhep}) were generated by crossing *Alfp-Cre*⁺ mice with mice containing floxed AMPK α 1 and α 2 subunits on a C57Bl/6 background (Guigas et al., 2006). *Lkb1*^{Δhep}, AMPK α 1/ α 2^{Δhep} and control littermates (CTR) receive care in compliance with institutional guidelines regulated by the “Direction Départementale des Services Vétérinaires de Paris”, France (authorization number 75956). Mice were kept under a controlled humidity and lighting schedule with a 12 h dark period with free access to food and water. To induce specific hepatocytes *Lkb1* deletion, eight weeks old male *Lkb1*^{Δhep} and CTR mice were fed with tamoxifen diet (+1000mg/kg TAM A115-T7100, Ssniff) during five days (Figure 1A). Two thirds partial hepatectomy (PHx) surgeries were performed two weeks after withdrawing tamoxifen diet (Figure 1A). PHx was performed as previously described (Higgins and Johnson, 1931; Mitchell et al., 2008). All surgeries were performed between 9:00 and 11:00 am; mice (n = 6 to 10 per group) were euthanized at 0, 2, 8, 12, 24, 30, 40, 48, 96 hours, and 13 days post-PHx. Two hours prior to sacrifice, mice were intraperitoneally injected with 50 mg/kg of Bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma-Aldrich). In terms of EGFR inhibition, mice were injected intraperitoneally twice 48 hours and 24 hours before sacrifice with 80mg/kg canertinib (Sigma-Aldrich) (Paranjpe et al., 2016). After sacrifice, part of liver tissue was fixed in 4% neutral buffered formalin for immunohistochemistry analysis. The remaining liver tissue was flash frozen in liquid nitrogen

and stored at -80°C until used. The percentage of liver regeneration was calculated by the following formula: Weight of nonremoved lobes / Total body weight of mice.

Analysis of hepatic triglyceride content

Aliquots of frozen liver (20–30 mg) were assayed for triglyceride content using a triglyceride quantification kit according to the manufacturer's protocol (Biovision, Mountain View, CA).

Histology, immunohistochemistry

Tissue was fixed by incubation in 4% formol overnight at 4 °C and embedded in paraffin wax. Hematoxylin /eosin and periodic acid–Schiff staining was carried out on 5-µm paraffin sections. For immunohistochemistry, liver sections (5µm) were de-paraffinized and incubated in citrate buffer at 95°C for 20 min for antigen retrieval. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 15 min at room temperature and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies including anti-BrdU (1:400 dilution, Thermo Fisher, MA5-12502), anti-pHH3 (1:500 dilution, Millipore, 06-570), anti-Ki67 (1:400 dilution, Thermo Fisher, MA5-14520). After three washes, tissue sections were incubated with biotinylated anti-mouse IgG (1:200 dilution, Vector Laboratories, CA, USA) for 1 hr at RT and then washed three times, after which streptavidin–horseradish peroxidase conjugates (Vector Laboratories, CA, USA) were added and the slides incubated for 45 min. After three washes with PBS, DAB solution (Vector Laboratories, CA, USA) was added and the slides were counterstained with haematoxylin.

Immunofluorescence

Liver sections (5-10µm) were deparaffinized and incubated in citrate buffer at 95°C for 20 min for antigen retrieval. Sections were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies including anti-β-Catenin (1:400 dilution, BD Biosciences, 610154), anti-β-Tubulin antibody (1:100 dilution, Sigma-Aldrich, Tub2.1) and CEACAM antibody (1:50 dilution, abcam,

ab108397). Anti-mouse or -rabbit IgG antibodies (1:500) conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher) were used as the secondary antibodies. Hoechst 33342 (0.2 µg/ml) purchased from Sigma-Aldrich was included in the final wash to counterstain nuclei.

Image acquisition and analysis

Images were taken using a LEICA DMI 6000 microscope at ×20, ×40 or ×63 magnification, PL APO objectives, a MicroMAX-1300Y/HS Princeton Instruments camera, and Metamorph 7 software (Molecular Devices). Z-axis stacks were collected using a piezoelectric device mounted at the base of the objective. For BrdU/Ki67/PHH3 staining, 4000 hepatocytes (for each liver sample analyzed) were counted; at least 10 areas of 33,500 µm² were analyzed. For ploidy experiments, at least 250 randomly selected fields of liver sections were imaged, corresponding to the analysis of more than 100,000 cells for nuclear ploidy analysis. To perform ploidy experiments, Hoechst 33342 staining was used to recognize nuclei with a roundness >0.8. Nuclear ploidy was detected automatically by a specific macro developed with ImageJ software (pixels ranging from 200 to 2,500 px²) as previously described ([Gentric et al., 2015](#)). Adobe Illustrator CC (Adobe Systems Software) was used for figure construction.

Statistical Analysis

Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's *t* test with Welch correction performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). All data are representative of 4 to 10 animals of each genotype and are expressed as mean ± SEM. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

ACCESSION NUMBERS

The accession number for the transcriptomic data reported in this paper is GSE100605.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.M. designed, performed experiments and interpreted data. N.B. and J.L. performed experiments. V.F. performed partial liver hepatectomy experiments. JP. C. and S. CM. performed microarray analysis and interpreted data. M.F. and B.V. generated *AMPK α 1/ α 2* knockout mice and interpreted data. C.P provided *Lkb1* knockout mice and interpreted data. C.D. conceived and planned the experiments and interpreted data. V.M. and C.D. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Angélique Gougelet, Athanassia Sotiropoulos and Catherine Postic for their critical evaluation of the work and to all members of the lab for fruitful discussion. We also thank the facilities of Histology, Immunostaining, Laser Microdissection (HistIM), Cochin Imaging Photonic (IMAG'IC) and Genomic (GENOM'IC) (Institut Cochin, Inserm U1016, Paris, France) and HELIXIO for array CGH (Clermont-Ferrand, France). This study was supported by grants from INSERM, the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2010 BLANC 1123 02). Vanessa Maillet was a recipient from Association Française pour l'Etude du Foie and Fondation ARC.

REFERENCES

- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., and DePinho, R.A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* *419*, 162-167.
- Berasain, C., and Avila, M.A. (2014). The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* *49*, 9-23.
- Brenman, J.E. (2007). AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division. *Cell Cycle* *6*, 2755-2759.
- Bucher, N.L. (1991). Liver regeneration: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* *6*, 615-624.
- Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2010). Polyploidization of liver cells. *Adv Exp Med Biol* *676*, 123-135.
- Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., and Desdouets, C. (2010). Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle* *9*, 460-466.
- Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G., and Desdouets, C. (2009). The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest* *119*, 1880-1887.
- Duncan, A.W. (2013). Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol*.
- Duncan, A.W., Hanlon Newell, A.E., Bi, W., Finegold, M.J., Olson, S.B., Beaudet, A.L., and Grompe, M. (2012). Aneuploidy as a mechanism for stress-induced liver adaptation. *J Clin Invest* *122*, 3307-3315.
- Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *J Hepatol* *32*, 19-31.
- Fausto, N., and Campbell, J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* *120*, 117-130.
- Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* *43*, S45-53.
- Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* *120*, 2355-2369.
- Fu, D., Wakabayashi, Y., Ido, Y., Lippincott-Schwartz, J., and Arias, I.M. (2010). Regulation of bile canaliculi network formation and maintenance by AMP-activated protein kinase and LKB1. *J Cell Sci* *123*, 3294-3302.
- Gentric, G., and Desdouets, C. (2014). Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol* *184*, 322-331.
- Gentric, G., Maillet, V., Paradis, V., Couton, D., L'Hermitte, A., Panasyuk, G., Fromenty, B., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2015). Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* *125*, 981-992.
- Guigas, B., Bertrand, L., Taleux, N., Foretz, M., Wiernsperger, N., Vertommen, D., Andreelli, F., Viollet, B., and Hue, L. (2006). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* *55*, 865-874.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., *et al.* (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* *391*, 184-187.
- Homolya, L., Fu, D., Sengupta, P., Jarnik, M., Gillet, J.P., Vitale-Cross, L., Gutkind, J.S., Lippincott-Schwartz, J., and Arias, I.M. (2014). LKB1/AMPK and PKA control ABCB11 trafficking and polarization in hepatocytes. *PLoS One* *9*, e91921.

- Huang, J., and Rudnick, D.A. (2014). Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration. *Am J Pathol* 184, 309-321.
- Jansen, M., Ten Klooster, J.P., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2009). LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol Rev* 89, 777-798.
- Just, P.A., Poncy, A., Charawi, S., Dahmani, R., Traore, M., Dumontet, T., Drouet, V., Dumont, F., Gilgenkrantz, H., Colnot, S., *et al.* (2015). LKB1 and Notch Pathways Interact and Control Biliary Morphogenesis. *PLoS One* 10, e0145400.
- Komposch, K., and Sibilio, M. (2015). EGFR Signaling in Liver Diseases. *Int J Mol Sci* 17.
- Kudryavtsev, B.N., Kudryavtseva, M.V., Sakuta, G.A., and Stein, G.I. (1993). Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64, 387-393.
- Lazaro-Diequez, F., Cohen, D., Fernandez, D., Hodgson, L., van Ijzendoorn, S.C., and Musch, A. (2013). Par1b links lumen polarity with LGN-NuMA positioning for distinct epithelial cell division phenotypes. *J Cell Biol* 203, 251-264.
- Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G., *et al.* (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 23, 833-843.
- Margall-Ducos, G., Morizur-Celton, S., Couton, D., Bregerie, O., and Desdouets, C. (2007). Liver Tetraploidization is Controlled by a New Process of Incomplete Cytokinesis. *Journal of Cell Science* 120, 3633-3639.
- Melchiorri, C., Chieco, P., Zedda, A.I., Coni, P., Ledda-Columbano, G.M., and Columbano, A. (1993). Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth. *Carcinogenesis* 14, 1825-1830.
- Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2014). AMPK α 1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. *J Hepatol* 60, 152-159.
- Michalopoulos, G.K. (2013). Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* 3, 485-513.
- Michalopoulos, G.K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 65, 1384-1392.
- Mirouse, V., and Billaud, M. The LKB1/AMPK polarity pathway. *FEBS Lett* 585, 981-985.
- Miyaoka, Y., Ebato, K., Kato, H., Arakawa, S., Shimizu, S., and Miyajima, A. (2012). Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 22, 1166-1175.
- Mohseni, M., Sun, J., Lau, A., Curtis, S., Goldsmith, J., Fox, V.L., Wei, C., Frazier, M., Samson, O., Wong, K.K., *et al.* (2014). A genetic screen identifies an LKB1-MARK signalling axis controlling the Hippo-YAP pathway. *Nat Cell Biol* 16, 108-117.
- Momcilovic, M., and Shackelford, D.B. (2015). Targeting LKB1 in cancer - exposing and exploiting vulnerabilities. *Br J Cancer* 113, 574-584.
- Nakano, A., and Takashima, S. (2012). LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes Cells* 17, 737-747.
- Nakau, M., Miyoshi, H., Seldin, M.F., Imamura, M., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2002). Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in *Lkb1* gene knockout mice. *Cancer Res* 62, 4549-4553.
- Nezi, L., and Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 21, 785-795.
- Ollila, S., and Makela, T.P. (2011). The tumor suppressor kinase LKB1: lessons from mouse models. *J Mol Cell Biol* 3, 330-340.
- Pandit, S.K., Westendorp, B., and de Bruin, A. (2013). Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 23, 556-566.

- Paranjpe, S., Bowen, W.C., Mars, W.M., Orr, A., Haynes, M.M., DeFrances, M.C., Liu, S., Tseng, G.C., Tsagianni, A., and Michalopoulos, G.K. (2016). Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. *Hepatology* 64, 1711-1724.
- Patel, K., Foretz, M., Marion, A., Campbell, D.G., Gourlay, R., Boudaba, N., Tournier, E., Titchenell, P., Pegg, M., Deak, M., *et al.* (2014). The LKB1-salt-inducible kinase pathway functions as a key gluconeogenic suppressor in the liver. *Nat Commun* 5, 4535.
- Porat-Shliom, N., Tietgens, A.J., Van Itallie, C.M., Vitale-Cross, L., Jarnik, M., Harding, O.J., Anderson, J.M., Gutkind, J.S., Weigert, R., and Arias, I.M. (2016). Liver kinase B1 regulates hepatocellular tight junction distribution and function in vivo. *Hepatology* 64, 1317-1329.
- Rudnick, D.A., and Davidson, N.O. (2012). Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol* 2012, 549241.
- Sebbagh, M., Olschwang, S., Santoni, M.J., and Borg, J.P. (2011). The LKB1 complex-AMPK pathway: the tree that hides the forest. *Fam Cancer* 10, 415-424.
- Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 9, 563-575.
- Shan, T., Xiong, Y., and Kuang, S. (2016). Deletion of *Lkb1* in adult mice results in body weight reduction and lethality. *Sci Rep* 6, 36561.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., Montminy, M., and Cantley, L.C. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310, 1642-1646.
- Shorning, B.Y., and Clarke, A.R. (2011). LKB1 loss of function studied in vivo. *FEBS Lett* 585, 958-966.
- Slim, C.L., Lazaro-Diequez, F., Bijlard, M., Toussaint, M.J., de Bruin, A., Du, Q., Musch, A., and van Ijzendoorn, S.C. (2013). Par1b induces asymmetric inheritance of plasma membrane domains via LGN-dependent mitotic spindle orientation in proliferating hepatocytes. *PLoS Biol* 11, e1001739.
- Slim, C.L., van, I.S.C., Lazaro-Diequez, F., and Musch, A. (2014). The special case of hepatocytes: unique tissue architecture calls for a distinct mode of cell division. *Bioarchitecture* 4, 47-52.
- 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.
- Tao, J., Calvisi, D.F., Ranganathan, S., Cigliano, A., Zhou, L., Singh, S., Jiang, L., Fan, B., Terracciano, L., Armeanu-Ebinger, S., *et al.* (2014). Activation of beta-catenin and Yap1 in human hepatoblastoma and induction of hepatocarcinogenesis in mice. *Gastroenterology* 147, 690-701.
- Toyoda, H., Bregerie, O., Vallet, A., Nalpas, B., Pivert, G., Brechot, C., and Desdouets, C. (2005). Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* 54, 297-302.
- Varela-Rey, M., Fernandez-Ramos, D., Martinez-Lopez, N., Embade, N., Gomez-Santos, L., Beraza, N., Vazquez-Chantada, M., Rodriguez, J., Luka, Z., Wagner, C., *et al.* (2009). Impaired liver regeneration in mice lacking glycine N-methyltransferase. *Hepatology* 50, 443-452.
- Vazquez-Chantada, M., Ariz, U., Varela-Rey, M., Embade, N., Martinez-Lopez, N., Fernandez-Ramos, D., Gomez-Santos, L., Lamas, S., Lu, S.C., Martinez-Chantar, M.L., *et al.* (2009). Evidence for LKB1/AMP-activated protein kinase/ endothelial nitric oxide synthase cascade regulated by hepatocyte growth factor, S-adenosylmethionine, and nitric oxide in hepatocyte proliferation. *Hepatology* 49, 608-617.

- Wang, M.J., Chen, F., Lau, J.T.Y., and Hu, Y.P. (2017). Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell Death Dis* 8, e2805.
- Wei, C., Bhattaram, V.K., Igwe, J.C., Fleming, E., and Tirnauer, J.S. (2012). The LKB1 tumor suppressor controls spindle orientation and localization of activated AMPK in mitotic epithelial cells. *PLoS One* 7, e41118.
- Weymann, A., Hartman, E., Gazit, V., Wang, C., Glauber, M., Turmelle, Y., and Rudnick, D.A. (2009). p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatology* 50, 207-215.
- Williams, T., and Brenman, J.E. (2008). LKB1 and AMPK in cell polarity and division. *Trends Cell Biol* 18, 193-198.
- Woods, A., Heslegrave, A.J., Muckett, P.J., Levene, A.P., Clements, M., Mobberley, M., Ryder, T.A., Abu-Hayyeh, S., Williamson, C., Goldin, R.D., *et al.* (2011). LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice. *Biochem J* 434, 49-60.
- Ylikorkala, A., Rossi, D.J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M., and Makela, T.P. (2001). Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in *Lkb1*-deficient mice. *Science* 293, 1323-1326.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hepatocytes-Cre mediated deletion of *Lkb1* increases cell proliferation and liver mass during liver regeneration process

(A) Schematic representation of strategy for hepatocyte-specific deletion of *Lkb1* and experimental procedure for partial hepatectomy.

(B) Hepatic regenerative index was determined by measuring liver weight/body weight ratio in CTR and *Lkb1*^{Δhep} mice at the indicated time points before and after PHx. Data represent the mean ± SEM, ($n \geq 6$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t test.

(C-E) Representative BrdU and Phospho-Histone H3 (PHH3) immunohistochemistry of CTR and *Lkb1*^{Δhep} liver tissues at different times after PHx (scale bar: 20 μm).

(D-F) Quantitative analysis of BrdU and PHH3 labeling (percentage of BrdU⁺ and PHH3⁺ hepatocytes). Data represent the mean ± SEM, ($n \geq 6$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t test.

(G) Quantitative PCR analysis of genes associated with cell cycle progression (*Ccna2*, *Ccnb1*) in CTR and *Lkb1*^{Δhep} liver tissues 24 and 30 hours after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM, ($n = 8$ per group). * $P < 0.05$, Student's t test.

Figure 2. Hepatocytes-specific silencing of *Lkb1* has a moderate impact on metabolic regulation during liver regeneration

(A) Hepatic triglycerides (TG) content was measured in CTR and *Lkb1*^{Δhep} liver tissues at different time before and after PHx. Data represent the mean ± SEM, ($n \geq 6$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t test.

(B) Quantitative PCR analysis of genes associated with fatty acid synthesis: acetyl-CoA carboxylase 1 [*Acc1*], sterol regulatory element-binding protein 1c [*Srebp-1c*], in CTR and

Lkb1^{Δhep} liver samples at different time before and after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM, ($n = 9$ per group). * $P < 0.05$, Student's t test.

(C) Glycogen content analysis in CTR and Lkb1^{Δhep} liver tissues assessed by periodic acid-Schiff (PAS) staining (scale bar: 20 μm). Pink color indicates the presence of hepatic glycogen before (0h) and after PHx (8 and 40 hours).

(D) Quantitative PCR analysis of genes associated with gluconeogenesis (PPAR γ coactivator 1 α [*Pgc1 α*], glucose-6-phosphatase [*G6Pase*]) in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples before and at different time after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM, ($n = 9$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t test.

(E) Immunoblot analysis comparing the expression of phospho-AMPK α ^{T172} and AMPK α in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples (before and at different time after PHx). γ -Tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

Figure 3. Hepatocytes-specific silencing of *Lkb1* activates specifically EGFR signaling

(A) Relative epidermal growth factor receptor (*Egfr*) mRNA level measured by quantitative PCR in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples before and at different time after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM, ($n = 9$ per group). *** $P < 0.001$, Student's t test.

(B-C) Immunoblot analysis comparing the expression of phospho-EGFR^{Y1173}, phospho-EGFR^{Y1068}, EGFR, phospho-AKT^{S473}, AKT, phospho-ERK1/2^{T202-Y204}, ERK1/2, phospho-GSK3 β ^{S9} and GSK3 β in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples (before and at different time after PHx). γ -Tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

- (D) Representative KI67 and Phospho-Histone H3 (PHH3) immunohistochemistry on CTR and Lkb1^{Δhep} resting liver tissues (scale bar: 20 μm).
- (E) Quantitative analysis of KI67 and PHH3 labeling (percentage of KI67⁺ and PHH3⁺ hepatocytes). Data represent the mean ± SEM, ($n \geq 6$ per group). ** $P < 0.01$, Student's t test.
- (F) Schematic representation of experimental procedure for canertinib treatment.
- (G) Immunoblot analysis comparing the expression of phospho-EGFR^{Y1173}, phospho-EGFR^{Y1068} and EGFR in Lkb1^{Δhep} liver samples treated or not with canertinib. γ-tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.
- (H) Representative KI67 immunohistochemistry on Lkb1^{Δhep} liver tissues treated or not with canertinib (scale bar: 20 μm) and quantitative analysis of KI67 labeling (percentage of KI67⁺ hepatocytes). Data represent the mean ± SEM, ($n = 4$ per group). ** $P < 0.01$, Student's t test.
- (I) A proposed working model for LKB1 regulating hepatocytes proliferation during liver regeneration process.

Figure 4. LKB1 is a mitotic regulator during liver regeneration process

- (A) Quantification of metaphase and anaphase events was performed on CTR and Lkb1^{Δhep} liver tissues sections immunostained with PHH3 (48 hours after PHx, see [Figure 1E](#)). Data represent the mean ± SEM, ($n = 6$ per group). ** $P < 0.01$, Student's t test.
- (B) GSEA was performed with transcriptomic data from CTR and Lkb1^{Δhep} liver tissues 48 hours after hepatectomy ($n = 4$ per group) (Gene Expression Omnibus GSE100605) and with BioCarta and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes gene sets. All results are shown in [Table S1](#) and only the best enrichments are shown (false discovery rate q value < 0.001).
- (C) GSEA plot for the top enriched pathway showing a significant enrichment for genes up-regulated in liver from Lkb1^{Δhep} mice with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes list of metaphase (M) genes.
- (D) Images of liver sections (48 hours after PHx) from Lkb1^{Δhep}, AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ ^{Δhep} and CTR

mice after double staining with β -tubulin (microtubule labeling, green) and Hoechst (nucleus, blue) (scale bar: 3 μ m).

(E) Images of liver sections (48 hours after PHx) from *Lkb1* ^{Δ hep}, *AMPK α 1/ α 2* ^{Δ hep} and CTR mice after double staining with CEACAM (baso-lateral labeling, green) and Hoechst (nucleus, blue) (scale bar: 3 μ m).

(F) A proposed working model for mitotic spindle orientation according to hepatocytes polarity in *Lkb1* ^{Δ hep}, *AMPK α 1/ α 2* ^{Δ hep} and CTR mice. (AD: Apical Domain ; BD : Basal Domain ; Blue dotted line : misorientation of axis of mitotic spindle) (adapted from [Lazaro-Dieuez et al., 2013](#))

Figure 5. *Lkb1* deletion impacts on genomic integrity in liver parenchyma at the end of regenerative process

(A) A proposed working model to explain the outcome of cells arrested in metaphase: (1) Mitotic slippage leading to the genesis of mononucleated polyploid cells. (2) After bypassing metaphase block, anaphase with lagging chromosome leading to the genesis of aneuploid cells.

(B) Images of liver sections from *Lkb1* ^{Δ hep} and CTR mice staining with Hoechst (nucleus, blue) (scale bar: 50 μ m). Box plots of the percentage of 2n, 4n, and $\geq$ 8n nuclei relative to total mononuclear in *Lkb1* ^{Δ hep} and CTR mice, 13 days after PHx. The bottom, central, and top lines of each box represent the first quartile, median, and third quartile of the distribution, respectively ($n = 6$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t test.

(C) Images of liver sections from *Lkb1* ^{Δ hep} and CTR mice staining with β -catenin (plasma membrane labeling, green) (scale bar: 50 μ m). Box plots representative of cell area in *Lkb1* ^{Δ hep} and CTR mice, 13 days after PHx. The bottom, central, and top lines of each box represent the first quartile, median, and third quartile of the distribution, respectively ($n = 6$ per group). *** $P < 0.001$, Student's t test.

(D) Images of liver sections from *Lkb1* ^{Δ hep} and CTR mice staining with β -catenin (plasma

membrane labeling, green) and with Hoechst (nucleus, blue) (scale bar: 20 μ m). Arrow points to trinucleate hepatocyte. Box plots representative of percentage of trinucleate hepatocytes in Lkb1 ^{Δ hep} and CTR mice, 13 days after PHx. The bottom, central, and top lines of each box represent the first quartile, median, and third quartile of the distribution, respectively ($n = 6$ per group). ** $P < 0.01$, Student's t test.

(E) Alterations in chromosome copy number were assessed by CGH analysis using Lkb1 ^{Δ hep} and CTR livers. Each color line represents genomic profile of one distinct Lkb1 ^{Δ hep} mouse. For chromosome loss, the log ratio decreases and shifts to the left; whereas for chromosome gain, the log ratio increases and shifts to the right.

FIGURE 1

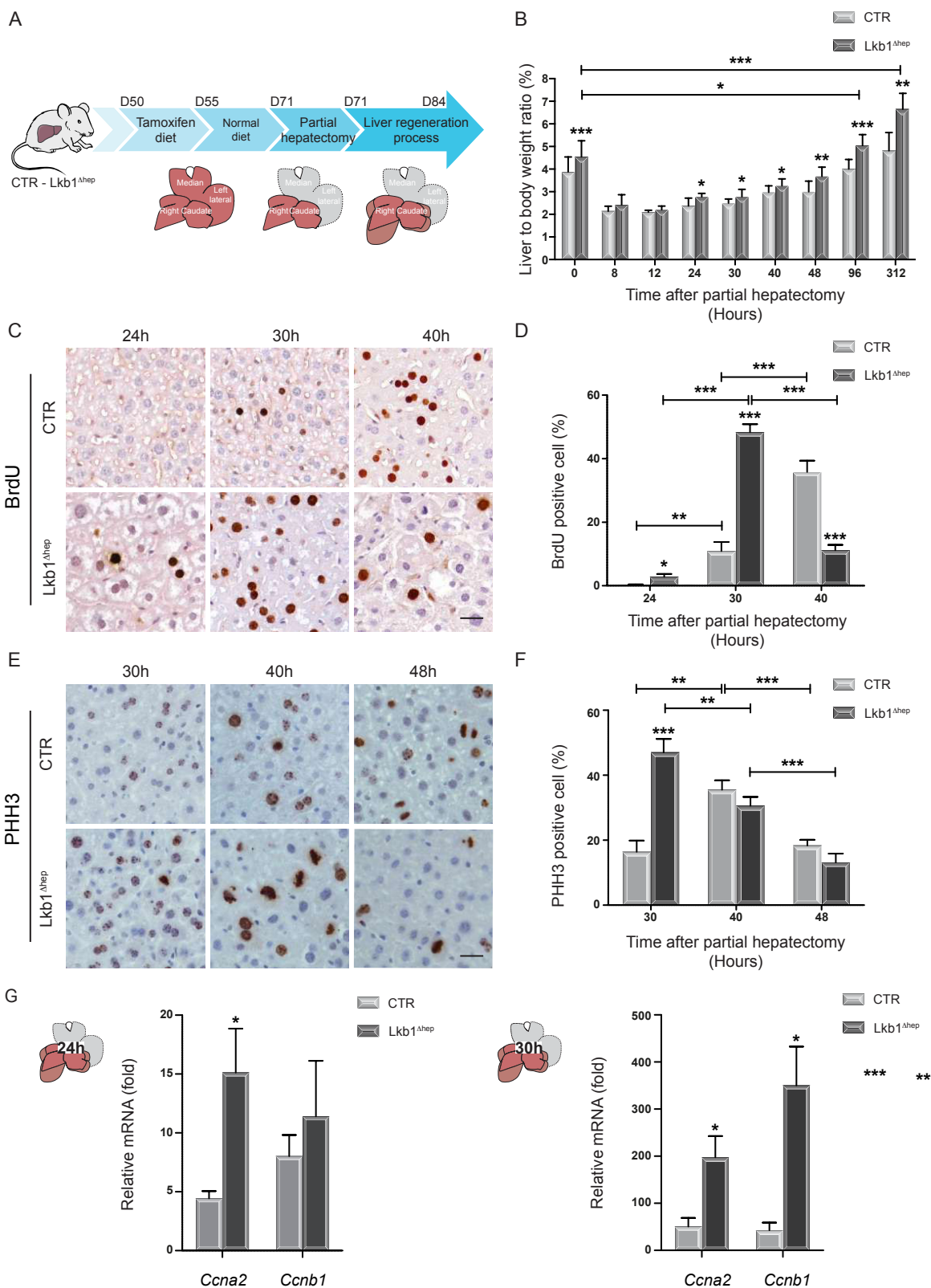


FIGURE 2

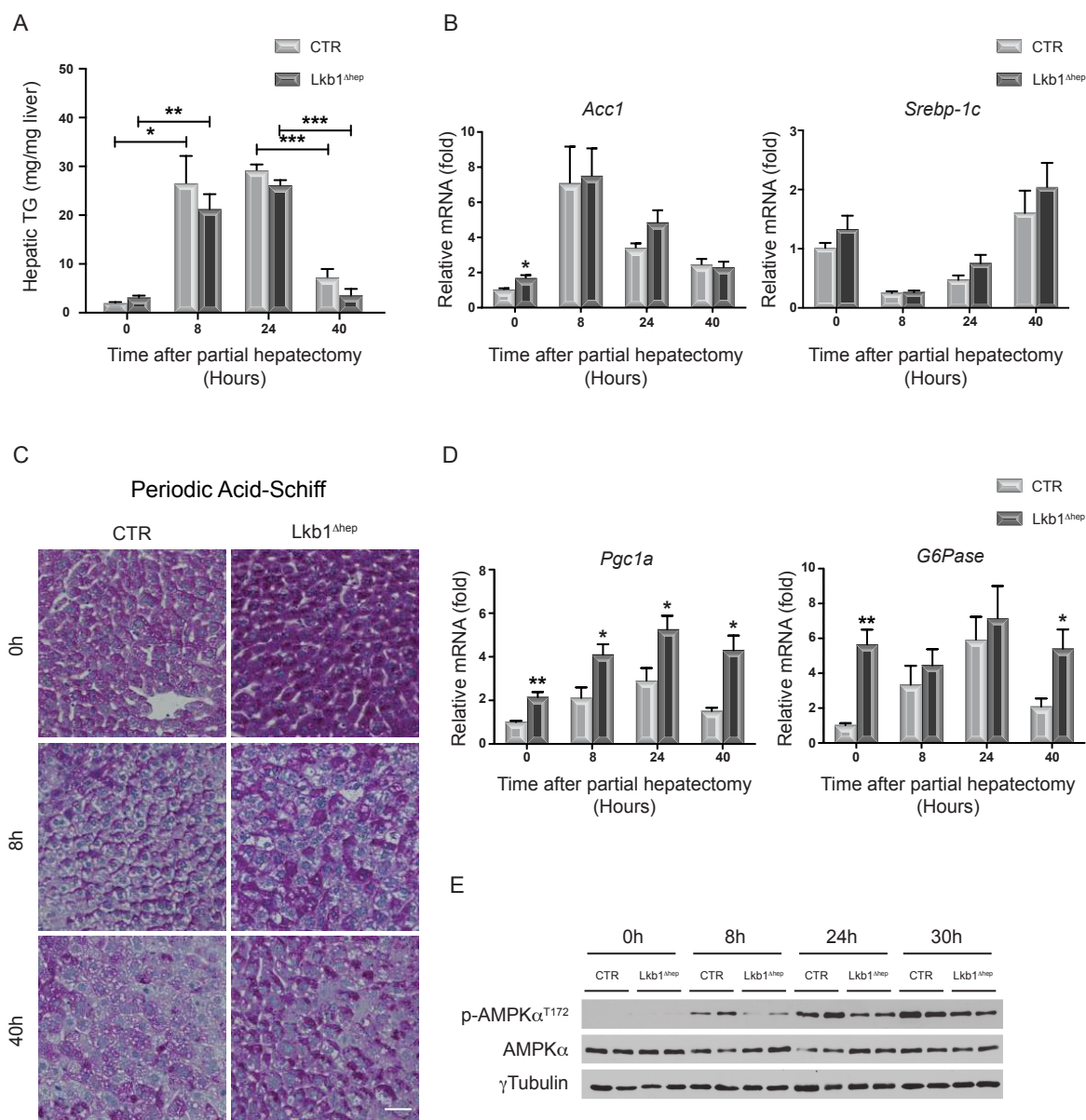


FIGURE 3

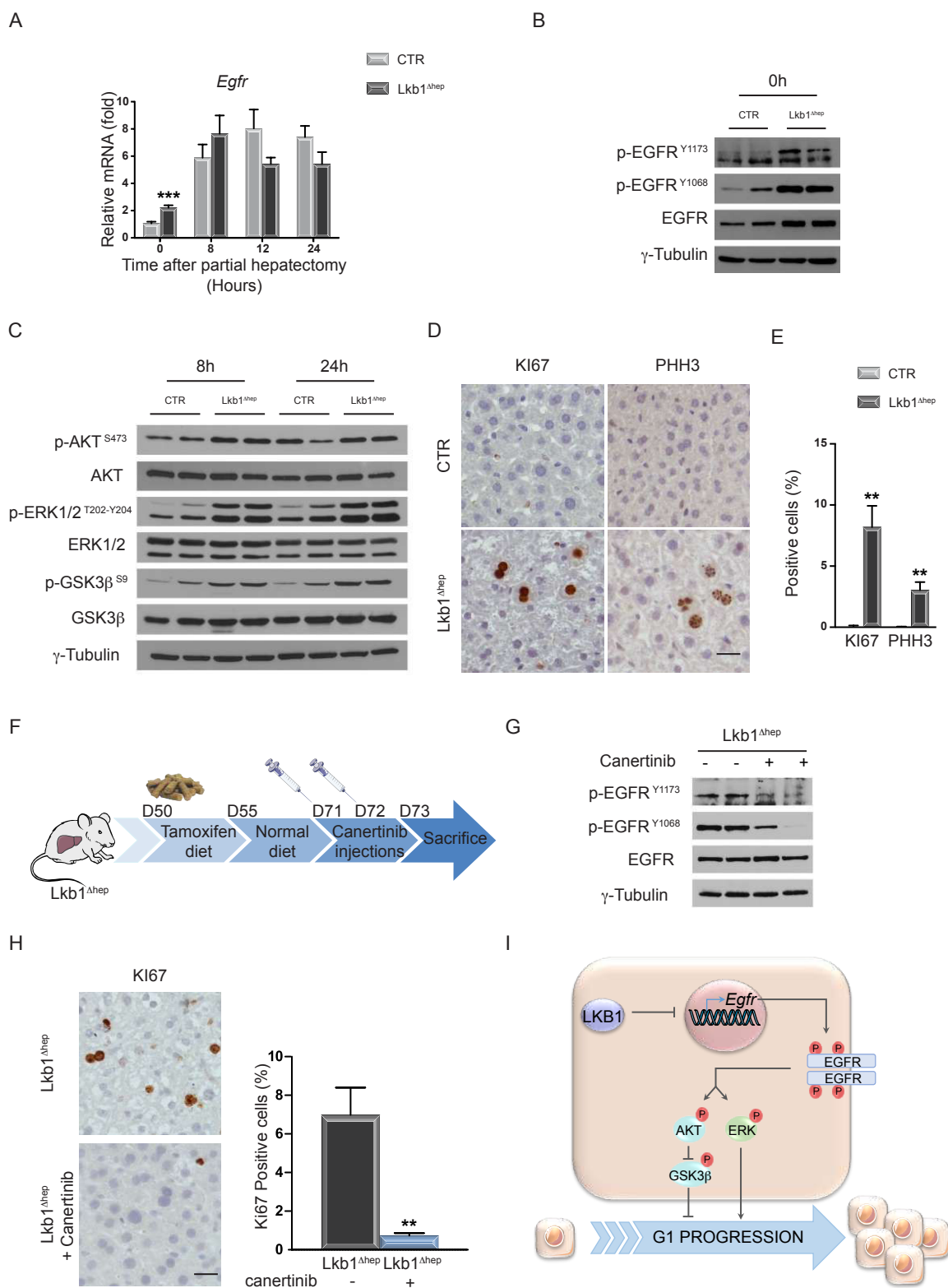


FIGURE 4

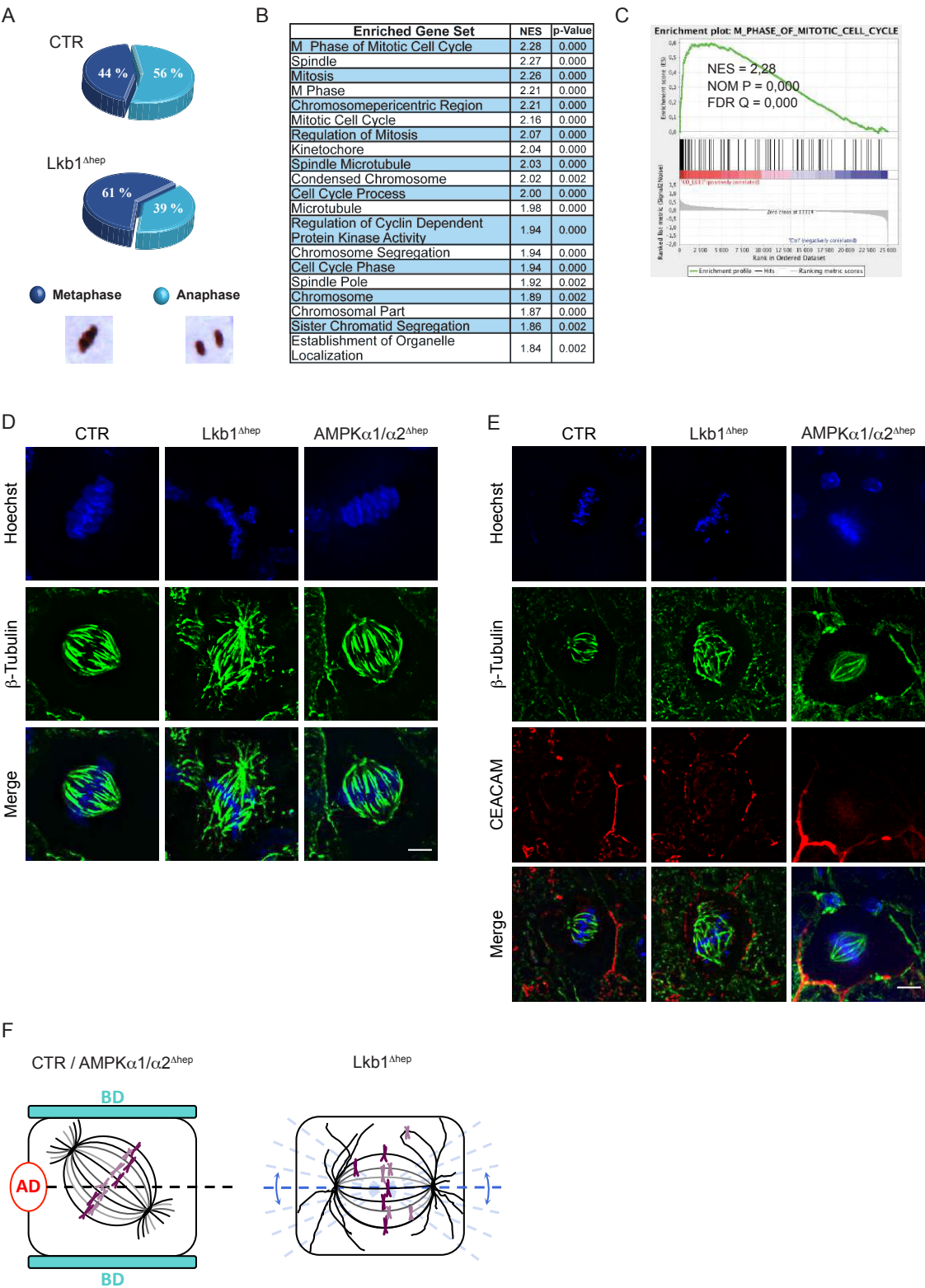
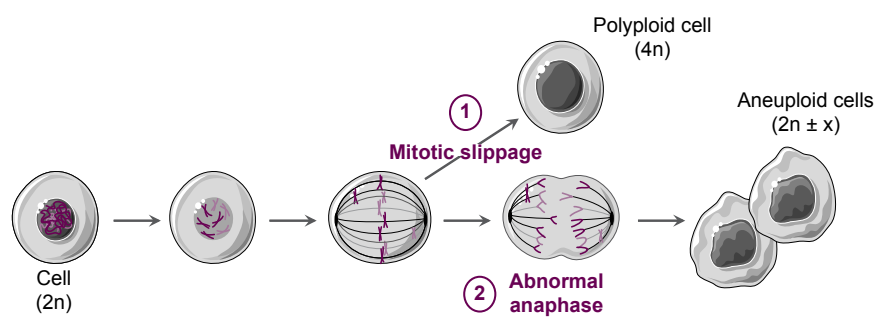
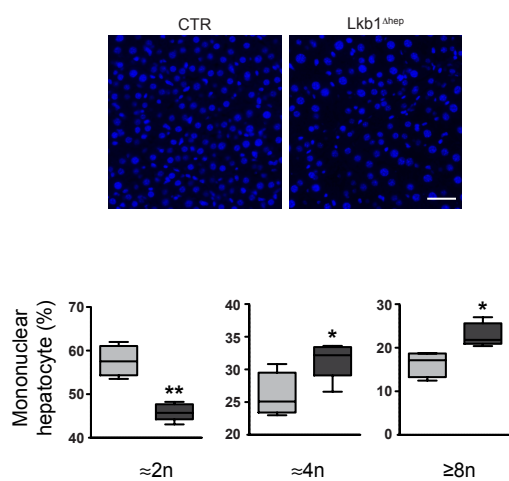


