Etude du rôle de LKB1 dans le foie

Pierre-Alexandre Just

▶ **To cite this version:**

Pierre-Alexandre Just. Etude du rôle de LKB1 dans le foie. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T085 . tel-01127169

HAL Id: tel-01127169
https://theses.hal.science/tel-01127169

Submitted on 7 Mar 2015

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : *Oncogenèse des épithéliums digestifs - Institut Cochin*

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Pierre-Alexandre JUST

Etude du rôle de LKB1 dans le foie

Date de soutenance : 10/12/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Christine PERRET	DR1, INSERM, Paris
Rapporteurs :	Valérie PARADIS	PU-PH, Université Paris Diderot, Paris
	Anne-Françoise BURNOL	DR1, CNRS, Paris
Examinateurs :	Benoît TERRIS	PU-PH, Université Paris Descartes, Paris
	Jean ROSENBAUM	DR1, INSERM, Bordeaux
Président :	Christian AUCLAIR	PU, ENS, Cachan

Remerciements

Au moment d'achever la rédaction de ce mémoire, je souhaite remercier un grand nombre de personnes qui ont permis cette aventure dans le monde LKB1.

Monsieur le professeur Christian Auclair, depuis mon Master 2, je suis étudiant au sein de votre École doctorale et j'ai pu apprécier l'incroyable diversité, la pluridisciplinarité et la qualité de son enseignement. Vous avez à plusieurs reprises jugé mon travail lors de différentes présentations et vos remarques m'ont toujours été sources de réflexions fructueuses. Soyez-en remercié.

Madame le professeur Valérie Paradis, vous me faites l'honneur de juger mon travail. Votre travail de recherche est en effet pour moi un exemple, alliant intelligemment observations anatomocliniques et confrontations biologiques. J'apprécie votre raisonnement, partant d'approches morphologiques et aboutissant à de nouveaux paradigmes pour la carcinogenèse hépatique, notamment celle liée au syndrome métabolique. Soyez-en remerciée.

Chère Anne-Françoise, voilà quelques années que je fréquente épisodiquement ton bureau pour bénéficier de tes discussions pertinentes. Tu t'es toujours rendue disponible pour entendre mes hypothèses, souvent farfelues, et apporter, sans aucun *a priori* (ce qui est une qualité malheureusement trop rare dans le monde de la recherche), des éléments de réponse et des conseils expérimentaux de premier choix. Je pense que ce travail n'est qu'une introduction à de futurs travaux en commun, experte que tu es en métabolisme et signalisation, et bien plus consciencieuse que moi dans l'approche expérimentale. Sois-en remerciée.

Monsieur Jean Rosenbaum, vous me faites également l'honneur de vous déplacer pour juger mon travail. Nous n'avons pas encore eu l'occasion de nous rencontrer directement mais je ne doute pas que vos remarques et commentaires seront fructueux pour l'aboutissement de ce travail. Soyez-en remercié.

Très cher Benoît, tu as toujours été mon mentor et tu as su me guider vers l'équipe de Christine pour mon Master 2 et mon doctorat. Tu m'as gentiment laissé « compter les carbones » au lieu de faire un travail purement alimentaire. J'ai pris beaucoup de plaisir sur ce projet assez fondamental mais je pense que ton intérêt marqué pour les corrélations génotype/phénotype sera, à l'avenir, certainement source de beaux travaux ensemble. Sois-en remercié.

Ma très chère Christine, tout ce travail accompli l'a été grâce à toi. Tu as été une directrice formidable, me laissant très libre pour aborder empiriquement différentes hypothèses et angles d'approche. Ta connaissance encyclopédique de la biologie a fait évoluer le projet vers des concepts audacieux et hors des sentiers battus. Ton approche conceptuelle et empirique de la biologie est celle qui me plait. Nous ne réfléchissons pas de la même manière mais nous nous sommes toujours retrouvés sur le fond des choses ; j'aime ton habilité à manier les concepts, quitte à les défaire si la vraie vie ne colle pas avec les idées trop bien assises. Merci pour

tout.

Sur le papier, mon projet de thèse paraissait simple. Dans les faits, les résultats obtenus ont rarement été ceux qui étaient attendus, faisant évoluer ce projet vers de nombreuses pistes, plus ou moins fructueuses, parfois opposées. Ceci a fait toute la richesse de ce projet, mais a nécessité l'aide précieuse de nombreuses personnes.

Tout d'abord, un immense merci à l'équipe « LKB1 », par ordre d'apparition sur scène : Virginie Audard, Laëtitia Finzi qui m'a tout appris, Soso et le fameux blot du 24 décembre qui nous a appris l'existence de ΔN-LKB1, Rajae ma colloc de bureau et de projet et avec qui j'ai su apprécier les délices de Fairouz pour oublier les déprims de manip, Valérie qui a géré avec *brio* les différentes lignées de souris, de nombreuses techniques histologiques et qui n'a pas d'égal pour récolter 30 litres de sang à partir d'une seule souris, Typhanie qui a beaucoup débrouillé le phénotype des bébés LKB1, Frédéric, directeur de la LFSWBE, tu as su faire perdurer la grande tradition du Western, Monsieur le président Massiré qui s'est plongé comme personne dans la difficile compréhension des altérations métaboliques des souris LKB1, Roland qui a mis toute sa compétence et sa rigueur pour l'étude techniquement difficile des tumeurs humaines et enfin Sara qui a, je l'espère, l'immense plaisir de poursuivre ce projet passionnant et de se former à l'archéologie de mes congélateurs mal rangés. À Catherine, car avec toi la culture n'était pas que cellulaire. Merci pour tout ton apprentissage du génie génétique. Chère Hélène, un infini merci pour tes discussions fructueuses et ta relecture attentive de ce « polar », tant sur le fond que sur la forme.

Un grand merci également aux autres groupes de l'équipe :

— aux *Romagnolo* : Béatrice, John, Medhi, Aurélie, la « Belge » (à qui je dois toujours une tablette de chocolat aux noix), ... : vous avez fait la bonne ambiance générale du labo et vous m'avez souvent aidé pendant mes congés pour surveiller (et peser...) de près mes petites souris, mêmes quand elles étaient nourries de farine de matsa.

— aux *Colnot* : Sabine, Cécile, Angélique, Chiara, Pascalette, Nadia.... : ma foie, ce ne sera pas la dernière foie que je parlerai de foie avec vous... Merci pour toutes nos manips et discussion conjointes. Un merci spécial à Cécile qui m'a appris l'IHC sur souris et une pensée émue pour Cyril dont le départ nous a à tout jamais privé de son humour et de sa bonne humeur légendaires.

— aux *Immunos* : Jean-Pierre, Anne-Marie, Antoine... Même si je ne comprends pas grands choses à vos hautes sphères, j'ai beaucoup aimé travaillé avec vous !

Ce travail a grandement bénéficié de magnifiques collaborations :

— avec le groupe de Carina Prip-Buus, pour l'étude du métabolisme lipidique et de la bioénergétique mitochondriale. Vous m'avez ouvert les portes

de votre labo avec beaucoup de gentillesse et m'avez livré tous vos secrets expérimentaux. Carina, j'espère que nous allons continuer à travailler ensemble car j'apprécie beaucoup ton raisonnement et ta rigueur, mêlés à toute ta sympathie. Merci infiniment à Véronique pour m'avoir appris à manier toute sorte de matériels assez étranges pour moi, soufflette à air comprimé, guillotine...

— avec le groupe de Frédéric Lemaigre, notamment Alexis Poncy, qui ont réalisé la superbe étude morphologique de la tubulogenèse biliaire dans nos souris.
— avec l'équipe de Serge Luquet, notamment Raphaël Denis, qui ont réalisé la complexe étude calorimétrique de nos souris.
— avec Cédric Coulouarn, pour de nombreuses analyses bioinformatiques présentées dans ce mémoire.

Un grand nombre de facilités offertes par l'Institut Cochin ont été mises à profit : la plateforme des animaleries (un grand merci à Isabelle, qui sait si bien concilier bien-être animal avec impératifs expérimentaux), la plateforme GENOMIC, notamment Florent, et la plateforme HISTIM. Merci également à Patricia, gestionnaire hors pair, pour avoir fait passé mes commandes avant celles de John...

Pour finir sur ce côté de la rue, je ne citerai pas, de peur d'en oublier certains, toutes les personnes que j'ai côtoyées au sein de l'Institut, leur demandant conseils ou leur taxant des réactifs. C'est un plaisir de travailler ici tant les échanges sont riches et variés. Je pense en particulier aux *Maire*, *Desdouets*, *Mayeux*, *Viollet*, *Postic*, *Bouillaud*, *Vaulont*, *etc.*

En traversant la rue du Faubourg Saint-Jacques, je dois maintenant remercier l'ensemble du personnel du service de pathologie de l'hôpital, pour m'avoir aidé et supporté pendant mes années de transition. Tout d'abord mes plus profonds remerciements à madame le professeur Marie-Cécile Vacher-Lavenu qui a toujours eu pour moi la plus grande bienveillance et qui a su gentiment me témoigner de sa confiance dans mon parcours hospitalo-universitaire. J'apprécie grandement tous les efforts et les excellentes conditions de travail que vous m'apportez pour mon épanouissement de routine et de recherche. Un grand merci également à madame Anne Audebourg qui a su m'aider à développer certains immunomarquages délicats et qui m'a (trop) souvent laissé m'étaler avec mon bazar sur sa paillasse. Merci également à madame Brigite Radenen, pour avoir toujours accepté mes demandes souvent trop urgentes... Enfin, une mention spéciale pour Bécassine *Puppet* pour avoir assuré presque toute ma routine pendant que je me noyais dans la rédaction de ce mémoire (et c'est tout...), et à *Bubulle* qui prend le relais, mais en musique. Enfin, un grand merci à monsieur le docteur Alexandre Rouquette, responsable qualité, chef de l'aile éponyme, directeur de l'UF *Entité*, orthotypographiste des hôpitaux de Paris, et qui doit être le seul à comprendre pourquoi

je tiens à remercier maintenant Shane McGowan, Jean-Côme Charpentier, les frères Tang, le maire de Longjumeau et *the Gingerbread man*.

« L'argent ne fait pas le bonheur », mais comme il y contribue fortement, je remercie sincèrement François Bassompierre et les postes d'accueil CNRS/AP-HP pour m'avoir financé deux ans pendant cette thèse.

Merci à LaTeX, pour le pire mais surtout pour le meilleur.

Enfin, mes derniers et plus tendres remerciements vont à ma famille qui m'a toujours épaulé, mes parents, mon frère, ma grand-mère, et surtout ma chérie Émilie et mes enfants Laurine, Colin et Léon pour m'avoir supporté pendant la difficile période de la rédaction et pour m'entourer de tout leur amour. Je vous aime.

Table des matières

Table des figures **xi**

Liste des tableaux **xiii**

Liste des gènes et conventions typographiques **xv**

I Introduction **1**

1 Le foie normal **5**
1.1 Anatomie, histologie, embryologie 5
1.1.1 Anatomie générale 5
1.1.2 Histologie structurale 6
1.1.3 Histologie fonctionnelle, concept de zonage et ses régulateurs moléculaires 10
1.1.4 Bases de l'organogenèse hépatique et développement des canaux biliaires 17
1.2 Métabolisme glucidolipidique 23
1.2.1 Rôle du foie dans l'homéostasie glucidolipidique : l'état nourri. 24
1.2.2 Rôle du foie dans l'homéostasie glucidolipidique : le jeûne . . 30
1.2.3 Catabolisme hépatique des acides aminés 34
1.2.4 Régulation moléculaire 38
1.2.5 Zonage du métabolisme glucidolipidique 44

2 Le carcinome hépatocellulaire **47**
2.1 Caractères généraux 49
2.1.1 Épidémiologie 49
2.1.2 Étiologies 49
2.1.3 Le cas des CHC survenant sans cirrhose 51
2.1.4 Les adénomes hépatocytaires et leur risque de transformation en CHC 51

2.2 Une maladie hétérogène . . . 53
2.2.1 Sur le plan morphologique . . . 53
2.2.2 Sur le plan moléculaire . . . 55
2.3 Quelques voies moléculaires importantes . . . 60
2.3.1 La voie PI3K/AKT/mTOR . . . 60
2.3.2 La voie « métabolique » . . . 62
2.3.3 Les voies de « différenciation » . . . 65
2.4 Les CHC mutés *CTNNB1* . . . 70
2.4.1 Activation différentielle de la voie Wnt/β-caténine en fonction du tissu et du stade de développement . . . 70
2.4.2 Multiples mécanismes d'activation de la voie WNT/β-caténine dans le CHC . . . 71
2.4.3 Les modèles murins d'hépatocarcinogenèse liée à β-caténine 73
2.4.4 Les caractéristiques cliniques et morphologiques des CHC mutés *CTNNB1* . . . 74
2.4.5 Comment expliquer l'aspect morphologique distinctif des CHC mutés *CTNNB1* ? . . . 76

3 LKB1 : kinase multi-tâches 79
3.1 Le syndrome de Peutz-Jeghers . . . 79
3.1.1 Contexte historique . . . 79
3.1.2 Structure du gène et de la protéine . . . 80
3.1.3 Profil d'invalidation de *LKB1* dans le syndrome de Peutz-Jeghers . . . 81
3.1.4 Aspects cliniques du syndrome de Peutz-Jeghers . . . 82
3.1.5 Corrélations génophénotypiques dans les syndrome de Peutz-Jeghers . . . 83
3.1.6 Le polype de Peutz-Jeghers. . . . 83
3.1.7 Apport des modèles murins. . . . 85
3.1.8 Une séquence hamartome→cancer dans le syndrome de Peutz-Jeghers ? . . . 86
3.1.9 Une théorie possible pour expliquer la carcinogenèse intestinale. . . . 88
3.2 L'axe LKB1/AMPK. . . . 89
3.2.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression de LKB1. . . . 90
3.2.2 Modifications post-traductionnelles de LKB1. . . . 90
3.2.3 LKB1 dans un complexe. . . . 91
3.2.4 l'AMPK, principale cible de LKB1. . . . 92
3.2.5 Activation de l'AMPK. . . . 94
3.3 Une kinase multi-tâches . . . 97
3.3.1 Contrôle des kinases de la famille ARK . . . 97

3.3.2 Contrôle du métabolisme glucidolipidique. 97
3.3.3 Contrôle de la polarité cellulaire. 103
3.3.4 Contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaires. . . 106
3.3.5 *LKB1* : oncogène ou gène suppresseur de tumeur ? 109
3.3.6 LKB1 et autres voies 113

4 Hypothèse de travail et plan expérimental 115

II Résultats 119

1 Dialogue entre LKB1 et β-caténine 121
1.1 Introduction 121
1.2 Résultats 125
1.3 Discussion 211

2 LKB1 et métabolisme hépatique 215
2.1 Introduction 215
2.2 Résultats 216
2.2.1 Lkb1 joue des rôles différents dans le foie embryonnaire et le foie adulte. 216
2.2.2 Lkb1 dans le foie contrôle l'homéostasie énergétique globale. 216
2.2.3 Lkb1 inhibe la signalisation AKT et la néoglucogenèse dans le foie. 217
2.2.4 L'invalidation hépatospécifique de *Lkb1* induit une dépendance énergétique aux acides aminés. 218
2.2.5 Rôles de Lkb1 dans le métabolisme lipidique hépatique. . . . 220
2.3 Discussion. 239

3 Une nouvelle isoforme de LKB1 243
3.1 Introduction 243
3.2 Résultats 245
3.3 Discussion 245

III Conclusion 249

Bibliographie 255

Table des figures

1.1 Histologie du foie 7
1.2 L'hépatocyte 9
1.3 Le lobule hépatique selon Kiernan. 10
1.4 L'acinus hépatique selon Rappaport. 11
1.5 L'acinus et le lobule hépatiques. 12
1.6 La travée hépatocytaire dans le concept de zonage métabolique. . . 13
1.7 Fonctions métaboliques zonées 14
1.8 La voie Wnt/β-caténine dans le foie normal. 16
1.9 La voie Wnt/β-caténine dans le zonage métabolique 18
1.10 Développement précoce du foie. 19
1.11 Tubulogenèse biliaire. 21
1.12 Acteurs moléculaires du développement biliaire 22
1.13 Métabolisme glucidolipidique hépatocytaire à l'état nourri 25
1.14 Régulation du métabolisme du glycogène. 27
1.15 Métabolisme glucidolipidique hépatocytaire à jeun 31
1.16 Catabolisme hépatocytaire des acides aminés. 35
1.17 Régulation du métabolisme à l'état nourri. 39
1.18 Régulation du métabolisme à jeun. 42
1.19 Régulation de FOXO1 43
1.20 Zonage lobulaire de la signalisation insuline 46

2.1 Aspects macroscopiques des CHC. 54
2.2 Aspects microscopiques des CHC. 56
2.3 Mutations récurrentes dans le CHC 58
2.4 Profils transcriptionnels des CHC 59
2.5 Profils transcriptionnels des CHC 60
2.6 Signalisation IGF 64
2.7 CHC mutés *CTNNB1* 75

3.1 Structure de l'AMPK 93
3.2 Schéma classique de l'activation de l'AMPK 94

3.3 Activation de l'AMPK au lysosome 96
3.4 Famille des *AMPK-related kinases*. 98
3.5 Rôles métaboliques de l'AMPK 99
3.6 Polarisation cellulaire induite par LKB1. 104
3.7 Signalisation mTOR 107
3.8 L'axe LKB1/AMPK dans le cancer 112