FIGURE 5

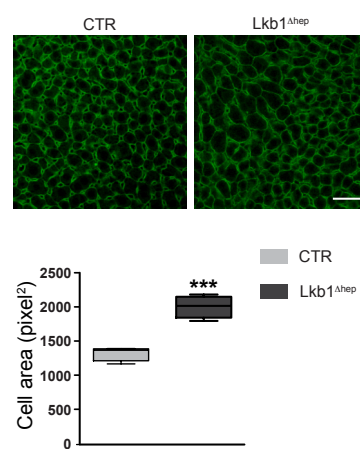
A



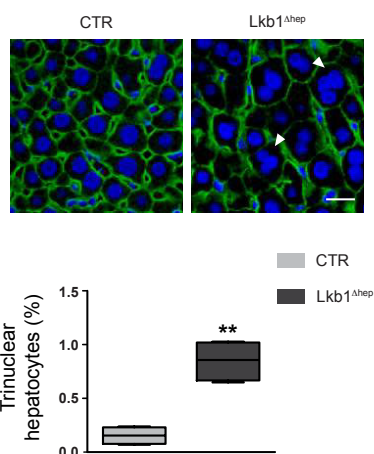
B



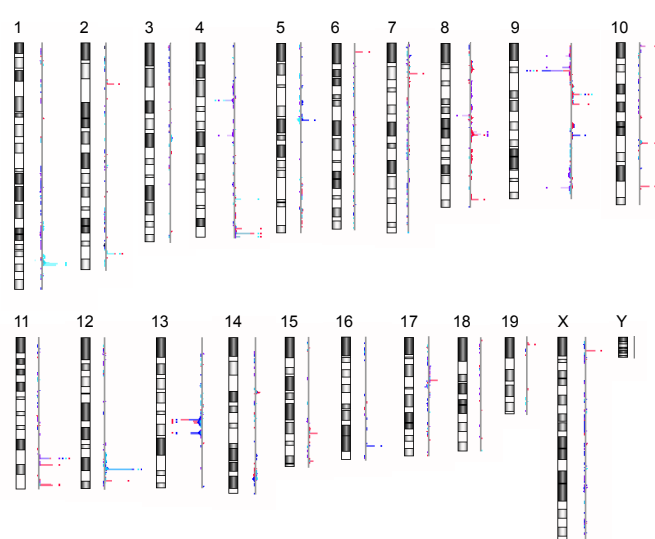
C



D



E



Supplemental Text and Figures

SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTAL FIGURES

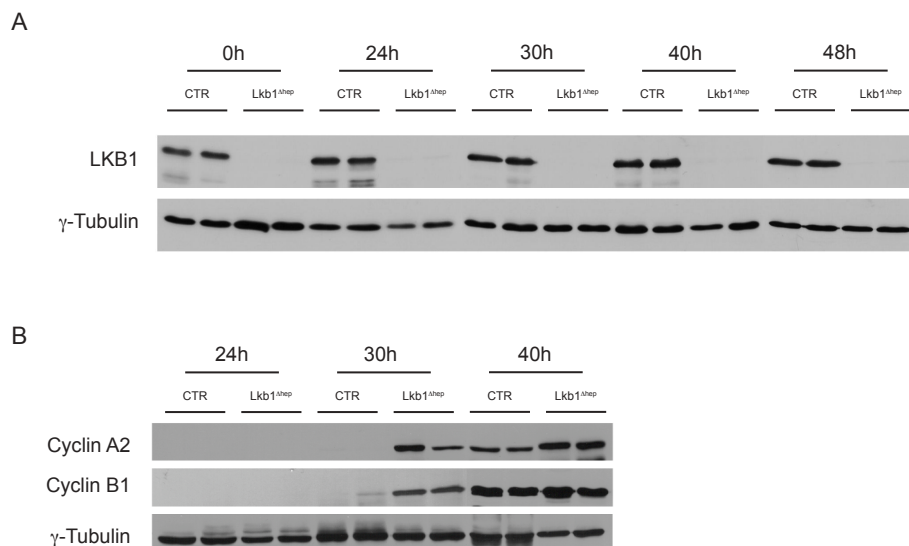


Figure S1. Hepatocyte-specific silencing of *Lkb1* up-regulated the expression of key component of cell cycle machinery during liver regeneration process. Related to Figure 1.

(A) Immunoblot analysis comparing the expression of LKB1 in CTR and Lkb1^{Δhep} liver tissues. Proteins samples were prepared at different time before (0h) and after PHx (24, 30, 40, 48h). γ-Tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

(B) Immunoblot analysis comparing the expression of CCNA2 and CCNB1 in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples (different time before and after PHx). γ-Tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

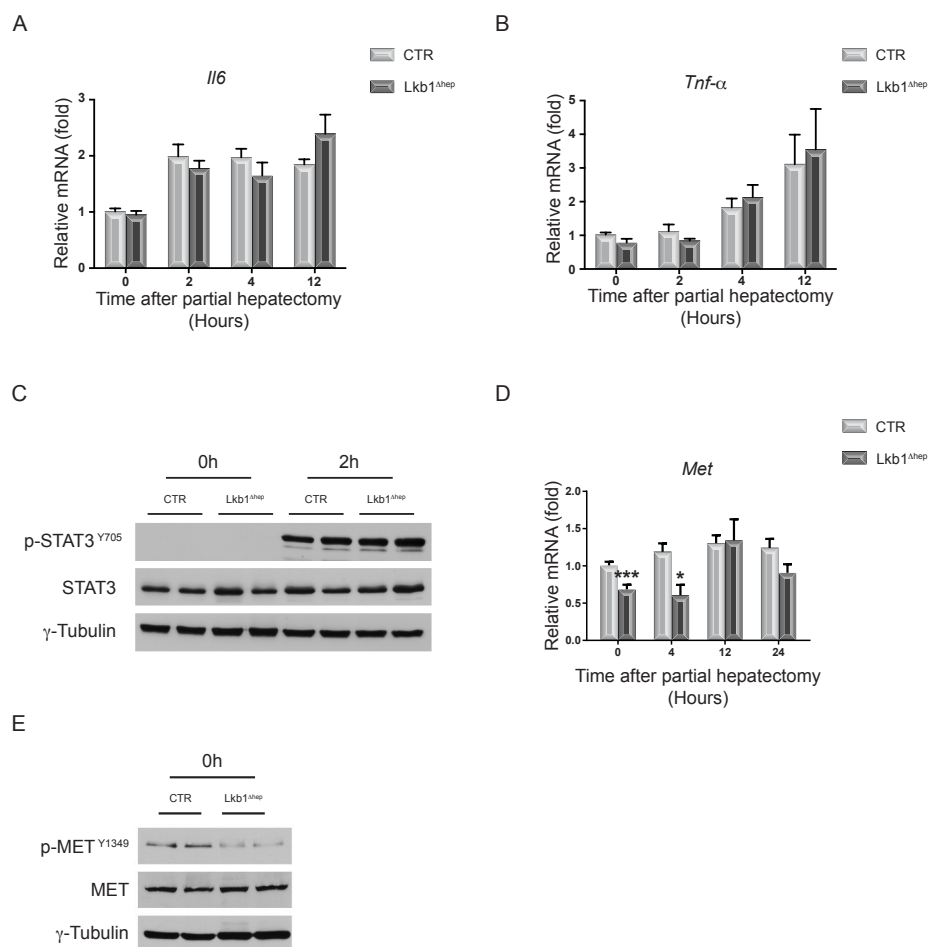


Figure S2. Deletion of *Lkb1* do not impact on cytokine signaling at early time point after liver PHx. Related to Figure 3.

(A-B) Relative *Tnfα* and *Il6* mRNA levels measured by quantitative PCR in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples at different time before and after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* rRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM, (*n* = 9 per group). **P* < 0.05, ***P* < 0.005, Student's *t* test.

(C-E) Immunoblot analysis comparing the expression of phospho-STAT3^{Y705}, STAT3, phospho-MET^{Y1349}, MET. Liver samples were extracted from the indicated genotype at different time before and after PHx. γ-Tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

(D) Relative receptor tyrosine kinases (*Met*) mRNA levels measured by quantitative PCR in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples before and at different time after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* mRNA for each sample. Data represent the mean ± SEM, (*n* = 9 per group). **P* < 0.05, ****P* < 0.001, Student's *t* test.

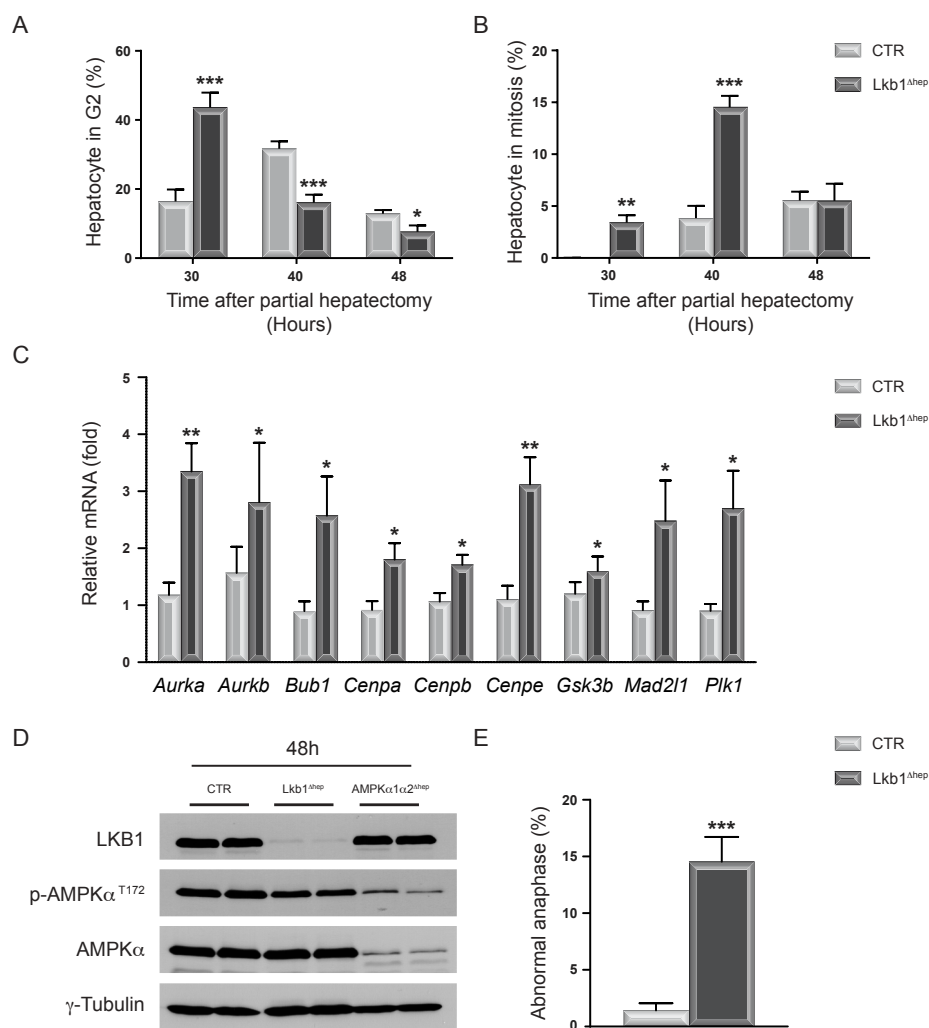


Figure S3. Deletion of *Lkb1* impact on mitosis progression independently of AMPK activity. Related to Figure 4 and 5.

(A-B) Quantitative analysis of PHH3 labeling at different time points after PHx. Phospho-Histone H3 (PHH3) nuclei labeling was considered a marker of G2 phase (A), phospho-Histone H3 (PHH3) chromosome labeling as a marker of mitosis (B) (see also Figure 1F). Data represent the mean $\pm$ SEM, ($n = 6$ per group). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's t test.

(C) Quantitative PCR analysis of genes associated with SAC activation (*Aurka*, *Aurkb*, *Plk1*, *Mad2l1*, *Bub1*, *Cenpa*, *Cenpb*, *Cenpe*, *Gsk3b*) in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples at 48 hours after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* rRNA for each sample. Data represent the mean $\pm$ SEM, ($n = 9$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t test.

(D) Immunoblot analysis comparing the expression of phospho-AMPKα^{T172} and AMPKα in Lkb1^{Δhep}, AMPKα1/α2^{Δhep} and CTR liver samples (48 hours after PHx). γ-Tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

(E) Quantification of abnormal anaphase events was performed on CTR and Lkb1^{Δhep} liver tissues sections immunostained with PHH3 (48 hours after PHx, see Figure 1E). Data represent the mean $\pm$ SEM, ($n = 6$ per group). *** $P < 0.001$, Student's t test.

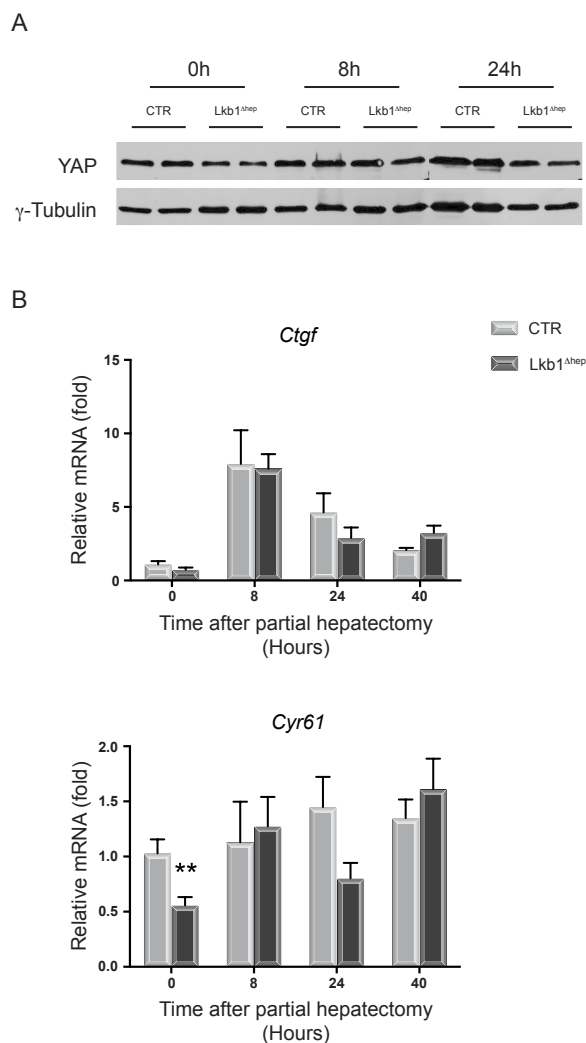


Figure S4. Deletion of *Lkb1* do not impact on YAP signaling

(A) Immunoblot analysis comparing the expression of unphosphorylated YAP (activated form). Liver samples were extracted from the indicated genotype at different time before and after PHx. γ -Tubulin served as a loading control. Lanes show samples from independent biological replicates.

(B) Relative *Ctgf* and *Cyr61* mRNA levels measured by quantitative PCR in CTR and Lkb1^{Δhep} liver samples at different time before and after PHx. Gene expression levels were normalized to the abundance of *18s* rRNA for each sample. Data represent the mean $\pm$ SEM, ($n = 9$ per group). ** $P < 0.005$, Student's t test.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1. Gene set enrichment analysis (GSEA) of transcriptomic data from CTR and Lkb1Δhep liver. Related to Figure 4

Rank	NAME	NES	NOM p-val
1	M_PHASE_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	2.2757652	0.0
2	SPINDLE	2.2680802	0.0
3	MITOSIS	2.2591996	0.0
4	M_PHASE	2.214076	0.0
5	CHROMOSOMEPERICENTRIC_REGION	2.2118986	0.0
6	MITOTIC_CELL_CYCLE	2.1595368	0.0
7	REGULATION_OF_MITOSIS	2.0664296	0.0
8	KINETOCHORE	2.0360527	0.0
9	SPINDLE_MICROTUBULE	2.026585	0.0
10	CONDENSED_CHROMOSOME	2.0155673	0.0016447369
11	CELL_CYCLE_PROCESS	2.0020669	0.0
12	MICROTUBULE	1.9756051	0.0
13	REGULATION_OF_CYCLIN_DEPENDENT_PROTEIN_KINASE_ACTIVITY	1.9430875	0.0
14	CHROMOSOME_SEGREGATION	1.9423074	0.0
15	CELL_CYCLE_PHASE	1.9412879	0.0
16	SPINDLE_POLE	1.9226696	0.0018939395
17	CHROMOSOME	1.8885577	0.0016977929
18	CHROMOSOMAL_PART	1.8746954	0.0
19	SISTER_CHROMATID_SEGREGATION	1.8584515	0.0018939395
20	ESTABLISHMENT_OF_ORGANELLE_LOCALIZATION	1.8380508	0.0017064846
21	CELL_DIVISION	1.8323085	0.0035778175
22	MITOTIC_SISTER_CHROMATID_SEGREGATION	1.8210946	0.0
23	CELL_CYCLE_GO_0007049	1.8111053	0.0
24	VOLTAGE_GATED_POTASSIUM_CHANNEL_ACTIVITY	1.7877728	0.003533569
25	MORPHOGENESIS_OF_AN_EPITHELIUM	1.7707686	0.0036968577
26	MICROTUBULE_CYTOSKELETON	1.743553	0.0
27	DIGESTION	1.7354909	0.003508772
28	CELL_CYCLE_CHECKPOINT_GO_0000075	1.7307433	0.005235602
29	ORGANELLE_LOCALIZATION	1.7299036	0.0053956835
30	MITOTIC_CELL_CYCLE_CHECKPOINT	1.7221568	0.01607143
31	REGULATION_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	1.7196326	0.01369863
32	MICROTUBULE_CYTOSKELETON_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.6954334	0.0017889087
33	VOLTAGE_GATED_CATION_CHANNEL_ACTIVITY	1.6324793	0.008665511
34	POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_PRODUCTION	1.597315	0.023172906
35	VOLTAGE_GATED_CHANNEL_ACTIVITY	1.5919014	0.0016806723
36	REGULATION_OF_CELL_CYCLE	1.589312	0.0
37	POTASSIUM_ION_TRANSPORT	1.5711572	0.007067138
38	POTASSIUM_CHANNEL_ACTIVITY	1.5351431	0.01923077
39	VOLTAGE_GATED_POTASSIUM_CHANNEL_COMPLEX	1.535033	0.019130435
40	NEUROPEPTIDE_BINDING	1.5169896	0.028725315
41	MOTOR_ACTIVITY	1.5163946	0.039215688
42	DNA_PACKAGING	1.5148859	0.041516244
43	HORMONE_ACTIVITY	1.5092505	0.023131672
44	COENZYME_METABOLIC_PROCESS	1.4891152	0.032986112
45	NEUROPEPTIDE_RECEPTOR_ACTIVITY	1.4727308	0.06326889
46	RIBOSOMAL_SUBUNIT	1.4718491	0.051601425
47	PROTEIN_KINASE_REGULATOR_ACTIVITY	1.4687549	0.039215688
48	CENTROSOME	1.4616815	0.032871973
49	CATION_CHANNEL_ACTIVITY	1.4298332	0.02
50	GATED_CHANNEL_ACTIVITY	1.4189392	0.017656501
51	MICROTUBULE_BASED_PROCESS	1.4183178	0.03826955
52	REGULATION_OF_CYTOKINE_PRODUCTION	1.4100727	0.08304498

53	PROTEIN_KINASE_INHIBITOR_ACTIVITY	1.4023827	0.06
54	ION_CHANNEL_ACTIVITY	1.3958806	0.01791531
55	MITOCHONDRIAL_RIBOSOME	1.3844995	0.10242086
56	RHYTHMIC_PROCESS	1.3813431	0.0707804
57	CYTOSKELETAL_PART	1.38072	0.007898894
58	CHROMOSOME_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.3797264	0.03069467
59	MICROTUBULE_ORGANIZING_CENTER	1.3706946	0.054770317
60	ORGANELAR_RIBOSOME	1.3695533	0.100548446
61	SUBSTRATE_SPECIFIC_CHANNEL_ACTIVITY	1.3680215	0.025641026
62	TUBE_DEVELOPMENT	1.3629844	0.1056338
63	KINASE_INHIBITOR_ACTIVITY	1.3590357	0.1027027
64	SPLICEOSOME	1.3562448	0.057692308
65	DETECTION_OF ABIOTIC_STIMULUS	1.3400713	0.13090909
66	KINASE_REGULATOR_ACTIVITY	1.338563	0.077186964
67	SYNAPTIC_TRANSMISSION	1.3320627	0.026622295
68	GLUTATHIONE_TRANSFERASE_ACTIVITY	1.3279853	0.13211009
69	NEGATIVE_REGULATION_OF_MAP_KINASE_ACTIVITY	1.3272105	0.12956205
70	CELLULAR_COMPONENT_DISASSEMBLY	1.3256518	0.11313868
71	CALCIUM_CHANNEL_ACTIVITY	1.3249267	0.09219858
72	INTERPHASE_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	1.3247918	0.076124564
73	DETECTION_OF_EXTERNAL_STIMULUS	1.3241116	0.11627907
74	REGULATION_OF_TRANSFERASE_ACTIVITY	1.3180007	0.0368
75	ACTIVATION_OF_PROTEIN_KINASE_ACTIVITY	1.3144524	0.113970585
76	NUCLEAR_CHROMOSOME	1.3102409	0.08199643
77	NEUROTRANSMITTER_BINDING	1.3100635	0.107583776
78	CELL_STRUCTURE_DISASSEMBLY_DURING_APOPTOSIS	1.3062688	0.14337568
79	NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSFERASE_ACTIVITY	1.304441	0.11478261
80	METAL_ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	1.2952956	0.05123967
81	CHROMATIN_BINDING	1.2875372	0.14616756
82	REGULATION_OF_PROTEIN_KINASE_ACTIVITY	1.2832153	0.057233706
83	REGULATION_OF_KINASE_ACTIVITY	1.277749	0.07096774
84	BRAIN_DEVELOPMENT	1.277037	0.12591241
85	MITOCHONDRIAL_OUTER_MEMBRANE	1.2770026	0.16513762
86	INTERPHASE	1.2767537	0.118584074
87	NEUROTRANSMITTER_RECEPTOR_ACTIVITY	1.2756994	0.116197184
88	NEGATIVE_REGULATION_OF_CATALYTIC_ACTIVITY	1.2745903	0.10309278
89	EPIDERMIS_DEVELOPMENT	1.2727879	0.10956522
90	CHLORIDE_CHANNEL_ACTIVITY	1.2704397	0.18953069
91	ANION_CHANNEL_ACTIVITY	1.2704014	0.16549295
92	TRANSMISSION_OF_NERVE_IMPULSE	1.2658267	0.045031056
93	REGULATION_OF_ANATOMICAL_STRUCTURE_MORPHOGENESIS	1.2645507	0.16485508
94	VOLTAGE_GATED_CALCIUM_CHANNEL_COMPLEX	1.2606531	0.1958042
95	TUBE_MORPHOGENESIS	1.2601565	0.19125684
96	VOLTAGE_GATED_CALCIUM_CHANNEL_ACTIVITY	1.248277	0.19400352
97	CONDENSED_NUCLEAR_CHROMOSOME	1.2463266	0.19178082
98	MONOVALENT_INORGANIC_CATION_TRANSPORT	1.2422915	0.087171055
99	TRANSCRIPTION_INITIATION_FROM_RNA_POLYMERASE_II_PROMOTER	1.2285268	0.1892361
100	NUCLEAR_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.2282364	0.16725352
101	PHOSPHOPROTEIN_PHOSPHATASE_ACTIVITY	1.216405	0.13380282
102	REPRODUCTIVE_PROCESS	1.2131784	0.11568938
103	INORGANIC_ANION_TRANSPORT	1.2115988	0.22980252
104	POSITIVE_REGULATION_OF_CELLULAR_COMPONENT_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.2061653	0.19642857
105	RESPONSE_TO_LIGHT_STIMULUS	1.2052871	0.19064748
106	CARBOXYLESTERASE_ACTIVITY	1.2030476	0.20216607
107	PROTEIN_HETERODIMERIZATION_ACTIVITY	1.1992207	0.18167202

108	MICROTUBULE_ASSOCIATED_COMPLEX	1.199106	0.19349316
109	ATPASE_ACTIVITY_COUPLED_TO_TRANSMEMBRANE_MOVEMENT_OF_IONS	1.1980032	0.24736843
110	GAMETE_GENERATION	1.1937901	0.15474209
111	REPRODUCTION	1.1916249	0.0778626
112	POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_CYCLE	1.1869799	0.25952813
113	METAL_ION_TRANSPORT	1.1859611	0.14871795
114	ADENYLATE_CYCLASE_ACTIVATION	1.1852857	0.23226951
115	MEIOTIC_CELL_CYCLE	1.1835922	0.2141593
116	PROTEIN_KINASE_BINDING	1.1753519	0.18363939
117	ION_TRANSPORT	1.1751777	0.1472
118	MEMBRANE_FUSION	1.1747086	0.22939068
119	NUCLEOLUS	1.1745653	0.15682968
120	MICROSOME	1.1717336	0.24048443
121	TRANSFERASE_ACTIVITY_TRANSFERRING_ALKYL_OR_ARYLOTHER_THAN_METHYLGROUPS	1.1700131	0.23966943
122	RIBOSOME_BIOGENESIS_AND_ASSEMBLY	1.1659776	0.25577265
123	ENERGY_DERIVATION_BY_OXIDATION_OF_ORGANIC_COMPOUNDS	1.1651301	0.22003578
124	CATION_TRANSPORT	1.1638238	0.15024233
125	CELLULAR_RESPIRATION	1.1608855	0.26459855
126	KINASE_BINDING	1.160029	0.20648465
127	FATTY_ACID_METABOLIC_PROCESS	1.1546047	0.20790379
128	G_PROTEIN_SIGNALING_ADENYLATE_CYCLASE_ACTIVATING_PATHWAY	1.1525383	0.25
129	ECTODERM_DEVELOPMENT	1.1518118	0.2214876
130	GLUCOSE_METABOLIC_PROCESS	1.1492451	0.24686942
131	PHOSPHORIC_MONOESTER_HYDROLASE_ACTIVITY	1.142132	0.21548821
132	DETECTION_OF_STIMULUS	1.141087	0.23920266
133	G1_PHASE	1.1370698	0.27075812
134	NUCLEOLAR_PART	1.135205	0.3091873
135	COFACTOR_METABOLIC_PROCESS	1.1319909	0.26102942
136	DNA_DAMAGE_CHECKPOINT	1.1304144	0.28911564
137	CHANNEL_REGULATOR_ACTIVITY	1.1283866	0.28521127
138	SEXUAL_REPRODUCTION	1.1277205	0.21308725
139	VESICULAR_FRACTION	1.120818	0.26824817
140	AUXILIARY_TRANSPORT_PROTEIN_ACTIVITY	1.1196446	0.30669144
141	G1_S_TRANSITION_OF_MITOTIC_CELL_CYCLE	1.1182544	0.30824372
142	RRNA_PROCESSING	1.1170634	0.2962963
143	EMBRYONIC_DEVELOPMENT	1.1077479	0.29734513
144	APOPTOTIC_NUCLEAR_CHANGES	1.104317	0.32664233
145	RESPONSE_TO_VIRUS	1.0967337	0.2962298
146	CYTOSKELETON_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.0963104	0.24018839
147	ATPASE_ACTIVITY_COUPLED_TO_TRANSMEMBRANE_MOVEMENT_OF_IONS PHOSPHORYLATIVE MECHANISM	1.0943019	0.34352517
148	DNA_DEPENDENT_ATPASE_ACTIVITY	1.0921808	0.33931777
149	MITOCHONDRIAL_MEMBRANE_PART	1.0894871	0.32478634
150	RRNA_METABOLIC_PROCESS	1.0883727	0.34954956
151	SMALL_NUCLEAR_RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX	1.0804185	0.35766423
152	REGULATION_OF_PROTEIN_STABILITY	1.0791008	0.3558394
153	REGULATION_OF_CATALYTIC_ACTIVITY	1.0729318	0.26898733
154	REGULATION_OF_DNA_METABOLIC_PROCESS	1.0671159	0.36301368
155	CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	1.0648742	0.31329113
156	GLUTAMATE_SIGNALING_PATHWAY	1.0616742	0.37692308
157	DETECTION_OF_STIMULUS_INVOLVED_IN_SENSORY_PERCEPTION	1.061046	0.3846154
158	NUCLEAR_PORE	1.0571152	0.37272727
159	CELL_CORTEX	1.0553741	0.38112524
160	CYTOSKELETON	1.0543563	0.30107528
161	CELL_CELL_SIGNALING	1.05331	0.3168168

162	REGULATION_OF_NEUROTRANSMITTER_LEVELS	1.0523666	0.4031142
163	ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	1.0463996	0.33284885
164	NEUROLOGICAL_SYSTEM_PROCESS	1.0443531	0.32855093
165	REGULATION_OF_ORGANELLE_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.0400267	0.38447973
166	INNATE_IMMUNE_RESPONSE	1.0387646	0.40252706
167	PROTEIN_TYROSINE_PHOSPHATASE_ACTIVITY	1.0358123	0.4
168	REGULATION_OF_MOLECULAR_FUNCTION	1.0353518	0.35459942
169	G_PROTEIN_SIGNALING_COUPLED_TO_CYCLIC_NUCLEOTIDE_SECOND_MESSENGER	1.0351298	0.40213522
170	NEURON_APOPTOSIS	1.0293956	0.4402174
171	RESPONSE_TO_OTHER_ORGANISM	1.0290928	0.40191388
172	MICROTUBULE_ORGANIZING_CENTER_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	1.0286648	0.42114696
173	REGULATION_OF_DNA_REPLICATION	1.0275509	0.44
174	SH2_DOMAIN_BINDING	1.0258685	0.41964287
175	PROTEIN_POLYMERIZATION	1.0257741	0.4
176	TRANSLATION_FACTOR_ACTIVITY_NUCLEIC_ACID_BINDING	1.0247525	0.40467626
177	MITOCHONDRIAL_MEMBRANE	1.0243412	0.40554592
178	CYCLIC_NUCLEOTIDE_MEDIATED_SIGNALING	1.0239823	0.40273038
179	DNA_INTEGRITY_CHECKPOINT	1.0233741	0.390625
180	DNA_DAMAGE_RESPONSESIGNAL_TRANSDUCTION	1.0203596	0.42449665
181	TRANSLATION_REGULATOR_ACTIVITY	1.0164931	0.43462896
182	DNA_METABOLIC_PROCESS	1.0124073	0.41489363
183	CELL_CORTEX_PART	1.0111942	0.43194193
184	GENERAL_RNA_POLYMERASE_II_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITY	1.0101432	0.42807627
185	RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX	1.0062984	0.4290375
186	HEMATOPOIETIN_INTERFERON_CLASSD200_DOMAIN_CYTOKINE_RECEPTOR_BINDING	1.0059673	0.48173913
187	LIPID_CATABOLIC_PROCESS	1.0055785	0.43915343
188	MULTI_ORGANISM_PROCESS	1.0032325	0.4301413
189	SUBSTRATE_SPECIFIC_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	1.0018922	0.4698276
190	SPECIFIC_RNA_POLYMERASE_II_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITY	0.99862784	0.46666667
191	SERINE_HYDROLASE_ACTIVITY	0.99814016	0.46350366
192	SERINE_TYPE_ENDOPEPTIDASE_ACTIVITY	0.99803054	0.47349823
193	ENVELOPE	0.9956555	0.45527157
194	ORGANELLE_ENVELOPE	0.99411494	0.44911146
195	TRANSLATION_INITIATION_FACTOR_ACTIVITY	0.99318373	0.46197718
196	AMINE_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.99225354	0.46422338
197	PROTEIN_AMINO_ACID_DEPHOSPHORYLATION	0.9916027	0.4694915
198	EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.9907727	0.4732297
199	NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	0.9906437	0.4768116
200	CELL_PROLIFERATION_GO_0008283	0.99062407	0.4674385
201	APOPTOTIC_PROGRAM	0.99009705	0.4729494
202	NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSCRIPTION	0.9888719	0.48939642
203	SEQUENCE_SPECIFIC_DNA_BINDING	0.9868531	0.456446
204	CALCIUM_ION_BINDING	0.98490924	0.47855917
205	HISTONE_MODIFICATION	0.9816727	0.4787234
206	MITOCHONDRIAL_ENVELOPE	0.9751016	0.5059423
207	CALCIUM_ION_TRANSPORT	0.97266424	0.5054348
208	SUBSTRATE_SPECIFIC_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.97062194	0.5298507
209	RESPONSE_TO_BIOTIC_STIMULUS	0.96930474	0.51428574
210	SERINE_TYPE_PEPTIDASE_ACTIVITY	0.9685551	0.4884956
211	ESTABLISHMENT_AND_OR_MAINTENANCE_OF_CHROMATIN_ARCHITECTURE	0.9680697	0.49659863
212	CATION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.9587958	0.5791139
213	REGULATION_OF_DEFENSE_RESPONSE	0.9584217	0.5008881
214	PROTEIN_SERINE_THREONINE_KINASE_ACTIVITY	0.95809156	0.5854766

215	S_ADENOSYLMETHIONINE_DEPENDENT_METHYLTRANSFERASE_ACTIVITY	0.95521617	0.51313484
216	TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.9457484	0.6388889
217	ORGANELLE_OUTER_MEMBRANE	0.9454783	0.5416667
218	DOUBLE_STRAND_BREAK_REPAIR	0.9449747	0.5137931
219	GENERATION_OF_NEURONS	0.9447553	0.57712305
220	TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITY	0.9428721	0.63543195
221	MRNA_BINDING	0.94034755	0.5326087
222	COVALENT_CHROMATIN_MODIFICATION	0.93660563	0.52743363
223	ONE_CARBON_COMPOUND_METABOLIC_PROCESS	0.93542266	0.5664845
224	MITOCHONDRIAL_PART	0.9339055	0.6048387
225	CASPASE_ACTIVATION	0.9312546	0.5435606
226	TRANSCRIPTION_INITIATION	0.92909306	0.58943784
227	RESPONSE_TO_BACTERIUM	0.9286979	0.5491228
228	NUCLEAR_ENVELOPE	0.9283098	0.5993031
229	GROWTH	0.9281815	0.6070796
230	MAGNESIUM_ION_BINDING	0.9274637	0.5849387
231	POSITIVE_REGULATION_OF_PROTEIN_MODIFICATION_PROCESS	0.92712486	0.58497316
232	CARBON_OXYGEN_LYASE_ACTIVITY	0.92402434	0.57651246
233	RESPONSE_TO_EXTRACELLULAR_STIMULUS	0.92223614	0.5935252
234	NITROGEN_COMPOUND_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.9200664	0.56732494
235	DEPHOSPHORYLATION	0.9183356	0.592721
236	OUTER_MEMBRANE	0.9179766	0.58147514
237	FEMALE_PREGNANCY	0.91334975	0.60431653
238	ORGANELLE_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.913132	0.76811594
239	NEGATIVE_REGULATION_OF_NUCLEOBASENUCLEOSIDENUCLEOTIDE_AND_NUCLEIC_ACID_METABOLIC_PROCESS	0.9130762	0.69242656
240	MITOCHONDRIAL_INNER_MEMBRANE	0.91203564	0.6234234
241	RNA_POLYMERASE_II_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITY	0.9108338	0.6842949
242	DNA_REPAIR	0.9107139	0.6677632
243	FEEDING_BEHAVIOR	0.9097105	0.6064982
244	CAMP_MEDIATED_SIGNALING	0.90508276	0.63286716
245	DETECTION_OF_CHEMICAL_STIMULUS	0.9035886	0.56742555
246	G_PROTEIN_SIGNALING_COUPLED_TO_CAMP_NUCLEOTIDE_SECOND_MESSENGER	0.9007296	0.6503378
247	SECRETORY_GRANULE	0.8992509	0.60733944
248	L_AMINO_ACID_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.89583856	0.5882353
249	REGULATION_OF_MAPKKK_CASCADE	0.8930023	0.6089386
250	FEMALE_GAMETE_GENERATION	0.89260703	0.6213768
251	METHYLTRANSFERASE_ACTIVITY	0.8900225	0.6177536
252	RESPONSE_TO_HORMONE_STIMULUS	0.8890186	0.66317624
253	NEUROGENESIS	0.8878312	0.68438536
254	RHODOPSIN_LIKE_RECEPTOR_ACTIVITY	0.8858623	0.7029703
255	DEFENSE_RESPONSE_TO_BACTERIUM	0.8830377	0.6357143
256	RESPONSE_TO_UV	0.8811357	0.6333938
257	NEGATIVE_REGULATION_OF_MULTICELLULAR_ORGANISMAL_PROCESS	0.8809913	0.63503647
258	ACTIVATION_OF_NF_KAPPA_B_TRANSCRIPTION_FACTOR	0.8806861	0.6401515
259	GUANYL_NUCLEOTIDE_BINDING	0.87823486	0.6770294
260	RESPONSE_TO_RADIATION	0.8775826	0.6950596
261	SOLUBLE_FRACTION	0.87701595	0.74721783
262	INORGANIC_ANION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.8757571	0.6685714
263	PROTEIN_DNA_COMPLEX_ASSEMBLY	0.8749099	0.68606704
264	SINGLE_STRANDED_DNA_BINDING	0.8736456	0.62
265	CELLULAR_LIPID_CATABOLIC_PROCESS	0.87171733	0.6554054
266	ACTIN_POLYMERIZATION_AND_OR_DEPOLYMERIZATION	0.8711077	0.676311
267	MRNA_PROCESSING_GO_0006397	0.8692058	0.7133106
268	POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_PROLIFERATION	0.8686426	0.7785235