2.1 Modifications de la composition alimentaire lors de la transition allaitement - sevrage. 219
2.2 Modèles murins de délétion hépatique de *Lkb1* 221
2.3 Phénotype global des animaux LKBKO^{livemb}. 222
2.4 Phénotype global des animaux LKBKO^{livad}. 223
2.5 Composition corporelle des animaux LKBKO^{livad}. 224
2.6 Activité locomotrice et comportement alimentaire dans le modèle LKBKO^{livad}. 225
2.7 Calorimétrie indirecte dans le modèle LKBKO^{livad}. 226
2.8 Tolérance au glucose et au pyruvate chez les animaux LKBKO^{livad}. 227
2.9 Contenu hépatique en glycogène dans le modèle LKBKO^{livad}. 228
2.10 Signalisation AMPK dans le modèle LKBKO^{livad}. 229
2.11 Signalisation AKT dans le modèle LKBKO^{livad}. 230
2.12 Insulinémie dans le modèle LKBKO^{livad}. 231
2.13 Expression des gènes cibles de Foxo1 dans le modèle LKBKO^{livad}. . 232
2.14 Expression rénale de Pepck dans le modèle LKBKO^{livad}. 233
2.15 Néoglucogenèse à partir d'acides aminés chez les animaux LKBKO^{livad}.234
2.16 Prise pondérale et survie dans le modèle LKBKO^{livemb} sous différents régimes alimentaires. 235
2.17 Dosages en triglycérides sériques et hépatiques, en cholestérol total sérique et en β-hydroxybutyrate sérique dans le modèle LKBKO^{livad}.236
2.18 Expression des gènes impliqués dans la lipogenèse et l'estérification des acides gras dans le modèle LKBKO^{livad}. 237
2.19 Expression des gènes impliqués dans la β-oxydation des acides gras et la cétogenèse dans le modèle LKBKO^{livad}. 238
2.20 Expression transcriptionnelle et protéique de Lkb1 en fonction de l'état nutritionnel. 240
2.21 Activité *in situ* des complexes II et IV de la chaîne respiratoire dans le modèle LKBKO^{livad}. 241

3.1 Découverte d'une nouvelle isoforme de LKB1. 244
3.2 D'autres nouvelles isoformes de LKB1 ? 247

Liste des tableaux

1.1 Zonage du métabolisme glucidolipidique. 44

2.1 Classification OMS des tumeurs hépatiques. 48

3.1 Corrélations génophénotypiques dans le syndrome de Peutz-Jeghers. 83
3.2 Tumeurs malignes chez les souris *Lkb1*$^{+/-}$ 110

Liste des gènes et conventions typographiques

ACACA acetyl-CoA carboxylase alpha.
ACLY ATP citrate lyase.
AFP alpha-fetoprotein.
AGXT alanine-glyoxylate aminotransferase.
AHR aryl hydrocarbon receptor.
AKT1S1 AKT1 substrate 1 (proline-rich).
AKT2 v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2.
ALB albumin.
APC adenomatous polyposis coli.
AQP9 aquaporin 9.
ARG1 arginase 1.
ATM ATM (ataxia telangiectasia mutated) serine/threonine kinase.
AXIN1 axin 1.
AXIN2 axin 2.

BMP4 bone morphogenetic protein 4.
BRSK1 BR serine/threonine kinase 1.
BRSK2 BR serine/threonine kinase 2.
BTRCP beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase.

CAB39 calcium binding protein 39, plus connue comme Mo25α.
CAB39L calcium binding protein 39-like, plus connue comme Mo25β.
CAMKK2 calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta.
CAR voir NR1I3.

CCND1 cyclin D1.

CD36 CD36 molecule / antigen (thrombospondin receptor).

CDC37 cell division cycle 37.

CDH1 cadherin 1, type 1, E-cadherin.

CDKN1A cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1).

CES3A carboxylesterase 3A.

CPS1 carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial.

CPT1A carnitine palmitoyltransferase 1A (liver).

CREB1 cAMP responsive element binding protein 1.

CREBBP CREB binding protein (CBP).

CRTC2 CREB regulated transcription coactivator 2.

CSNK1A1 lymphoid enhancer-binding factor 1, communément appelée CK.

CTNNB1 catenin (cadherin-associated protein), beta 1, communément appelée β-caténine.

CUL7 cullin 7.

CYP1A2 cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2.

CYP2E1 cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1.

Cyp2f2 cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2.

CYP7A1 cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1.

CYP8B1 cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1.

DEPTOR DEP domain containing MTOR-interacting protein.

DLAT dihydrolipoamide S-acetyltransferase, enzyme du complexe de la pyruvate deshydrogénase.

DLL1 delta-like 1.

DLL3 delta-like 3.

DLL4 delta-like 4.

EIF4EBP1 eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1.

EP300 CREB binding protein (CBP).

EPCAM epithelial cell adhesion molecule.

ESR1 estrogen receptor 1 (alpha).

FABP1 fatty acid binding protein 1, liver.

FASN fatty acid synthase.

FBP1 fructose-1,6-bisphosphatase, communément appelée FBPase.

FBPase voir FBP1.

FGF1 fibroblast growth factor 1.

FGF10 fibroblast growth factor 10.

FGF2 fibroblast growth factor 2.

FGF8 fibroblast growth factor 8.

FOXA1 forkhead box A1.

FOXA2 forkhead box A2.

FOXO1 forkhead box O1.

FST follistatin.

FYN FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase.

G6Pase voir G6PC.

G6PC glucose-6-phosphatase, catalytic subunit, communément appelée G6Pase.

GATA4 GATA binding protein 4.

GATA6 GATA binding protein 6.

GCK glucokinase (hexokinase 4), communément appelée GK.

GCKR glucokinase (hexokinase 4) regulator.

GK voir GCK.

GLS2 glutaminase 2 (liver, mitochondrial).

GLUL glutamate-ammonia ligase, communément appelée glutamine synthétase (GS).

GLUT2 glucose transporter 2, voir SLC2A2.

GLUT4 glucose transporter 4, voir SLC2A4.

GNAS GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus.

GRAMD1C GRAM domain containing 1C.

GRB10 growth factor receptor bound protein 10.

GS voir GLUL.

GSK3B glycogen synthase kinase 3 beta.

GSTM2 glutathione S-transferase mu 2 (muscle).

GSTM3 glutathione S-transferase mu 3 (brain).

gstm6 glutathione S-transferase mu 6 (muscle).

HAL histidine ammonia-lyase.

HES1 hes (hairy and enhancer of split) family bHLH transcription factor 1.

HEY1 hes-related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1.

HEYL hes-related family bHLH transcription factor with YRPW motif-like.

HGF hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor).

HHEX hematopoietically expressed homeobox.

HIF1A hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor).

HMGCR 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.

HNF1A HNF1 homeobox A.

HNF1B HNF1 homeobox B.

HNF4A hepatocyte nuclear factor 4, alpha.

HNF6 voir ONECUT1.

HRAS Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog.

IDH3A isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha.

IGF1 insulin-like growth factor 1 (somatomedin C).

IGF1R insulin-like growth factor 1 receptor.

IGF2 insulin-like growth factor 2 (somatomedin A).

IGF2R insulin-like growth factor 2 receptor.

IL6ST interleukin 6 signal transducer, aussi appelé GP130.

INSR insulin receptor.

IRS1 insulin receptor substrate 1.

IRS2 insulin receptor substrate 2.

JAG1 jagged 1.

JAG2 jagged 2.

KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

KRT19 keratin 19.

LATS1 large tumor suppressor kinase 1.

LATS2 large tumor suppressor kinase 2.

LECT2 leukocyte cell-derived chemotaxin 2.

LEF1 lymphoid enhancer-binding factor 1.

LGR5 leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5.

LKB1 liver kinase B1, voir « STK11 ».

LRP6 low density lipoprotein receptor-related protein 6.

MAML1 mastermind-like 1 (Drosophila).

MAML2 mastermind-like 2 (Drosophila).

MAML3 mastermind-like 3 (Drosophila).

MAPK8 mitogen-activated protein kinase 8, aussi appelée c-Jun N-terminal kinase.

MAPKAP1 mitogen-activated protein kinase associated protein 1.

MARK1 MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1.

MARK2 MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2.

MARK3 MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3.

MARK4 MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4.

MET MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase.

MLST8 regulatory associated protein of MTOR, complex 1.

MLXIPL MLX interacting protein-like, plus communément appelé ChREBP.

MTOR mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase).

MYC v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog.

NDRG1 N-myc downstream regulated 1.

NKD1 naked cuticle homolog 1.

NOTCH1 notch 1.

NOTCH2 notch 2.

NOTCH3 notch 3.

NOTCH4 notch 4.

NR1I3 nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3, communément appelé CAR.

NR5A2 nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2.

NRARP NOTCH-regulated ankyrin repeat protein.