269	MAPKKK_CASCADE_GO_0000165	0.86628056	0.74509805
270	DEVELOPMENTAL_MATURATION	0.8626311	0.6597744
271	REGULATION_OF_CELL_PROLIFERATION	0.86084056	0.8564743
272	PEPTIDE_RECEPTOR_ACTIVITY	0.86011213	0.70627064
273	REGULATION_OF_PEPTIDYL_TYROSINE_PHOSPHORYLATION	0.860068	0.666065
274	AMINO_ACID_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.8599159	0.68222624
275	REGULATION_OF_ENDOCYTOSIS	0.8594966	0.6443662
276	RIBOSOME	0.8590443	0.6849817
277	LIPID_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.8571723	0.67130435
278	MICROTUBULE_ORGANIZING_CENTER_PART	0.8524302	0.6761566
279	ANION_TRANSPORT	0.8484298	0.6802842
280	AMINE_TRANSPORT	0.84613276	0.72527474
281	VIRAL_GENOME_REPLICATION	0.8423582	0.672447
282	NEGATIVE_REGULATION_OF_METABOLIC_PROCESS	0.8411203	0.9069021
283	MITOCHONDRIAL_RESPIRATORY_CHAIN	0.8406891	0.70289856
284	CELLULAR_RESPONSE_TO_STIMULUS	0.8394385	0.7
285	SERINE_TYPE_ENDOPEPTIDASE_INHIBITOR_ACTIVITY	0.8356619	0.7076649
286	PROTEIN_DIMERIZATION_ACTIVITY	0.83409727	0.86277604
287	CHROMATIN	0.8328266	0.738574
288	ENDOPEPTIDASE_ACTIVITY	0.8321866	0.8103448
289	TRANSCRIPTION_FROM_RNA_POLYMERASE_II_PROMOTER	0.8288221	0.95633185
290	G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_PROTEIN_SIGNALING_PATHWAY	0.8273976	0.9486781
291	RNA_SPLICING_FACTOR_ACTIVITYTRANSESTERIFICATION_MECHANISM	0.82656634	0.72149533
292	ION_BINDING	0.8265328	0.91419655
293	NEGATIVE_REGULATION_OF_SIGNAL_TRANSDUCTION	0.8251356	0.7637655
294	RESPONSE_TO_NUTRIENT_LEVELS	0.82466274	0.73730296
295	REPLICATION_FORK	0.8242477	0.72007364
296	SYNAPSE_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.8241339	0.71711713
297	ENZYME_INHIBITOR_ACTIVITY	0.822332	0.8487805
298	PHOSPHATASE_REGULATOR_ACTIVITY	0.81998307	0.7274401
299	POSITIVE_REGULATION_OF_CASPASE_ACTIVITY	0.81644106	0.754159
300	INSULIN_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.8126766	0.7327273
301	NUCLEAR_LUMEN	0.8107898	0.9598214
302	T_CELL_ACTIVATION	0.80952245	0.76149917
303	NEGATIVE_REGULATION_OF_CELLULAR_METABOLIC_PROCESS	0.8079337	0.9584
304	AMINE_RECEPTOR_ACTIVITY	0.8075629	0.8071161
305	CYTOPLASMIC_VESICLE_MEMBRANE	0.8070164	0.77205884
306	RESPONSE_TO_OXIDATIVE_STRESS	0.80690783	0.7952623
307	DEVELOPMENT_OF_PRIMARY_SEXUAL_CHARACTERISTICS	0.80451685	0.7330827
308	FATTY_ACID_OXIDATION	0.8032746	0.7741935
309	TRANSFERASE_ACTIVITY_TRANSFERRING_ONE_CARBON_GROUPS	0.803009	0.78496504
310	DNA_REPLICATION	0.8025689	0.85109985
311	REGULATION_OF_HEART_CONTRACTION	0.8017476	0.7358834
312	GTP_BINDING	0.797942	0.7978533
313	NEGATIVE_REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FROM_RNA_POLYMERASE_II_PROMOTER	0.7966839	0.8531952
314	INORGANIC_CATION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.79288876	0.83931625
315	ENDOSOME_TRANSPORT	0.79193044	0.7818182
316	RESPONSE_TO ABIOTIC_STIMULUS	0.7899344	0.87842464
317	RIBONUCLEASE_ACTIVITY	0.7851284	0.7661597
318	ORGANIC_ACID_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.7816551	0.84734136
319	CATION_BINDING	0.7812173	0.95253164
320	CYTOPLASMIC_VESICLE_PART	0.78037083	0.80104715
321	TRANSCRIPTION_FROM_RNA_POLYMERASE_III_PROMOTER	0.77945405	0.76360226
322	NEURON_DIFFERENTIATION	0.7716426	0.89018303
323	NUCLEOTIDE_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.7685099	0.76739925

324	INTERMEDIATE_FILAMENT	0.7665479	0.8231173
325	INTERMEDIATE_FILAMENT_CYTOSKELETON	0.76650685	0.80550456
326	TRANSCRIPTION_COFACTOR_ACTIVITY	0.76650524	0.9784768
327	CARBOHYDRATE_CATABOLIC_PROCESS	0.765548	0.81714284
328	REGULATION_OF_BINDING	0.76526517	0.86964285
329	ZINC_ION_BINDING	0.75914276	0.9089347
330	DIVALENT_INORGANIC_CATION_TRANSPORT	0.7590373	0.8293578
331	ANATOMICAL_STRUCTURE_MORPHOGENESIS	0.75792086	0.9985163
332	NUCLEAR_CHROMOSOME_PART	0.7572919	0.8233276
333	PROTEIN_HOMODIMERIZATION_ACTIVITY	0.7566807	0.9532872
334	UBIQUITIN_LIGASE_COMPLEX	0.75140285	0.84424776
335	REGULATION_OF_GENE_EXPRESSION_EPIGENETIC	0.7483153	0.8534483
336	TRANSCRIPTION_FACTOR_COMPLEX	0.7477206	0.92845255
337	POSITIVE_REGULATION_OF_TRANSFERASE_ACTIVITY	0.7475069	0.92906576
338	VESICLE_MEMBRANE	0.74593806	0.8436945
339	PROTEASOME_COMPLEX	0.74472195	0.8614232
340	PORE_COMPLEX	0.7443969	0.8442907
341	REGULATION_OF_CELL_DIFFERENTIATION	0.7411164	0.9083192
342	REGULATION_OF_T_CELL_ACTIVATION	0.74026525	0.8389982
343	EXTRACELLULAR_LIGAND_GATED_ION_CHANNEL_ACTIVITY	0.7386321	0.83396226
344	LIGAND_GATED_CHANNEL_ACTIVITY	0.7358256	0.88164663
345	EXCITATORY_EXTRACELLULAR_LIGAND_GATED_ION_CHANNEL_ACTIVITY	0.7353944	0.8379374
346	MONOVALENT_INORGANIC_CATION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.73517835	0.86339754
347	NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_PROLIFERATION	0.73484653	0.9773096
348	NEURON_DEVELOPMENT	0.73216915	0.920742
349	NUCLEOPLASM_PART	0.731872	0.984127
350	VITAMIN_METABOLIC_PROCESS	0.7310676	0.8457249
351	ORGANELLE_LUMEN	0.7283373	1.0
352	CELLULAR_PROTEIN_CATABOLIC_PROCESS	0.7276073	0.9125
353	CENTROSOME_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.72723746	0.81835204
354	REGULATION_OF_CELLULAR_COMPONENT_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.7265262	0.9655172
355	PEPTIDE_BINDING	0.7260504	0.9483333
356	ORGANIC_ACID_TRANSPORT	0.7259578	0.899654
357	MEMBRANE_ENCLOSED_LUMEN	0.72017473	0.9984871
358	MITOCHONDRION	0.71912426	0.99848026
359	ACETYLGUCOSAMINYLTRANSFERASE_ACTIVITY	0.7178676	0.8439202
360	PROTEIN_CATABOLIC_PROCESS	0.7150982	0.95262265
361	REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FROM_RNA_POLYMERASE_II_PROMOTER	0.71505356	0.9968944
362	DNA_DEPENDENT_DNA_REPLICATION	0.7149846	0.9240283
363	RNA_SPLICING	0.7096354	0.9555921
364	DNA_HELICASE_ACTIVITY	0.7031149	0.89748204
365	AMINE_BINDING	0.70027745	0.870438
366	REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITY	0.6994159	0.9283276
367	JAK_STAT_CASCADE	0.6990186	0.9052823
368	MRNA_METABOLIC_PROCESS	0.6972518	0.9711375
369	NEGATIVE_REGULATION_OF_BINDING	0.6962592	0.8802947
370	ENZYME_BINDING	0.69186896	0.9967213
371	HYDROGEN_ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.6907852	0.9209139
372	NEGATIVE_REGULATION_OF_DNA_BINDING	0.6903724	0.88425046
373	PROTEIN_N_TERMINUS_BINDING	0.68879354	0.9205527
374	MACROMOLECULE_CATABOLIC_PROCESS	0.68845034	0.9902439
375	REGULATION_OF_HYDROLASE_ACTIVITY	0.68805	0.9784411
376	LYMPHOCYTE_DIFFERENTIATION	0.68707323	0.8951175
377	COFACTOR_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.6869304	0.8901515

378	LEUKOCYTE_DIFFERENTIATION	0.68553466	0.9134438
379	NUCLEAR_MEMBRANE	0.6835858	0.9519573
380	CELL_PROJECTION_BIOGENESIS	0.6813818	0.9015544
381	ORGANELLE_INNER_MEMBRANE	0.68137145	0.96213424
382	TRANSCRIPTION_FACTOR_BINDING	0.68029225	1.0
383	RNA_HELICASE_ACTIVITY	0.67342424	0.9220779
384	RESPONSE_TO_NUTRIENT	0.6729798	0.90316576
385	ATP_DEPENDENT_HELICASE_ACTIVITY	0.6720333	0.92335117
386	RNA_BINDING	0.6717089	1.0
387	UNFOLDED_PROTEIN_BINDING	0.6715283	0.94755876
388	EMBRYONIC_MORPHOGENESIS	0.66737306	0.87607574
389	DNA_CATABOLIC_PROCESS	0.66698825	0.93333334
390	NEURON_PROJECTION	0.66585726	0.9066901
391	CELLULAR_PROTEIN_COMPLEX_ASSEMBLY	0.6633398	0.93442625
392	TRANSLATIONAL_INITIATION	0.6598435	0.93772244
393	PIGMENT_METABOLIC_PROCESS	0.6568091	0.92022264
394	NUCLEOPLASM	0.6538355	1.0
395	ATP_DEPENDENT_RNA_HELICASE_ACTIVITY	0.6504383	0.9038113
396	POSITIVE_REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITY	0.65007275	0.9288256
397	PIGMENT_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.6493118	0.9118166
398	CELLULAR_CATABOLIC_PROCESS	0.6486423	0.998374
399	POSITIVE_REGULATION_OF_DNA_BINDING	0.6475408	0.9369369
400	MEDIATOR_COMPLEX	0.64616436	0.92720306
401	CARBOXYLIC_ACID_TRANSPORT	0.6454284	0.9600694
402	POSITIVE_REGULATION_OF_BINDING	0.6435744	0.94507575
403	MITOCHONDRIAL_LUMEN	0.64108515	0.9664903
404	CATABOLIC_PROCESS	0.64034	0.9970238
405	MITOCHONDRIAL_MATRIX	0.6393729	0.9842932
406	CORTICAL_CYTOSKELETON	0.6358374	0.9183303
407	HEPARIN_BINDING	0.634205	0.93260473
408	CELLULAR_MACROMOLECULE_CATABOLIC_PROCESS	0.627109	0.9983416
409	REGULATION_OF_ACTION_POTENTIAL	0.62320256	0.9194991
410	AMINE_CATABOLIC_PROCESS	0.618577	0.95621717
411	SYNAPTOGENESIS	0.61218333	0.9564394
412	NEURITE_DEVELOPMENT	0.6094476	0.98738736
413	NUCLEAR_MEMBRANE_PART	0.596704	0.9891501
414	BIOPOLYMER_CATABOLIC_PROCESS	0.5906659	1.0
415	RNA_PROCESSING	0.5801798	1.0
416	POSITIVE_REGULATION_OF_HYDROLASE_ACTIVITY	0.57334805	0.9894921
417	OXIDOREDUCTASE_ACTIVITY_ACTING_ON_THE_ALDEHYDE_OR_OXO_GROUP_OF_DONORSNAD OR NADP AS ACCEPTOR	0.55969673	0.9729242
418	MITOCHONDRIAL_TRANSPORT	0.5580706	0.978022
419	SH3_DOMAIN_BINDING	0.55456716	0.9794521
420	RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX_BIOGENESIS_AND_ASSEMBLY	0.5528789	0.99828476
421	ACETYLCHOLINE_BINDING	0.5460609	0.96520144
422	PHOSPHOLIPID_METABOLIC_PROCESS	0.5431337	1.0
423	VIRAL_INFECTIONOUS_CYCLE	0.5400798	0.98892987
424	STRESS_ACTIVATED_PROTEIN_KINASE_SIGNALING_PATHWAY	0.5316616	0.99831367
425	STRUCTURE_SPECIFIC_DNA_BINDING	0.5110593	1.0
426	JNK_CASCADE	0.5047698	1.0
427	VIRAL_REPRODUCTIVE_PROCESS	0.4987627	0.9982487
428	THYROID_HORMONE_RECEPTOR_BINDING	0.48828056	0.9895833
429	NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	0.48586637	0.99469966
430	PHOSPHOTRANSFERASE_ACTIVITY_PHOSPHATE_GROUP_AS_ACCEPTOR	0.48057103	0.99819493
431	RNA_CATABOLIC_PROCESS	0.4803351	0.99276674
432	PHOSPHOLIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.46384558	0.99646646

433	VIRAL_REPRODUCTION	0.4572334	0.9982729
434	NUCLEOTIDE_METABOLIC_PROCESS	0.45659125	0.99808794
435	NUCLEOBASENUCLEOSIDENUCLEOTIDE_AND_NUCLEIC_ACID_TRANSPORT	0.44226676	0.99820787
436	NEGATIVE_REGULATION_OF_DNA_METABOLIC_PROCESS	0.41326904	0.9981818
437	MEMBRANE_LIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.39267328	1.0
438	RNA_EXPORT_FROM_NUCLEUS	0.392661	0.9982759

Table S2. List of deregulated genes involved in the regulation of the M phase of the mitotic cell cycle, obtained from GSEA analysis. Related to Figure 4

Rank	NAME	RANK IN GENE LIST	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
1	CDC25C	71	0.033757195	Yes
2	CDCA5	76	0.06939466	Yes
3	KIF2C	94	0.103416175	Yes
4	BUB1	99	0.13732861	Yes
5	PLK1	113	0.16995014	Yes
6	NUSAP1	153	0.19948739	Yes
7	ANLN	187	0.2278565	Yes
8	BUB1B	247	0.25304484	Yes
9	NCAPH	285	0.2781667	Yes
10	MAD2L1	288	0.30462503	Yes
11	KIF11	321	0.32922682	Yes
12	TPX2	330	0.3545063	Yes
13	AURKA	359	0.37836662	Yes
14	BIRC5	427	0.39930987	Yes
15	KNTC1	429	0.4228975	Yes
16	NEK2	438	0.44604257	Yes
17	TTK	468	0.467775	Yes
18	CCNA2	587	0.4845594	Yes
19	UBE2C	690	0.50092983	Yes
20	CENPE	753	0.5182198	Yes
21	PKMYT1	845	0.5336182	Yes
22	NDC80	1104	0.54034096	Yes
23	KIF22	1134	0.5560977	Yes
24	SMC4	1253	0.5676597	Yes
25	EREG	1423	0.57647854	Yes
26	MPHOSPH9	1481	0.5896252	Yes
27	NPM2	1845	0.5890405	Yes
28	KIF15	2287	0.58391666	Yes
29	DLGAP5	2454	0.58935916	Yes
30	ESPL1	2666	0.5925027	Yes
31	RAN	2996	0.5901862	Yes
32	PIN1	3163	0.5940695	Yes
33	ANAPC11	3592	0.58660764	Yes
34	ANAPC10	3655	0.5937182	Yes
35	NOLC1	3807	0.5970001	Yes
36	GML	4139	0.5925404	No
37	CDKN2B	4929	0.56845653	No
38	ZWINT	5038	0.5715832	No
39	TARDBP	5323	0.5672429	No
40	DDX11	5798	0.55466694	No
41	CDC27	5938	0.5553936	No
42	ANAPC5	5963	0.5607175	No
43	EGF	5985	0.5661293	No
44	PPP5C	7091	0.5267943	No
45	CIT	7817	0.5019963	No
46	PRMT5	7914	0.5023829	No
47	NBN	9038	0.46054736	No
48	ZW10	9388	0.44954202	No

49	SUGT1	9620	0.44308785	No
50	CETN1	10384	0.41464028	No
51	SSSCA1	10595	0.40826958	No
52	RCC1	10716	0.40542468	No
53	CDC23	10904	0.39974058	No
54	TGFB1	11399	0.38136467	No
55	CDC25B	11413	0.3823097	No
56	BRSK1	11915	0.36325115	No
57	CDK13	12016	0.36023045	No
58	RAD17	12320	0.34882653	No
59	CDC16	13624	0.29670653	No
60	ANAPC4	14056	0.27995625	No
61	DCTN3	14182	0.275595	No
62	MPHOSPH6	14688	0.25636137	No
63	DCTN2	14888	0.24959369	No
64	RINT1	15541	0.22516316	No
65	AKAP8	15849	0.21484612	No
66	PBRM1	16086	0.20757894	No
67	CHFR	16723	0.18482547	No
68	CLIP1	16824	0.18369544	No
69	SMC1A	16922	0.18276602	No
70	NUMA1	17229	0.173715	No
71	PAM	17781	0.15530902	No
72	TRIAP1	18205	0.14246412	No
73	EPGN	19783	0.085039705	No
74	PDS5B	19824	0.089427695	No
75	CHMP1A	19843	0.09472123	No
76	SMC3	20847	0.06186607	No
77	TGFA	21125	0.058680125	No
78	NEK6	21790	0.041119814	No
79	MAD2L2	22490	0.023902932	No
80	PML	22605	0.03050806	No
81	PCBP4	22958	0.028724547	No
82	CD28	23902	0.007339075	No
83	ATM	23949	0.02227244	No
84	TTN	24187	0.03138447	No

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of total RNA and quantitative PCR analysis

Total RNA from mouse liver tissue was extracted using Trizol (Invitrogen), and 2 µg were used as a template for cDNA synthesis (MMLV, Life Technologies). Quantitative PCR (q-PCR) was performed using a SYBR Luminaris Color HiGreen qPCR master mix (Thermo Scientific) and specific primers. The reactions were performed in 96-well plates in a LightCycler 480 instrument (Roche) with 40 cycles. We determined the relative amounts of the mRNAs studied by means of the second-derivative maximum method, with LightCycler 480 analysis software and 18S RNA as the invariant control for all studies.

Aurka F	AGC-GTT-TGC-CAA-CTC-AGT-G
Aurka R	TCT-AGA-ATA-TGC-GCC-CCT-TG
Aurkb F	TGA-GAT-TGG-GCG-TCC-TTT-G
Aurkb R	CCC-GAG-CCA-AGT-ACA-CGT-TT
CcnA2 F	GCC-TTC-ACC-ATT-CAT-GTG-GAT
CcnA2 R	TTG-CTC-CGG-GTA-AAG-AGA-CAG
CcnB1 F	AAG-GTG-CCT-GTG-TGT-GAA-CC
CcnB1 R	GTC-AGC-CCC-ATC-ATC-TGC-G
Pgc-1aF	ATA-CCG-CAA-AGA-GCA-CGA-GAA-G
Pgc-1aR	CTC-AAG-AGC-AGC-GAA-AGC-GTC-ACA-G
G6PaseF	ACT-GTG-GGC-ATC-AAT-CTC-CTC
G6PaseR	CGG-GAC-AGA-CAG-ACG-TTC-AGC
Srebp1 F	AAC-GTC-ACT-TCC-AGC-TAG-AC
Srebp1 R	CCA-CTA-AGG-TGC-CTA-CAG-AGC
Acc1 F	GGG-ACT-TCA-TGA-ATT-TGC-TGA-TTC-TCA-GTT
Acc1 R	GTC-ATT-ACC-ATC-TTC-ATT-ACC-TCA-ATC-T
Egfr F	ATG-TCC-TCA-TTG-CCC-TCA-AC
Egfr R	GCA-TGG-GCA-GTT-CCC-TAA-G
Met F	GAC-CTC-AGT-GCT-CTA-AAT-CCA-G
Met R	TCC-AGC-AAA-GTC-CCA-TGA-TAG
Bub1 F	CAA-AAG-CAT-TTG-CTT-CTT-TCC
Bub1 R	TGA-AGA-ACT-GAG-AGC-CCA-GAA
Cenpa F	AGT-TCT-GGC-GGT-CCT-GAC-G
Cenpa R	CCG-CCT-TCC-CTA-AGC-CTT-CT
Cenpb F	GGA-GTC-ACC-ACC-CAG-GCT-CT
Cenpb R	GCA-GAA-GGA-CCC-GAC-GAG-AT
Cenpe F	TCA-TAC-ACA-TCG-GAC-GCC-ACT-GAA
Cenpe R	ACT-CTT-TCT-TAG-CGT-CAA-GGG-CCA
Gsk3 beta F	TCC-ATT-CCT-TTG-GAA-TCT-GC
Gsk3 beta R	CAA-TTC-AGC-CAA-CAC-ACA-CAG-C
Mad211 F	TTT-GAG-ATG-ACC-ACC-AG
Mad211 R	ACT-GAC-CCC-GAG-CTC-ATA-AA
Plk1 F	CCC-CAC-CAG-AAG-GAG-AAG-ATG
Plk1 R	AAA-TAC-AAA-TAC-AAA-GTC-GCT-GTC-C

Preparation of total protein extracts and immunoblotting

Total proteins were extracted from snap-frozen livers as described previously (Celton-Morizur et al., 2009). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay (Bio-Rad Protein Assay). Proteins (50 µg) were resolved by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes (0.45-µm pore size), which were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Primary antibodies used for western blotting were the following anti-Akt (1:2000, Cell Signaling Technology, 9272), anti-phospho Akt (Ser 473) (1:4000, Cell Signaling Technology, 9271), anti-AMPKα (1:2000, Cell Signaling Technology, 2532), anti-phospho

AMPK α (Thr 172) (1:2000, Cell Signaling Technology, 2535), anti-Cyclin B1 (1:1000, Cell Signaling Technology, 4138), anti-EGFR (1:2000, Cell Signaling Technology, 2532), anti-phospho EGFR (Tyr 1068) (1:1000, Cell Signaling Technology, 2234), anti-phospho EGFR (Tyr 1173) (1:1000, Thermo Fisher, MA5-15158), anti-ERK (1:4000, Cell Signaling Technology, 9102), anti-phospho ERK (Thr 202-Tyr 204) (1:4000, Cell Signaling Technology, 9101), anti-GSK3 β (1:1000, Cell Signaling Technology, 9315), anti-phospho GSK3 β (Ser 9) (1:1000, Cell Signaling Technology, 9336), anti-LKB1 (1:2000, Cell Signaling Technology, 3047), anti-STAT3 (1:1000, Cell Signaling Technology, 9132), anti phospho STAT3 (Tyr 705) (1:1000, Cell Signaling Technology, 9145); anti-YAP (1:4000, Cell Signaling Technology, 4912), anti-Met (1:500 dilution, Thermo Fisher, MA5-15198), anti Phospho Met (Tyr1349) (1:500 dilution, Thermo Fisher, MA5-15082), anti-Cyclin A2 (1:1000, abcam, ad32386), anti and anti- γ -Tubulin (1:10000, Sigma Aldrich, GTU88). The protein-bound primary antibodies were detected with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher). Immunoreactive bands were revealed using the "Clarity Western ECL Substrate" purchased from Bio-Rad. Blots were exposed to Amersham Hyperfilm (GE Healthcare). In all immunoblotting, γ -tubulin was used to normalize the results.

Microarray and gene expression analysis

Total RNA from mouse liver tissue (n=4 per group), 48 hours after hepatectomy, was extracted using Trizol protocol (Invitrogen). All RNA processing steps, microarrays and statistical analysis were carried out by the Genom'IC facility (Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France). RNA quality was checked with a Bioanalyzer 2100 (with the Agilent RNA6000 pico chip kit). Reverse transcription were carried out on 400 pg of total RNA, following the Ovation Pico WTA System V2 (Nugen). Sens Target DNA (5 μ g) are then hybridized to GeneChip® MTA1.0 (Affymetrix), washed and finally scanned using the GCS3000 7G. The scanned images are then analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (CEL Intensity files) and metrics for Quality Controls. A two-way analysis of variance (ANOVA) was applied for each gene to identify genes differentially expressed between both groups (CTR / Lkb1^{Δhep}). Then, p-values and fold changes were used to filter and select differentially expressed genes.

Gene set enrichment analysis (GSEA) were performed on control and Lkb1^{Δhep} mice tissues with BioCarta and KEGG gene sets (www.broad.mit.edu/gsea). To characterize significantly enriched or depleted groups of genes, this statistical study tests the relative position of a collection of genes (GeneSet) within an independent, ranked data set (GeneList). Using a statistical analysis, the nominal p value and false discovery rate (q value) were defined, based on 1,000 random permutations between the different GeneSets studied. According to the software developers, results were significant for p value < 0.05 and q value < 0.25 (false discovery rate below 25%). Microarray data were referenced with the GSE number (GSE100605) on Gene Expression Omnibus NCBI site.

Array CGH

Genomic DNA from liver samples (n=4) was isolated using PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Array CGH was performed by HELIXIO using the Agilent SurePrint G3 Mouse CGH Microarray 4x180K (AMADID 027411). Labelling, Hybridization, washing, scanning and data extraction was conducted according to the manufacturer's protocol. Briefly, 1 μ g of genomic DNA samples were digested, with two restriction enzymes AluI and RsaI. The labeling was assessed using SureTag Complete DNA Labeling Kit (Agilent Technologies), with incorporation in DNA samples of dUTP coupled to cyanine 5 (Cy5) or cyanine 3 (Cy3). Data were extracted after hybridisation, washing and scanning of slides using Feature Extraction 11.5.1.1 software (Agilent Technologies) and the log ratio [$\log(\text{cy5 processed signal} / \text{cy3 processed signal})$] was measured. Following data extraction, raw results were analyzed with Agilent Genomic Workbench Lite Edition 6.5 (Agilent Technologies) to detect and identify chromosomal aberrations (aneuploidy and genomic copy number variations). Finally, Aberration Detection Method 2 (ADM2) statistical algorithm makes it possible to identify regions for which the average of the absolute value of the log ratio is higher than the specified threshold. To minimize the detection of nonrelevant variants, data analyses were performed using threshold 6.0. ADM2 results were then filtered with the following parameters: Minimum number of oligonucleotides varying by region: 3; Absolute value of the log ratio: ≥ 0.25 .

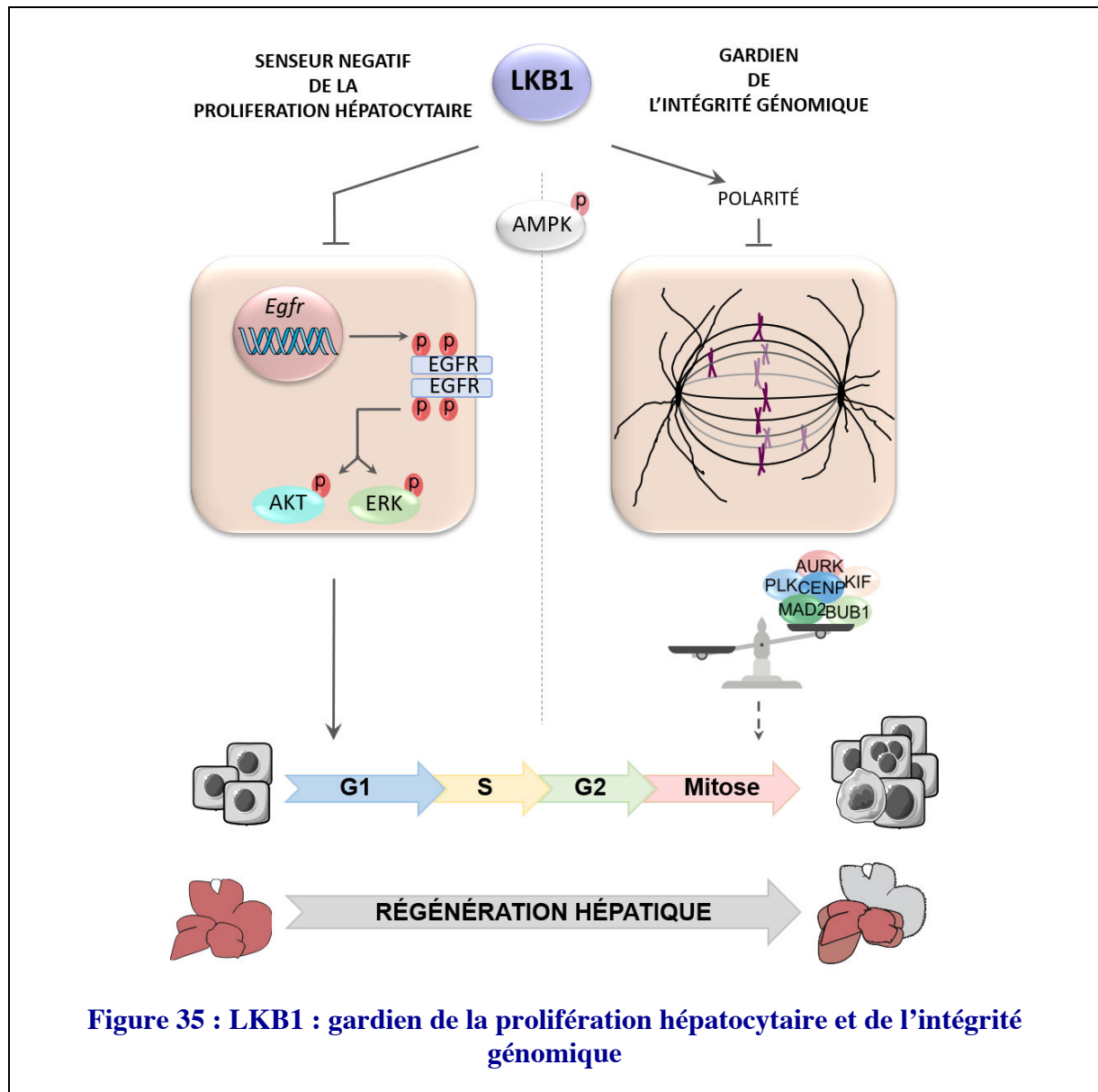
SUPPLEMENTAL REFERENCES

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

DISCUSSION

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer que la master kinase LKB1 est un acteur essentiel de la régénération hépatique régulant notamment la prolifération hépatique et l'intégrité génomique (**Figure 35**). Cette kinase est tout d'abord essentielle à la sortie de quiescence des hépatocytes, en contrôlant la signalisation EGFR. Nos résultats soulignent également que LKB1 contrôle la polarité de la division cellulaire et est de ce fait un gardien de la ploïdie cellulaire. Au cours de cette discussion, j'aborderai trois points majeurs :

- (1) Comment LKB1 régule la voie EGFR, des mécanismes directs ou indirects sont-ils en jeu?
- (2) Quelles voies de signalisation contrôlées par LKB1 régulent la division cellulaire ?
- (3) Existe-t'il des altérations d'expression de Lkb1 au cours de la carcinogenèse hépatique en lien avec l'instabilité chromosomique ?

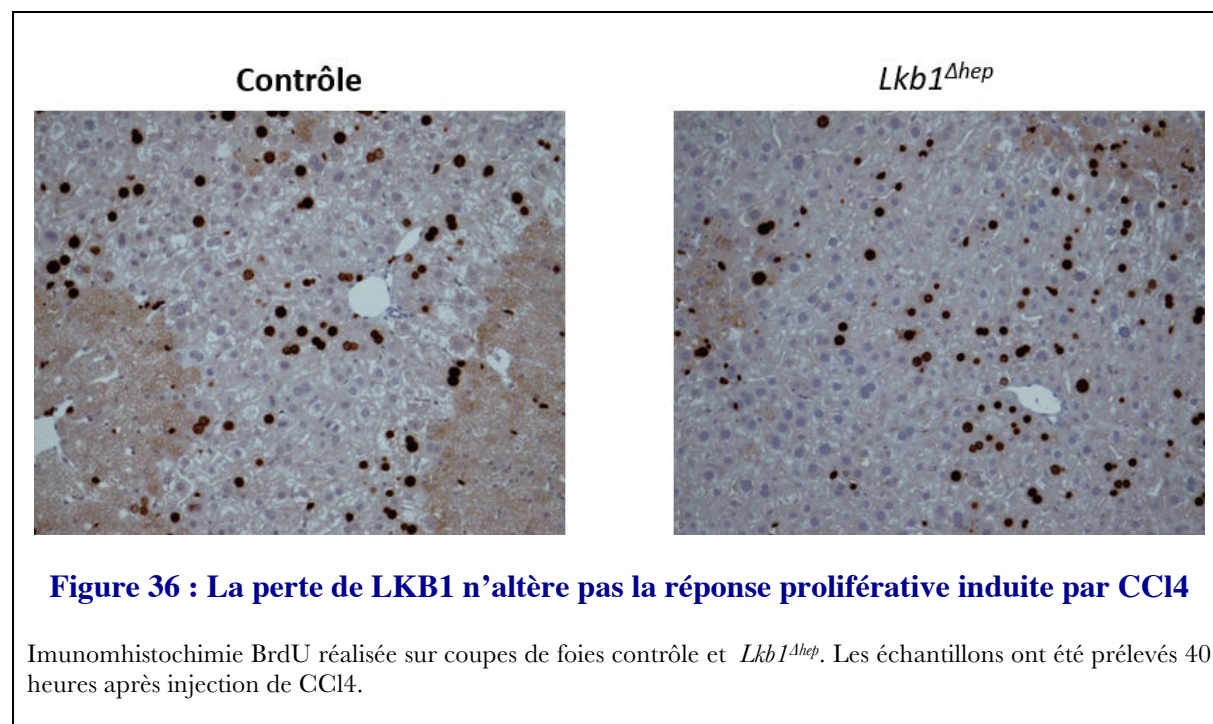


1. LKB1 : régulateur de la prolifération hépatocytaire

Notre étude a clairement établi que la délétion de *Lkb1*, spécifiquement dans les hépatocytes, induit une augmentation drastique de la réponse proliférative hépatocytaire, au cours de la régénération hépatique. En absence de LKB1, la réplication de l'ADN est effectivement observée 10 heures avant les hépatocytes contrôles, suggérant une réduction considérable de la phase G1. Nos résultats ont mis en exergue l'implication de la signalisation EGFR dans ce phénotype. Dans notre modèle, les foies *Lkb1^{Δhep}* perdent leur statut quiescent, en raison de l'activation de l'EGFR, et présentent un état que nous appelons « pré-primés ». Cet état sensibilise les foies *Lkb1^{Δhep}* à des stimuli pro-prolifératifs et ainsi leur permet de répondre plus rapidement aux signaux induits par l'hépatectomie. Ces résultats ont été confirmés lors d'expériences de sauvetage phénotypique. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'EGFR, dans les souris déficientes pour *Lkb1*, est suffisante pour restaurer un état de quiescence. Ces travaux nous ont permis de démontrer que LKB1 est un acteur clé de la sortie de quiescence des hépatocytes, lors du processus de régénération hépatique, suite à une HP.

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, chez l'Homme, la régénération hépatique est induite en réponse à différents types de lésions tissulaires. Les dommages, causés par des stress divers, tels que l'alcool, les virus, les toxines, l'ischémie, les hépatites auto-immunes ou la transplantation hépatique, provoquent l'installation de cycles de lyse/régénération. Il est donc judicieux de s'interroger sur le rôle de LKB1 dans la sortie de quiescence des hépatocytes, induite suite à ces différents dommages. Fait intéressant, le rôle de l'EGFR, dans la réponse régénérative, n'est pas toujours pro-prolifératif et semble largement dépendre du type de lésions infligées au tissu hépatique (Komposch and Sibilis, 2015). Ainsi, dans un processus de lyse/régénération induit par CCl₄, l'EGFR ne participe pas à la réponse proliférative hépatocytaire. Scheving et ses collaborateurs ont effectivement démontré, dans un modèle murin, que l'inhibition de l'EGFR, spécifiquement dans les hépatocytes, ne contrarie pas la régénération hépatique induite par CCl₄ (Scheving et al., 2015). D'autre part, les dommages causés sont également identiques à ceux observés dans les souris contrôles, suite au CCl₄ (Scheving et al., 2015). Notre étude ayant mis en évidence un lien entre LKB1 et EGFR, nous avons donc initié des expériences préliminaires de CCl₄, sur des souris contrôles et *Lkb1^{Δhep}*. En corrélation avec l'étude de Scheving, la perte de LKB1 ne contrarie pas la réponse proliférative, suite à des cycles de lyse/régénération induits par le CCl₄. En effet, nous

n'avons pas noté de différence d'incorporation du BrdU (Bromodésoxyuridine), marqueur de la phase S, entre les hépatocytes contrôles et *Lkb1^{Δhep}* (**Figure 36**).