NUAK1 NUAK family, SNF1-like kinase, 1.

NUAK2 NUAK family, SNF1-like kinase, 2.

OAT ornithine aminotransferase.

ONECUT1 one cut homeobox 1, aussi appelée HNF6..

ONECUT2 one cut homeobox 2.

OPN osteopontin, voir SPP1.

PCK1 phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble), communément appelée PEPCK.

PDPK1 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1.

PFKL phosphofructokinase, liver.

PHLPP1 PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1.

PHLPP2 PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2.

PIK3CA phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha.

PkL voir PKLR.

PKLR pyruvate kinase, liver and RBC.

POR P450 (cytochrome) oxidoreductase.

PPARGC1A peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha, plus communément appelé PGC1α.

PRKACA protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha, sous-unité catalytique de la protéine kinase A.

PRKCA protein kinase C, alpha.

PRR5 proline rich 5 (renal).

PRR5L proline rich 5 like.

PTEN phosphatase and tensin homolog.

PTPN1 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1.

RB1 retinoblastoma 1.

RBP4 retinol binding protein 4, plasma.

RBPJ recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region.

RHBG Rh family, B glycoprotein (gene/pseudogene).

RICTOR RPTOR independent companion of MTOR, complex 2.

RP6KA3 ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3.

RPS6KB1 ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1.

RPTOR regulatory associated protein of MTOR complex 1.

SALL4 spalt-like transcription factor 4.

SDH succinate deshydrogenase complex, complexe II de la chaîne respiratoire codée par différents gènes.

SDS serine dehydratase.

SGK1 serum/glucocorticoid regulated kinase 1.

SHC1 SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1.

SIK1 salt-inducible kinase 1.

SIK2 salt-inducible kinase 2.

SIK3 SIK family kinase 3.

SIRT1 sirtuin 1.

SIRT2 sirtuin 2.

SLC1A2 solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2, aussi appelée GLT-1.

SLC2A2 solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2.

SLC2A4 solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4.

SLPI secretory leukocyte peptidase inhibitor.

SMAD2 SMAD family member 2.

SNRK SNF related kinase ; SNF=sucrose nonfermenting.

SOX9 SRY (sex determining region Y)-box 9.

SP5 Sp5 transcription factor.

SPP1 secreted phosphoprotein 1, communément appelée OPN.

SREBF1 sterol regulatory element binding transcription factor 1, aussi appelée SREBP-1c.

SREBP-1c Voir SREBF1.

STAT3 signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor).

STK11 serine/threonine kinase 11, communément appelée « LKB1 ».

STK3 serine/threonine kinase 3, plus souvent appelée MST2.

STK4 serine/threonine kinase 4, plus souvent appelée MST1.

STRADA STE20-related kinase adaptor alpha.

STRADB STE20-related kinase adaptor beta.

Sult5a1 sulfotransferase family 5A, member 1.

TBC1D7 TBC1 domain family, member 7.

TBX3 T-box 3.

TCF3 transcription factor 3.

TCF4 transcription factor 4.

TCF7 transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box).

TGFBR2 transforming growth factor, beta receptor II.

TP53 tumor protein p53.

TSC1 tuberous sclerosis 1.

TSC2 tuberous sclerosis 2.

TTR transthyretin.

ULK1 unc-51 like autophagy activating kinase 1, aussi appelée ATG1.

WNT5B wingless-type MMTV integration site family, member 5B.

WWTR1 WW domain containing transcription regulator 1, aussi appelé TAZ.

YAP Yes-associated protein 1.

Pour respecter la nomenclature en vigueur, la convention typographique suivante a été adoptée. Les noms des gènes sont composés en lettres italiques, celui des protéines en lettres romaines. Pour référer aux gènes et protéines chez *Homo sapiens*, le symbole sera composé en lettres capitales, pour *Mus musculus*, seule la première lettre sera capitale.

Par exemple :

	Gène	Protéine
H. sapiens	*STK11*	STK11
M. musculus	*Stk11*	Stk11

Les références bibliographiques sont appelées dans le texte par des nombres entre crochets.

Les appels aux notes de bas de pages sont indiqués dans le texte par des nombres en exposant.

Pour l'expression des grandeurs, le système international des unités est utilisé, sauf mentions contraires.

Première partie

Introduction

Ce travail de thèse a été initié pour donner suite à celui de Virginie Audard [1, 2] qui décrivait le morphophénotype particulier des carcinomes hépatocellulaires porteurs d'une mutation du gène *CTNNB1* codant la β-caténine. L'hypothèse que nous avons émise de l'implication de la protéine LKB1 [1] dans la carcinogenèse de ces tumeurs pour en expliquer la signature morphologique nous a amené à étudier les conséquences physiologiques de son invalidation dans le foie murin, son expression dans les carcinomes hépatocellulaires humains et ses liens avec la signalisation Wnt/β-caténine.

Cette introduction visera à décrire dans un premier temps certains éléments choisis concernant l'histologie et la physiologie hépatiques afin d'offrir au lecteur intéressé les informations nécessaires à la compréhension des données présentées dans ce mémoire.

Une seconde partie illustrera la grande hétérogénéité des carcinomes hépatocellulaires humains et expliquera la singularité de ceux porteurs d'une mutation activatrice du gène *CTNNB1*.

La troisième partie présentera l'état actuel des connaissances sur LKB1.

Enfin, l'exposé de notre hypothèse de travail et du plan expérimental adopté conclura cette partie introductive.

1. L'acronyme LKB1 correspond à *Liver kinase B1*. Le symbole officiel est STK11, correspondant à *Serine/Threonine kinase 11*. Dans ce mémoire de thèse, afin de suivre l'usage de la littérature francophone et anglophone, *LKB1* et LKB1 seront respectivement utilisés pour mentionner respectivement le gène et la protéine au lieu des symboles officiels *STK11* et STK11.

Chapitre 1

Le foie normal

Le foie est un organe indispensable à la vie ; des expériences réalisées sur le chien au début du XIX^{e} siècle ont montré que l'hépatectomie provoquait la mort en une douzaine d'heures. Les physiologistes, au cours des deux derniers siècles, ont peu à peu défini les différentes fonctions vitales assurées par le foie, par exemple :

- synthèse de la protéine majoritaire du sang, l'albumine, responsable des propriétés oncotiques du sang,
- synthèse de tous les facteurs de la coagulation, sauf du facteur III (facteur tissulaire) et IV (calcium),
- synthèse et excrétion de la bile, nécessaire à la digestion des lipides,
- détoxication de nombreuses substances endogènes (dérivés métaboliques) et exogènes,
- homéostasie glucidolipidique corporelle,
- *et cætera*.

Ce chapitre n'a pas pour but de décrire en détails l'extraordinaire éventail des fonctions physiologiques assurées par le foie, mais plutôt d'en développer certaines, choisies car impliquées dans les données expérimentales que nous avons obtenues.

1.1 Notions d'anatomie, d'histologie et d'embryologie

1.1.1 Anatomie générale

Situé dans l'hypocondre droit, le foie est constitué chez l'Homme de deux lobes et neuf segments[1]. Organe plein, revêtu par la capsule fibreuse de Glisson, sa vascularisation provient du pédicule hépatique (artère hépatique et veine porte) et

1. Une excellente description de l'anatomie et de l'histologie du foie peut être lue dans [3].

se termine par les veines hépatiques. Anciennement appelées veines sus-hépatiques, ces dernières sont de nombre variable et se jettent dans la veine cave inférieure. L'artère hépatique est une branche du tronc cœliaque, première collatérale de l'aorte abdominale. Le sang qu'elle contient est de type artériel, riche en dioxygène. La veine porte est formée de la réunion du tronc spléno-mésentérique (confluent de la veine splénique et de la veine mésentérique inférieure) et de la veine mésentérique supérieure. Elle fait partie du réseau porte, *i.e.* composée de deux réseaux capillaires en série ; le premier est le réseau capillaire intestinal et le second est le réseau capillaire sinusoïdal hépatique (voir la sous-section 1.1.2). Le sang est de type veineux, pauvre en dioxygène ; cependant, d'origine splanchnique, il est chargé en nutriments et en hormones pancréatiques.

Cette double vascularisation afférente, dont les subdivisions successives sont à l'origine de la segmentation hépatique selon COUINAUD, font toute l'originalité de la structure histologique du foie. Le sang afférent, à la fois de type artériel (*via* l'artère hépatique) et de type veineux splanchnique (*via* la veine porte), parcourra le parenchyme hépatique où de nombreux échanges auront lieu, avant de rejoindre la circulation veineuse systémique *via* les veines hépatiques et la veine cave inférieure.