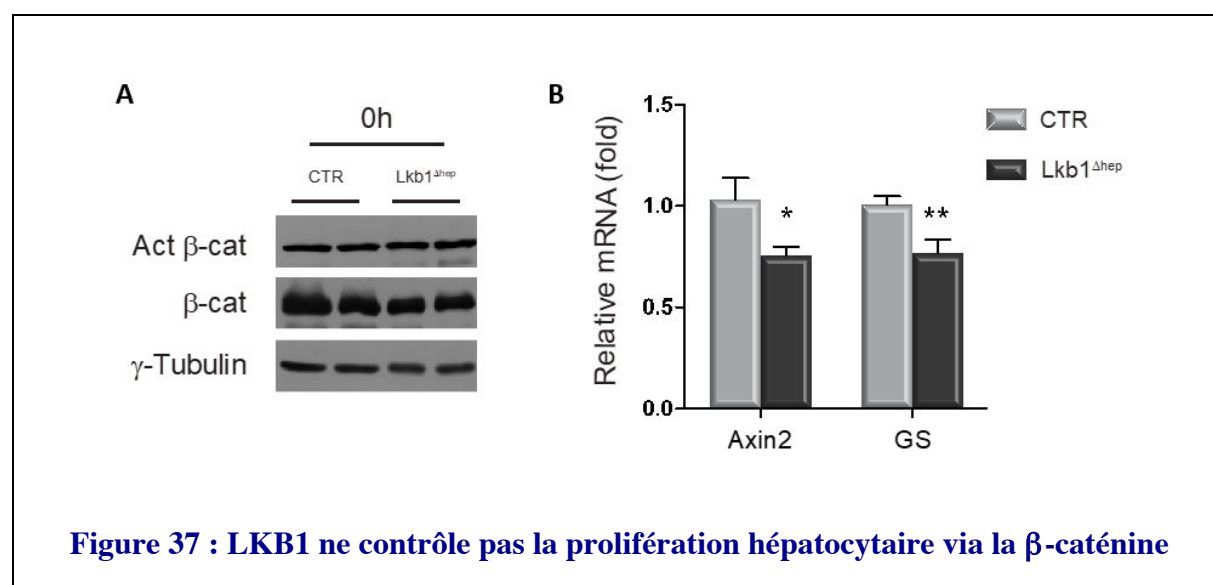
Cependant, nous n'avons pas encore examiné si la perte de LKB1 impacte sur les dommages tissulaires et par la suite il sera donc important de compléter notre analyse. Finalement, ces résultats, bien que préliminaires, ont permis de renforcer le lien entre LKB1/EGFR et ont également établi que leur rôle dans le contrôle de la prolifération est largement dépendant du stimulus infligé au tissu.

La découverte du lien étroit entre LKB1 et EGFR, dans la régénération hépatique (HP), a soulevée différentes questions, auxquelles il serait intéressant de répondre dans la continuité de cette étude. Quelles interactions existent entre la master kinase et le récepteur ? Sont-elles directes ou indirectes ? Outre une signalisation intrinsèque, est ce que des signaux extrinsèques pourraient participer à cette réponse pro-proliférative, médiée par l'EGFR ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons recherché des facteurs pro-prolifératifs, connus dans les mécanismes de régénération, pouvant réguler l'expression de l'EGFR. Deux acteurs sont rapidement apparus comme des candidats potentiels : β -caténine et YAP.

La β -caténine est un facteur clé du processus de régénération hépatique et intervient notamment dans les étapes précoces de la régénération (Monga et al., 2001; Torre et al., 2011). Son lien avec l'EGFR a été largement décrit dans la littérature dans différents tissus (Hu and Li, 2010; Paul et al., 2013; Tan et al., 2005). Dans le tissu hépatique, l'existence de cette interaction a également été renforcée par la découverte d'un site de liaison à TCF (T-cell

factor family protein) dans le promoteur de l'EGFR (Tan et al., 2005). D'autre part, dans un modèle d'extinction de β -caténine, spécifiquement dans les hépatocytes, il a notamment été montré que la réduction de l'expression de l'EGFR contrecarre la régénération hépatique (Tan et al., 2006). Fait intéressant, une étude récente a montré que LKB1 inhibe la prolifération de cellules cancéreuses gastriques en réprimant la translocation nucléaire de β -caténine et Yap (Ma et al., 2016). La β -caténine semblait donc être un candidat prometteur. Toutefois, nos récents résultats nous laissent penser que LKB1 ne semble pas contrôler la prolifération hépatocytaire, via la β -caténine. Au cours de la régénération, nous n'avons pas mis en évidence de différences dans l'expression de la forme active de β -caténine, entre les animaux contrôles et *Lkb1^{Δhep}* (Figure 37A). De plus, l'analyse des messagers de différentes cibles de β -caténine dans le foie, comme la Glutamine Synthétase (GS) ou l'Axine 2, n'a pas non plus révélé de différence (Figure 37B).



Finalement, la fonction d'activateur transcriptionnel de la β -caténine a également été investiguée *in vitro* par une étude préliminaire TOP/FOP Flash Assay (Plasmide TCF-rapporteur), sur des cultures primaires d'hépatocytes contrôles et *Lkb1^{Δhep}*. Au cours de cette expérience, aucune différence de l'activité luciférase n'a été révélée entre les deux groupes d'animaux, soutenant l'idée d'une fonction de LKB1, indépendante de la β -caténine.

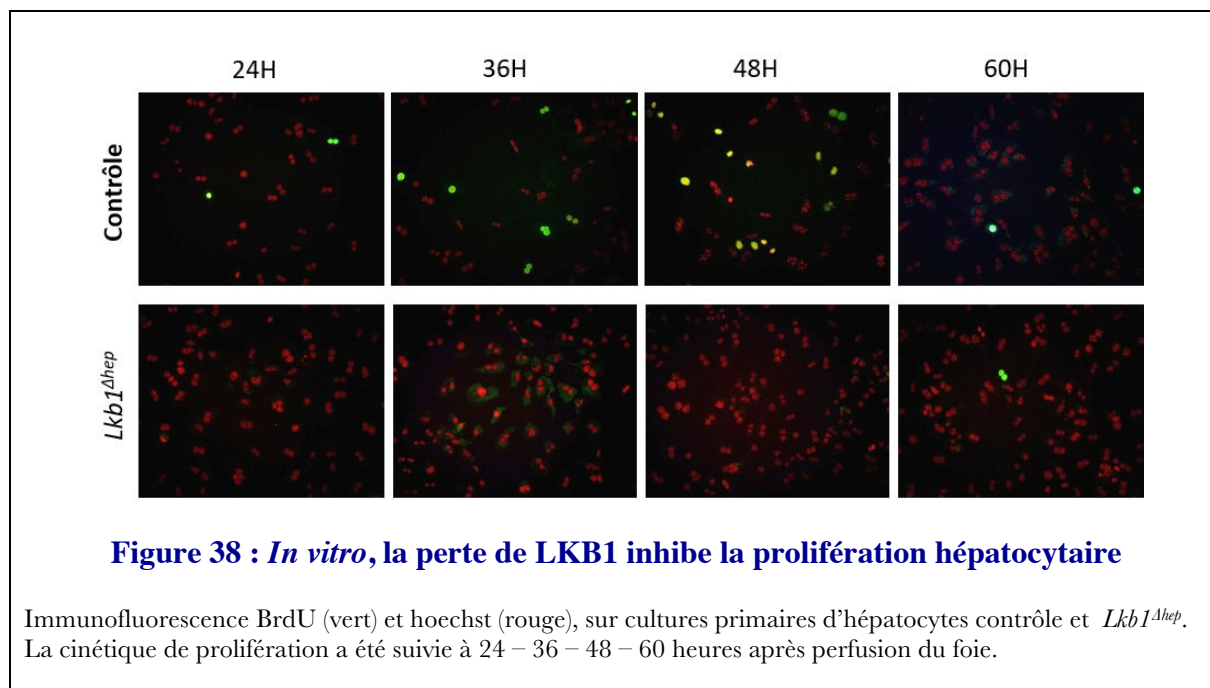
Concernant YAP, différents travaux ont démontré son importance au cours du processus de régénération (Liu et al., 2010a; Liu et al., 2009; Michalopoulos, 2017; Yimlamai et al., 2014). Dans les cellules de mammifères, la voie de signalisation Hippo permet de contrôler l'entrée de YAP dans le noyau. L'activation des kinases LATS (Large Tumor Suppressor Kinase) induit la phosphorylation de Yap, conduisant soit à sa dégradation, soit à sa séquestration

cytoplasmique par le facteur 14-3-3. Dans le noyau, Yap fonctionne comme un facteur de transcription, en activant différentes signalisations impliquées notamment dans la prolifération et la croissance cellulaire. Au cours de ma thèse, une étude, publiée par le groupe de Fernando Camargo, révélait un lien entre LKB1 et YAP dans la prolifération hépatocytaire. En effet, dans un système murin d'extinction de LKB1, spécifiquement dans le foie, les auteurs démontraient une augmentation de la prolifération hépatocytaire à l'état basal, relative à une activation de YAP (Mohseni et al., 2014). Nous nous sommes donc penchés sur le facteur YAP. Cependant, nos résultats n'ont fourni aucune preuve de dérégulation de YAP, dans notre modèle *Lkb1^{Δhep}*. Par analyse western blot, nous avons montré que la forme non-phosphorylé de YAP (forme active) n'est pas augmentée en absence de LKB1. D'autre part, l'expression des messagers de deux des principales cibles de YAP (*Cyr61*, *Ctgf* (Connective tissue growth factor)) n'est pas induite dans les foies *Lkb1^{Δhep}*. Dans le modèle de Camargo, l'extinction de LKB1 reposait sur l'utilisation d'un adénovirus Cre. Ainsi, la divergence des résultats obtenus dans l'étude de Camargo et la notre pourrait être expliquée par l'induction de signaux pro-prolifératifs différents, notamment suite à l'utilisation d'un adénovirus connu pour être associé à une réponse inflammatoire.

Bien que prometteurs, ces deux candidats (β-caténine, YAP) n'ont finalement pas permis d'expliquer le lien entre LKB1 et EGFR. Finalement, d'autres facteurs pourraient réguler l'expression de l'*Egfr*, en se fixant sur des séquences « enhancer » distales ou proximales. Dans ce but, nous pourrions réaliser des expériences de « foot-printing », nous permettant ainsi d'identifier des protéines et facteurs de transcription fixés sur des séquences à proximité du gène codant pour l'EGFR. Enfin, nous ne pouvons pas exclure la possibilité de modifications post-transcriptionnelles permettant la stabilisation de l'ARN messager de l'EGFR.

Actuellement, nos travaux ne nous permettent pas d'établir clairement si LKB1 contrôle uniquement l'expression de l'*Egfr*. Ainsi nous avons émis une seconde hypothèse, dans laquelle la master kinase pourrait également réguler des signaux extrinsèques, essentiels à l'activation de l'EGFR et au processus de régénération. Nous avons suggéré l'importance de ces signaux dans la réponse pro-proliférative, médiée par l'EGFR dans les foies *Lkb1^{Δhep}*, lors d'expériences de prolifération réalisées *in vitro*. Classiquement, dans un modèle de culture primaire, les hépatocytes effectuent un cycle de division en 60 heures et présentent un pic de phase S entre 36 et 48 heures. Dans ce contexte « cell autonomous », nous avons été surpris de n'observer aucune prolifération des hépatocytes *Lkb1^{Δhep}*, comparativement à des hépatocytes contrôles (**Figure 38**). Nos résultats semblent donc soutenir l'idée que la prolifération, observée *in vivo*

en absence de LKB1, est dépendante d'un dialogue entre l'hépatocyte et les signaux microenvironnementaux.



Pour rappel, dans le foie, de nombreux ligands sont responsables de l'activation de l'EGFR. Suite à des lésions ou au cours de la régénération hépatique, l'expression de la plupart des ligands d'EGFR est augmentée, comme cela a été observé pour l'EGF, HB-EGF, TGF α ou l'Amphiréguline (Berasain and Avila, 2014; Berasain et al., 2005; Kiso et al., 1995; Komposch and Sibilio, 2015; Webber et al., 1993). Nous avons donc analysé l'expression des messagers de ces ligands, *in vivo*, dans le modèle *Lkb1^{Ahep}*, avant et après hépatectomie. Nos résultats n'ont pas mis en évidence de modifications de l'expression d'HB-EGF, TGF α ou de l'Amphiréguline (Figure 39). En revanche, nous avons noté une augmentation de l'EGF en absence de LKB1, mais ce résultat reste non significatif (Figure 39).

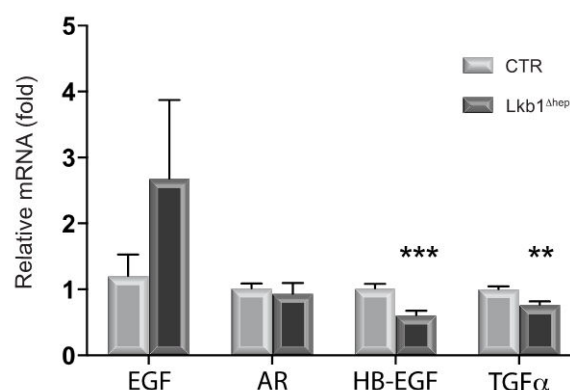


Figure 39 : Expression des ligands de l'EGFR dans les foies quiescents de souris contrôles et *Lkb1*^{Δhep}

L'EGF est un facteur produit à l'extérieur du tissu hépatique, par les glandes salivaires et le duodénum. Le facteur de croissance est ainsi acheminé, via la circulation sanguine, et arrive en zone périportale afin d'activer la prolifération hépatocytaire. Par la suite, il serait donc pertinent d'étudier les taux d'EGF circulants afin de valider nos résultats. Dans ce but, le prélèvement de sérum dans la veine porte, dans les souris *Lkb1*^{Δhep}, pourrait nous permettre d'analyser précisément des dérégulations du signal EGF, suite à une analyse par Elisa. D'autres ligands de l'EGFR sont aussi connus pour participer au processus de régénération, comme l'épiréguline (EREG). En effet, différents travaux ont démontré l'importance de ce ligand dans la régénération hépatique. Toutefois, bien que l'expression de l'EREG soit augmentée et participe à ce processus, son inhibition, seule, ne suffit pas à contrecarrer la régénération (Berasain and Avila, 2014; Komurasaki et al., 2002; Tomita et al., 2014). Fait notable, au cours de l'analyse transcriptomique, réalisée 48 heures après HP sur des tissus hépatiques contrôles et *Lkb1*^{Δhep}, l'EREG sort en 25ème position des gènes différentiellement exprimés dans les foies déficients pour LKB1 (GSEA – pathway « M phase of the mitotic cell cycle »). Il serait donc intéressant d'étudier les niveaux d'expression des messagers de l'EREG, dans le foie quiescent et à des temps plus précoces de la régénération en absence de LKB1. Komurasaki et ses collaborateurs ont montré *in vitro*, dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat, que la réponse proliférative était plus importante suite à une stimulation EREG, comparativement à l'EGF (Komurasaki et al., 2002). Dans nos cultures primaires, il est important de rappeler que la prolifération hépatocytaire est stimulée par l'EGF. Les hépatocytes *Lkb1*^{Δhep} ne semblent donc pas répondre à ce seul signal *in vitro*. Dans la suite de ce projet, il serait intéressant de stimuler les hépatocytes primaires *Lkb1*^{Δhep} avec de l'EREG et constater si cet événement suffit à restaurer la réponse proliférative.

2. LKB1 : sentinelle de la fidélité mitotique

Au cours de notre étude, nous avons également démontré que LKB1 est un gardien de l'intégrité génomique, durant le processus de régénération. En mitose, l'absence de LKB1 est, en effet, associée à de nombreux défauts d'organisation et d'orientation du fuseau mitotique ainsi que de l'alignement des chromosomes. Ces événements sont à l'origine d'un arrêt du cycle à la transition métaphase/anaphase, dans les hépatocytes *Lkb1^{Δhep}*. Dans la littérature, cet arrêt est induit par l'activation du Spindle Assembly Checkpoint (SAC). Ce point de contrôle agit afin de maintenir la stabilité génomique, en retardant la progression en anaphase jusqu'à ce que la ségrégation correcte des chromosomes puisse être garantie (Nezi and Musacchio, 2009). Dans le modèle *Lkb1^{Δhep}*, nous avons mis en évidence, grâce à l'analyse transcriptomique précédemment décrite, une surexpression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation de ce point de contrôle. Nos résultats ont ainsi confirmé l'activation du SAC suite à l'émergence de nombreux défauts mitotiques, en absence de LKB1. Dans notre modèle, ces anomalies mitotiques sont également corrélées à une perte de la polarité hépatocytaire, dans les foies *Lkb1^{Δhep}*.

Pendant la mitose, l'hépatocyte adopte une polarité spécifique et oriente le pôle de son fuseau mitotique à proximité du domaine apical (Slim et al., 2014). Dans l'introduction, nous avons évoqué l'importance de la polarité au cours de la mitose, pour la formation et le positionnement correct du fuseau. Ce dernier est formé de différents composants, tels que les centrosomes : centre organisateur de l'ensemble du réseau de microtubules ; les microtubules astraux (MTA) : permettant l'ancrage et la stabilité de fuseau ; les microtubules kinétochoriens (MTK) : responsables de la ségrégation des chromosomes.

Au vu des défauts importants de l'organisation des fuseaux, en absence de LKB1, est ce que l'un ou plusieurs de ces éléments pourrait être défectueux dans le modèle *Lkb1^{Δhep}* et ainsi contribuer à l'activation du SAC ? La formation d'un fuseau conforme étant primordiale au maintien de l'intégrité mitotique, en perspective de notre étude, il sera donc important de caractériser plus précisément les défauts du fuseau mitotique, observés dans les foies *Lkb1^{Δhep}*.

Tout d'abord, concernant les microtubules astraux, la polarité mitotique permet le positionnement de deux structures corticales opposées, qui permettent l'ancrage des deux ensembles de MTA dans la membrane plasmique latérale, à équidistance du domaine basal (Slim et al., 2014). La polymérisation des MTA doit donc être suffisante et dirigée vers le cortex, afin d'ancrer le fuseau au cortex et d'orienter la mitose, mais également pour exercer une tension suffisante pour maintenir le fuseau et permettre l'attraction correcte des

chromosomes en anaphase. Dans la suite de notre projet, il serait intéressant d'observer l'intégrité de ce réseau astral. Pour cela l'utilisation d'une microscopie confocale, combinée à une reconstitution en 3D, nous permettra de visualiser la longueur, l'orientation et le nombre de ces microtubules, après immunofluorescence marquant ces fibres (anticorps : α ou β -tubuline). En mitose, la polymérisation des MTK est également essentielle pour l'exploration dans la cellule, afin de « capturer » l'ensemble des kinétochores. D'autre part, il doit s'exercer une tension suffisante entre les deux kinétochores d'un même chromosome, pour permettre une ségrégation chromosomique fidèle. Par la suite, nous souhaiterions donc caractériser le réseau de MTK en réalisant des immunofluorescences, marquant à la fois les microtubules (anticorps : α ou β -tubuline) et les kinétochores (anticorps : CENP (Centromere protein) ou CREST), sur coupes de foie 48 heures post-hépatectomie (temps de la mitose). Ainsi, ces expériences nous permettraient de contrôler que chaque kinétochore est associé à un microtubule, mais également de mesurer la distance entre les deux kinétochores d'un même chromosome, reflet de la tension exercée par les MTK. Enfin, le dernier, mais pas des moindres, composant du fuseau que nous souhaiterions caractériser dans le modèle *Lkb1^{Δhep}* est le centrosome. Le positionnement correct des centrosomes, ainsi que leur regroupement, dans le cas de cellules polyploïdes, est capital à la mise en place d'un fuseau bipolaire. Organisateur clé de l'ensemble du réseau de microtubules, un défaut de leur nombre ou de leur positionnement conduirait à d'importantes anomalies mitotiques, ainsi qu'en aval à la genèse de cellules hautement polyploïdes et aneuploïdes, comme observées dans le modèle *Lkb1^{Δhep}*. Dans la continuité de nos travaux, il sera donc essentiel de réaliser une analyse en immunofluorescence (γ -tubuline), afin de dénombrer et de valider le positionnement correct de ces centrosomes dans les hépatocytes *Lkb1^{Δhep}*.

L'autre question majeure qui devra être adressée dans notre modèle sera : quelles cibles de LKB1 peuvent être impliquées dans le contrôle de l'intégrité mitotique des hépatocytes?

Lors de la caractérisation du fuseau, l'ensemble des nouveaux résultats que nous obtiendrons, nous permettra de nous orienter plus particulièrement vers certaines cibles de LKB1.

La première cible potentielle à laquelle nous penserions instinctivement est l'AMPK. En effet, des études antérieures ont démontré, dans différents systèmes, que la signalisation LKB1/AMPK est essentielle pour la polarité et la division cellulaire, notamment en contrôlant l'orientation du fuseau (Brenman, 2007; Jansen et al., 2009; Nakano and Takashima, 2012; Sebbagh et al., 2011). *In vitro*, dans des cellules épithéliales rénales, Wei et ses collaborateurs ont notamment démontré que la délétion de *Lkb1* (SiRNA) conduit à une localisation aberrante de l'AMPK activé sur le fuseau mitotique (Wei et al., 2012). Toutefois,

ce phénotype ne semble pas être conservé dans le tissu hépatique. En effet, nos résultats ont montré que l'activité de l'AMPK n'est pas éteinte dans les animaux *Lkb1^{Δhep}*. De plus, nous avons également établi que la perte de l'AMPK dans le parenchyme hépatique n'a aucun impact sur l'intégrité du fuseau mitotique. Par conséquent, dans le foie, LKB1 contrôle la polarité de division cellulaire, indépendamment de l'AMPK. Dans l'introduction, nous avons également vu que LKB1 peut réguler la polarité, notamment via la famille des MARKs protéines (Jansen et al., 2009; Nakano and Takashima, 2012; Sebbagh et al., 2011). Parmi ces kinases, Par1b, aussi appelé MARK2, pourrait être un candidat potentiel. Fait intéressant, dans des lignées de cellules rénales et hépatocytaires, il a été démontré que Par1b contrôle l'orientation du fuseau mitotique, en régissant la fixation des MTA dans le cortex (Lazaro-Diequez et al., 2013; Slim et al., 2013). En corrélation avec des marqueurs de polarité, l'étude de la localisation de Par1b/MARK2, au cours de la division des hépatocytes *Lkb1^{Δhep}*, pourrait nous permettre de définir si cette kinase peut participer au programme mitotique, médié par LKB1, au cours la régénération du foie. Enfin, si nous constatons des défauts associés aux centrosomes, une autre cible connue pourrait se montrer d'intérêt : la Polo-like kinase 1 ou PLK1. Une étude récente a effectivement mis en évidence, *in vitro*, l'implication de LKB1 dans la régulation de la duplication des centrosomes, indépendamment de l'AMPK, mais via la régulation de PLK1 (Werle et al., 2014). Dans cette étude, la perte de LKB1 conduit à une augmentation des formes phosphorylée et totale de la protéine PLK1, associée à une amplification du nombre de centrosomes. Ces événements conduisent dans ces cellules à un retard de mitose, à l'émergence de contingents bi et multinucléés, ainsi qu'à une augmentation de la polyploïdie (Werle et al., 2014). Au regard de cette interaction entre LKB1 et PLK1, il serait donc important, dans notre modèle *Lkb1^{Δhep}*, d'étudier les niveaux d'expression, totale et phosphorylée, de la protéine PLK1.

Finalement, nous ne pouvons pas exclure, la possibilité de l'intervention d'une autre protéine, ciblée par LKB1, telle que d'autres isoformes de la famille des MARKs protéines.

3. LKB1 : gardien de l'intégrité génomique hépatocyttaire

Nos travaux ont par ailleurs démontré que la perte de LKB1 dans le tissu hépatique conduit en fin de processus régénératif à la mise en place d'une instabilité chromosomique. Ainsi, nous observons à la fois la présence d'un contingent polyploïde mononucléé, généré par un mécanisme de « mitotic slippage », mais également d'un contingent aneuploïde, lié au contournement de l'arrêt en métaphase et à une progression en anaphase malgré la présence

de chromosomes non alignés. LKB1 agit donc dans le tissu hépatique comme un gardien de l'intégrité génomique. Il est intéressant de noter que cette fonction semble identique à celle d'APC dans le tissu intestinal. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la perte d'APC est associée à l'amplification d'un contingent polyploïde, généré par un mécanisme de « mitotic slippage ». Dans le cas du cancer du côlon, il existe également un hot spot de mutation p53 et la combinaison de ces deux paramètres présente un risque majeur. En effet, dans ce contexte p53 muté, les cellules polyploïdes engendrées par « mitotic slippage », suite à la perte d'APC, pourraient échapper au programme d'apoptose et proliférer de façon incontrôlée, participant ainsi au processus de tumorigenèse intestinale.

A ce jour, l'implication de la kinase LKB1 dans le processus de tumorigenèse hépatique demeure peu étudiée. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. Les principaux facteurs de risque du CHC sont les infections par le virus de l'hépatite B et C, la consommation excessive d'alcool, les surcharges en fer, l'exposition à l'aflatoxine B1 ou les stéatohépatites non alcooliques (liées notamment à l'obésité, au diabète de type 2). Des travaux récents de génomique fonctionnelle ont permis d'identifier et de grouper les CHC en fonction de la présence d'altérations génétiques. Ces analyses ont permis de confirmer d'une part la fréquence des mutations de CTNNB1 (codant pour le β -caténine), d'AXIN1 et de TP53, mais également d'identifier de nouvelles signatures moléculaires associées notamment au remodelage de la chromatine (ARID1A, ARID2), au stress oxydant (NRF2, KEAP1), à différents régulateurs du cycle cellulaire (IRF2, ATM) et à la voie Ras/raf/Map kinase (FGF19, RPS6KA) (Guichard et al., 2012). L'analyse des séquences non-codantes a aussi mis en évidence des mutations somatiques de la séquence promotrice du gène codant pour la télomérase transcriptase inverse (TERT) (Nault et al., 2014). Il est important de rappeler que selon l'étiologie et la signature moléculaire, les tumeurs sont également répertoriées de la manière suivante : peu, modérément ou totalement différenciées, en corrélation notamment avec la mise en place d'une CIN. Ainsi, les tumeurs arborant des mutations p53 sont associées à une instabilité chromosomique et un état indifférencié; à l'inverse les tumeurs β -caténine sont génétiquement stables et bien différenciées. Certains sous-groupes de CHC étant clairement associés à la présence d'une CIN, il serait intéressant de savoir si de potentielles altérations de l'expression de *Lkb1* prennent place en aval d'un hit oncogénique, participant ainsi à l'émergence d'une instabilité génomique dans ces groupes. D'autre part, LKB1 étant une master kinase, même si aucune différence d'expression des messagers n'était constatée lors de cette analyse, il serait nécessaire d'étudier l'activité de la kinase dans cette même cohorte. Finalement, outre l'instabilité

chromosomique, le laboratoire a récemment découvert que les tumeurs p53 présentent une augmentation drastique de la polyploïdie. Différentes signatures moléculaires des CHC pourraient être associées à l'émergence de contingents hautement polyplœides et aneuploïdes, ainsi il serait vraiment intéressant de savoir si des altérations de LKB1 peuvent participer à la genèse de ces populations, dans l'hépatocarcinogénèse humaine. Ces travaux pourraient également nous permettre de définir si ces variations d'expression de LKB1 corréleraient avec une signature moléculaire particulière.

REFERENCES

- A -

- Abe, E., Mocharla, H., Yamate, T., Taguchi, Y., and Manolagas, S.C. (1999). Meltrin- α , a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcified tissue international* 64, 508-515.
- Ahringer, J. (2003). Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Current opinion in cell biology* 15, 73-81.
- Ahuja, P., Perriard, E., Pedrazzini, T., Satoh, S., Perriard, J.C., and Ehler, E. (2007). Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy. *Experimental cell research* 313, 1270-1283.
- Alberghina, L., Smeraldi, C., Ranzi, B.M., and Porro, D. (1998). Control by nutrients of growth and cell cycle progression in budding yeast, analyzed by double-tag flow cytometry. *Journal of bacteriology* 180, 3864-3872.
- Alessi, D.R., Sakamoto, K., and Bayascas, J.R. (2006). LKB1-dependent signaling pathways. *Annual review of biochemistry* 75, 137-163.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973.
- Anatskaya, O.V., and Vinogradov, A.E. (2007). Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics* 89, 70-80.
- Anatskaya, O.V., and Vinogradov, A.E. (2010). Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammalian transcriptome. *Functional & integrative genomics* 10, 433-446.
- Andreassen, P.R., and Margolis, R.L. (1994). Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 127, 789-802.
- Arias, I.M., Che, M., Gatmaitan, Z., Leveille, C., Nishida, T., and St Pierre, M. (1993). The biology of the bile canaliculus, 1993. *Hepatology* 17, 318-329.
- Auer, G.U., Backdahl, M., Forsslund, G.M., and Askensten, U.G. (1985). Ploidy levels in nonneoplastic and neoplastic thyroid cells. *Analytical and quantitative cytology and histology* 7, 97-106.

- B -

- Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., and Clevers, H.C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *The EMBO journal* 22, 3062-3072.
- Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Battle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457-466.
- Barbier-Torres, L., Delgado, T.C., Garcia-Rodriguez, J.L., Zubiete-Franco, I., Fernandez-Ramos, D., Buque, X., Cano, A., Gutierrez-de Juan, V., Fernandez-Dominguez, I., Lopitz-Otsoa, F., *et al.* (2015). Stabilization of LKB1 and Akt by neddylation regulates energy metabolism in liver cancer. *Oncotarget* 6, 2509-2523.
- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., and DePinho, R.A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162-167.
- Basant, A., Lekontsev, S., Tse, Y.C., Zhang, D., Longhini, K.M., Petronczki, M., and Glotzer, M. (2015). Aurora B kinase promotes cytokinesis by inducing centralspindlin oligomers that associate with the plasma membrane. *Developmental cell* 33, 204-215.
- Bays, J.L., Campbell, H.K., Heidema, C., Sebbagh, M., and DeMali, K.A. (2017). Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK. *Nature cell biology* 19, 724-731.
- Beggs, A.D., Latchford, A.R., Vasen, H.F., Moslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bertario, L., Blanco, I., Bulow, S., Burn, J., *et al.* (2010). Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut* 59, 975-986.
- Benedetti, A., Bassotti, C., Rapino, K., Marucci, L., and Jezequel, A.M. (1996). A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *Journal of hepatology* 24, 335-342.
- Benkemoun, L., Descoteaux, C., Chartier, N.T., Pintard, L., and Labbe, J.C. (2014). PAR-4/LKB1 regulates DNA replication during asynchronous division of the early *C. elegans* embryo. *The Journal of cell biology* 205, 447-455.
- Berasain, C., and Avila, M.A. (2014). The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *Journal of gastroenterology* 49, 9-23.
- Berasain, C., Garcia-Trevijano, E.R., Castillo, J., Erroba, E., Lee, D.C., Prieto, J., and Avila, M.A. (2005). Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 128, 424-432.

- Beyer, H.S., Sherman, R., and Zieve, L. (1991). Aging is associated with reduced liver regeneration and diminished thymidine kinase mRNA content and enzyme activity in the rat. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 117, 101-108.
- Bischoff, R., and Heintz, C. (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 201, 41-54.
- Blaise, S., de Parseval, N., Benit, L., and Heidmann, T. (2003). Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13013-13018.
- Blond, J.L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., and Cosset, F.L. (2000). An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *Journal of virology* 74, 3321-3329.
- Blouin, A., Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *The Journal of cell biology* 72, 441-455.
- Bogdanos, D.P., Gao, B., and Gershwin, M.E. (2013). Liver immunology. *Comprehensive Physiology* 3, 567-598.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10608-10613.
- Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., and Alessi, D.R. (2003a). MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *The EMBO journal* 22, 5102-5114.
- Boudeau, J., Deak, M., Lawlor, M.A., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2003b). Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *The Biochemical journal* 370, 849-857.
- Boudeau, J., Scott, J.W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D.G., Prescott, A.R., van Aalten, D.M., and Alessi, D.R. (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *Journal of cell science* 117, 6365-6375.
- Boveri, T. (2008). Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of cell science* 121 Suppl 1, 1-84.
- Braun, L., Mead, J.E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G.I., and Fausto, N. (1988). Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 1539-1543.
- Brennan, J.E. (2007). AMPK/LKB1 signaling in epithelial cell polarity and cell division. *Cell cycle* 6, 2755-2759.
- Bucher, N.L., and Malt, R.A. (1971). *Regeneration of liver and kidney* (Little, Brown).
- Burchard, J., Zhang, C., Liu, A.M., Poon, R.T., Lee, N.P., Wong, K.F., Sham, P.C., Lam, B.Y., Ferguson, M.D., Tokiwa, G., *et al.* (2010). microRNA-122 as a regulator of mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma. *Molecular systems biology* 6, 402.

- C -

- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.
- Cao, L., Peng, B., Yao, L., Zhang, X., Sun, K., Yang, X., and Yu, L. (2010). The ancient function of RB-E2F pathway: insights from its evolutionary history. *Biology direct* 5, 55.
- Castedo, M., Coquelle, A., Vivet, S., Vitale, I., Kauffmann, A., Dessen, P., Pequignot, M.O., Casares, N., Valent, A., Mouhamad, S., *et al.* (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *The EMBO journal* 25, 2584-2595.
- Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D., Margall-Ducos, G., and Desdouets, C. (2009). The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *The Journal of clinical investigation* 119, 1880-1887.
- Chae, H.D., Lee, M.R., and Broxmeyer, H.E. (2012). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside induces G(1)/S arrest and Nanog downregulation via p53 and enhances erythroid differentiation. *Stem cells* 30, 140-149.
- Chagraoui, H., Kassouf, M., Banerjee, S., Goardon, N., Clark, K., Atzberger, A., Pearce, A.C., Skoda, R.C., Ferguson, D.J., Watson, S.P., *et al.* (2011). SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. *Blood* 118, 723-735.

- Chamla, Y., Roumy, M., Lassegues, M., and Battin, J. (1980). Altered sensitivity to cholchicine and PHA in human cultured cells. *Human genetics* 53, 249-253.
- Chen, H.Z., Ouseph, M.M., Li, J., Pecot, T., Chokshi, V., Kent, L., Bae, S., Byrne, M., Duran, C., Comstock, G., *et al.* (2012). Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nature cell biology* 14, 1192-1202.
- Chen, Y.J., Chen, C.M., Twu, N.F., Yen, M.S., Lai, C.R., Wu, H.H., Wang, P.H., and Yuan, C.C. (2009). Overexpression of Aurora B is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 455, 431-440.
- Cheng, B., and Crasta, K. (2017). Consequences of mitotic slippage for antimicrotubule drug therapy. *Endocrine-related cancer* 24, T97-T106.
- Cheng, J., Liu, C., Hu, K., Greenberg, A., Wu, D., Ausman, L.M., McBurney, M.W., and Wang, X.D. (2017). Ablation of systemic SIRT1 activity promotes nonalcoholic fatty liver disease by affecting liver-mesenteric adipose tissue fatty acid mobilization. *Biochimica et biophysica acta*.
- Chircop, M. (2014). Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases* 5.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* 40, 179-204.
- Clubb, F.J., Jr., and Bishop, S.P. (1984). Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 50, 571-577.
- Collin de Lhortet, A., Gilgenkrantz, H., and Guidotti, J.E. (2012). EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration. *International journal of hepatology* 2012, 476910.
- Collins, S.P., Reoma, J.L., Gamm, D.M., and Uhler, M.D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *The Biochemical journal* 345 Pt 3, 673-680.
- Coopman, P., and Djiane, A. (2016). Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73, 3535-3553.
- Cornell, R.P. (1985). Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. *The American journal of physiology* 249, R551-562.
- Corradetti, M.N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R.A., and Guan, K.L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes & development* 18, 1533-1538.
- Creasy, M.R., Crolla, J.A., and Alberman, E.D. (1976). A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Human genetics* 31, 177-196.
- Cross, R.A., and McAinsh, A. (2014). Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 257-271.
- Csibi, A., Lee, G., Yoon, S.O., Tong, H., Ilter, D., Elia, I., Fendt, S.M., Roberts, T.M., and Blenis, J. (2014). The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc translation. *Current biology : CB* 24, 2274-2280.
- Cuenca, A.A., Schetter, A., Aceto, D., Kempfues, K., and Seydoux, G. (2003). Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development* 130, 1255-1265.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews Cancer* 8, 512-522.

- D -

- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- D'Avino, P.P., Giansanti, M.G., and Petronczki, M. (2015). Cytokinesis in animal cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, a015834.
- Date, M., Matsuzaki, K., Matsushita, M., Tahashi, Y., Sakitani, K., and Inoue, K. (2000). Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *Journal of hepatology* 32, 251-260.
- Davies, S.P., Carling, D., Munday, M.R., and Hardie, D.G. (1992). Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *European journal of biochemistry* 203, 615-623.
- Davoli, T., and de Lange, T. (2011). The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 585-610.
- Davoli, T., and de Lange, T. (2012). Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer cell* 21, 765-776.

- Davoli, T., Denchi, E.L., and de Lange, T. (2010). Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* 141, 81-93.
- Day, E.A., Ford, R.J., and Steinberg, G.R. (2017). AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28, 545-560.
- Deka, J., Kuhlmann, J., and Muller, O. (1998). A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau. *European journal of biochemistry* 253, 591-597.
- Delahunty, T.J., and Rubinstein, D. (1970). Accumulation and release of triglycerides by rat liver following partial hepatectomy. *Journal of lipid research* 11, 536-543.
- den Elzen, N., Buttery, C.V., Maddugoda, M.P., Ren, G., and Yap, A.S. (2009). Cadherin adhesion receptors orient the mitotic spindle during symmetric cell division in mammalian epithelia. *Molecular biology of the cell* 20, 3740-3750.
- Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I.P., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., Jamieson, T.J., Meniel, V., Clarke, A., and Nathke, I.S. (2007). Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *The Journal of cell biology* 176, 183-195.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., *et al.* (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.
- Dogliotti, G., Kullmann, L., Dhumale, P., Thiele, C., Panichkina, O., Mendl, G., Houben, R., Haferkamp, S., Puschel, A.W., and Krahn, M.P. (2017). Membrane-binding and activation of LKB1 by phosphatidic acid is essential for development and tumour suppression. *Nature communications* 8, 15747.
- Dorfman, J., and Macara, I.G. (2008). STRADalpha regulates LKB1 localization by blocking access to importin-alpha, and by association with Crm1 and exportin-7. *Molecular biology of the cell* 19, 1614-1626.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297-308.
- Duelli, D., and Lazebnik, Y. (2007). Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nature reviews Cancer* 7, 968-976.
- Duelli, D.M., Padilla-Nash, H.M., Berman, D., Murphy, K.M., Ried, T., and Lazebnik, Y. (2007). A virus causes cancer by inducing massive chromosomal instability through cell fusion. *Current biology : CB* 17, 431-437.
- Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 9, 790-803.
- Duncan, A.W., Hickey, R.D., Paulk, N.K., Culbertson, A.J., Olson, S.B., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2009). Ploidy reductions in murine fusion-derived hepatocytes. *PLoS genetics* 5, e1000385.
- Duncan, A.W., Taylor, M.H., Hickey, R.D., Hanlon Newell, A.E., Lenzi, M.L., Olson, S.B., Finegold, M.J., and Grompe, M. (2010). The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* 467, 707-710.
- Dunn, J.C., Tompkins, R.G., and Yarmush, M.L. (1991). Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnology progress* 7, 237-245.
- Dunn, J.C., Yarmush, M.L., Koebe, H.G., and Tompkins, R.G. (1989). Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3, 174-177.

- E -

- Eliades, A., Papadantonakis, N., and Ravid, K. (2010). New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. *The Journal of biological chemistry* 285, 18909-18917.
- Epstein, C.J. (1967). Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the Mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57, 327-334.
- Erenpreisa, J.E., Ivanov, A., Dekena, G., Vitina, A., Krampe, R., Freivalds, T., Selivanova, G., and Roach, H.I. (2000). Arrest in metaphase and anatomy of mitotic catastrophe: mild heat shock in two human osteosarcoma cell lines. *Cell biology international* 24, 61-70.
- Esteller, M., Avizienyte, E., Corn, P.G., Lothe, R.A., Baylin, S.B., Aaltonen, L.A., and Herman, J.G. (2000). Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 19, 164-168.

- F -

- Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45-53.
- Fededa, J.P., and Gerlich, D.W. (2012). Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nature cell biology* 14, 440-447.
- Fernandes, N., Sun, Y., Chen, S., Paul, P., Shaw, R.J., Cantley, L.C., and Price, B.D. (2005). DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM. *The Journal of biological chemistry* 280, 15158-15164.
- Fogarty, S., Ross, F.A., Vara Ciruelos, D., Gray, A., Gowans, G.J., and Hardie, D.G. (2016). AMPK Causes Cell Cycle Arrest in LKB1-Deficient Cells via Activation of CAMKK2. *Molecular cancer research : MCR* 14, 683-695.
- Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 25-37.
- Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *The Journal of clinical investigation* 120, 2355-2369.
- Fox, D.T., and Duronio, R.J. (2013). Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* 140, 3-12.
- Friedman, S.L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews* 88, 125-172.
- Fry, M., Silber, J., Loeb, L.A., and Martin, G.M. (1984). Delayed and reduced cell replication and diminishing levels of DNA polymerase-alpha in regenerating liver of aging mice. *Journal of cellular physiology* 118, 225-232.
- Fu, A., Ng, A.C., Depatie, C., Wijesekara, N., He, Y., Wang, G.S., Bardeesy, N., Scott, F.W., Touyz, R.M., Wheeler, M.B., *et al.* (2009). Loss of Lkb1 in adult beta cells increases beta cell mass and enhances glucose tolerance in mice. *Cell metabolism* 10, 285-295.
- Fu, D., Wakabayashi, Y., Ido, Y., Lippincott-Schwartz, J., and Arias, I.M. (2010). Regulation of bile canicular network formation and maintenance by AMP-activated protein kinase and LKB1. *Journal of cell science* 123, 3294-3302.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437, 1043-1047.
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E.P., McBurney, M.W., Sauve, A.A., and Sartorelli, V. (2008). Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Developmental cell* 14, 661-673.
- Fullerton, M.D. (2016). AMP-activated protein kinase and its multifaceted regulation of hepatic metabolism. *Current opinion in lipidology* 27, 172-180.

- G -

- Gallagher, J.P., Grover, C.E., Hu, G., and Wendel, J.F. (2016). Insights into the Ecology and Evolution of Polyploid Plants through Network Analysis. *Molecular ecology* 25, 2644-2660.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., and Kohler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401, 341.
- Gammon, A., Jaspersion, K., Kohlmann, W., and Burt, R.W. (2009). Hamartomatous polyposis syndromes. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 23, 219-231.
- Ganem, N.J., and Pellman, D. (2007). Limiting the proliferation of polyploid cells. *Cell* 131, 437-440.
- Ganem, N.J., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current opinion in genetics & development* 17, 157-162.
- Gao, P., and Zheng, J. (2010). High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer. *Virology journal* 7, 238.
- Gao, P., and Zheng, J. (2011). Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses--related cancers. *Cancer letters* 303, 1-8.
- Garcia, D., and Shaw, R.J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular cell* 66, 789-800.
- Gaude, H., Aznar, N., Delay, A., Bres, A., Buchet-Poyau, K., Caillat, C., Vigouroux, A., Rogon, C., Woods, A., Vanacker, J.M., *et al.* (2012). Molecular chaperone complexes with antagonizing activities regulate stability and activity of the tumor suppressor LKB1. *Oncogene* 31, 1582-1591.
- Gebhardt, R., Lindros, K., Lamers, W.H., and Moorman, A.F. (1991). Hepatocellular heterogeneity in ammonia metabolism: demonstration of limited colocalization of carbamoylphosphate synthetase and glutamine synthetase. *European journal of cell biology* 56, 464-467.

- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease* 21, 311-335.
- Gentric, G., and Desdouets, C. (2014). Polyploidization in liver tissue. *The American journal of pathology* 184, 322-331.
- Gentric, G., Maillet, V., Paradis, V., Couton, D., L'Hermitte, A., Panasyuk, G., Fromenty, B., Celton-Morizur, S., and Desdouets, C. (2015). Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation* 125, 981-992.
- Gerlyng, P., Abyholm, A., Grotmol, T., Erikstein, B., Huitfeldt, H.S., Stokke, T., and Seglen, P.O. (1993). Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell proliferation* 26, 557-565.
- Gholkar, A.A., Cheung, K., Williams, K.J., Lo, Y.C., Hamideh, S.A., Nnebe, C., Khuu, C., Bensinger, S.J., and Torres, J.Z. (2016). Fatostatin Inhibits Cancer Cell Proliferation by Affecting Mitotic Microtubule Spindle Assembly and Cell Division. *The Journal of biological chemistry* 291, 17001-17008.
- Giardiello, F.M., Welsh, S.B., Hamilton, S.R., Offerhaus, G.J., Gittelsohn, A.M., Booker, S.V., Krush, A.J., Yardley, J.H., and Luk, G.D. (1987). Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *The New England journal of medicine* 316, 1511-1514.
- Gire, V., and Dulic, V. (2015). Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell cycle* 14, 297-304.
- Gissen, P., and Arias, I.M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of hepatology* 63, 1023-1037.
- Glaser, S.S., Gaudio, E., Miller, T., Alvaro, D., and Alpini, G. (2009). Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert reviews in molecular medicine* 11, e7.
- Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307, 1735-1739.
- Goldstone, S., Pavey, S., Forrest, A., Sinnamon, J., and Gabrielli, B. (2001). Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene* 20, 921-932.
- Gordon, D.J., Resio, B., and Pellman, D. (2012). Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature reviews Genetics* 13, 189-203.
- Gorla, G.R., Malhi, H., and Gupta, S. (2001). Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *Journal of cell science* 114, 2943-2951.
- Granot, Z., Swisa, A., Magenheimer, J., Stolovich-Rain, M., Fujimoto, W., Manduchi, E., Miki, T., Lennerz, J.K., Stoeckert, C.J., Jr., Meyuhis, O., et al. (2009). LKB1 regulates pancreatic beta cell size, polarity, and function. *Cell metabolism* 10, 296-308.
- Green, R.A., and Kaplan, K.B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *The Journal of cell biology* 163, 949-961.
- Guengerich, F.P. (1999). Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39, 1-17.
- 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. *Nature genetics* 44, 694-698.
- Guidotti, J.E., Bregerie, O., Robert, A., Debey, P., Brechot, C., and Desdouets, C. (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 278, 19095-19101.
- Guo, S., and Kemphues, K.J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.
- Gupta, S. (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. *Seminars in cancer biology* 10, 161-171.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* 30, 214-226.

- H -

- Haga, S., Ozaki, M., Inoue, H., Okamoto, Y., Ogawa, W., Takeda, K., Akira, S., and Todo, S. (2009). The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49, 204-214.
- Haissaguerre, M., Saucisse, N., and Cota, D. (2014). Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology* 397, 67-77.
- Halilbasic, E., Claudel, T., and Trauner, M. (2013). Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *Journal of hepatology* 58, 155-168.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 251-262.

- Harris, H., and Watkins, J.F. (1965). Hybrid Cells Derived from Mouse and Man: Artificial Heterokaryons of Mammalian Cells from Different Species. *Nature* 205, 640-646.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.
- Hasenour, C.M., Berglund, E.D., and Wasserman, D.H. (2013). Emerging role of AMP-activated protein kinase in endocrine control of metabolism in the liver. *Molecular and cellular endocrinology* 366, 152-162.
- Hasenour, C.M., Ridley, D.E., Hughey, C.C., James, F.D., Donahue, E.P., Shearer, J., Viollet, B., Foretz, M., and Wasserman, D.H. (2014). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) effect on glucose production, but not energy metabolism, is independent of hepatic AMPK in vivo. *The Journal of biological chemistry* 289, 5950-5959.
- Hattori, N., Davies, T.C., Anson-Cartwright, L., and Cross, J.C. (2000). Periodic expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) in trophoblast giant cells defines a G2-like gap phase of the endocycle. *Molecular biology of the cell* 11, 1037-1045.
- Haussinger, D., Lamers, W.H., and Moorman, A.F. (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. *Enzyme* 46, 72-93.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 271, 27879-27887.
- He, Y., Yan, D., Zheng, D., Hu, Z., Li, H., and Li, J. (2016). Cell Division Cycle 6 Promotes Mitotic Slippage and Contributes to Drug Resistance in Paclitaxel-Treated Cancer Cells. *PloS one* 11, e0162633.
- Hearle, N., Schumacher, V., Menko, F.H., Olschwang, S., Boardman, L.A., Gille, J.J., Keller, J.J., Westerman, A.M., Scott, R.J., Lim, W., *et al.* (2006). Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 3209-3215.
- Heilman, S.A., Nordberg, J.J., Liu, Y., Sluder, G., and Chen, J.J. (2009). Abrogation of the postmitotic checkpoint contributes to polyploidization in human papillomavirus E7-expressing cells. *Journal of virology* 83, 2756-2764.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., *et al.* (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391, 184-187.
- Hemminki, A., Tomlinson, I., Markie, D., Jarvinen, H., Sistonen, P., Bjorkqvist, A.M., Knuutila, S., Salovaara, R., Bodmer, W., Shibata, D., *et al.* (1997). Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nature genetics* 15, 87-90.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell* 14, 501-513.
- Hezel, A.F., Gurumurthy, S., Granot, Z., Swisa, A., Chu, G.C., Bailey, G., Dor, Y., Bardeesy, N., and Depinho, R.A. (2008). Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms. *Molecular and cellular biology* 28, 2414-2425.
- Hixon, M.L., and Gualberto, A. (2003). Vascular smooth muscle polyploidization--from mitotic checkpoints to hypertension. *Cell cycle* 2, 105-110.
- Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8839-8843.
- Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., *et al.* (2008). SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 283, 20015-20026.
- Houde, V.P., Ritorto, M.S., Gourlay, R., Varghese, J., Davies, P., Shpiro, N., Sakamoto, K., and Alessi, D.R. (2014). Investigation of LKB1 Ser431 phosphorylation and Cys433 farnesylation using mouse knockin analysis reveals an unexpected role of prenylation in regulating AMPK activity. *The Biochemical journal* 458, 41-56.
- Houwen, R.H., Baharloo, S., Blankenship, K., Raeymaekers, P., Juyn, J., Sandkuijl, L.A., and Freimer, N.B. (1994). Genome screening by searching for shared segments: mapping a gene for benign recurrent intrahepatic cholestasis. *Nature genetics* 8, 380-386.
- Howell, J.J., Ricoult, S.J., Ben-Sahra, I., and Manning, B.D. (2013). A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism. *Biochemical Society transactions* 41, 906-912.
- Hsu, S.H., Delgado, E.R., Otero, P.A., Teng, K.Y., Kutay, H., Meehan, K.M., Moroney, J.B., Monga, J.K., Hand, N.J., Friedman, J.R., *et al.* (2016). MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology* 64, 599-615.
- Hu, L., Plafker, K., Vorozhko, V., Zuna, R.E., Hanigan, M.H., Gorbosky, G.J., Plafker, S.M., Angeletti, P.C., and Ceresa, B.P. (2009). Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology* 384, 125-134.

- Hu, T., and Li, C. (2010). Convergence between Wnt-beta-catenin and EGFR signaling in cancer. *Molecular cancer* 9, 236.
- Huang, W., She, L., Chang, X.Y., Yang, R.R., Wang, L., Ji, H.B., Jiao, J.W., and Poo, M.M. (2014). Protein kinase LKB1 regulates polarized dendrite formation of adult hippocampal newborn neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 469-474.
- Huminiecki, L., and Heldin, C.H. (2010). 2R and remodeling of vertebrate signal transduction engine. *BMC biology* 8, 146.
- Hundal, R.S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., Inzucchi, S.E., Schumann, W.C., Petersen, K.F., Landau, B.R., *et al.* (2000). Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 2063-2069.
- Huppertz, B., Frank, H.G., Kingdom, J.C., Reister, F., and Kaufmann, P. (1998). Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochemistry and cell biology* 110, 495-508.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *The Journal of biological chemistry* 280, 29060-29066.
- Hutterer, A., Glotzer, M., and Mishima, M. (2009). Clustering of centralspindlin is essential for its accumulation to the central spindle and the midbody. *Current biology : CB* 19, 2043-2049.

- I -

- Ichikawa, S., Mucida, D., Tyznik, A.J., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2011). Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *Journal of immunology* 186, 5549-5555.
- Ikeda, Y., Sato, K., Pimentel, D.R., Sam, F., Shaw, R.J., Dyck, J.R., and Walsh, K. (2009). Cardiac-specific deletion of LKB1 leads to hypertrophy and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* 284, 35839-35849.
- Incassati, A., Patel, D., and McCance, D.J. (2006). Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. *Oncogene* 25, 2444-2451.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-590.
- Ishii, T., Fujishiro, M., Masuda, M., Okudela, K., Kitamura, H., Teramoto, S., and Matsuse, T. (2004). Nutritional deficiency affects cell cycle status and viability in A549 cells: role of p27Kip1. *Cancer letters* 213, 99-109.
- Itoh, Y., Sanosaka, M., Fuchino, H., Yahara, Y., Kumagai, A., Takemoto, D., Kagawa, M., Doi, J., Ohta, M., Tsumaki, N., *et al.* (2015). Salt-inducible Kinase 3 Signaling Is Important for the Gluconeogenic Programs in Mouse Hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 290, 17879-17893.
- Izawa, D., and Pines, J. (2011). How APC/C-Cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. *Nature cell biology* 13, 223-233.
- Izawa, D., and Pines, J. (2015). The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. *Nature* 517, 631-634.

- J -

- Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J.M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2005). Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS letters* 579, 1417-1423.
- Jansen, M., de Leng, W.W., Baas, A.F., Myoshi, H., Mathus-Vliegen, L., Taketo, M.M., Clevers, H., Giardiello, F.M., and Offerhaus, G.J. (2006). Mucosal prolapse in the pathogenesis of Peutz-Jeghers polyposis. *Gut* 55, 1-5.
- Jansen, M., Ten Klooster, J.P., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2009). LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiological reviews* 89, 777-798.
- Jeggo, P.A., Pearl, L.H., and Carr, A.M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature reviews Cancer* 16, 35-42.
- Jeghers, H., Mc, K.V., and Katz, K.H. (1949). Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *The New England journal of medicine* 241, 1031-1036.
- Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W., and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nature genetics* 18, 38-43.
- Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., *et al.* (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 448, 807-810.

- Jishage, K., Nezu, J., Kawase, Y., Iwata, T., Watanabe, M., Miyoshi, A., Ose, A., Habu, K., Kake, T., Kamada, N., *et al.* (2002). Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 8903-8908.
- Jones, M.R., and Ravid, K. (2004). Vascular smooth muscle polyploidization as a biomarker for aging and its impact on differential gene expression. *The Journal of biological chemistry* *279*, 5306-5313.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell* *18*, 283-293.
- Jungermann, K., and Katz, N. (1989). Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiological reviews* *69*, 708-764.
- Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual review of nutrition* *16*, 179-203.
- Jungermann, K., and Thurman, R.G. (1992). Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme* *46*, 33-58.
- Just, P.A., Poncy, A., Charawi, S., Dahmani, R., Traore, M., Dumontet, T., Drouet, V., Dumont, F., Gilgenkrantz, H., Colnot, S., *et al.* (2015). LKB1 and Notch Pathways Interact and Control Biliary Morphogenesis. *PloS one* *10*, e0145400.
- Juwana, J.P., Henderikx, P., Mischo, A., Wadle, A., Fadle, N., Gerlach, K., Arends, J.W., Hoogenboom, H., Pfreundschuh, M., and Renner, C. (1999). EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins. *International journal of cancer* *81*, 275-284.

- K -

- Kaestner, K.H. (2009). In the zone: how a hepatocyte knows where it is. *Gastroenterology* *137*, 425-427.
- Kang, H.S., Cho, H.C., Lee, J.H., Oh, G.T., Koo, S.H., Park, B.H., Lee, I.K., Choi, H.S., Song, D.K., and Im, S.S. (2016). Metformin stimulates IGFBP-2 gene expression through PPARalpha in diabetic states. *Scientific reports* *6*, 23665.
- Karuman, P., Gozani, O., Odze, R.D., Zhou, X.C., Zhu, H., Shaw, R., Brien, T.P., Bozzuto, C.D., Ooi, D., Cantley, L.C., *et al.* (2001). The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Molecular cell* *7*, 1307-1319.
- Kasahara, M. (2007). The 2R hypothesis: an update. *Current opinion in immunology* *19*, 547-552.
- Kaufman, M.H. (1991). Histochemical identification of primordial germ cells and differentiation of the gonads in homozygous tetraploid mouse embryos. *Journal of anatomy* *179*, 169-181.
- Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., and Cheng, N.S. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* *52*, 311-320.
- Kim, J.E., Billadeau, D.D., and Chen, J. (2005). The tandem BRCT domains of Ect2 are required for both negative and positive regulation of Ect2 in cytokinesis. *The Journal of biological chemistry* *280*, 5733-5739.
- Kim, J.Y., Choi, H.E., Lee, H.H., Shin, J.S., Shin, D.H., Choi, J.H., Lee, Y.S., and Lee, K.T. (2015). Resveratrol analogue (E)-8-acetoxy-2-[2-(3,4-diacetoxyphenyl)ethenyl]-quinazoline induces G(2)/M cell cycle arrest through the activation of ATM/ATR in human cervical carcinoma HeLa cells. *Oncology reports* *33*, 2639-2647.
- Kim, L.C., Cook, R.S., and Chen, J. (2017). mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* *36*, 2191-2201.
- Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Higashiyama, S., Ito, N., Tsushima, H., Taniguchi, N., and Matsuzawa, Y. (1995). Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* *22*, 1584-1590.
- Kojima, T., Yamamoto, T., Murata, M., Chiba, H., Kokai, Y., and Sawada, N. (2003). Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* *36*, 157-164.
- Kojima, Y., Miyoshi, H., Clevers, H.C., Oshima, M., Aoki, M., and Taketo, M.M. (2007). Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase signaling. *The Journal of biological chemistry* *282*, 23532-23540.
- Komposch, K., and Sibilía, M. (2015). EGFR Signaling in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences* *17*.
- Komurasaki, T., Toyoda, H., Uchida, D., and Nemoto, N. (2002). Mechanism of growth promoting activity of epiregulin in primary cultures of rat hepatocytes. *Growth factors* *20*, 61-69.
- Koo, S.H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreaton, R.A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., *et al.* (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* *437*, 1109-1111.

- Krawchuk, D., Anani, S., Honma-Yamanaka, N., Polito, S., Shafik, M., and Yamanaka, Y. (2015). Loss of LKB1 leads to impaired epithelial integrity and cell extrusion in the early mouse embryo. *Journal of cell science* 128, 1011-1022.
- Kudryavtsev, B.N., Kudryavtseva, M.V., Sakuta, G.A., and Stein, G.I. (1993). Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology* 64, 387-393.
- Kung, A.L., Sherwood, S.W., and Schimke, R.T. (1990). Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 9553-9557.
- Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Jacob, S.T., and Ghoshal, K. (2006). Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *Journal of cellular biochemistry* 99, 671-678.
- Kuwada, S.K., and Burt, R. (2011). A rationale for mTOR inhibitors as chemoprevention agents in Peutz-Jeghers syndrome. *Familial cancer* 10, 469-472.

- L -

- Lacroix, B., and Maddox, A.S. (2012). Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *The Journal of pathology* 226, 338-351.
- Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 283, 27628-27635.
- Lapante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Current biology* : CB 22, R966-980.
- Lazaro-Dieguez, F., Cohen, D., Fernandez, D., Hodgson, L., van Ijzendoorn, S.C., and Musch, A. (2013). Par1b links lumen polarity with LGN-NuMA positioning for distinct epithelial cell division phenotypes. *The Journal of cell biology* 203, 251-264.
- Lazzerini Denchi, E., Celli, G., and de Lange, T. (2006). Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreduplication. *Genes & development* 20, 2648-2653.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287, 319-321.
- Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275-280.
- LeCluyse, E.L., Audus, K.L., and Hochman, J.H. (1994). Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *The American journal of physiology* 266, C1764-1774.
- Lee, C.W., Wong, L.L., Tse, E.Y., Liu, H.F., Leong, V.Y., Lee, J.M., Hardie, D.G., Ng, I.O., and Ching, Y.P. (2012). AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer research* 72, 4394-4404.
- Lee, J., Kim, J.A., Margolis, R.L., and Fotedar, R. (2010). Substrate degradation by the anaphase promoting complex occurs during mitotic slippage. *Cell cycle* 9, 1792-1801.
- Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.H., Shong, M., Kim, J.M., Kim, J., *et al.* (2007). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 447, 1017-1020.
- Lee, S.W., Li, C.F., Jin, G., Cai, Z., Han, F., Chan, C.H., Yang, W.L., Li, B.K., Rezaeian, A.H., Li, H.Y., *et al.* (2015). Skp2-dependent ubiquitination and activation of LKB1 is essential for cancer cell survival under energy stress. *Molecular cell* 57, 1022-1033.
- Li, F., McNelis, M.R., Lustig, K., and Gerdes, A.M. (1997a). Hyperplasia and hypertrophy of chicken cardiac myocytes during posthatching development. *The American journal of physiology* 273, R518-526.
- Li, F., Wang, X., Bunger, P.C., and Gerdes, A.M. (1997b). Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 1541-1551.
- Li, F., Wang, X., and Gerdes, A.M. (1997c). Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organisation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 1553-1565.
- Li, J., Liu, J., Li, P., Mao, X., Li, W., Yang, J., and Liu, P. (2014). Loss of LKB1 disrupts breast epithelial cell polarity and promotes breast cancer metastasis and invasion. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR 33, 70.
- Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V., and Taub, R. (2002). STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *The Journal of biological chemistry* 277, 28411-28417.
- Liang, X., Nan, K.J., Li, Z.L., and Xu, Q.Z. (2009). Overexpression of the LKB1 gene inhibits lung carcinoma cell proliferation partly through degradation of c-myc protein. *Oncology reports* 21, 925-931.

- Liang, X., Wang, P., Gao, Q., Xiang, T., and Tao, X. (2010). Endogenous LKB1 knockdown accelerates G(1)/S transition through p53 and p16 pathways. *Cancer biology & therapy* 9, 156-160.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine* 6, 1348-1354.
- Liu, B., Bell, A.W., Paranjpe, S., Bowen, W.C., Khillan, J.S., Luo, J.H., Mars, W.M., and Michalopoulos, G.K. (2010a). Suppression of liver regeneration and hepatocyte proliferation in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice. *Hepatology* 52, 1060-1067.
- Liu, B., Paranjpe, S., Bowen, W.C., Bell, A.W., Luo, J.H., Yu, Y.P., Mars, W.M., and Michalopoulos, G.K. (2009). Investigation of the role of glypican 3 in liver regeneration and hepatocyte proliferation. *The American journal of pathology* 175, 717-724.
- Liu, L., Siu, F.M., Che, C.M., Xu, A., and Wang, Y. (2012). Akt blocks the tumor suppressor activity of LKB1 by promoting phosphorylation-dependent nuclear retention through 14-3-3 proteins. *American journal of translational research* 4, 175-186.
- Liu, Z., Yue, S., Chen, X., Kubin, T., and Braun, T. (2010b). Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circulation research* 106, 1498-1506.
- Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G., *et al.* (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO journal* 23, 833-843.
- Lochhead, P.A., Salt, I.P., Walker, K.S., Hardie, D.G., and Sutherland, C. (2000). 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49, 896-903.
- Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* 112, 3164-3174.
- Loutit, J.F., and Nisbet, N.W. (1982). The Origin of Osteoclasts. *Immunobiology* 161, 193-203.
- Lu, P., Prost, S., Caldwell, H., Tugwood, J.D., Betton, G.R., and Harrison, D.J. (2007). Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 18, 617-626.

- M -

- Ma, L.G., Bian, S.B., Cui, J.X., Xi, H.Q., Zhang, K.C., Qin, H.Z., Zhu, X.M., and Chen, L. (2016). LKB1 inhibits the proliferation of gastric cancer cells by suppressing the nuclear translocation of Yap and beta-catenin. *International journal of molecular medicine* 37, 1039-1048.
- Mable, B.K., Alexandrou, M.A., and Taylor, M.I. (2011). Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. *Journal of Zoology* 284, 151-182.
- Madra, S., Styles, J., and Smith, A.G. (1995). Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSn mice during carcinogenesis. *Carcinogenesis* 16, 719-727.
- Malik, R., Selden, C., and Hodgson, H. (2002). The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Seminars in cell & developmental biology* 13, 425-431.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Margall-Ducos, G., Celton-Morizur, S., Couton, D., Bregerie, O., and Desdouets, C. (2007). Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *Journal of cell science* 120, 3633-3639.
- Martin, S.G., and St Johnston, D. (2003). A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature* 421, 379-384.
- Martinez-Lopez, N., Varela-Rey, M., Fernandez-Ramos, D., Woodhoo, A., Vazquez-Chantada, M., Embade, N., Espinosa-Hevia, L., Bustamante, F.J., Parada, L.A., Rodriguez, M.S., *et al.* (2010). Activation of LKB1-Akt pathway independent of phosphoinositide 3-kinase plays a critical role in the proliferation of hepatocellular carcinoma from nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 52, 1621-1631.
- Mato, J.M., Martinez-Chantar, M.L., and Lu, S.C. (2013). S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. *Annals of hepatology* 12, 183-189.
- Mc Gee, M.M. (2015). Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators of inflammation* 2015, 146282.
- Meadows, J.C., and Millar, J.B. (2015). Sharpening the anaphase switch. *Biochemical Society transactions* 43, 19-22.
- Mehenni, H., Resta, N., Park, J.G., Miyaki, M., Guanti, G., and Costanza, M.C. (2006). Cancer risks in LKB1 germline mutation carriers. *Gut* 55, 984-990.

- Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2014). AMPK α 1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. *Journal of hepatology* 60, 152-159.
- Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *The American journal of physiology* 273, E1107-1112.
- Meserve, J.H., and Duronio, R.J. (2012). Atypical E2Fs drive atypical cell cycles. *Nature cell biology* 14, 1124-1125.
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., *et al.* (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403, 785-789.
- Mian, I., Pierre-Louis, W.S., Dole, N., Gilberti, R.M., Dodge-Kafka, K., and Tirnauer, J.S. (2012). LKB1 destabilizes microtubules in myoblasts and contributes to myoblast differentiation. *PloS one* 7, e31583.
- Michalopoulos, G.K. (2017). Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 65, 1384-1392.
- Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* 276, 60-66.
- Miettinen, T.P., Pessa, H.K., Caldez, M.J., Fuhrer, T., Diril, M.K., Sauer, U., Kaldis, P., and Bjorklund, M. (2014). Identification of transcriptional and metabolic programs related to mammalian cell size. *Current biology : CB* 24, 598-608.
- Mitchellhill, K.I., Michell, B.J., House, C.M., Stapleton, D., Dyck, J., Gamble, J., Ullrich, C., Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1997). Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase β 1 subunit. *The Journal of biological chemistry* 272, 24475-24479.
- Mitchell, C., and Willenbring, H. (2008). A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature protocols* 3, 1167-1170.
- Miyaoka, Y., Ebato, K., Kato, H., Arakawa, S., Shimizu, S., and Miyajima, A. (2012). Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current biology : CB* 22, 1166-1175.
- Mohseni, M., Sun, J., Lau, A., Curtis, S., Goldsmith, J., Fox, V.L., Wei, C., Frazier, M., Samson, O., Wong, K.K., *et al.* (2014). A genetic screen identifies an LKB1-MARK signalling axis controlling the Hippo-YAP pathway. *Nature cell biology* 16, 108-117.
- Monga, S.P., Padiaditakis, P., Mule, K., Stolz, D.B., and Michalopoulos, G.K. (2001). Changes in WNT/ β -catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* 33, 1098-1109.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews Cancer* 10, 550-560.
- Morgan, E.T., Li-Masters, T., and Cheng, P.Y. (2002). Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology* 181-182, 207-210.
- Morton, J.P., Jamieson, N.B., Karim, S.A., Athineos, D., Ridgway, R.A., Nixon, C., McKay, C.J., Carter, R., Brunton, V.G., Frame, M.C., *et al.* (2010). LKB1 haploinsufficiency cooperates with Kras to promote pancreatic cancer through suppression of p21-dependent growth arrest. *Gastroenterology* 139, 586-597, 597 e581-586.
- Mullins, J.M., and Biesele, J.J. (1977). Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *The Journal of cell biology* 73, 672-684.
- Muramatsu, Y., Yamada, T., Moralejo, D.H., Mochizuki, H., Sogawa, K., and Matsumoto, K. (2000). Increased polyploid incidence is associated with abnormal copper accumulation in the liver of LEC mutant rat. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* 107, 129-136.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 379-393.
- Musch, A. (2014). The unique polarity phenotype of hepatocytes. *Experimental cell research* 328, 276-283.

- N -

- Nadal, C., and Zajdela, F. (1967). [Hepatic polyploidy in the rat. IV. Experimental changes in the nucleolar volume of liver cells and their mechanisms of regulation]. *Experimental cell research* 48, 518-528.
- Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* 468, 653-658.
- Nakano, A., and Takashima, S. (2012). LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 17, 737-747.
- Nakatani, T., Inouye, M., and Mirochnitchenko, O. (1997). Overexpression of antioxidant enzymes in transgenic mice decreases cellular ploidy during liver regeneration. *Experimental cell research* 236, 137-146.
- Nakau, M., Miyoshi, H., Seldin, M.F., Imamura, M., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2002). Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice. *Cancer research* 62, 4549-4553.

- Nakayama, Y., and Inoue, T. (2016). Antiproliferative Fate of the Tetraploid Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons. *Molecules* 21.
- Nakayama, Y., Soeda, S., Ikeuchi, M., Kakae, K., and Yamaguchi, N. (2017). Cytokinesis Failure Leading to Chromosome Instability in v-Src-Induced Oncogenesis. *International journal of molecular sciences* 18.
- Naora, H. (1957). Microspectrophotometry of cell nuclei stained with the Feulgen reaction. IV. Formation of tetraploid nuclei in rat liver cells during postnatal growth. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 3, 949-975.
- Narbonne-Reveau, K., Senger, S., Pal, M., Herr, A., Richardson, H.E., Asano, M., Deak, P., and Lilly, M.A. (2008). APC/CFzr/Cdh1 promotes cell cycle progression during the Drosophila endocycle. *Development* 135, 1451-1461.
- Nault, J.C., Calderaro, J., Di Tommaso, L., Balabaud, C., Zafrani, E.S., Bioulac-Sage, P., Roncalli, M., and Zucman-Rossi, J. (2014). Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology* 60, 1983-1992.
- Nelson, W.J., Dickinson, D.J., and Weis, W.I. (2013). Roles of cadherins and catenins in cell-cell adhesion and epithelial cell polarity. *Progress in molecular biology and translational science* 116, 3-23.
- Nezi, L., and Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Current opinion in cell biology* 21, 785-795.
- Ng, R., Song, G., Roll, G.R., Frandsen, N.M., and Willenbring, H. (2012). A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *The Journal of clinical investigation* 122, 1097-1108.
- Nony, P., Gaude, H., Rossel, M., Fournier, L., Rouault, J.P., and Billaud, M. (2003). Stability of the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1 requires its binding to the molecular chaperones Hsp90/Cdc37. *Oncogene* 22, 9165-9175.

- O -

- O'Brien, S.J., Menninger, J.C., and Nash, W.G. (2006). *Atlas of Mammalian Chromosomes* (Wiley).
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332, 1433-1435.
- Ogle, B.M., Cascalho, M., and Platt, J.L. (2005). Biological implications of cell fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 567-575.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication* (Springer-Verlag).
- Ohno, S. (1999). Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Seminars in cell & developmental biology* 10, 517-522.
- Oparil, S., Bishop, S.P., and Clubb, F.J., Jr. (1984). Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. *Hypertension* 6, III38-43.
- Orr, H.A. (1990). "Why Polyploidy is Rarer in Animals Than in Plants" Revisited. *The American Naturalist* 136, 759-770.
- Otto, S.P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131, 452-462.
- Otto, S.P., and Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics* 34, 401-437.
- Ouseph, M.M., Li, J., Chen, H.Z., Pecot, T., Wenzel, P., Thompson, J.C., Comstock, G., Chokshi, V., Byrne, M., Forde, B., et al. (2012). Atypical E2F repressors and activators coordinate placental development. *Developmental cell* 22, 849-862.

- P -

- Pacquelet, A., Uhart, P., Tassan, J.P., and Michaux, G. (2015). PAR-4 and anillin regulate myosin to coordinate spindle and furrow position during asymmetric division. *The Journal of cell biology* 210, 1085-1099.
- Pajvani, U.B., Qiang, L., Kangsamaksin, T., Kitajewski, J., Ginsberg, H.N., and Accili, D. (2013). Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability. *Nature medicine* 19, 1054-1060.
- Pajvani, U.B., Shawber, C.J., Samuel, V.T., Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., Kitajewski, J., and Accili, D. (2011). Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. *Nature medicine* 17, 961-967.
- Pandit, S.K., Westendorp, B., and de Bruin, A. (2013). Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends in cell biology* 23, 556-566.
- Pandit, S.K., Westendorp, B., Nantasanti, S., van Lie, E., Tooten, P.C., Cornelissen, P.W., Toussaint, M.J., Lamers, W.H., and de Bruin, A. (2012). E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nature cell biology* 14, 1181-1191.

- Paranjpe, S., Bowen, W.C., Mars, W.M., Orr, A., Haynes, M.M., DeFrances, M.C., Liu, S., Tseng, G.C., Tsagianni, A., and Michalopoulos, G.K. (2016). Combined systemic elimination of MET and epidermal growth factor receptor signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation. *Hepatology* 64, 1711-1724.
- Parisi, T., Beck, A.R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z., and Amati, B. (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *The EMBO journal* 22, 4794-4803.
- Partanen, J.I., Tervonen, T.A., Myllynen, M., Lind, E., Imai, M., Katajisto, P., Dijkgraaf, G.J., Kovanen, P.E., Makela, T.P., Werb, Z., *et al.* (2012). Tumor suppressor function of Liver kinase B1 (Lkb1) is linked to regulation of epithelial integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E388-397.
- Patel, K., Foretz, M., Marion, A., Campbell, D.G., Gourlay, R., Boudaba, N., Tournier, E., Titchenell, P., Peggie, M., Deak, M., *et al.* (2014). The LKB1-salt-inducible kinase pathway functions as a key gluconeogenic suppressor in the liver. *Nature communications* 5, 4535.
- Paul, I., Bhattacharya, S., Chatterjee, A., and Ghosh, M.K. (2013). Current Understanding on EGFR and Wnt/beta-Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. *Genes & cancer* 4, 427-446.
- Peutz, J. (1921). Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentations of skin and mucous membrane. *Nederl Maandschr Geneesk* 10, 134-146.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 427-438.
- Podbilewicz, B. (2014). Virus and cell fusion mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology* 30, 111-139.
- Porat-Shliom, N., Tietgens, A.J., Van Itallie, C.M., Vitale-Cross, L., Jarnik, M., Harding, O.J., Anderson, J.M., Gutkind, J.S., Weigert, R., and Arias, I.M. (2016). Liver kinase B1 regulates hepatocellular tight junction distribution and function in vivo. *Hepatology* 64, 1317-1329.
- Presneau, N., Duhamel, L.A., Ye, H., Tirabosco, R., Flanagan, A.M., and Eskandarpour, M. (2017). Post-translational regulation contributes to the loss of LKB1 expression through SIRT1 deacetylase in osteosarcomas. *British journal of cancer* 117, 398-408.
- Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nature reviews Molecular cell biology* 18, 187-201.

- Q -

- Qjao, D.D., Yang, J., Lei, X.F., Mi, G.L., Li, S.L., Li, K., Xu, C.Q., and Yang, H.L. (2017). Expression of microRNA-122 and microRNA-22 in HBV-related liver cancer and the correlation with clinical features. *European review for medical and pharmacological sciences* 21, 742-747.

- R -

- Raff, J.W., Jeffers, K., and Huang, J.Y. (2002). The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *The Journal of cell biology* 157, 1139-1149.
- Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Loughed, W.M., and Lotto, W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *The Anatomical record* 119, 11-33.
- Raslova, H., Kauffmann, A., Sekkai, D., Ripoché, H., Larbret, F., Robert, T., Tronik Le Roux, D., Kroemer, G., Debili, N., Dessen, P., *et al.* (2007). Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood* 109, 3225-3234.
- Ritho, J., Arold, S.T., and Yeh, E.T. (2015). A Critical SUMO1 Modification of LKB1 Regulates AMPK Activity during Energy Stress. *Cell reports* 12, 734-742.
- Rizvi, A.Z., Swain, J.R., Davies, P.S., Bailey, A.S., Decker, A.D., Willenbring, H., Grompe, M., Fleming, W.H., and Wong, M.H. (2006). Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6321-6325.
- Robinson, M.W., Harmon, C., and O'Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular & molecular immunology* 13, 267-276.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.
- Rossi, D.J., Ylikorkala, A., Korsisaari, N., Salovaara, R., Luukko, K., Launonen, V., Henkemeyer, M., Ristimäki, A., Aaltonen, L.A., and Makela, T.P. (2002). Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12327-12332.

- Roy, A., Lordier, L., Mazzi, S., Chang, Y., Lapierre, V., Larghero, J., Debili, N., Raslova, H., and Vainchenker, W. (2016). Activity of nonmuscle myosin II isoforms determines localization at the cleavage furrow of megakaryocytes. *Blood* 128, 3137-3145.
- Rudnick, D.A., and Davidson, N.O. (2012). Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *International journal of hepatology* 2012, 549241.
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology* 4, 177-197.