Le pédicule hépatique comporte également les canaux biliaires droit et gauche dont la confluence forme le canal hépatique commun. Ce dernier forme le canal cholédoque après confluence avec le canal cystique issu de la vésicule biliaire et se jette dans le 2e duodénum au niveau de la grande caroncule (ou ampoule de VATER) dans laquelle il rejoint le canal pancréatique principal de WIRSUNG, qui draine les sécrétions pancréatiques exocrines. Les voies biliaires permettent l'excrétion de la bile dans l'intestin où cette dernière participera aux mécanismes de la digestion des substances hydrophobes comme les lipides.

1.1.2 Histologie structurale

Histologiquement, le foie est classiquement vu comme une successions d'unités structurales appelées lobules hépatiques [2](voir figure 1.1 page suivante). De forme schématiquement hexagonale, elles sont centrées par une branche d'une veine hépatique appelée veine centrolobulaire ; leurs sommets sont constitués par les espaces portes. Les **espaces portes** sont des structures arrondies comportant, au sein d'un tissu conjonctif grêle, une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et un canal biliaire interlobulaire. Ce dernier se drainera dans la voie biliaire principale. Le revêtement biliaire est épithélial, cubique unistratifié, fait de cellules appelées cholangiocytes. Des espaces portes à la veine centrolobulaire se situe un réseau de **capillaires sinusoïdes** assurant la circulation sanguine d'une façon centripète. Aussi appelés capillaires discontinus, les capillaires sinusoïdes consti-

2. Pour de plus amples détails histologiques, on pourra se référer à [3] et [4].

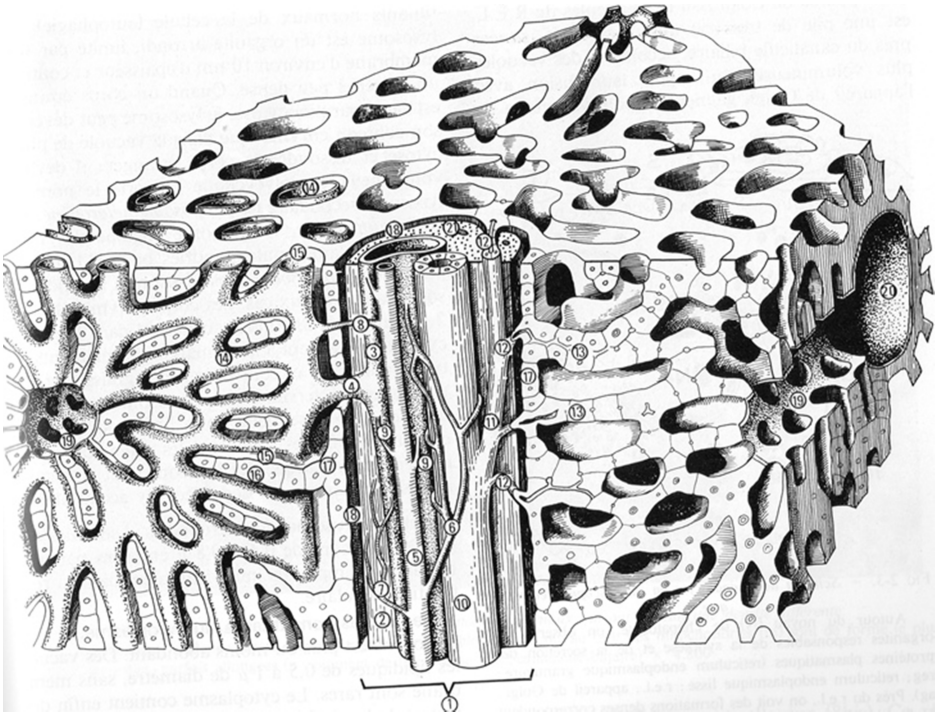


FIGURE 1.1 – Schéma tridimensionnel du tissu hépatique. 1 : espace porte, 2 : tissu conjonctif portal, 3 : branche de la veine porte, 4 : veine axiale distributrice, 5 : branche de l'artère hépatique, 6 : plexus artériel péribiliaire, 7 : réseau artériel intraportal, 8 : branche artérielle débouchant dans les sinusoïdes périphériques, 9 : anastomose directe artério-porte, 10 : canal biliaire, 11 : ductule biliaire, 12 : canal de HERING, 13 : canalicules biliaires dans la travée hépatocytaire, 14 : capillaire sinusoïde, 15 : espace périsinusoïdal de DISSE, 16 : travée hépatocytaire, 17 : lame limitante, 18 : espace périportal de MALL, 19 : veine hépatique centrale, 20 : veine hépatique sublobulaire, 21 : vaisseau lymphatique. Issu de [4].

tuent un type de capillaires que l'on ne retrouve que dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Les cellules endothéliales qui constituent leur paroi ne sont pas jointives et comportent des pores transcytoplasmiques. Les échanges avec l'espace sous-endothélial et les hépatocytes sont ainsi facilités par cette barrière sanguine perméable aux macromolécules et à certains types cellulaires (hématies, cellules de KÜPFFER). Séparées de la paroi des sinusoïdes par l'espace de DISSE [3] se disposent, radialement autour de la veine centrolobulaire, les travées hépatocytaires.

Les **hépatocytes**, cellules majoritaires du foie, sont des cellules épithéliales qui peuvent être globalement considérées comme de forme cubique ou hexaédrique.

3. L'espace de DISSE, est constitué de fibres de réticuline et comporte les macrophages résidents du foie (les cellules de KÜPFFER), impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques du métabolisme et de l'immunité, ainsi que les cellules stellaires ou cellules de ITO, impliquées notamment dans le métabolisme de la vitamine A et dans la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire.

Organisés en travées dont l'épaisseur est uni- (rarement bi-) cellulaire, les hépatocytes sont en rapport par leurs faces latérales avec les hépatocytes adjacents de la même travée, et par deux autres faces opposées avec les capillaires sinusoïdes revêtus de leur trame réticulinique (voir figure 1.2 page ci-contre). Au niveau des faces répondant aux sinusoïdes, la membrane plasmique des hépatocytes dessine des microvillosités, lieu d'échanges bidirectionnels entre l'hépatocyte et la circulation sanguine. Au niveau des faces latérales, une petite dépression de la membrane plasmique de deux hépatocytes contigus forme le canalicule biliaire [4], qui correspond au pôle apical hépatocytaire, délimité par des jonctions serrées. La membrane plasmique au niveau du pôle apical (ou pôle biliaire) forme également des microvillosités. La présence de plusieurs pôles apicaux par hépatocyte rend la polarité hépatocytaire unique dans l'organisme, bien différente de la polarité apicobasale épithéliale de type simple, laquelle ne comporte qu'un seul pôle apical, étendu, par cellule. Les canalicules biliaires, siège de l'excrétion de la bile par les hépatocytes, constituent un réseau cheminant dans les travées hépatocytaires et drainant la bile jusqu'au canal biliaire de l'espace porte voisin [5].

Ainsi, deux circuits fluidiques antidirectionnels coexistent dans le lobule hépatique : le circuit sanguin, centripète (*i.e.* des espaces portes vers la veine centrolobulaire), et le circuit biliaire, centrifuge (*i.e.* des hépatocytes les plus centraux vers les canaux biliaires interlobulaires des espaces portes).

Cette vision est à l'origine du concept de l'unité fonctionnelle du **lobule hépatique** décrit en 1833 par KIERNAN par l'observation de foies de porcs [5](voir figures 1.3 page 10 et 1.5 page 12). Le lobule, centré par la veine centrolobulaire, est arbitrairement subdivisé en trois zones annulaires concentriques : la zone périportale (périphérique), la zone intermédiaire et la zone péricentrolobulaire (centrale, aussi appelée périveineuse). Cependant, le fait que ce soit le circuit sanguin efférent et non afférent qui centre cette structure rend la proposition de lobule hépatique discutable comme modèle d'unité fonctionnelle autonome dans un sens microcirculatoire.

De fait, et grâce à des progrès concomitants sur la connaissance de la microvascularisation hépatique, RAPPAPORT a proposé en 1976 le modèle concurrent d'**acinus hépatique** [6]. Dans ce modèle, illustré figure 1.4 page 11, l'unité fonctionnelle, de forme variable, est centrée par une branche terminale de la veine porte et de l'artère hépatique ; elle se situe donc à cheval sur deux lobules « classiques », entre deux (ou plus) veines centrolobulaires. Les hépatocytes se disposent selon la direction circulatoire du sang afférent, ce qui permet de diviser arbitrairement l'acinus en trois zones concentriques organisées autour de la branche terminale de

4. à ne pas confondre avec les canaux biliaires, situés dans les espaces portes...

5. La jonction entre canalicule et canal biliaire est assurée par les canaux de HERING dont le revêtement est intermédiaire entre hépatocytes et cholangiocytes.