- S -

- Sanchez-Cespedes, M. (2011). The role of LKB1 in lung cancer. *Familial cancer* 10, 447-453.
- Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer research* 62, 3659-3662.
- Sapkota, G.P., Boudeau, J., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., and Alessi, D.R. (2002a). Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome. *The Biochemical journal* 362, 481-490.
- Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P., and Alessi, D.R. (2002b). Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *The Biochemical journal* 368, 507-516.
- Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M., and Alessi, D.R. (2001). Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell growth. *The Journal of biological chemistry* 276, 19469-19482.
- Scheving, L.A., Zhang, X., Stevenson, M.C., Threadgill, D.W., and Russell, W.E. (2015). Loss of hepatocyte EGFR has no effect alone but exacerbates carbon tetrachloride-induced liver injury and impairs regeneration in hepatocyte Met-deficient mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 308, G364-377.
- Schughart, K., Pravtcheva, D., Newman, M.S., Hunihan, L.W., Jiang, Z.L., and Ruddle, F.H. (1989). Isolation and regional localization of the murine homeobox-containing gene Hox-3.3 to mouse chromosome region 15E. *Genomics* 5, 76-83.
- Schwayer, C., Sikora, M., Slovakova, J., Kardos, R., and Heisenberg, C.P. (2016). Actin Rings of Power. *Developmental cell* 37, 493-506.
- Screaton, R.A., Conkright, M.D., Katoh, Y., Best, J.L., Canettieri, G., Jeffries, S., Guzman, E., Niessen, S., Yates, J.R., 3rd, Takemori, H., et al. (2004). The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119, 61-74.
- Sebbagh, M., Olschwang, S., Santoni, M.J., and Borg, J.P. (2011). The LKB1 complex-AMPK pathway: the tree that hides the forest. *Familial cancer* 10, 415-424.
- Sebbagh, M., Santoni, M.J., Hall, B., Borg, J.P., and Schwartz, M.A. (2009). Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin. *Current biology : CB* 19, 37-42.
- Seglen, P.O. (1997). DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell biology and toxicology* 13, 301-315.
- Seitz, H.K., and Stickel, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* 7, 599-612.
- Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature reviews Cancer* 9, 563-575.
- Shan, T., Zhang, P., Liang, X., Bi, P., Yue, F., and Kuang, S. (2014). Lkb1 is indispensable for skeletal muscle development, regeneration, and satellite cell homeostasis. *Stem cells* 32, 2893-2907.
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3329-3335.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., Montminy, M., and Cantley, L.C. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310, 1642-1646.
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., and Poo, M.M. (2007). LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565-577.
- Shelly, M., and Poo, M.M. (2011). Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization. *Developmental neurobiology* 71, 508-527.
- Shi, Q., and King, R.W. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, 1038-1042.

- Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annual review of cell and developmental biology* 22, 207-235.
- Shirnekhi, H.K., Kelley, E.P., DeLuca, J.G., and Herman, J.A. (2017). Spindle assembly checkpoint signaling and sister chromatid cohesion are disrupted by HPV E6-mediated transformation. *Molecular biology of the cell* 28, 2035-2041.
- Shorning, B.Y., and Clarke, A.R. (2011). LKB1 loss of function studied in vivo. *FEBS letters* 585, 958-966.
- Shulman, J.M., Benton, R., and St Johnston, D. (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 101, 377-388.
- Siegrist, S.E., and Doe, C.Q. (2005). Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell* 123, 1323-1335.
- Sigal, S.H., Rajvanshi, P., Gorla, G.R., Sokhi, R.P., Saxena, R., Gebhard, D.R., Jr., Reid, L.M., and Gupta, S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *The American journal of physiology* 276, G1260-1272.
- Sigrist, S.J., and Lehner, C.F. (1997). *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* 90, 671-681.
- Slim, C.L., Lazaro-Dieuez, F., Bijlard, M., Toussaint, M.J., de Bruin, A., Du, Q., Musch, A., and van Ijzendoorn, S.C. (2013). Par1b induces asymmetric inheritance of plasma membrane domains via LGN-dependent mitotic spindle orientation in proliferating hepatocytes. *PLoS biology* 11, e1001739.
- Slim, C.L., van, I.S.C., Lazaro-Dieuez, F., and Musch, A. (2014). The special case of hepatocytes: unique tissue architecture calls for a distinct mode of cell division. *Bioarchitecture* 4, 47-52.
- Smedsrod, B., De Bleser, P.J., Braet, F., Lovisetti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., and Geerts, A. (1994). Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 35, 1509-1516.
- Smith, D.P., Rayter, S.I., Niederlander, C., Spicer, J., Jones, C.M., and Ashworth, A. (2001). LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Human molecular genetics* 10, 2869-2877.
- Smith, D.P., Spicer, J., Smith, A., Swift, S., and Ashworth, A. (1999). The mouse Peutz-Jeghers syndrome gene *Lkb1* encodes a nuclear protein kinase. *Human molecular genetics* 8, 1479-1485.
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research* 108, 73-112.
- Soltis, P.S., and Soltis, D.E. (2016). Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Current opinion in plant biology* 30, 159-165.
- Somiya, M., Sasaki, Y., Matsuzaki, T., Liu, Q., Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., Maturana, A.D., and Kuroda, S. (2015). Intracellular trafficking of bio-nanocapsule-liposome complex: Identification of fusogenic activity in the pre-S1 region of hepatitis B virus surface antigen L protein. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 212, 10-18.
- Song, P., Xie, Z., Wu, Y., Xu, J., Dong, Y., and Zou, M.H. (2008). Protein kinase Czeta-dependent LKB1 serine 428 phosphorylation increases LKB1 nucleus export and apoptosis in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 12446-12455.
- Sottile, F., Aulicino, F., Theka, I., and Cosma, M.P. (2016). Mesenchymal stem cells generate distinct functional hybrids in vitro via cell fusion or entosis. *Scientific reports* 6, 36863.
- Steigemann, P., and Gerlich, D.W. (2009). An evolutionary conserved checkpoint controls abscission timing. *Cell cycle* 8, 1814-1815.
- Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136, 473-484.
- Steinberg, G.R. (2009). Role of the AMP-activated protein kinase in regulating fatty acid metabolism during exercise. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 34, 315-322.
- Stephenne, X., Foretz, M., Taleux, N., van der Zon, G.C., Sokal, E., Hue, L., Viollet, B., and Guigas, B. (2011). Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* 54, 3101-3110.
- Stocker, E., and Heine, W.D. (1971). Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitrage zur Pathologie* 144, 400-408.
- Stolz, D.B., Mars, W.M., Petersen, B.E., Kim, T.H., and Michalopoulos, G.K. (1999). Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer research* 59, 3954-3960.
- Strazzabosco, M., and Fabris, L. (2008). Functional anatomy of normal bile ducts. *Anatomical record* 291, 653-660.
- Su, G.H., Hruban, R.H., Bansal, R.K., Bova, G.S., Tang, D.J., Shekher, M.C., Westerman, A.M., Entius, M.M., Goggins, M., Yeo, C.J., et al. (1999). Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *The American journal of pathology* 154, 1835-1840.
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer research* 55, 2972-2977.

- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology* 154, 925-936.
- Sudakin, V., Ganioth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular biology of the cell* 6, 185-197.
- Sudo, T., Nitta, M., Saya, H., and Ueno, N.T. (2004). Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer research* 64, 2502-2508.

- T -

- Tachibana, I., and Hemler, M.E. (1999). Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *The Journal of cell biology* 146, 893-904.
- Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (2000). Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *Journal of virology* 74, 5066-5074.
- Talarmin, H., Rescan, C., Cariou, S., Glaize, D., Zanninelli, G., Bilodeau, M., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C., and Baffet, G. (1999). The mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Molecular and cellular biology* 19, 6003-6011.
- Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrellos, E., Luo, J.H., Ranganathan, S., Monga, D.K., Bell, A., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P. (2005). Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in liver. *Gastroenterology* 129, 285-302.
- Tan, X., Behari, J., Cieply, B., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P. (2006). Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 131, 1561-1572.
- Tanaka, S., Arii, S., Yasen, M., Mogushi, K., Su, N.T., Zhao, C., Imoto, I., Eishi, Y., Inazawa, J., Miki, Y., *et al.* (2008). Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *The British journal of surgery* 95, 611-619.
- Tanwar, P.S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L., and Teixeira, J.M. (2012). Altered LKB1/AMPK/TSC1/TSC2/mTOR signaling causes disruption of Sertoli cell polarity and spermatogenesis. *Human molecular genetics* 21, 4394-4405.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I., and Miki, T. (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *The Journal of cell biology* 147, 921-928.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 836-847.
- Taylor, M.V. (2000). Muscle development: molecules of myoblast fusion. *Current biology : CB* 10, R646-648.
- Thaiparambil, J.T., Eggers, C.M., and Marcus, A.I. (2012). AMPK regulates mitotic spindle orientation through phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Molecular and cellular biology* 32, 3203-3217.
- Thery, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.B., and Bornens, M. (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature cell biology* 7, 947-953.
- Thompson, M.D., and Monga, S.P. (2007). WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 45, 1298-1305.
- Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A., and Makela, T.P. (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Human molecular genetics* 11, 1497-1504.
- Tiainen, M., Ylikorkala, A., and Makela, T.P. (1999). Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9248-9251.
- Tomancak, P., Piano, F., Riechmann, V., Gunsalus, K.C., Kempfues, K.J., and Ephrussi, A. (2000). A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nature cell biology* 2, 458-460.
- Tomita, K., Haga, H., Mizuno, K., Katsumi, T., Sato, C., Okumoto, K., Nishise, Y., Watanabe, H., Saito, T., and Ueno, Y. (2014). Epiregulin promotes the emergence and proliferation of adult liver progenitor cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 307, G50-57.
- Tormos, A.M., Talens-Visconti, R., and Sastre, J. (2015). Regulation of cytokinesis and its clinical significance. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 52, 159-167.
- Torre, C., Benhamouche, S., Mitchell, C., Godard, C., Veber, P., Letourneur, F., Cagnard, N., Jacques, S., Finzi, L., Perret, C., *et al.* (2011). The transforming growth factor-alpha and cyclin D1 genes are direct targets of beta-catenin signaling in hepatocyte proliferation. *Journal of hepatology* 55, 86-95.
- Toyoda, H., Bregerie, O., Vallet, A., Nalpas, B., Pivert, G., Brechot, C., and Desdouets, C. (2005). Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* 54, 297-302.

- Toyoda, H., Kumada, T., Bregerie, O., Brechot, C., and Desdouets, C. (2006). Conserved balance of hepatocyte nuclear DNA content in mononuclear and binuclear hepatocyte populations during the course of chronic viral hepatitis. *World journal of gastroenterology* 12, 4546-4548.
- Tran, T.Q., Lowman, X.H., Reid, M.A., Mendez-Dorantes, C., Pan, M., Yang, Y., and Kong, M. (2017). Tumor-associated mutant p53 promotes cancer cell survival upon glutamine deprivation through p21 induction. *Oncogene* 36, 1991-2001.
- Trapp, E.K., Majunke, L., Zill, B., Sommer, H., Andergassen, U., Koch, J., Harbeck, N., Mahner, S., Friedl, T.W.P., Janni, W., *et al.* (2017). LKB1 pro-oncogenic activity triggers cell survival in circulating tumor cells. *Molecular oncology*.
- Treyer, A., and Musch, A. (2013). Hepatocyte polarity. *Comprehensive Physiology* 3, 243-287.
- Tsai, W.C., Hsu, P.W., Lai, T.C., Chau, G.Y., Lin, C.W., Chen, C.M., Lin, C.D., Liao, Y.L., Wang, J.L., Chau, Y.P., *et al.* (2009). MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49, 1571-1582.
- Tsai, W.C., Hsu, S.D., Hsu, C.S., Lai, T.C., Chen, S.J., Shen, R., Huang, Y., Chen, H.C., Lee, C.H., Tsai, T.F., *et al.* (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *The Journal of clinical investigation* 122, 2884-2897.

- U -

- Ullah, Z., Kohn, M.J., Yagi, R., Vassilev, L.T., and DePamphilis, M.L. (2008). Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. *Genes & development* 22, 3024-3036.
- Ullah, Z., Lee, C.Y., and Depamphilis, M.L. (2009). Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell division* 4, 10.

- V -

- Van de Peer, Y., Fawcett, J.A., Proost, S., Sterck, L., and Vandepoele, K. (2009). The flowering world: a tale of duplications. *Trends in plant science* 14, 680-688.
- Van de Peer, Y., Mizrachi, E., and Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature reviews Genetics* 18, 411-424.
- van der Heijden, F.L., and James, J. (1975). Polyploidy in the human myometrium. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung* 89, 18-26.
- van Leuken, R., Clijsters, L., and Wolthuis, R. (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochimica et biophysica acta* 1786, 49-59.
- van Lier, M.G., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E.M., Kuipers, E.J., Steyerberg, E.W., and van Leerdam, M.E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *The American journal of gastroenterology* 105, 1258-1264; author reply 1265.
- Varela-Rey, M., Fernandez-Ramos, D., Martinez-Lopez, N., Embade, N., Gomez-Santos, L., Beraza, N., Vazquez-Chantada, M., Rodriguez, J., Luka, Z., Wagner, C., *et al.* (2009). Impaired liver regeneration in mice lacking glycine N-methyltransferase. *Hepatology* 50, 443-452.
- Vassilopoulos, G., Wang, P.R., and Russell, D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-904.
- Vazquez-Chantada, M., Ariz, U., Varela-Rey, M., Embade, N., Martinez-Lopez, N., Fernandez-Ramos, D., Gomez-Santos, L., Lamas, S., Lu, S.C., Martinez-Chantar, M.L., *et al.* (2009). Evidence for LKB1/AMP-activated protein kinase/ endothelial nitric oxide synthase cascade regulated by hepatocyte growth factor, S-adenosylmethionine, and nitric oxide in hepatocyte proliferation. *Hepatology* 49, 608-617.
- Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraro, C., and Menendez, J.A. (2009). The active form of the metabolic sensor: AMP-activated protein kinase (AMPK) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. *Cell cycle* 8, 2385-2398.
- Vignery, A. (2005). Macrophage fusion: are somatic and cancer cells possible partners? *Trends in cell biology* 15, 188-193.
- Vinciguerra, P., Godinho, S.A., Parmar, K., Pellman, D., and D'Andrea, A.D. (2010). Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *The Journal of clinical investigation* 120, 3834-3842.
- Vinken, M., Papeleu, P., Snykers, S., De Rop, E., Henkens, T., Chipman, J.K., Rogiers, V., and Vanhaecke, T. (2006). Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality. *Critical reviews in toxicology* 36, 299-318.
- Vorhagen, S., and Niessen, C.M. (2014). Mammalian aPKC/Par polarity complex mediated regulation of epithelial division orientation and cell fate. *Experimental cell research* 328, 296-302.

- Wang, M.J., Chen, F., Lau, J.T.Y., and Hu, Y.P. (2017). Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell death & disease* **8**, e2805.
- Wang, M.J., Chen, F., Li, J.X., Liu, C.C., Zhang, H.B., Xia, Y., Yu, B., You, P., Xiang, D., Lu, L., *et al.* (2014a). Reversal of hepatocyte senescence after continuous in vivo cell proliferation. *Hepatology* **60**, 349-361.
- Wang, S.C., Lin, X.L., Li, J., Zhang, T.T., Wang, H.Y., Shi, J.W., Yang, S., Zhao, W.T., Xie, R.Y., Wei, F., *et al.* (2014b). MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA. *PloS one* **9**, e101330.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901.
- Wang, Y.S., Chen, J., Cui, F., Wang, H., Wang, S., Hang, W., Zeng, Q., Quan, C.S., Zhai, Y.X., Wang, J.W., *et al.* (2016). LKB1 is a DNA damage response protein that regulates cellular sensitivity to PARP inhibitors. *Oncotarget* **7**, 73389-73401.
- Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J., and Kempthues, K.J. (2000). The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* **127**, 1467-1475.
- Weaver, B.A., and Cleveland, D.W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell* **8**, 7-12.
- Webber, E.M., FitzGerald, M.J., Brown, P.I., Bartlett, M.H., and Fausto, N. (1993). Transforming growth factor- α expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor- α and hepatocyte growth factor. *Hepatology* **18**, 1422-1431.
- Weglarz, T.C., Degen, J.L., and Sandgren, E.P. (2000). Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. *The American journal of pathology* **157**, 1963-1974.
- Wei, C., Bhattaram, V.K., Igwe, J.C., Fleming, E., and Tirnauer, J.S. (2012). The LKB1 tumor suppressor controls spindle orientation and localization of activated AMPK in mitotic epithelial cells. *PloS one* **7**, e41118.
- Weibel, E.R., Staubli, W., Gnagi, H.R., and Hess, F.A. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *The Journal of cell biology* **42**, 68-91.
- Werle, K., Chen, J., Xu, H.G., Zhao, R.X., He, Q., Lu, C., Cui, R., Liang, J., Li, Y.L., and Xu, Z.X. (2014). Liver kinase B1 regulates the centrosome via PLK1. *Cell death & disease* **5**, e1157.
- White, A.E., Livanos, E.M., and Tlsty, T.D. (1994). Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes & development* **8**, 666-677.
- Willkomm, L., and Bloch, W. (2015). State of the art in cell-cell fusion. *Methods in molecular biology* **1313**, 1-19.
- Wilson, J.W., and Leduc, E.H. (1948). The occurrence and formation of binucleate and multinucleate cells and polyploid nuclei in the mouse liver. *The American journal of anatomy* **82**, 353-391.
- Wingo, S.N., Gallardo, T.D., Akbay, E.A., Liang, M.C., Contreras, C.M., Boren, T., Shimamura, T., Miller, D.S., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., *et al.* (2009). Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PloS one* **4**, e5137.
- Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of ultrastructure research* **31**, 125-150.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., and Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism* **2**, 21-33.
- Woods, A., Heslegrave, A.J., Muckett, P.J., Levene, A.P., Clements, M., Mobberley, M., Ryder, T.A., Abu-Hayyeh, S., Williamson, C., Goldin, R.D., *et al.* (2011). LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice. *The Biochemical journal* **434**, 49-60.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology : CB* **13**, 2004-2008.
- Wu, Y., and Griffin, E.E. (2017). Regulation of Cell Polarity by PAR-1/MARK Kinase. *Current topics in developmental biology* **123**, 365-397.

- X -

Xia, R., Chen, S., Chen, Y., Zhang, W., Zhu, R., and Deng, A. (2015). A chromosomal passenger complex protein signature model predicts poor prognosis for non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy* **8**, 721-726.

- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., *et al.* (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* *472*, 230-233.
- Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.H. (2008). Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* *117*, 952-962.
- Xie, Z., Dong, Y., Zhang, J., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.H. (2009). Identification of the serine 307 of LKB1 as a novel phosphorylation site essential for its nucleocytoplasmic transport and endothelial cell angiogenesis. *Molecular and cellular biology* *29*, 3582-3596.
- Xu, H., He, J.H., Xiao, Z.D., Zhang, Q.Q., Chen, Y.Q., Zhou, H., and Qu, L.H. (2010). Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. *Hepatology* *52*, 1431-1442.

- Y -

- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., and Fujisawa-Sehara, A. (1995). A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* *377*, 652-656.
- Yamada, T., Sogawa, K., Kim, J.K., Izumi, K., Suzuki, Y., Muramatsu, Y., Sumida, T., Hamakawa, H., and Matsumoto, K. (1998). Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* *99*, 283-304.
- Yanagimachi, R., and Noda, Y.D. (1970). Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *Journal of ultrastructure research* *31*, 486-493.
- Yang, B., and Bankir, L. (2005). Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *American journal of physiology Renal physiology* *288*, F881-896.
- Yang, J., Sun, L., Wang, L., Hassan, H.M., Wang, X., Hylemon, P.B., Wang, T., Zhou, H., Zhang, L., and Jiang, Z. (2017). Activation of Sirt1/FXR Signaling Pathway Attenuates Triptolide-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Frontiers in pharmacology* *8*, 260.
- Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., and Camargo, F.D. (2014). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* *157*, 1324-1338.
- Ylikorkala, A., Rossi, D.J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M., and Makela, T.P. (2001). Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science* *293*, 1323-1326.
- Yosef, R., Pilpel, N., Papismadov, N., Gal, H., Ovadya, Y., Vadai, E., Miller, S., Porat, Z., Ben-Dor, S., and Krizhanovsky, V. (2017). p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *The EMBO journal*.
- Yuce, O., Pickny, A., and Glotzer, M. (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *The Journal of cell biology* *170*, 571-582.

- Z -

- Zeng, P.Y., and Berger, S.L. (2006). LKB1 is recruited to the p21/WAF1 promoter by p53 to mediate transcriptional activation. *Cancer research* *66*, 10701-10708.
- Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Deak, M., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M. (2009a). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* *326*, 1707-1711.
- Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Goldie, S., Navratilova, I., Boudeau, J., Deak, M., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M. (2009b). ATP and MO25alpha regulate the conformational state of the STRADalpha pseudokinase and activation of the LKB1 tumour suppressor. *PLoS biology* *7*, e1000126.
- Zhang, J., Guo, W.H., and Wang, Y.L. (2014). Microtubules stabilize cell polarity by localizing rear signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 16383-16388.
- Zhang, L., Li, J., Young, L.H., and Caplan, M.J. (2006). AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 17272-17277.
- Zhang, Y., Jiang, C., Li, H., Lv, F., Li, X., Qian, X., Fu, L., Xu, B., and Guo, X. (2015). Elevated Aurora B expression contributes to chemoresistance and poor prognosis in breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* *8*, 751-757.
- Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K.L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature cell biology* *13*, 877-883.

- Zhao, J.W., Fang, F., Guo, Y., Zhu, T.L., Yu, Y.Y., Kong, F.F., Han, L.F., Chen, D.S., and Li, F. (2016). HPV16 integration probably contributes to cervical oncogenesis through interrupting tumor suppressor genes and inducing chromosome instability. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR 35, 180.
- Zheng, B., and Cantley, L.C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 819-822.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., *et al.* (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation* 108, 1167-1174.
- Zimmet, J., and Ravid, K. (2000). Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Experimental hematology* 28, 3-16.
- Zu, Y., Liu, L., Lee, M.Y., Xu, C., Liang, Y., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M., and Wang, Y. (2010). SIRT1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary porcine aortic endothelial cells. *Circulation research* 106, 1384-1393.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A., and Nathke, I.S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Current biology* : CB 11, 44-49.

ANNEXES

Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease

Géraldine Gentric,^{1,2,3} Vanessa Maillet,^{1,2,3} Valérie Paradis,⁴ Dominique Couton,^{1,2,3} Antoine L'Hermitte,^{1,2,3} Ganna Panasyuk,^{3,5} Bernard Fromenty,⁶ Séverine Celton-Morizur,^{1,2,3} and Chantal Desdouets^{1,2,3}

¹INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France. ²CNRS, UMR 8104, Paris, France. ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁴Pathology Department, Beaujon Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Clichy, France. ⁵INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon, Université Paris Diderot, Paris, France. ⁶INSERM U1151/CNRS UMR 8253, Necker Enfants Malades Institute, Paris, France. ⁶INSERM, U991, Université de Rennes 1, Rennes, France.

Polyploidization is one of the most dramatic changes that can occur in the genome. In the liver, physiological polyploidization events occur during both liver development and throughout adult life. Here, we determined that a pathological polyploidization takes place in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a widespread hepatic metabolic disorder that is believed to be a risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC). In murine models of NAFLD, the parenchyma of fatty livers displayed alterations of the polyploidization process, including the presence of a large proportion of highly polyploid mononuclear cells, which are rarely observed in normal hepatic parenchyma. Biopsies from patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) revealed the presence of alterations in hepatocyte ploidy compared with tissue from control individuals. Hepatocytes from NAFLD mice revealed that progression through the S/G₂ phases of the cell cycle was inefficient. This alteration was associated with activation of a G₂/M DNA damage checkpoint, which prevented activation of the cyclin B1/CDK1 complex. Furthermore, we determined that oxidative stress promotes the appearance of highly polyploid cells, and antioxidant-treated NAFLD hepatocytes resumed normal cell division and returned to a physiological state of polyploidy. Collectively, these findings indicate that oxidative stress promotes pathological polyploidization and suggest that this is an early event in NAFLD that may contribute to HCC development.

Introduction

The liver is a fascinating organ with multiple functions and remarkable features. In addition to its crucial role in a wide array of metabolic processes, it also possesses regenerative capabilities that enable it to respond to several types of damage. Although the liver is made up of various cell types, hepatocytes account for 78% of liver volume and 70% of all liver cells (1), and these cells carry out most of the important functions of the liver. Hepatocytes are quiescent and differentiated cells, with an average life span ranging from 200 to 300 days. Moreover, mammalian hepatocytes are able to increase their number of chromosome sets, a phenomenon called polyploidization. Polyploid hepatocytes are characterized by the number of nuclei per cell (cellular ploidy) as well as the ploidy of each nucleus (nuclear ploidy). In rodents, hepatocytes are mainly tetraploid (binuclear with 2 diploid nuclei or mononuclear with 1 tetraploid nucleus) and octoploid (binuclear with 2 tetraploid nuclei or mononuclear with 1 octoploid nucleus) (2, 3). In humans, hepatocytes are essentially tetraploid (4, 5). Although the process of liver polyploidization has been documented extensively (6–8), this phenomenon remains poorly understood. During postnatal development, a scheduled division program characterized by incomplete cytokinesis results in the

genesis of binuclear tetraploid hepatocytes (2x2n), which subsequently play a pivotal role in liver polyploidization (3, 9–11). Remarkably, during postnatal development and adult life, hepatocytes are able to increase their DNA content but also reduce it through a process called “ploidy reversal” (2, 12). In fact, polyploid hepatocytes undergo multipolar mitosis, producing daughter cells with half the chromosome content but also with aneuploid content. Polyploid hepatocytes use dynamic aneuploidization and polyploidization to induce genetic heterogeneity and thus maintain homeostasis or cope with environmental stress (13). Hepatocytes in adult rodents and humans retain a remarkable ability to proliferate in response to damage. In these circumstances, the liver polyploidy profile can also be modified. Signals promoting hepatocyte polyploidy include liver regeneration following partial hepatectomy (14), metabolic overload (15, 16), chemical overload (17), oxidative damage (18), and viral infection (5). However, the cellular and molecular mechanisms regulating polyploidy in these different situations are not fully understood.

We showed previously that insulin signaling controls the genesis of polyploid hepatocytes during liver development through the PI3K/AKT pathway by regulating the late stages of mitosis (19, 20). The close connection between liver physiology and insulin signaling prompted us to investigate whether polyploidy is modified during metabolic disorders of the liver, such as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). This metabolic disease is commonly associated with metabolic syndrome (MS), obesity, and type 2 diabetes (21, 22). Due to the increasing incidence of obesity, NAFLD has become a worldwide health concern. NAFLD includes a large

Authorship note: Chantal Desdouets and Séverine Celton-Morizur contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Submitted: August 21, 2014; **Accepted:** December 15, 2014.

Reference information: *J Clin Invest*. 2015;125(3):981–992. doi:10.1172/JCI73957.

Table 1. Cellular ploidy of the NAFLD mouse models (by image quantification)

NAFLD models	Mononuclear proportion (%)	Binuclear proportion (%)	P value	SEM
<i>ob/ob</i>	83.6	16.4	<0.001	± 1.3
WT	57.1	42.9		± 2.1
HFD	82.7	17.3	<0.005	± 0.8
Control	66.2	33.8		± 0.6
MCD diet	73.3	26.7	<0.001	± 1.1
Control	65.6	34.4		± 1.3
<i>Pten</i> KO	80.6	19.4	<0.05	± 1.5
Control	72.0	28.0		± 1.7

Mononuclear proportion and binuclear proportion refer to the hepatocyte population. Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's *t* test.

spectrum of hepatic lesions, ranging from simple reversible steatosis (intrahepatic accumulation of triglycerides) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) to more severe lesions, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (23–25). There is growing evidence that HCC can occur during NAFLD in noncirrhotic livers (26–29). A “2-hit” model has been proposed to explain the progression of simple fatty liver disease to NASH (30). Alterations of lipid homeostasis associated with obesity, insulin resistance, and adipokine abnormalities constitute the first hit and result in fat accretion in the liver (31). This state subsequently primes the liver for the second hit, characterized by oxidative stress, lipid peroxidation, and an increase in cytokine production and inflammation, ultimately resulting in NASH (32, 33). Oxidative stress originating from mitochondria and cytochrome P450 2E1 is considered as a key signal in the pathophysiology of NASH (34, 35). Interestingly, studies in animal models and patients show that antioxidants, such as vitamin C, vitamin E, and N-acetylcysteine (NAC), are useful for both protecting against NAFLD and treating this disease (36–38). ROS affect several cell signaling pathways involved in cell proliferation and tumorigenicity (39, 40). Increasing evidence indicates that NAFLD strongly affects the intrinsic proliferative properties of hepatocytes. Many signs of impaired proliferation have been found in fatty hepatocytes (41–43).

In the present study, we used both mouse models and patients suffering from NAFLD to demonstrate that the molecular and cellular mechanisms controlling liver polyploidization are altered profoundly during the course of this metabolic disease. Indeed, our work reveals that oxidative stress induces an alteration of hepatic polyploidy, which could represent a novel cellular signature for NAFLD.

Results

NAFLD drives the genesis of highly polyploid hepatocytes in rodent and human liver parenchyma. We first examined changes to the ploidy profile of hepatocytes during NAFLD in obese, diabetic leptin-deficient *ob/ob* mice. These mice are hyperphagic and display insulin resistance, hyperglycemia, and hypercholesterolemia and develop massive hepatic steatosis with moderate necroinflammation and

mild fibrosis (44–47). We analyzed the hepatocyte ploidy profile by flow cytometry (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI73957DS1). We observed that livers of *ob/ob* mice were enriched in hepatocytes with high DNA content compared with the control one (Figure 1A). In order to determine whether cellular (number of nuclei per hepatocyte) and/or nuclear ploidy (ploidy of each nucleus) were altered, we used imaging approaches. Labeling of nuclear (Hoechst) and plasma membrane (β -catenin) compartments was performed to investigate cellular ploidy in liver sections (Figure 1B and refs. 3, 5, 48). The binuclear fraction was lower in the liver parenchyma of *ob/ob* mice than in that of WT mice (*ob/ob*: 16.4% $\pm$ 1.3%; WT: 42.9% $\pm$ 2.1%) (Figure 1B and Table 1). This result is consistent with observations made in the context of insulin resistance (20). We next investigated nuclear ploidy by measuring the nucleus area. The mononuclear diploid (2n) hepatocyte population was substantially lower in *ob/ob* liver than in WT liver (*ob/ob*: 9.5% $\pm$ 1.7%; WT: 29.9% $\pm$ 2.7%) (Figure 1C and Table 2). By contrast, mononuclear tetraploid hepatocytes were enriched in *ob/ob* liver (*ob/ob*: 34.2% $\pm$ 2.6%; WT: 22.4% $\pm$ 1.5%) (Figure 1C and Table 2). Importantly, *ob/ob* liver contained highly polyploid mononuclear hepatocytes ($\geq 8n$), which were infrequently observed in WT liver (*ob/ob*: 39.9% $\pm$ 1.2%; WT: 4.8% $\pm$ 3.2%) (Figure 1C and Table 2).

Next, we investigated ploidy profiles in diet-induced mouse models of NAFLD, including mice fed a high-fat diet (HFD) or a methionine-choline-deficient (MCD) diet, to further examine the link between steatosis and alterations to ploidy. A HFD is well known to increase body weight, body fat, and induce insulin resistance and hyperinsulinemia (49). The MCD diet promotes steatohepatitis by impairing the secretion of very low-density lipoprotein and creating conditions of high oxidative stress (50). Consistent with our findings in the *ob/ob* model, alterations of cellular and nuclear ploidy profiles were observed in both models (Figure 2 and Tables 1 and 2). Importantly, the highly polyploid mononuclear fraction was enriched in mice fed a HFD or a MCD diet (Figure 2 and Table 2). Finally, we determined the ploidy profile in the liver-specific phosphatase and tensin homolog (*Pten*) knockout mouse, which is a genetic mouse model that reflects the progression of NAFLD to NASH and HCC, which is related to human pathology. In the liver, the activation of the pro-anabolic PI3K/AKT pathway drives de novo lipogenesis as well as pathological liver growth (25). In this mouse model, loss of PTEN tumor suppressor results in chronic activation of PI3K/AKT signaling, leading to pronounced steatosis and, as mice age, to liver tumorigenesis (25). We first evaluated the nuclear ploidy profile in 3-month-old *Pten* KO mice at pretumoral stages. At this age, the *Pten* KO mouse liver shows extensive steatohepatitis (51, 52). Similar to other NAFLD models, the ploidy profile of *Pten* KO livers was different from that of WT livers and was characterized by the amplification of the highly polyploid mononuclear population (Supplemental Figure 2A and Table 2). In order to establish a relationship between hepatocyte polyploidy and HCC incidence, we have also analyzed ploidy profile in 10-month-old *Pten* KO mice. At this age, hepatic PTEN mutants are presented with multiple malignant lesions (51, 52). Importantly, we observed that highly polyploid mononuclear hepatocytes ($\geq 8n$) were also enriched in livers of tumoral KO mice compared with those in control animals

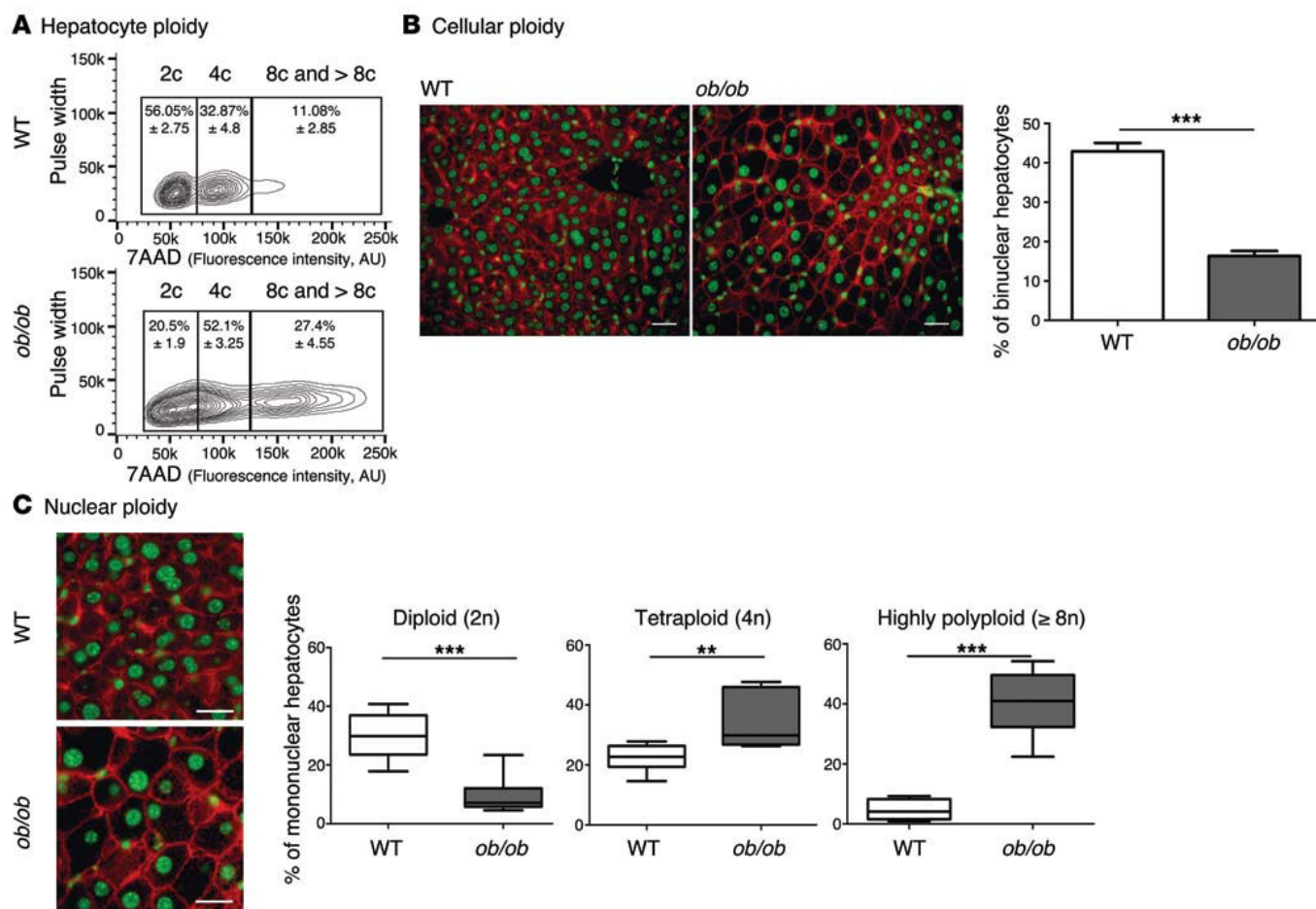


Figure 1. Hepatocyte ploidy profiles are altered in a genetic mouse model of NAFLD. (A) Hepatocytes from WT and *ob/ob* livers were separated into ploidy populations by FACS analyses ($n = 3$ per group) with 2c, 4c, and 8c and >8c DNA content corresponding to diploid, tetraploid, and highly polyploid hepatocytes, respectively. Of note, smear between hepatocytes populations (*ob/ob* cells) is due to high granularity (correlation with high lipid content). 7AAD, 7-aminoactinomycin D. (B) Images of liver sections from WT and *ob/ob* mice after double staining with β -catenin (plasma membrane labeling, red) and Hoechst (nucleus, green) (scale bar: 20 μ m). Percentage of binuclear hepatocytes in WT and *ob/ob* mice ($n = 6$ per group). Results represent mean $\pm$ SEM. *** $P < 0.001$, Student's t test. (C) β -Catenin/Hoechst immunostaining in WT and *ob/ob* mice (scale bar: 20 μ m) and box plots of the percentage of 2n, 4n, and $\geq 8n$ mononuclear hepatocytes relative to total hepatocytes in WT and *ob/ob* mice. The bottom, central, and top lines of each box represent the first quartile, median, and third quartile of the distribution, respectively ($n = 6$ per group). ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, Student's t test.

(Supplemental Figure 2A). Interestingly, we observed that highly polyploid hepatocytes were also present in hepatocellular tumors in the livers of *Pten* KO mice (Supplemental Figure 2B).

Importantly, we also investigated the ploidy profile of the liver in patients diagnosed with NASH who had undergone liver resection for HCC. Patients included in the study were of similar age (54 ± 7 years), which is important because hepatocyte ploidy varies in accordance with age (53). MS was the only risk factor for chronic liver disease (CLD) in patients with NASH ($n = 16$). Eight patients had moderate fibrosis (NASH Grp1), and the others had bridging fibrosis or cirrhosis (NASH Grp2). The control group ($n = 8$, HCC resected) was composed of patients with bridging fibrosis or cirrhosis but did not present any risk factors for MS. Immunofluorescence staining and quantification revealed that the binuclear fraction was small and equivalent in liver parenchyma for the 3 groups of patients (Figure 3A and Table 3). Interestingly, the percentage of diploid hepatocytes was significantly lower in patients with NASH with moderate (NASH Grp1: $46.3\% \pm 1.8\%$) or advanced fibrosis (NASH Grp2: $42.8\% \pm 2.8\%$) than in the control patients

(control: $59.3\% \pm 5.5\%$) (Figure 3B and Table 4). Conversely, the percentage of highly polyploid mononuclear hepatocytes ($\geq 8n$) was significantly higher in patients with NASH with moderate or advanced fibrosis (NASH Grp1: $15.3\% \pm 1.3\%$ and NASH Grp2: $16.0\% \pm 1.6\%$, respectively) than in control patients (control: $5.2\% \pm 0.9\%$) (Figure 3B and Table 4). Finally, in order to determine whether polyploidy could be causally related to hepatocarcinogenesis, we analyzed ploidy profiles in patients with NASH without HCC (NASH Grp3). Highly polyploid mononuclear hepatocytes were also present in fatty liver parenchyma tissue ($18.0\% \pm 2.8\%$) (Figure 3 and Table 4). Altogether, our data reveal a shift in the distribution of hepatocyte ploidy toward an increase in highly polyploid mononuclear hepatocytes in patients with NASH, which seems to be independent of the severity of fibrosis and precedes HCC development.

Progression of NAFLD hepatocytes through S and G₂ phases is altered. We sought to determine the precise mechanism leading to the genesis of the highly polyploid mononuclear population in NAFLD livers. We isolated primary hepatocytes from WT and *ob/ob* mice and analyzed cell cycle progression. In our culture con-

Table 2. Nuclear ploidy of the NAFLD mouse models (by image quantification)

NAFLD models	Mononuclear proportion (%)	2n	P value	4n	P value	≥8n	P value
<i>ob/ob</i>	83.6	9.5 ± 1.7	<0.001	34.2 ± 2.6	<0.001	39.9 ± 1.2	<0.001
WT	57.1	29.9 ± 2.7		22.4 ± 1.5		4.8 ± 3.2	
HFD	82.7	12.1 ± 1.4	<0.05	29.8 ± 0.7	<0.005	40.8 ± 1.7	<0.001
Control	66.2	16.2 ± 2.9		33.7 ± 1.4		16.3 ± 3.3	
MCD diet	73.3	27.6 ± 1.2	<0.001	34.1 ± 0.8	<0.001	11.6 ± 1.5	<0.001
Control	65.6	37.9 ± 1.0		25.4 ± 0.7		2.3 ± 0.4	
<i>Pten</i> KO	80.6	23.5 ± 0.3	<0.05	30.0 ± 0.7	<0.05	27.1 ± 1.0	<0.005
Control	72.0	26.2 ± 0.8		27.5 ± 0.5		18.3 ± 0.6	

Mononuclear proportion refers to the hepatocyte population. Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's *t* test.

ditions, primary hepatocytes only divided once and progressed through S phase 48 hours after plating, with a maximal mitotic index 60 hours after plating (Figure 4A and refs. 3, 54). Cell viability after liver perfusion was equivalent for both genotypes. BrdU incorporation was similar between *ob/ob* and WT hepatocytes early during culture, suggesting that *ob/ob* hepatocytes entered S phase normally (Figure 4B and Supplemental Figure 3A). We also investigated the expression pattern of components of the cell cycle machinery that control progression through G₁ and entry to S phase.

The increase of D-cyclin (*Ccnd1*) and E-cyclin (*Ccne1*) mRNA abundance during cell cycle progression was equivalent in both cultures (Supplemental Figure 3B). Interestingly, *ob/ob* hepatocytes accumulated in S phase at late time points during culture (48 and 60 hours), whereas control hepatocytes exited S phase as expected during this period (Figure 4B). We confirmed this result by analyzing expression of A-cyclin (*CCNA2*), a master regulator of progression through the S phase (55). The abundance of *Ccna2* mRNA decreased at between 48 and 60 hours in the control culture, whereas its expression significantly increased in *ob/ob* hepatocytes (Figure 4D), likely reflecting alterations of S phase progression.

We then used phospho-histone H3 (PHH3) punctiform nuclei labeling (a marker for cells in late G₂) to determine G₂ progression (Figure 4C). In contrast with control cultures, *ob/ob* hepatocytes accumulated in G₂ phase in cultures at 60 hours after plating (Figure 4C). We next examined the abundance of mitosis-promoting factor (MPF), which comprises a complex between B-cyclin (*CCNB1*) and CDK1. The accumulation of *CCNB1* and dephosphorylation of CDK1 at Tyr15 are nec-

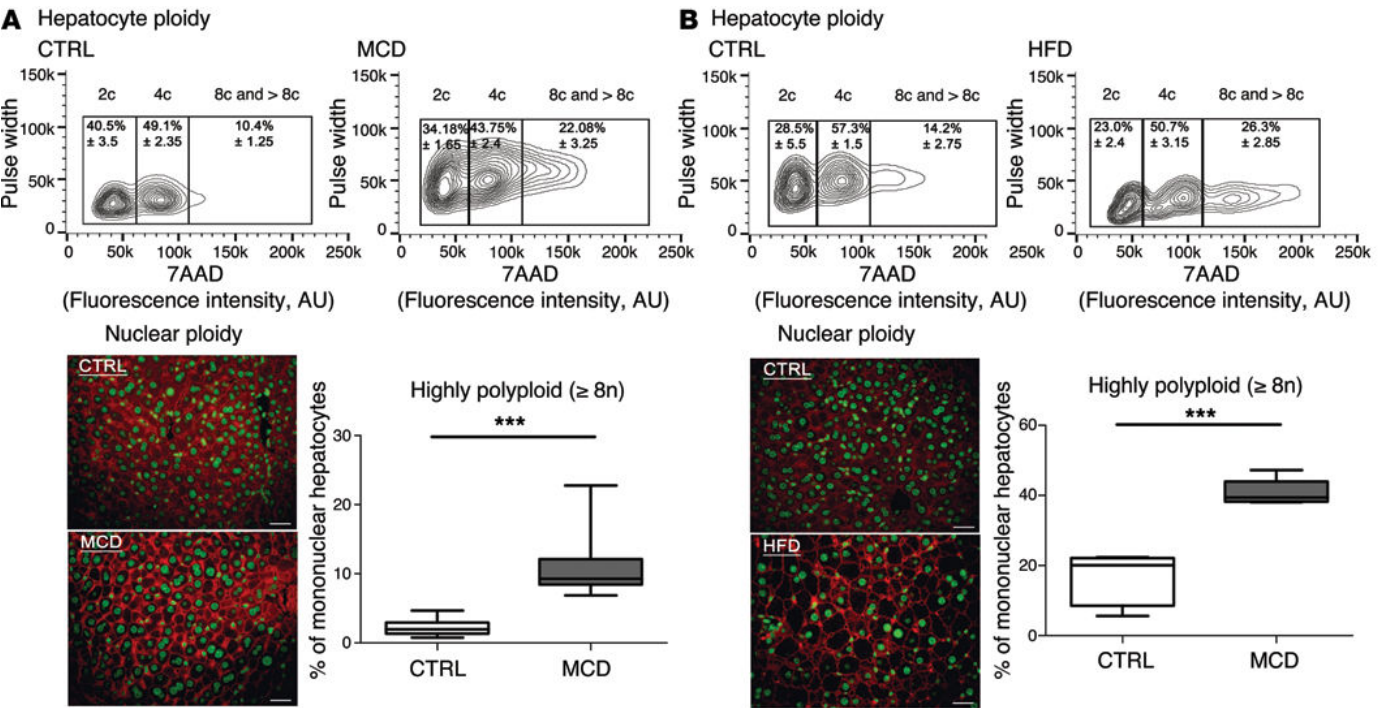


Figure 2. Hepatocyte ploidy profiles are altered in dietary mouse models of NAFLD. (A) MCD diet model. Hepatocytes were separated into ploidy populations by FACS analysis (*n* = 3 per group) with 2c, 4c, and 8c and >8c DNA content corresponding to diploid, tetraploid, and highly polyploid hepatocytes, respectively. Images of liver sections after double staining with anti-β-catenin (plasma membrane labeling, red) and Hoechst (nucleus, green) in WT mice fed control (CTRL) or MCD diets (scale bar: 20 μm). Box plots of the percentage of ≥8n mononuclear hepatocytes relative to total hepatocytes in control-fed and MCD diet-fed mice. Results represent mean ± SEM (*n* = 8 per group). ****P* < 0.001, Student's *t* test. **(B)** HFD model. Hepatocytes were separated into ploidy populations by FACS analysis (*n* = 3 per group) with 2c, 4c, and 8c and >8c DNA content corresponding to diploid, tetraploid, and highly polyploid hepatocytes, respectively. Images of liver sections after double staining with anti-β-catenin (red) and Hoechst (green) in WT mice fed a control or a HFD (scale bar: 20 μm). Box plots of the percentage of ≥8n mononuclear hepatocytes relative to total hepatocytes in control-fed and HFD-fed mice. Results represent mean ± SEM (*n* = 5 per group). ****P* < 0.001, Student's *t* test.

Table 3. Cellular ploidy of patients with NASH (by image quantification)

	Mononuclear proportion (%)	Binuclear proportion (%)	P value	SEM
Control	90.5	9.5	NS	± 0.9
NASH Grp1	90.2	9.8		± 0.7
NASH Grp2	91.5	8.5	NS ^a	± 1.1
NASH Grp3	90.8	9.2		± 2.2

Mononuclear proportion and binuclear proportion refer to the hepatocyte population. Comparisons were between control and NASH groups and among the 3 NASH groups. Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's *t* test. ^aNS reflects a comparison among all 3 NASH groups.

essary for the activation of the MPF complex and the initiation of mitosis (56, 57). In our model, the abundance of *Ccnb1* mRNA and protein increased normally from G₁ to G₂ phase (24–60 hours after plating) and CDK1 was highly phosphorylated during S phase (36 hours after plating) in both *ob/ob* and control hepatocytes (Figure 4, D and E). The phosphorylation of CDK1 decreased in WT hepatocytes as the cells proceeded through G₂/M; however, in *ob/ob* cultures, inhibitory CDK1 phosphorylation was maintained and enhanced in *ob/ob* cultures (Figure 4E), reflecting an inactive MPF. We also analyzed the expression of MCM7, which is one of the minichromosome maintenance (MCM) proteins that are critical for licensing DNA replication in proliferating cells (58). MCM2–MCM7 are normally removed from replicated DNA, so that it cannot undergo further initiation events until it passes through mitosis (59). The abundance of MCM7 protein was higher in *ob/ob* proliferating hepatocytes than in control hepatocytes (Supplemental Figure 4). In control cells, only a small amount of MCM7 was present in the chromatin fraction at 60 hours, the time at which hepatocytes progress through G₂/M phase (Figure 4F). By contrast, MCM7 was highly abundant in the chromatin fraction in *ob/ob* hepatocytes (Figure 4F), consistent with G₂/M arrest. Importantly,

similar alterations in cell cycle progression were observed in MCD diet and HFD hepatocyte cultures (Supplemental Figure 5). Taken together, we showed that NAFLD hepatocytes present an altered cell cycle progression, which correlates to the genesis of highly polyploid mononuclear cells in fatty liver tissue.

We determined next whether mononuclear polyploid fatty hepatocytes are able to bypass the G₂/M arrest and reenter a new cell cycle. We used continuous labeling with 2 thymidine analogs (chlorodeoxyuridine [CldU] and iododeoxyuridine [IdU]) to follow division in vivo during disease progression (Figure 5A). Briefly, mice were fed an MCD diet, and CldU and IdU were incorporated successively into their drinking water. This approach enables the proliferative status of liver cells to be followed over a large time period. Importantly, it can show whether an individual hepatocyte that has already progressed through S phase (CldU⁺, green nucleus, Figure 5B) is able to reenter another replicative cell cycle (CldU⁺IdU⁺, yellow nucleus, Figure 5B). We observed that polyploid mononuclear fatty hepatocytes (4n: 45.6% and ≥8n: 10.9%) have achieved a first replicative cell cycle (CldU⁺, green labeling, Figure 5, B and C) and have progressed through another replicative cycle (IdU⁺, red labeling, Figure 5, B and C). These data strongly suggest that polyploid mononuclear hepatocytes are able to reenter the cell cycle despite G₂/M arrest.

A persistent DNA damage response, resulting from oxidative stress-induced polyploidization in NAFLD hepatocytes. Recent work suggests that pathological polyploidization is an adaptation to genomic stress (60). Cells respond to a diverse array of DNA lesions with an evolutionarily conserved DNA damage response (61). The DNA damage response is a signal transduction pathway that is primarily mediated by proteins of the PI3K-like protein kinase family: ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and RAD3-related (ATM/ATR) (62, 63). We assessed whether this DNA damage checkpoint was activated in proliferative NAFLD hepatocytes. ATR phosphorylation was barely detectable in proliferative control hepatocytes (Figure 6). By contrast, ATR was highly phosphorylated as the cells proceeded through S and G₂ phase in *ob/ob* hepatocytes (48–60 hours after plating)

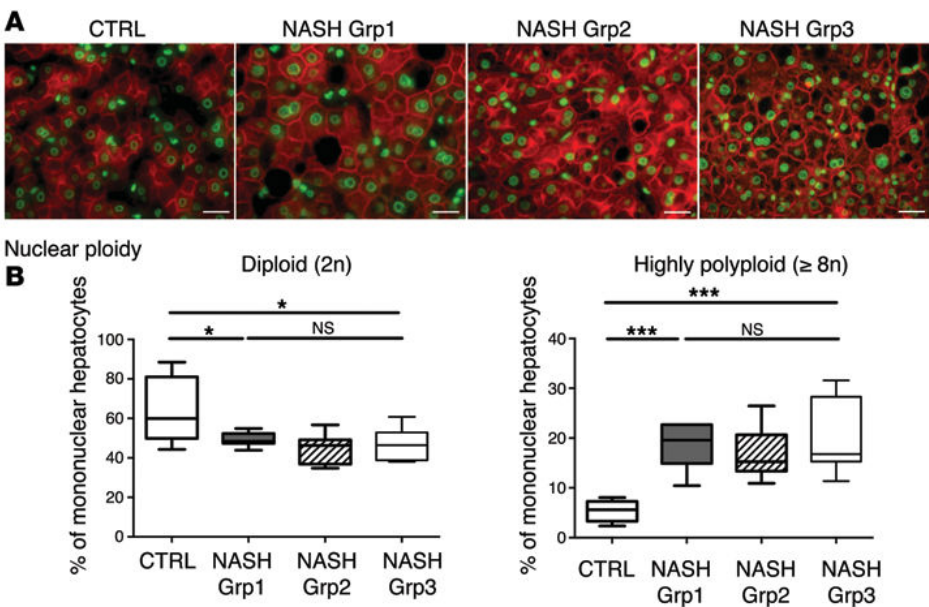


Figure 3. Alteration of liver nuclear ploidy in patients diagnosed with NASH. Nuclear ploidy profiles were analyzed in patients with CLD (resection for HCC) with bridging fibrosis or cirrhosis but with no features of MS (control), in patients with MS with moderate fibrosis (NASH Grp1), and in patients with MS with bridging fibrosis or cirrhosis (NASH Grp2) (*n* = 8 per group). Nuclear ploidy profiles were also analyzed in patients with MS with moderate fibrosis and without HCC (liver biopsy) (NASH Grp3). (A) Images of human liver sections (control and NASH Grp1–Grp3) after double staining with KL1 (plasma membrane labeling, red) and Hoechst (nucleus, green) (scale bar: 20 μ m). (B) Box plots of the percentage of diploid (2n) and highly polyploid ($\geq 8n$) mononuclear hepatocytes relative to total hepatocytes in each patient group. The bottom, central, and top lines of each box represent the first quartile, median, and third quartile of the distribution, respectively. **P* < 0.05, ****P* < 0.001, Student's *t* test.

Table 4. Nuclear ploidy of patients with NASH (by image quantification)

	Mononuclear proportion (%)	2n	P value	4n	P value	≥8n	P value
Control	90.5	59.3 ± 5.5	<0.05	26.0 ± 4.8	NS	5.2 ± 0.9	<0.001
NASH Grp1	90.2	46.3 ± 1.8		28.6 ± 1.5		15.3 ± 1.3	
NASH Grp2	91.5	42.8 ± 2.8	NS ^A	32.7 ± 2.2	NS ^A	16.0 ± 1.6	NS ^A
NASH Grp3	90.8	42.7 ± 3.7		30.1 ± 1.3		18.0 ± 2.8	

Mononuclear proportion refers to the hepatocyte population. Comparisons were between control and NASH groups and among the 3 NASH groups. Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's *t* test. ^ANS reflects a comparison among all 3 NASH groups.

(Figure 6). As expected, this was associated with an activation of p53 protein and the accumulation of p21 protein in *ob/ob* hepatocytes (Figure 6). Importantly, the DNA damage checkpoint was also activated in proliferative MCD diet and HFD hepatocytes (Supplemental Figure 5, C and D). These results are consistent with the idea that the transient arrest in G₂/M of NAFLD hepatocytes is regulated by the DNA damage pathway under the control of ATR/p53/p21 signaling.

ROS overproduction and subsequent oxidative stress influence genomic integrity greatly (40). Oxidative stress in the liver plays a central role in the progression of steatosis (34, 64). As expected, markers of oxidative stress are detectable in *ob/ob* hepatocytes both in vivo and in vitro: accumulation of ROS, a high abundance of glutathione peroxidase-3 (GPX3) (reflecting the adaptive activation of antioxidant defenses), and a high abundance of hemoglobin α (HBA1) recently correlated with oxidative stress in patients with NASH (ref. 65 and Supplemental Figure 6, A–C). We treated primary *ob/ob* hepatocytes with the antioxidant NAC and examined cell cycle progression. NAC treatment impaired the accumulation of ROS (assessed with dihydroethidium [DHE] labeling) as well as that of *Gpx3* and *Hba1* mRNA (Figure 7A and Supplemental Figure 6C), with no impact on cell viability. Moreover, the accumulation of BrdU at 60 hours after plating was lower in *ob/ob* hepatocytes treated with NAC than in untreated cells (Figure 7B), showing that treated cells progressed normally through the cell cycle. Importantly, ATR activation at this time point was substantially lower in treated cells than in untreated cells (Figure 7C). Finally, by analyzing ploidy at a late time point of culture, we observed that highly polyploid hepatocytes were enriched in *ob/ob* cultures compared with control (at 60 hours after plating) cultures (Supplemental Figure 6D). Notably, antioxidant treatment restored a normal ploidy profile in *ob/ob* cultures (Supplemental Figure 6D). We then subjected *ob/ob* and WT mice to long-term NAC treatment to examine the role of oxidative stress in vivo. This antioxidant was chosen because it is well tolerated in animals and can be administered orally over long periods of time (66). NAC treatment was initiated from early gestation through administration to pregnant female mice and maintained after birth until the mice were killed at 10 weeks old. DHE labeling and *Gpx3* and *Hba1* mRNA levels were significantly lower in *ob/ob* mice treated with NAC than in untreated *ob/ob* mice (Figure 7D), confirming that long-term administration of NAC significantly alleviates oxidative

stress in *ob/ob* liver parenchyma. Remarkably, the proportion of highly polyploid hepatocytes was significantly lower in treated *ob/ob* mice than in untreated *ob/ob* mice, with a concomitant enrichment of the diploid hepatocytes (Figure 7E). Hence, these data indicate that affecting oxidative stress during NAFLD is sufficient to prevent the development of the pathological polyploidization.

Discussion

The development and progression of NAFLD is a growing health issue worldwide, and this condition can lead to

end-stage liver diseases such as cirrhosis and HCC. Our limited understanding of the pathogenesis of NAFLD stems from its complex nature, governed by close interactions between genetic factors and environmental cues (67). Alarming, there are increasing reports of NASH linked to HCC, without accompanying cirrhosis (26, 29). Our results reveal for what we believe to be the first time a connection between hepatocyte polyploidy and fatty liver disorders (Figure 8). Using various murine models of NAFLD, we show that polyploidization is altered in fatty liver, with a specific enrichment of the highly polyploid mononuclear population, which is rarely observed in normal hepatic parenchyma. We also observed similar alterations of hepatocyte ploidy in patients with NASH. In addition, we show that polyploidization occurs in NAFLD hepatocytes experiencing a “G₂/M DNA damage checkpoint” (ATR/p53/p21 signaling). We also show that oxidative stress, a key player in NAFLD progression, is crucial for pathological polyploidization in fatty liver.

Polyploidization is one of the most dramatic changes known to occur in the genome. In mammals, the development of polyploid cells can contribute to tissue differentiation and, therefore, may represent a gain of function (68). However, given that cellular stress promotes polyploidization and that many diseased organs contain polyploid cells, polyploidization could also be considered as a pathological lesion (69). The liver is the only organ that modulates its ploidy content both during its life span and following different types of stress (13, 19, 70). The primary mechanism for physiological polyploidization involves a failure of cytokinesis, characterized by a modulation of insulin/AKT and E2F signaling (9, 11, 20). Interestingly, other factors can promote polyploidy in adults, such as regeneration following partial hepatectomy (48, 71, 72), fibrogenesis (5, 73), and metabolic overload (18, 74). Although some correlation exists between polyploidization and these stresses, little is known about the mechanisms leading to the genesis of polyploid hepatocytes and the consequences on liver parenchyma function. Our findings suggest that alteration of the ploidy profile of hepatocytes can be considered as a new signature of metabolic liver disorders. Indeed, our data from both mouse models and patients with NAFLD support the hypothesis that steatosis is sufficient per se to induce alterations in ploidy status. Many signals and genes are reported to be involved in pathological polyploidization (7, 60, 69). In our model, oxidative stress triggered the activation of a G₂/M DNA damage checkpoint under

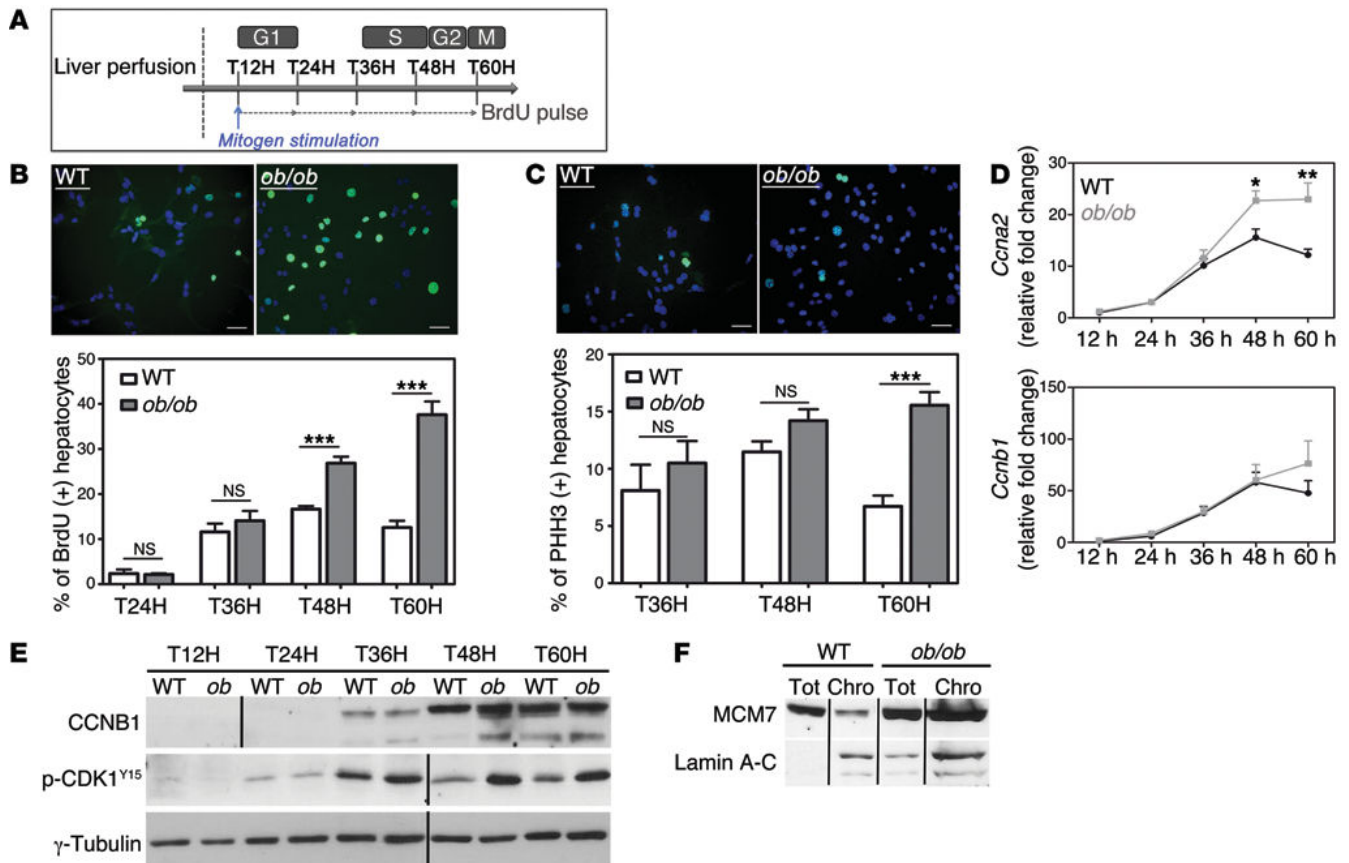


Figure 4. NAFLD hepatocytes preferentially undergo an altered cell cycle. Experiments were carried out in hepatocytes isolated from WT or *ob/ob* livers (4 independent cultures). **(A)** Experimental scheme of culture. T12H, time 12 hours after plating. **(B)** Immunostaining of primary hepatocytes with anti-BrdU (green) and Hoechst (blue) at 60 hours after plating (scale bar: 20 μ m) and quantitative analysis of BrdU labeling (percentage of BrdU⁺ hepatocytes). Data represent the mean $\pm$ SEM. ****P* < 0.001, Student's *t* test. **(C)** Double immunostaining of primary hepatocytes at 60 hours after plating, with anti-PHH3 (green) and Hoechst (blue) (scale bar: 20 μ m) and quantitative analysis of G₂-labeling index (percentage of PHH3⁺ nuclei). Data represent mean $\pm$ SEM. ****P* < 0.001, Student's *t* test. **(D)** RNA extracted from WT (black circle) and *ob/ob* (gray square) primary hepatocytes (*n* = 5) and *Ccna2* and *Ccnb1* mRNAs were analyzed by quantitative real-time PCR. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, Student's *t* test. **(E)** CCNB1 and phosphorylated CDK1 (Tyr15) protein levels were analyzed in WT and *ob/ob* cultures during the time-course experiment. γ -Tubulin was used as a loading control. The CCNB1 blot was derived from parallel samples run on a separate gel. The Western blot is from the same experiment as the Figure 6 and Supplemental Figure 4 and is representative of 4 different cultures. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous, as indicated by the black line. **(F)** Soluble chromatin was prepared from culture at 60 hours, and MCM7 was analyzed by Western blotting. Lamin A-C was used as an indicator of fraction purity. Tot, total fraction; Chro, chromatin fraction. The Western blot is representative of 4 different cultures. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous.

the control of ATR/p53/p21 signaling, preventing the activation of the cyclin B1/CDK1 complex. Eukaryotic cells have evolved strategies to counteract a G₂ DNA damage signal and may enter senescence or continue to grow through endoreplication (60, 69, 75, 76). Endoreplication (also called endocycling and endomitosis) refers to a process when cells successively alternate between S and G phases without chromosome segregation (60, 77). Interestingly, we have observed that NAFLD polyploid hepatocytes can undergo two successive S phases, suggesting that endoreplication might be preferentially performed in this context. Previous studies have shown an evolutionary conserved link between ATM/ATR-dependent pathways and polyploidy-inducing endoreplication cycles (60, 69). In *Arabidopsis*, root tip and sepal cells activate ATM and ATR orthologs and undergo endoreplication following the induction of double-stranded DNA breaks (78). In mammals, telomere shortening appears to be a potent signal for endoreplication, and Davoli et al. showed that p53-deficient cells undergo endoreplication,

which requires ATM/ATR (79). Interestingly, these polyploid cells resume cell division cycles upon the restoration of telomere protection (79). Endoreplication is now well known and considered as an alternative division method in the context of genomic stress (60). Hepatocytes have extraordinary regenerative capabilities and respond strongly to both physiological and pathological proliferative signals. These cells must therefore have efficient mechanisms to cope with genomic alterations. In fatty liver, we suggest that genomic alterations, induced by oxidative stress, could be responsible for pathological polyploidization. We have already shown that oxidative stress in NAFLD liver directly activates a DNA damage checkpoint (ATR activation) (see above). Remarkably, prevention of oxidative stress was sufficient to restore a physiological hepatic ploidy status. Future studies will elucidate the precise mechanism linking genomic stress to pathological polyploidy.

The relevance of these highly polyploid hepatocytes to the pathogenesis of NAFLD is unclear. It is tempting to speculate that

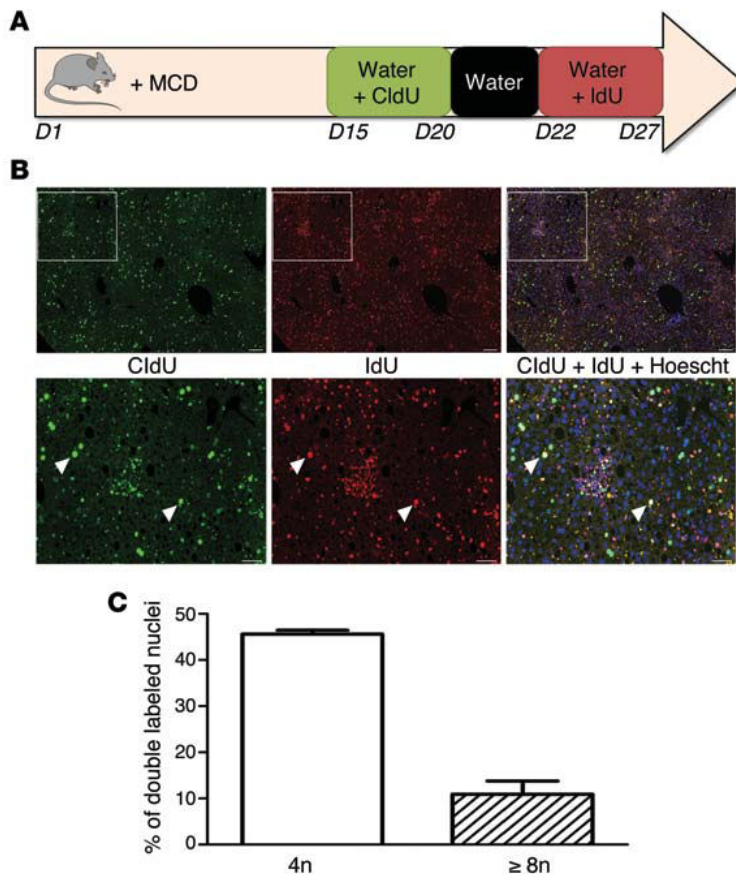


Figure 5. NAFLD mononuclear polyploid cells are able to reenter the cell cycle. (A) Schematic representation of the nuclei double-labeling experiment with thymidine analogs. C57BL/6J mice were fed MCD diet for 4 weeks (d1–d27). At d15, animals had access to labeled CldU drinking water for 5 days. Over following 2 days, animals had access to unlabeled water to clear unincorporated CldU, followed by 5 days of access to IdU drinking water. (B) Images of hepatocyte nuclei from MCD diet liver sections after costaining with anti-CldU (green) and anti-IdU (red) and a merge with Hoechst (blue) (scale bar: 50 μ m). The arrowheads point to double-labeled nuclei (yellow) (scale bar: 200 μ m). (C) Quantification of polyloid mononuclear fatty hepatocytes with nuclei double labeling (CldU*IdU*) in MCD diet liver ($n = 4$). Results represent mean $\pm$ SEM.

Methods

Animals care and diets. C57BL/6J lean (WT) and *ob/ob* (B6.V-*Lep^{ob}/J*) male mice purchased from Janvier Laboratories were housed in a temperature-controlled environment with 12-hour-light/dark cycles. Animals had free access to water and a control diet (D12492, Research Diet), providing 60% carbohydrate, 20% fat, and 20% protein in terms of energy. For HFD-induced NAFLD experiments, 21-day-old C57BL/6J mice were assigned randomly to 2 groups fed for 12 to 16 weeks with the control diet or a HFD (D07051001, Research Diet), providing 10% carbohydrate, 70% fat, and 20% protein in terms of energy. For MCD diet-induced fatty liver, 10-week-old mice were fed for 3 to 5 weeks with a MCD diet (Ssniff EF R/M, MCD mod) purchased from Ssniff Spezialdiäten GmbH.

Alb-Cre Pten^{fl/fl} (*Pten* KO) mice were obtained from the laboratory of M. Pende (Inserm U1151/CNRS UMR 8253, Necker Enfants Malades Institute) (52). For investigations with the antioxidant NAC, heterozygous male and female *ob/+* mice were mated and had a free access to water with or without 10 mM NAC. Progenies were kept with their parents for 21 days and then weaned and had free access to water with or without 10 mM NAC. For all experiments, animals were sacrificed and livers were immediately flash frozen and stored at -80°C or fixed in phosphate-buffered 4% formalin.

Patients. The study group included 32 male patients who underwent liver biopsy or resection for HCC. These patients were part of a previously published cohort, which was characterized for all parameters linked to CLD and MS (27, 81). The first group included

fatty hepatocytes with specific alterations of cell division participate in the progression of NAFLD to NASH and HCC. Interestingly, we observed that alteration of polyploid profile takes place before HCC development in the livers of patients. Additionally, a highly polyploid contingent was present in the HCC nodules in the livers of *Pten*-null mice, suggesting its implication in the tumorigenesis process. Future studies should aim to trace the mononuclear polyploid population and determine both its fate and role in liver carcinogenesis. Current data suggest that polyploid hepatocytes can be considered to act as a kind of “Dr. Jekyll and Mr. Hyde.” Diril and collaborators demonstrated that *Cdk1*^{−/−} livers regenerate through endoreplication cycles. In this context, M phase kinase deficiency confers a total resistance against tumorigenesis induced by activated RAS and the silencing of p53, suggesting that endoreplication drives hepatocytes to senescence (80). By contrast, polyploid hepatocytes generate progenies with reduced ploidy by a process called “ploidy reversal” (2, 12). Uniquely, this cellular process generates daughter cells that are mostly aneuploid. Recent data suggest that aneuploid hepatocytes generated in physiological conditions are beneficial and these cells even promote adaptation to chronic injury in a tyrosinemia mouse model (12). In the context of NAFLD, it is possible that highly polyploid hepatocytes with DNA damage give rise to pathological aneuploid progenies that could contribute to progression to NASH and HCC in this circumstance.

In conclusion, the present study demonstrates for what we believe to be the first time a clear link between oxidative stress and pathological polyploidization during NAFLD. Future studies should be aimed at understanding the role of the population of highly polyploid hepatocytes in the emergence of HCC during NAFLD, which is a major concern for public health.

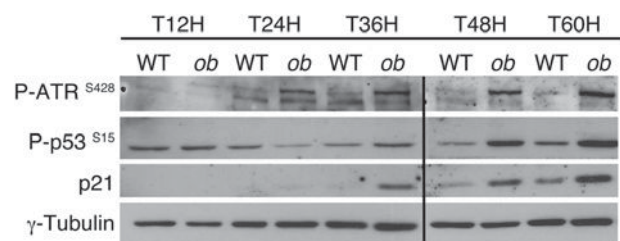


Figure 6. Polyploidization in NAFLD is associated with the activation of ATR/p53/p21 signaling. The abundance of phosphorylated ATR (Ser428), phosphorylated p53 (Ser15), and p21 protein was analyzed in primary hepatocytes isolated from WT or *ob/ob* mice. γ -Tubulin was used as a loading control. The Western blot is from the same experiment as the Figure 4E and Supplemental Figure 4 and is representative of 4 different cultures. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous, as indicated by the black line.

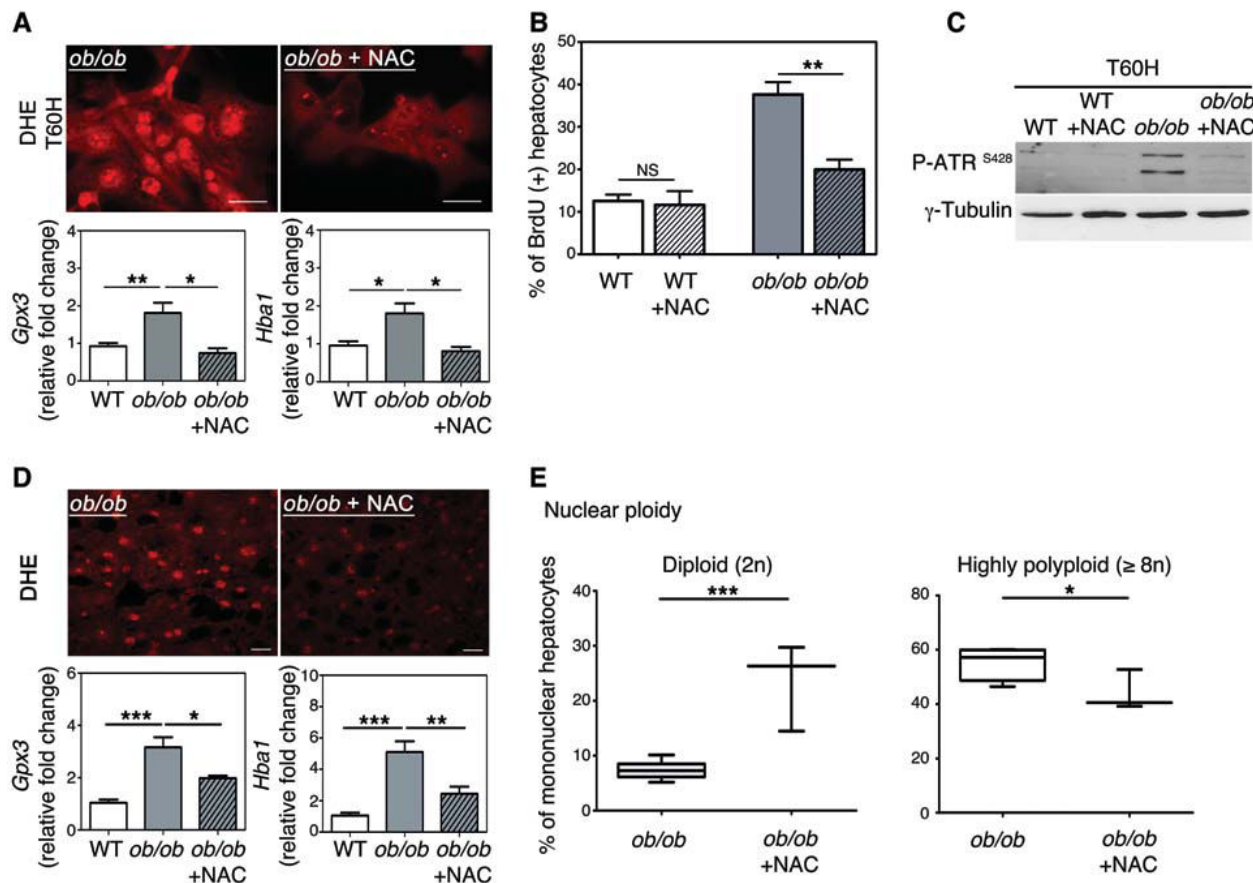


Figure 7. Antioxidant treatment prevents activation of the G₂/M DNA damage checkpoint and rescues normal hepatocyte polyploidy. (A) DHE staining of hepatocytes (60 hours of culture). The ROS-sensitive vital dye DHE (red) was used to detect the production of superoxide (scale bar: 20 μm). The abundance of *Gpx3* and *Hba1* mRNA was assessed by qPCR in WT hepatocytes and in *ob/ob* hepatocytes treated with NAC or not treated (*n* = 4). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, Student's *t* test. (B) Quantitative analysis of BrdU labeling. Data represent mean ± SEM of 4 independent cultures. ****P* < 0.01, Student's *t* test. (C) Western blot analysis of phosphorylated ATR (Ser428) (60 hours of culture). γ-Tubulin was used as a loading control. The Western blot is representative of 4 different cultures. (D) DHE immunostaining of liver sections isolated from *ob/ob* mice treated with NAC for 10 weeks or from *ob/ob* mice that were not treated (*n* = 3 per group) (scale bar: 20 μm). The abundance of *Gpx3* and *Hba1* mRNA was assessed by qPCR (*n* = 3 per group). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, Student's *t* test. (E) Analysis of nuclear ploidy in *ob/ob* mice treated or not with NAC. Box plots of the percentage of diploid (2n) and highly polyploid (≥8n) hepatocytes relative to all mononuclear hepatocytes. The bottom, central, and top lines of each box represent the first quartile, median, and third quartile of the distribution, respectively (*n* = 3 per group). **P* < 0.05, ****P* < 0.001, Student's *t* test.