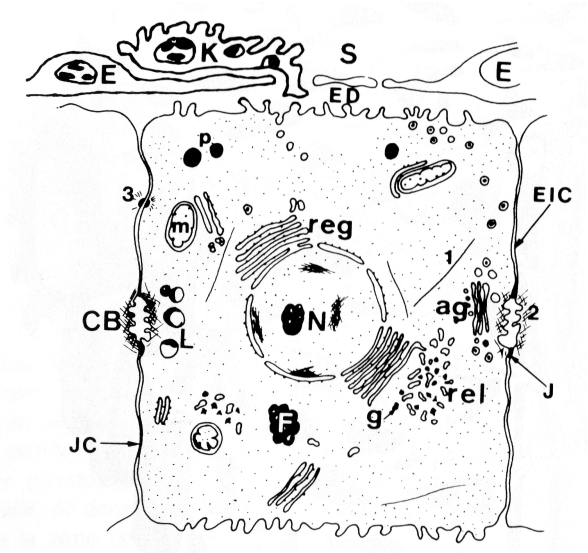


FIGURE 1.2 – Schéma de l'hépatocyte en microscopie électronique. Autour du noyau (N) de l' hépatocyte, on observe les organites responsables de la synthèse et de la maturation des protéines (réticulum endoplasmique granuleux : reg, réticulum endoplasmique lisse : rel, appareil de GOLGI : ag). Près du rel, sont présentes des formations granulaires denses correspondant à du glycogène (g). Les mitochondries (m), abondantes, sont de forme arrondie ou allongée. Les lysosomes (L) sont souvent situés près des canalicules biliaires (CB), bordés de microvillosités et correspondant au pôle apical hépatocytaire. Dans le cytoplasme peuvent également être observés des peroxysomes (p) et des pigments de lipofuscine (F). Les gouttelettes lipidiques, de nombre et de densité variables, ne sont pas représentées. L'espace intercellulaire (EIC) est limité du côté des canalicules par des jonctions (J) serrées et adhérentes ; on observe aussi des jonctions communicantes de type gap (JC). Le sinusoïde (S) est bordé par les cellules endothéliales (E) entre lesquelles se trouvent des cellules de KÜPFFER (K) et séparées des hépatocytes par l'espace de DISSE (ED) où baignent les microvillosités hépatocytaires. 1 : microtubule, 2 : microfilament, 3 : filament intermédiaire près des desmosomes. Issu de [4]

la veine porte, et recevant, de la zone 1 à la zone 3, un sang dont le contenu en dioxygène et nutriments est progressivement décroissant.

La figure 1.5 page 12 présente les **différences entre lobule et acinus hépatiques**. L'acinus, centré par la structure assurant l'apport sanguin afférent (branches terminales de la veine porte et de l'artère hépatique), apparaît d'emblée comme meilleur modèle d'unité fonctionnelle que celui de lobule, centré par la structure assurant le drainage sanguin efférent (branche de la veine hépatique = veine centrolobulaire). Si ceci semble vrai considérant la micro-circulation hépatique, il semblerait que le modèle de lobule hépatique soit le plus approprié pour la description de l'hétérogénéité fonctionnelle métabolique des hépatocytes. En effet, selon RAPPAPORT, la zone 1 de l'acinus apparaît comme convexe, les zones 3 d'acini adjacents formant une zone périveinulaire de forme stellaire. Or, les travaux

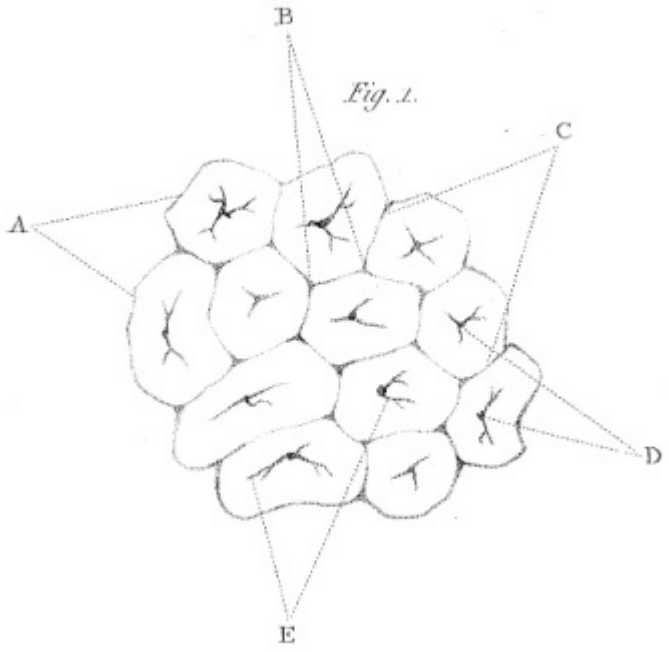


FIGURE 1.3 – Le lobule hépatique principal selon la description de KIERNAN. Les légendes *verbatim* sont les suivantes : « **A** : Angular lobules in a state of anaemia, as they appear on the external surface of the liver. **B** : The interlobular space containing the larger interlobular branches of the hepatic duct, portal vein and hepatic artery. **C** : The interlobular fisures, in which the smaller interlobular branches of the hepatic duct, portal vein and hepatic artery ramify. **D** : Intralobular veins, occupying the centres of the lobules. **E** : Smaller veins, terminating in the central veins. ». Issu de [5].

de LAMERS *et al.* [7] ont montré que la zone 1 apparaît comme concave et non convexe sur des coupes histologiques et que la zone périveinulaire apparaît comme arrondie et non stellaire. De même, sans entrer dans les détails microcirculatoires, les travaux de MATSUMOTO [8] tendent également à préférer le concept de lobule, l'apport sanguin afférent parvenant à la périphérie de l'unité microcirculatoire.

1.1.3 Histologie fonctionnelle, concept de zonage et ses régulateurs moléculaires

L'histologie et la connaissance de la microvascularisation hépatique ont introduit, comme nous venons de le voir, le concept d'unité fonctionnelle hépatique, que ce soit le lobule de KIERNAN ou de MATSUMOTO ou l'acinus de RAPPAPORT. Cependant, ces modèles structuraux ne suffisent pas rendre compte d'un degré de complexité supplémentaire de l'histophysiologie hépatique qu'est l'**hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes** au sein du lobule. Dans sa vision contemporaine, cette notion a été amenée par JUNGERMANN, KATZ et SASSE qui ont décrit

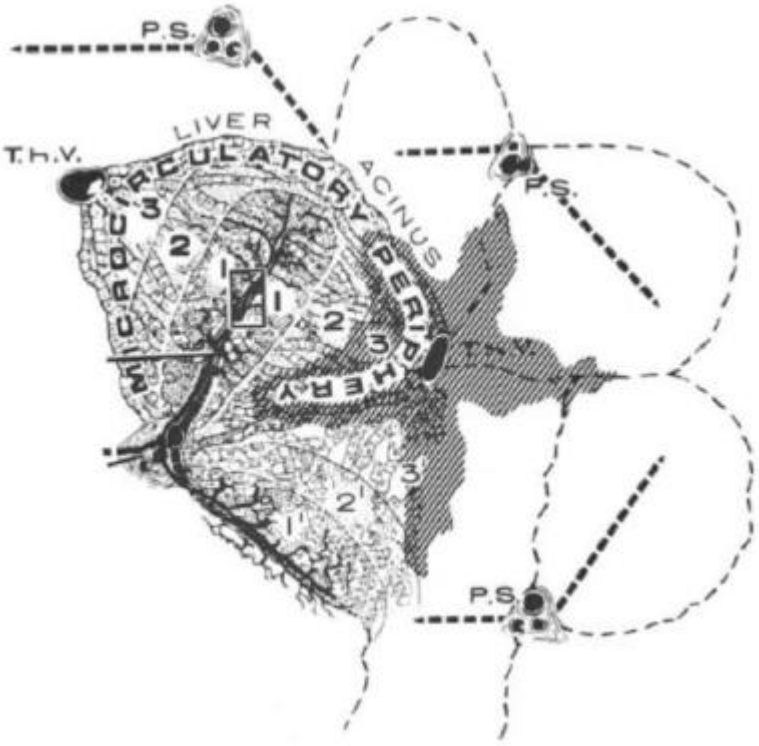


FIGURE 1.4 – L'acinus hépatique selon la description de RAPPAPORT. L'acinus occupe des territoires de deux lobules hépatiques adjacents. Il est centré par les branches terminales des veine porte et artère hépatique, issues des espaces portes **(PS)**. Trois zones microcirculatoires concentriques sont décrites : la zone 1, centrale, riche en dioxygène, la zone 2 et la zone 3, périveinulaire, pauvre en dioxygène, à proximité des branches des veines hépatiques (**ThV**, *terminal hepatic venule*). Issu de [6].

en 1975 la localisation périportale de l'activité glucose 6-phosphatase [9], le sens porto-central de la glycogénolyse et le sens centro-portal de la glycogénogenèse [10].