24 patients with MS without HCC (8 patients) or with HCC (16 patients); MS was the only risk factor for CLD. MS was defined as increased waist circumference (waist-to-hip ratio >0.9 in men) or body mass index >30 kg/m² and at least two of the following risk factors: fasting plasma glucose >6.1 mM, dyslipidemia (triglycerides ≥1.7 mM or high-density lipoprotein cholesterol <0.9 mM), and hypertension (blood pressure >140/90 mm Hg). All other potential causes of CLD were ruled out. For all patients, pathological analysis was performed to assess the different lesions of the nontumoral liver, including steatosis and fibrosis (82). Using a semiquantitative score (Kleiner score, ref. 82; METAVIR score, ref. 83), fibrosis was determined for patients with CLD and MS as follows: F0, no fibrosis; F1, enlarged portal tracts without extensive septa; F2, presence of a few fibrous septa; F3, presence of numerous fibrous septa; and F4, cirrhosis. Diagnosis of steatohepatitis was based on the NAFLD activity score. Cases with an NAFLD activity score ranging from 0 to 2, 3 to 4, or >5 were considered as “not NASH,” probable, or “definite NASH,” respectively. For comparison, we also selected a second group of 8 patients with HCC as a consequence of HCV cir-

rhosis, with no evident causes of MS and absent or mild steatosis. Histologic examination of lesions was performed in a blinded fashion by surgical pathologists.

Liver tissue labeling with CldU and IdU. CldU and IdU were purchased from Sigma-Aldrich and dissolved in drinking water at a concentration of 1 mg/ml. Four-week-old C57BL/6J mice were fed MCD diet for 4 weeks. For the experiments, CldU treatment was initiated at day 15, after the beginning of the diet, for 5 days. Animals had a free access to unlabeled water to clear unincorporated CldU during the following 2 days. Thereafter, IdU treatment was performed using the same method as that for CldU. Labeled drinking water was stored in the dark and changed every 24 hours. Immunofluorescence labeling was performed as described previously (84).

Cell isolation, culture of primary hepatocytes, and FACS analysis. Hepatocytes were isolated from mouse livers by in situ perfusion and were seeded in complete medium, as described previously (20); briefly, hepatocytes were isolated in 6- to 7-week-old *ob/ob* mice and in 6- to 7-week-old MCD diet-fed mice (following 3 weeks of diet) and in 16-week-old HFD-fed mice (following 13 weeks of diet). Cell

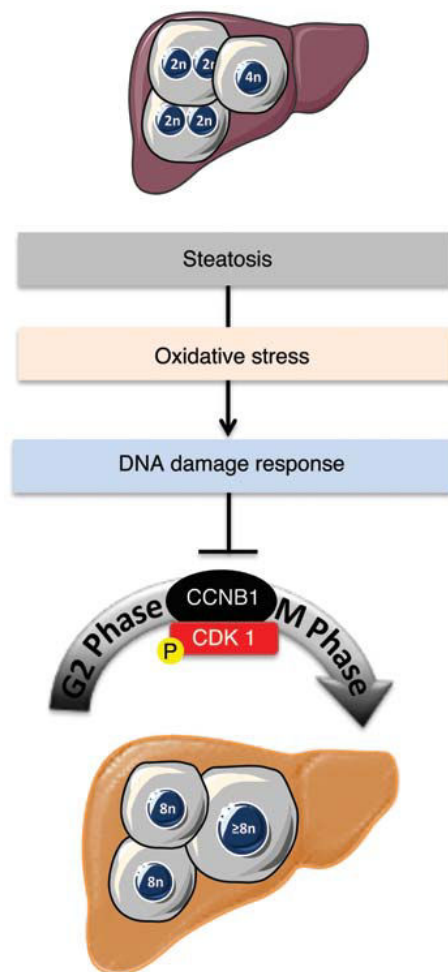


Figure 8. Proposed model for the role of oxidative stress in liver polyploidization during NAFLD.

viability after liver perfusion was equivalent ($\geq 90\%$) in all mouse models (WT, *ob/ob*, MCD diet, HFD). After cell spreading, the culture medium was deprived of fetal bovine serum and proliferation was induced with treatment with 50 ng/ml mitogenic EGF (Sigma-Aldrich). For rescue experiments, primary hepatocytes were treated with 7.5 mM NAC after seeding and during all of the culture time. Incorporation of the thymidine analog BrdU was used as an index of cell proliferation (Roche Mannheim). Freshly isolated hepatocytes were fixed in 70% ethanol overnight at 4°C. Fixed hepatocytes were loaded with 7-aminoactinomycin D (Invitrogen), and DNA content was determined with a LSR2 cytometer (BD Biosciences). Data files were analyzed using FlowJo software.

Gene expression analysis. Total RNA was isolated from frozen livers or frozen primary hepatocytes using a Nucleo-Spin RNA II Kit (Macherey-Nagel), and 2 μ g were used as a template for cDNA synthesis (MMLV, Life Technologies). PCR reactions containing the cDNA were set up in triplicate using FastStart SYBR Green Master (Roche) or the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Quantitative PCR was performed in real time using the Light-Cycler instrument (Roche Applied Science). Primer sequences were 5'-ACCCGGTCAACTTCAAGC-3' (forward) and 5'-AACGGTATTTGGAGGTCAGC-3' (reverse) for *Hba1* and 5'-GTCCGC-

CAGTATGCTGCCAGGAA-3' (forward) and 5'-GCTTTGGTCCTGGGCTTCTTACC-3' (reverse) for 6S sense. Others primers were predesigned QuantiTect Primers purchased from Qiagen. Expression of mouse ribosomal protein 6S (6S) or hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) (Qiagen) was used as reference.

Preparation of protein and chromatin extracts. Total proteins were extracted from snap-frozen livers or from primary hepatocytes as described previously (20). Hepatocytes nuclear extracts were prepared using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific). The nuclear fraction was centrifuged for 5 minutes at 1,700 g, and the pellet (corresponding to the chromatin fraction) was washed with 3 mM EDTA/0.2 mM EGTA/1 mM fresh DTT/Protease Inhibitor Cocktail (Roche) and finally sonicated for 30 minutes. Protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay.

Western blot analysis. Proteins (about 50 μ g) were resolved by SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes (0.45- μ m pore size), which were incubated overnight at 4°C with antibodies. Rabbit anti-p21 and mouse anti-MCM7 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. Rabbit anti-CCNB1, anti-phosphorylated ATR (Ser428), anti-phosphorylated CDK1 (Tyr15), and anti-phosphorylated p53 (Ser15) antibodies and mouse anti-lamin A/C (4C11) antibody were purchased from Cell Signaling Technology. Mouse γ -tubulin-GTU88 antibody was purchased from Sigma-Aldrich. The protein-bound primary antibodies were detected with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (ThermoFisher Scientific). Immunoreactive bands were revealed with a chemiluminescence kit (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate) purchased from ThermoFisher Scientific, and blots were exposed to Amersham Hyperfilm (GE Healthcare). In all Western blots, γ -tubulin was used to normalize the results.

Immunohistochemistry. Animal and human livers were fixed overnight in formalin, embedded in paraffin, and cut into 3- to 7- μ m-thick slices. Primary hepatocytes were fixed in -20°C methanol for 5 minutes for PHH3 staining or in -20°C ethanol 75%/acetic acid 25% for 20 minutes for the BrdU labeling. Immunohistochemistry was performed with the BrdU Detection Kit I (Roche), mouse anti- β -catenin antibody (1:200) (BD Biosciences), rabbit anti-PHH3 antibody (1:200) (Millipore), or mouse anti-pan cytokeratin KL-1 antibody (1:50) (Clinisciences). Anti-mouse or -rabbit IgG antibodies (1:500) conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Invitrogen) were used as the secondary antibodies. Hoechst 33342 (0.2 μ g/ml) purchased from Sigma-Aldrich was included in the final wash to counterstain nuclei.

In situ detection of ROS. In the presence of ROS, DHE (Invitrogen) was oxidized to ethidium bromide, which stains nuclei bright red by intercalating with the DNA (85). Fresh cross sections (10 μ m) of unfixed, frozen mouse livers were immediately incubated with 5 μ M DHE at 37°C for 30 minutes in a humidified chamber, subsequently washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, and coverslipped. Primary hepatocytes were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, incubated with 5 μ M DHE at 37°C for 30 minutes, subsequently washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, and coverslipped. The fluorescence intensity of DHE staining was measured with ImageJ software.

Image acquisition and analysis. For BrdU/PHH3/DHE staining and ploidy experiments (Hoechst 33342/ β -catenin/KL1), images were taken using a LEICA DMI 6000 microscope at $\times 20$ or $\times 40$ magnifi-

cation, PL APO objectives, a MicroMAX-1300Y/HS Princeton Instruments camera, and Metamorph 7 software (Molecular Devices). Z-axis stacks were collected using a piezoelectric device mounted at the base of the objective. For BrdU/PHH3 staining, at least 500 hepatocytes were counted in at least 10 different areas at each culture time (12, 24, 36, 48, 60 hours after plating). For ploidy experiments, at least 250 randomly selected fields of liver sections were imaged, corresponding to the analysis of more than 8,000 cells for nuclear ploidy analysis and more than 1,000 cells for cellular analysis.

To perform ploidy experiments, Hoechst 33342 staining was used to recognize nuclei with a roundness >0.8 , and then β -catenin (mouse models) or KL1 (patients) staining was used to discriminate mononuclear and binuclear hepatocytes. Nuclear ploidy was detected automatically by a specific macro developed with ImageJ software (pixels ranging from 200 to 2,500 px²). Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Software) was used for figure construction.

Statistics. Statistical significance was determined with a 2-tailed Student's *t* test performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). All data are representative of 3 to 8 animals of each genotype or 3 to 5 cultures and are expressed as mean $\pm$ SEM. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Study approval. All procedures were carried out according to the French guidelines for the care and use of experimental animals. All animal studies were approved by the regional veterinary services of the Paris police headquarters (agreement no. 75-956) and by the

Mouse Facility Core laboratory (Institut Cochin, Inserm U1016, Université Paris Descartes, Paris, France). All patients gave written informed consent, and the study protocol was approved by the ethics committee of the Beaujon Hospital.

Acknowledgments

The authors are grateful to Jean Pierre Couty, Sabine Colnot, and Catherine Postic for their critical evaluation of the work and to all members of the lab for fruitful discussion. We also thank the facilities of Histology, Immunostaining, Laser Microdissection and Cell Imaging and Cytometry Immuno-Biology (Institut Cochin, Inserm U1016, Paris, France). This study was supported by grants from INSERM, the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2010 BLANC 1123 02), the Fondation ARC pour la recherche contre le Cancer (Fondation ARC no. SF120111203568), the Association Française sur l'Etude du Foie, and Janssen Cilag laboratory. Géraldine Gentric was a recipient of grants from DIM Région Ile de France "Cardiovasculaire - Obésité - Rein - Diabète" and from Fondation ARC.

Address correspondence to: Chantal Desdouets, Institut Cochin, Faculté de Médecine Cochin Port Royal, Département de Développement, Reproduction et Cancer, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. Phone: 33.1.44.41.24.39; E-mail: chantal.desdouets@inserm.fr.

- Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010;18(2):175–189.
- Duncan AW, et al. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature*. 2010;467(7316):707–710.
- Guidotti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdouets C. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(21):19095–19101.
- Duncan AW, et al. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology*. 2012;142(1):25–28.
- Toyoda H, et al. Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut*. 2005;54(2):297–302.
- Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidization of liver cells. *Adv Exp Med Biol*. 2010;676:123–135.
- Gentric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol*. 2014;184(2):322–331.
- Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol*. 2000;10(3):161–171.
- Chen HZ, et al. Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1192–1202.
- Margall-Ducos G, Morizur-Celton S, Couton D, Bregerie O, Desdouets C. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis. *J Cell Sci*. 2007;120(pt 20):3633–3639.
- Pandit SK, et al. E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2012;14(11):1181–1191.
- Duncan AW, et al. Aneuploidy as a mechanism for stress-induced liver adaptation. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3307–3315.
- Duncan AW. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol*. 2013;24(4):347–356.
- Gerlyng P, et al. Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Prolif*. 1993;26(6):557–565.
- Yamada T, et al. Increased polyploidy, delayed mitosis and reduced protein phosphatase-1 activity associated with excess copper in the Long Evans Cinnamon rat. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1998;99(3):283–304.
- Takeda K, Eguchi H, Soeda S, Shirahata A, Kawamura M. Fe(II)/Cu(I)-dependent P-type ATPase activity in the liver of Long-Evans cinnamon rats. *Life Sci*. 2005;76(19):2203–2209.
- Hasmall SC, Roberts RA. Hepatic ploidy, nuclearity, and distribution of DNA synthesis: a comparison of nongenotoxic hepatocarcinogens with noncarcinogenic liver mitogens. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;144(2):287–293.
- Gorla GR, Malhi H, Gupta S. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J Cell Sci*. 2001;114(pt 16):2943–2951.
- Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle*. 2010;9(3):460–466.
- Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, Margall-Ducos G, Desdouets C. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1880–1887.
- Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(4):545–563.
- Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679–689.
- Angulo P. NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1848–1852.
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2):S99–S112.
- Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):656–665.
- Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol*. 2012;56(6):1384–1391.
- Paradis V, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology*. 2009;49(3):851–859.
- Park EJ, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010;140(2):197–208.
- Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology*. 2010;51(5):1820–1832.
- Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology*. 1998;27(6):1463–1466.
- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med*.

- 2009;9(3):299–314.
32. Sanyal AJ, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120(5):1183–1192.
 33. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol*. 2002;37(1):56–62.
 34. Aubert J, Begriche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;35(10):630–637.
 35. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):59–69.
 36. de Oliveira CP, et al. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2008;38(2):159–165.
 37. Oliveira CP, et al. Vitamin C and vitamin E in prevention of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in choline deficient diet fed rats. *Nutr J*. 2003;2:9.
 38. Pacana T, Sanyal AJ. Vitamin E and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012;15(6):641–648.
 39. Menon SG, et al. Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G1 arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*. 2007;67(13):6392–6399.
 40. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 2005;10:1881–1896.
 41. Yang SQ, Lin HZ, Mandal AK, Huang J, Diehl AM. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology*. 2001;34(4):694–706.
 42. Leclercq IA, et al. Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin. *Lab Invest*. 2006;86(11):1161–1171.
 43. Yang S, et al. Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology*. 2004;39(2):403–411.
 44. Haluzik M, et al. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology*. 2004;145(7):3258–3264.
 45. Guigas B, et al. AMP-activated protein kinase-independent inhibition of hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation by AICA riboside. *Biochem J*. 2007;404(3):499–507.
 46. Trak-Smayra V, Paradis V, Massart J, Nasser S, Jebara V, Fromenty B. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. *Int J Exp Pathol*. 2011;92(6):413–421.
 47. Nishina PM, Lowe S, Wang J, Paigen B. Characterization of plasma lipids in genetically obese mice: the mutants obese, diabetes, fat, tubby, and lethal yellow. *Metabolism*. 1994;43(5):549–553.
 48. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol*. 2012;22(13):1166–1175.
 49. Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(1):35–44.
 50. Caballero F, et al. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J Biol Chem*. 2010;285(24):18528–18536.
 51. Horie Y, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest*. 2004;113(12):1774–1783.
 52. Panasyuk G, et al. PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat Commun*. 2012;3:672.
 53. Kudryavtsev BN, Kudryavtseva MV, Sakuta GA, Stein GI. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1993;64(6):387–393.
 54. Desdouets C, Thoresen GH, Senamaud-Beaufort C, Christoffersen T, Brechot C, Sobczak-Thépot J. cAMP-dependent positive control of cyclin A2 expression during G1/S transition in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261(1):118–122.
 55. Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(8):1317–1326.
 56. Norbury C, Blow J, Nurse P. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J*. 1991;10(11):3321–3329.
 57. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci*. 2012;125(pt 20):4703–4711.
 58. Diffley JF. Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366(1584):3545–3553.
 59. Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA. How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(8):405–414.
 60. Fox DT, Duronio RJ. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development*. 2013;140(1):3–12.
 61. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179–204.
 62. Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J*. 2011;436(3):527–536.
 63. Stracker TH, Roig I, Knobel PA, Marjanovic M. The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet*. 2013;4:37.
 64. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;58(4):1497–1507.
 65. Liu W, Baker SS, Baker RD, Nowak NJ, Zhu L. Upregulation of hemoglobin expression by oxidative stress in hepatocytes and its implication in nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2011;6(9):e24363.
 66. Laurent G, et al. Oxidative stress contributes to aging by enhancing pancreatic angiogenesis and insulin signaling. *Cell Metab*. 2008;7(2):113–124.
 67. Naik A, Kosir R, Rozman D. Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. *Genomics*. 2013;102(2):84–95.
 68. Gentric G, Celton-Morizur S, Desdouets C. Polyploidy and liver proliferation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36(1):29–34.
 69. Davoli T, de Lange T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:585–610.
 70. Pandit SK, Westendorp B, de Bruin A. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol*. 2013;23(11):556–566.
 71. Nadal C, Zajdela F. [Somatic polyploid cells in rat liver. I. The role of binuclear cells in the formation of the polyploid cells]. *Exp Cell Res*. 1966;42(1):99–116.
 72. Sigal SH, et al. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol*. 1999;276(5):G1260–1272.
 73. Toyoda H, Kumada T, Bregerie O, Brechot C, Desdouets C. Conserved balance of hepatocyte nuclear DNA content in mononuclear and binuclear hepatocyte populations during the course of chronic viral hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(28):4546–4548.
 74. Troadec MB, et al. Iron overload promotes cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes. *J Hepatol*. 2006;44(2):391–399.
 75. Aylon Y, Oren M. p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol*. 2012;5(4):315–323.
 76. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729–740.
 77. Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):197–210.
 78. Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology*. 2008;47(2):677–685.
 79. Davoli T, Denchi EL, de Lange T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*. 2010;141(1):81–93.
 80. Diril MK, et al. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3826–3831.
 81. Paradis V, et al. Cullin7: a new gene involved in liver carcinogenesis related to metabolic syndrome. *Gut*. 2013;62(6):911–919.
 82. Kleiner DE, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–1321.
 83. Bedossa P, Poinard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289–293.
 84. Tuttle AH, et al. Immunofluorescent detection of two thymidine analogues (CldU and IdU) in primary tissue. *J Vis Exp*. 2010;(46):2166.
 85. Nishina S, et al. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology*. 2008;134(1):226–238.

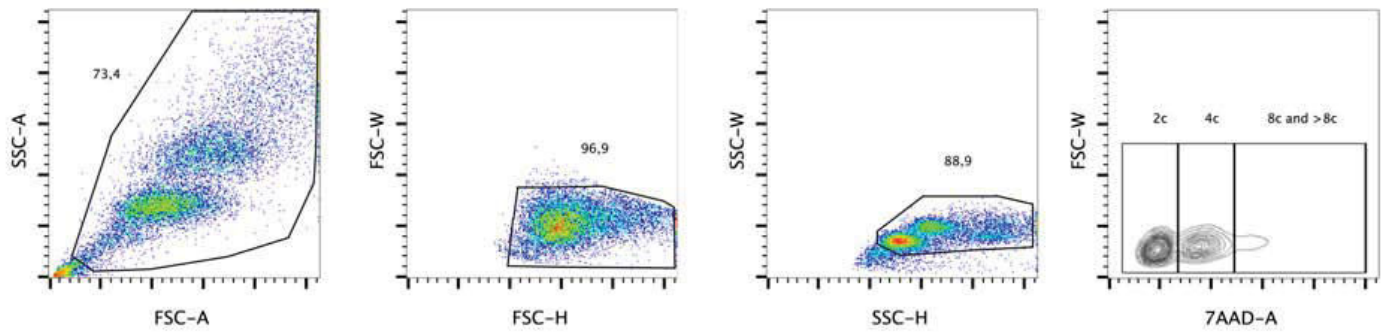


Figure S1. Gating strategy used to identify 2c, 4c, 8c and $\geq 8c$ hepatocytes
Hepatocyte suspensions were fixed and labelled with 7-AAD and analysed by flow cytometry. FACS analysis shows the ploidy distribution from a representative wild-type mouse. Unspecific signals resulting from doublets events (cells) were excluded based on FSC-height vs. FSC-width and SSC-height vs. SSC-width dot plots and excluded from the data acquired according to flow cytometric standard procedure.

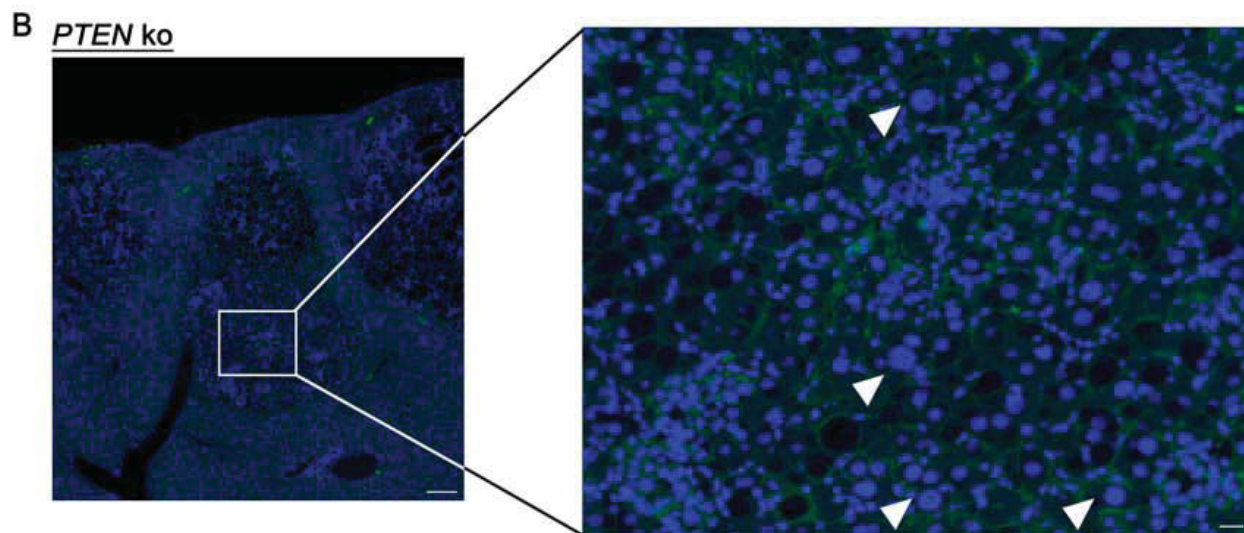
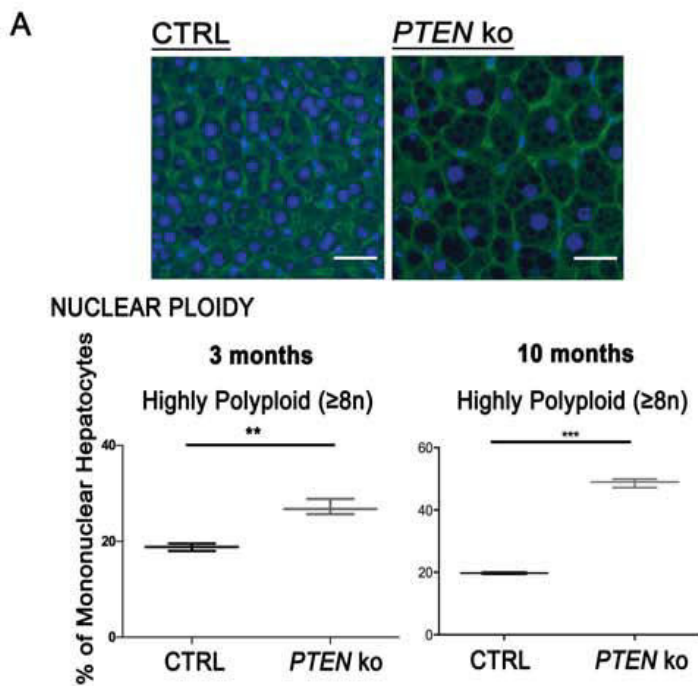
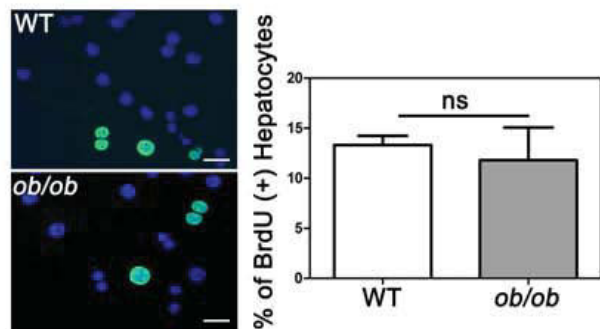


Figure S2. Hepatocyte ploidy profiles are altered in the liver of *PTEN*-null mice.

(A) Nuclear ploidy: upper panel: images of liver sections after double staining with anti- β -catenin (plasma membrane labeling, green) and Hoechst (nucleus, blue), in 3 month-old CTRL and *PTEN* ko mice (scale bar: 20 μ m). Lower panel: Box plots of the percentage of $\geq 8n$ mononuclear hepatocytes relative to total hepatocytes in 3 and 10 month-old control CTRL (white box) and *PTEN* ko (gray box) mice. Results are means $\pm$ SEM ($n = 3$ per group), ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Student's t test.

(B) Liver section from a 10 month-old *PTEN* ko mouse showing HCCs (scale bar: 500 μ m). Note that highly polyploid mononuclear hepatocytes (indicated by arrowheads) are present in HCC nodules (as shown in the high power field, scale bar: 100 μ m).

A



B

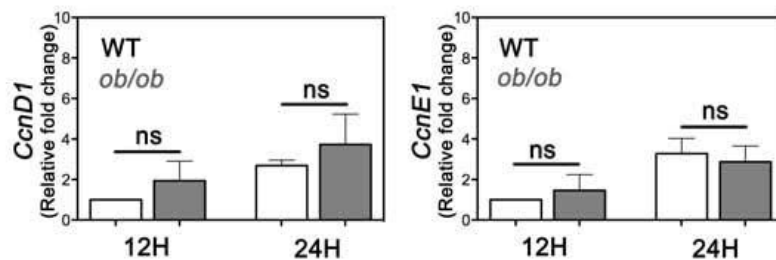


Figure S3. Progression through G1 and entry to S phase are similar between primary cultures of *ob/ob* hepatocytes and control hepatocytes.

(A) Left panel: Double immunostaining of primary hepatocytes with anti-BrdU (green) and Hoechst (blue). Right panel: Analysis of BrdU short pulse incorporation (32-36 h post-plating) in WT (white bar) and *ob/ob* cultures (gray bar) ($n=5$ per group). ns: not significant. Student's t test.

(B) Total RNA was extracted from WT (white boxes) and *ob/ob* (gray boxes) primary hepatocytes ($n=5$). The abundance of *CcnD1* and *CcnE1* mRNA was analyzed by quantitative real-time PCR. ns: not significant. Student's t test.

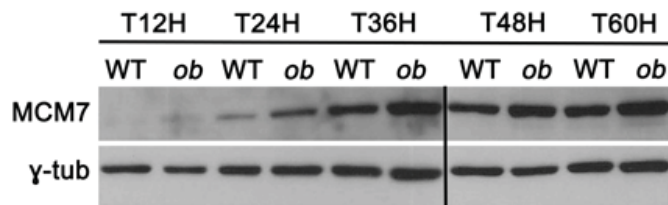


Figure S4. MCM7 is highly expressed in *ob/ob* hepatocytes. The abundance of MCM7 protein was analyzed during time-course experiments. γ -tubulin was used as a loading control. The western blot is from the same experiment as the Figure 4E and Figure 6 and is representative of four different cultures. Lanes were run on the same gel but were noncontiguous.

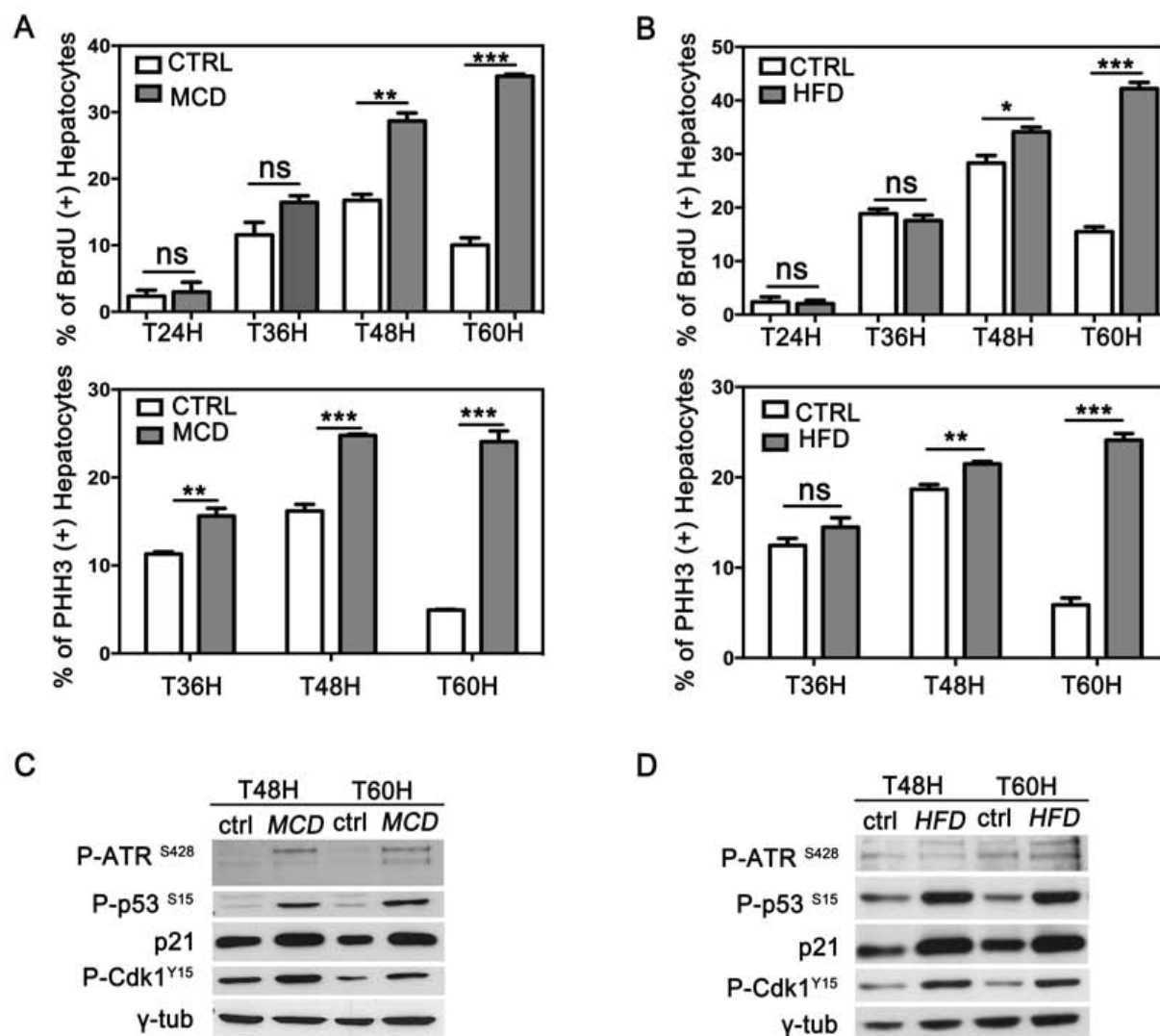


Figure S5. Cell cycle analysis of primary hepatocytes from dietary mouse models of NAFLD.

(A) MCD model (B) HFD model. Upper panel: Quantitative analysis of BrdU labeling assessed by the percentage of BrdU-positive cells in primary hepatocytes isolated from WT (white bars) or MCD and HFD (gray bars) livers. Lower panel: Quantitative analysis of G2 labeling index assessed by the percentage of PHH3-positive nuclei. Data are the means $\pm$ SEM for three independent cultures. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, ns: not significant, Student's *t* test.

(C) MCD model (D) HFD model. Western blot analysis of the abundance of phosphorylated-ATR (Ser428), phosphorylated-p53 (Ser15), p21 protein and phosphorylated-Cdk1 (Tyr15) in primary hepatocytes from CTRL, MCD and HFD mice cultured for 48 h or 60 h. γ -tubulin was used as a loading control. The western blot is representative of three different cultures.

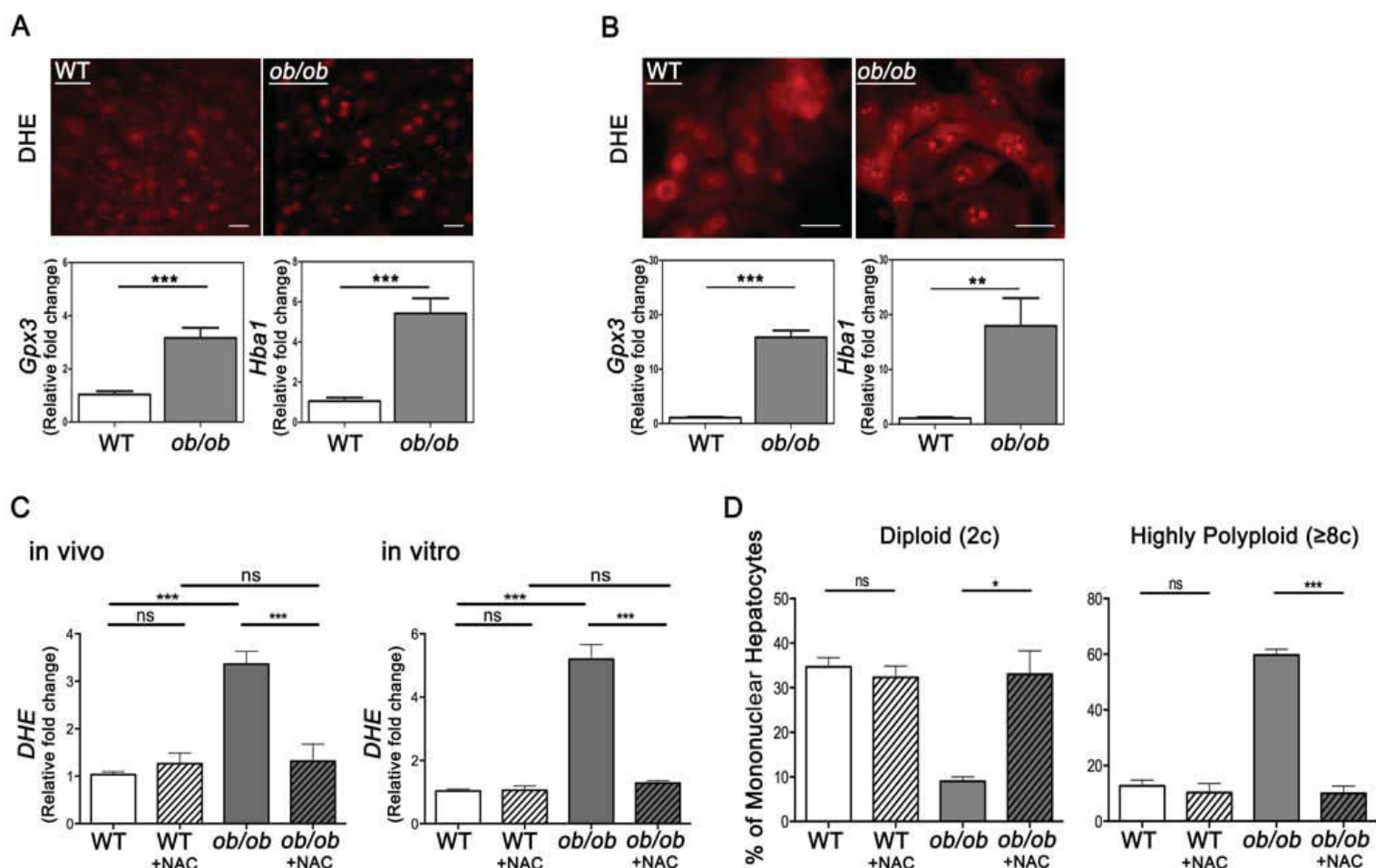


Figure S6. Impact of oxidative stress on NAFLD hepatocyte polyploidization.

Assessment of oxidative stress in the liver (A) or in primary hepatocytes (B) of WT and *ob/ob* mice (treated or not with NAC). The ROS-sensitive vital dye DHE (red) was used to detect the production of superoxide (upper panels). The abundance of *Gpx3* and *Hba1* mRNA was measured by quantitative real-time PCR ($n=6$ for both in vivo and in vitro analyses). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Student's *t* test.

(C) Quantitative analysis of DHE fluorescence intensity in vivo ($n=3$ per group) and in vitro ($n=4$ per group). *** = $P < 0.001$, ns: not significant, Student's *t* test.

(D) Analyses of nuclear ploidy (2c, $\geq 8c$) in primary cultures (T60h post-plating) isolated from WT (white bar) or *ob/ob* (gray bar) liver treated (stripped gray bars) or not with NAC (4 independent cultures). * $P < 0.05$, *** = $P < 0.001$, ns: not significant, Student's *t* test.