D'un point de vue métabolique, le foie apparaît selon ce modèle comme un organe hétérogène, constitué de zones bien définies aux fonctions enzymatiques différentes. L'hétérogénéité phénotypique des hépatocytes au sein du lobule est à l'origine du concept du **zonage métabolique du foie**[6], revu en [11–15]. Ce concept modélise la spécification fonctionnelle métabolique des hépatocytes le long de l'axe porto-centrolobulaire, déterminant leur destin périportal, intermédiaire ou péricentrolobulaire. Cet axe est calqué sur celui du flux sanguin artériel (issu de l'artère hépatique, 25 %) et portal (issu de la veine porte, 75 %) dirigé des espaces portes vers la veine centrolobulaire (voir figure 1.6 page 13). Les hépatocytes périportaux représentent six à huit rangées cellulaires autour des espaces portes, les

6. L'anglicisme « zonation » est souvent utilisé.

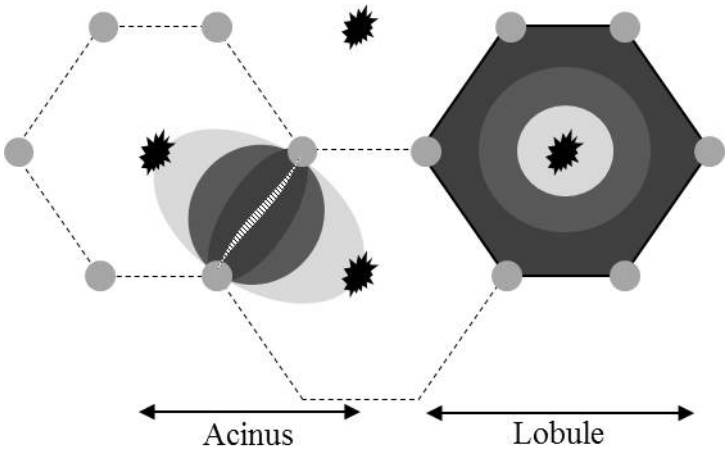


FIGURE 1.5 – L'acinus de RAPPAPORT et le lobule de KIERNAN. **L'acinus, à gauche**, correspond à l'unité fonctionnelle microcirculatoire du foie. Centré par une branche terminale de la veine porte et de l'artère hépatique, il est subdivisé en zones 1, 2 et 3 à mesure que les hépatocytes s'éloignent de l'apport sanguin afférent riche en dioxygène et se rapproche des veines centrolobulaires **(étoiles noires)**. **Le lobule, à droite**, est quant à lui, centré par la veine centrolobulaire. Les espaces portes **(cercles gris)** se situent à la périphérie du lobule. Trois zones fonctionnelles concentriques sont présentes du centre vers la périphérie : la zone péricentrolobulaire, la zone intermédiaire et la zone périportale.

péricentrolobulaires deux à trois rangées autour de la veine centrolobulaire, les intermédiaires, moins bien caractérisés, six à dix rangées entre les deux précédentes zones. D'un point de vue finaliste, le concept de zonage sous-entend que la ségrégation fonctionnelle des hépatocytes des différentes zones du lobule hépatique va permettre la réalisation de voies métaboliques complémentaires ou opposées selon que les hépatocytes sont périportaux ou péricentrolobulaires, afin d'aboutir à l'homéostasie métabolique générale du lobule.

Le meilleur **exemple de zonage** est celui de la détoxication de l'ammoniac (voir figure 1.7 page 14). D'origine intestinale (catabolisme des acides aminés), l'ammoniac est tout d'abord métabolisé en urée par les hépatocytes périportaux grâce à une machinerie enzymatique de haute capacité et de faible affinité impliquant CPS1[7] et ARG1[8]. L'ammoniac résiduel non transformé en urée par les hépatocytes périportaux est pris en charge par les hépatocytes péricentrolobulaires, avec un système enzymatique de faible capacité et de forte affinité impliquant notamment GLUL[9] [16]. Parmi les autres activités métaboliques hépatiques zonées, citons :

— le métabolisme glucidique et lipidique (voir section 1.2.5 page 44).

7. carbamoyl-phosphate synthase 1
8. arginase 1
9. glutamate-ammonia ligase, communément appelée glutamine synthétase, ou GS

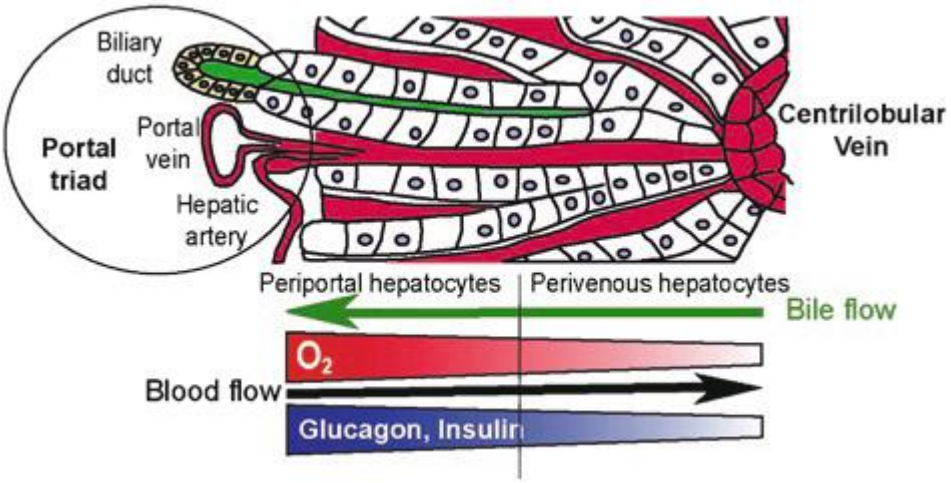


FIGURE 1.6 – La travée hépatocytaire dans le concept de zonage métabolique. La circulation sanguine (**en rouge**) se fait dans un sens porto-central alors que le flux biliaire canaliculaire (**en vert**) se fait dans le sens opposé. La concentration sanguine en dioxygène, hormones et nutriments décroit progressivement selon un gradient continu de la zone périportale à la zone péricentrolobulaire. Issu de [12].

- le métabolisme des xénobiotiques [17], essentiellement péricentrolobulaire. Le système des cytochromes P450 va permettre la fonctionnalisation par monooxygénation (essentiellement péricentrolobulaire), suivie des étapes de conjugaison par glucuronoconjugaison (péricentrolobulaire) ou sulfoconjugaison (périportale) des substances xénobiotiques. L'activité glutathione peroxydase est également périportale.
- la synthèse des acides biliaires à partir de cholestérol, *via* CYP7A1 et CYP8B1, péricentrolobulaire [18].
- le métabolisme des acides aminés [19], avec un catabolisme périportal de l'histidine et de la sérine, et une synthèse péricentrolobulaire de la glutamine.

Les activités métaboliques des hépatocytes ne sont cependant pas toutes zonées : la synthèse de certaines protéines plasmatiques comme la transthyrétine et la transferrine est diffuse dans le lobule, celle de l'albumine, même si elle connait un renforcement périportal, est également assurée par tous les hépatocytes du lobule.

Quels sont les déterminants permettant la mise en place du zonage lobulaire, *i.e.* la ségrégation fonctionnelle des hépatocytes dans le lobule ? Plusieurs théories ont été proposées.

La **théorie développementale** propose que les hépatocytes périportaux et péricentrolobulaires dériveraient de lignées cellulaires différentes. Cependant, à l'encontre de cette théorie, le zonage lobulaire est absent à la naissance (alors que la morphogenèse hépatique est achevée), et n'apparaît que vers une semaine de vie

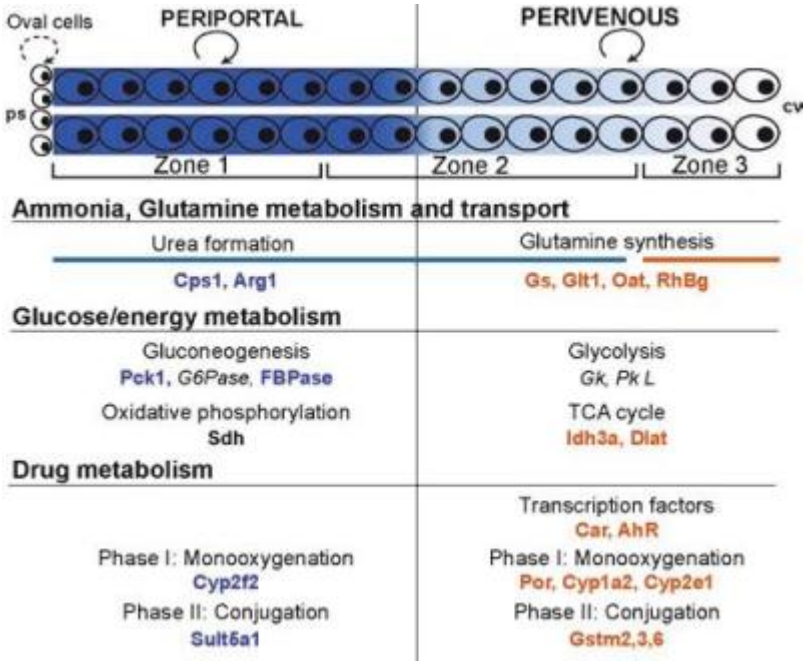


FIGURE 1.7 – Quelques fonctions métaboliques zonées. Pour chacune des fonctions indiquées, les protéines correspondantes sont précisées. Elles sont écrites en italique lorsque le contrôle de leur zonage est post-transcriptionnel, et en lettres oranges ou bleues selon qu'elles sont respectivement cibles positives ou négatives de la voie Wnt/β-caténine. Pour les acronymes Cps1,Arg1, GS (Glul), Oat,Rhbg, Pck1, G6Pase(G6pc), FBPase(Fbp1), GK(Gck), PkL(Pklr), Sdh, Idh3a, Dlat, CAR (Nr1i3), Ahr, Cyp2f2, Por, Cyp1a2, Cyp2e1, Sult5a1, Gstm2, Gstm3 et Gstm6, se référer à la liste des gènes en préambule. Issu de [12].

[20].

La **théorie du *streaming liver*** [21] s'est fondée sur le fait que l'hépatocyte, quiescent par nature, est plus apte à entrer dans le cycle cellulaire (et donc à proliférer) s'il est périportal plutôt que péricentrolobulaire. La zone périportale comporte en effet une plus grande densité de cellules ovales, putatifs progéniteurs hépatocytaires. Selon cette théorie, les hépatocytes se renouvelleraient en continu et à bas bruit dans la zone périportale et migreraient progressivement vers la zone péricentrolobulaire tout en acquérant un phénotype de type péricentrolobulaire à mesure qu'ils perdraient leur phénotype périportal. Cependant, si quelques études sont allées dans le sens de cette hypothèse [22], cette théorie est actuellement le sujet de vives controverses dans la littérature [23–25].

La **théorie du flux sanguin** semble plus à même d'expliquer le zonage métabolique lobulaire. Comme illustré figure 1.7, le long de l'axe porto-centrolobulaire, se dessine un gradient décroissant d'apports en dioxygène, métabolites d'origine splanchnique ou systémique et hormones d'origine pancréatique (glucagon, insuline), les hépatocytes périportaux étant soumis à des pressions élevées en dioxygène

et à des concentrations élevées d'hormones et nutriments alors que les hépatocytes péricentrolobulaires sont irrigués par un sang appauvri en dioxygène, hormones et nutriments. La spécification métabolique différentielle des hépatocytes selon l'axe porto-central serait secondaire à la modification progressive de la composition du sang irriguant ces hépatocytes selon le même axe. Cependant, il a été montré que, si la modification de la teneur en dioxygène et hormones du sang afférent au lobule était bel et bien capable de modifier la distribution zonée des machineries enzymatiques du métabolisme glucidique [26] ou lipidique [27], la distribution zonale d'autres systèmes métaboliques, comme celui du métabolisme de l'ammoniac, n'était pas modifiée. Cette théorie du flux sanguin semble donc être adaptée pour expliquer le zonage de certains processus métaboliques comme le métabolisme glucidique, selon un modèle de **zonage dynamique** dépendant de l'imprégnation locale en hormones glucorégulatrices, nutriments et dioxygène ; cependant, elle n'est pas suffisante pour expliquer le zonage d'autres voies métaboliques comme celle de l'ammoniac [28].

Le zonage se définit par l'expression différentielle de protéines au sein du lobule. D'une façon générale, le niveau d'expression d'une protéine est régulé par des mécanismes post-traductionnels affectant la stabilité de la protéine et par des mécanismes transcriptionnels, affectant le niveau d'expression des ARN [10] messagers codant cette protéine. De façon intéressante, l'étude à haut débit de l'expression différentielle entre hépatocytes périportaux et péricentrolobulaires des ARN messagers codant des protéines zonées a montré que cette expression était parallèle à celle des protéines correspondantes, qu'elles soient impliquées dans le métabolisme des glucides, de l'ammoniac ou des xénobiotiques [29]. Ceci a ouvert la voie de la **théorie du contrôle transcriptionnel** du zonage métabolique lobulaire.

Le premier élément régulateur transcriptionnel a avoir été identifié a été la β-caténine, suite à la découverte du contrôle direct par la β-caténine de l'expression de GLUL, enzyme ayant un fort zonage péricentrolobulaire [30]. La voie Wnt/β-caténine (pour revue [31–39]) est une voie de signalisation très conservée dans le règne animal. Elle est impliquée dans le développement embryonnaire, l'homéostasie et le renouvellement tissulaire selon un mode dépendant du contexte tissulaire et du stade de développement. Elle joue également un rôle oncogénique dans la tumorigenèse de nombreuses tumeurs. L'acteur principal de cette voie est la β-caténine (voir figure 1.8 page suivante). Protéine à domaines *armadillo*, elle est présente dans la cellule épithéliale au sein de trois pools cellulaires :

— un pool membranaire, où la β-caténine participe aux jonctions adhérentes avec les cadhérines et les autres caténines (α et γ).
— un pool nucléaire, où elle agit comme cofacteur transcriptionnel des facteurs

10. acide ribo-nucléique

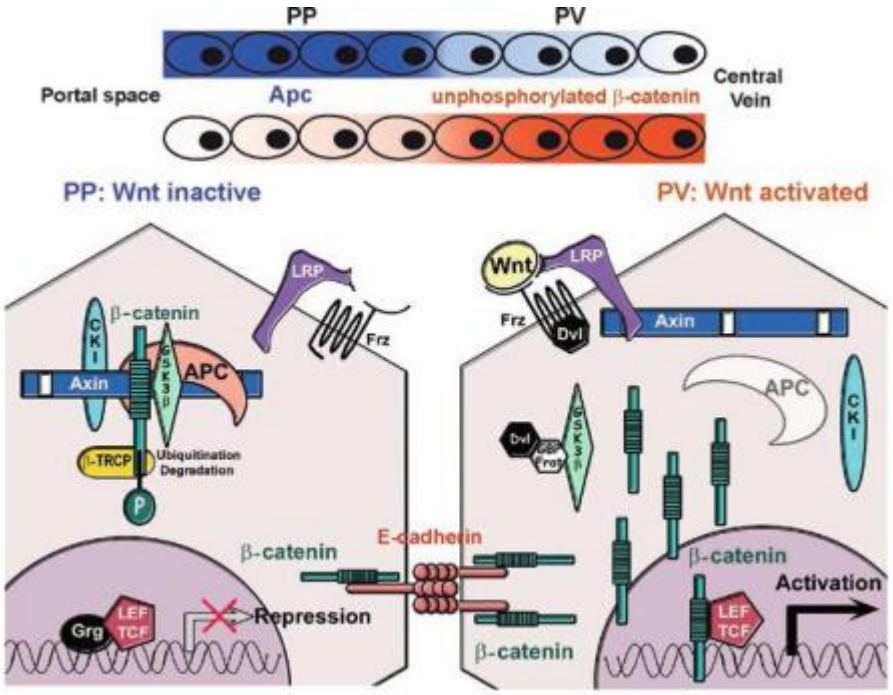


FIGURE 1.8 – La voie Wnt/β-caténine dans le foie normal. **En haut**, schéma représentant deux gradients opposés : celui de la forme activée de β-caténine, centro-portal, et celui du régulateur négatif APC, porto-central. La β-caténine est donc active dans la zone péricentrolobulaire. **En bas**, diagrammes schématisant la répression de la voie quand les facteurs Wnt sont absents (**à gauche**) et son activation quand ils sont présents (**à droite**). Voir le corps du texte pour détails. Issu de [12].

de transcription de la famille LEF/TCF [11].

— et un pool cytoplasmique dans lequel la β-caténine est en permanence phosphorylée par la glycogène synthase kinase-3β (GSK3B) et la caséine kinase-1 (CSNK1A1) dans un complexe multiprotéique associant le produit de deux gènes suppresseurs de tumeurs : *adenomatous polyposis coli* (*APC*) et axine (*AXIN1* et *AXIN2*). Suite à sa phosphorylation, la β-caténine est ubiquitinylée par l'ubiquitine ligase BTRCP et adressée au protéasome pour dégradation.

La fixation des facteurs Wnt [12], sécrétés par les cellules environnantes, aux ré-

11. Famille comprenant chez *H. sapiens* et *M. musculus* les gènes *TCF7*, *TCF3*, *TCF4* et *LEF1*.

12. Dix-neuf facteurs Wnt sont identifiés chez la souris, dont onze sont exprimés dans le foie. Cependant, les facteurs Wnt impliqués dans le zonage péricentrolobulaire de l'activité β-caténine, de même que les cellules productrices (cellules endothéliales de la veine centrolobulaire ?, hépatocytes péricentrolobulaires ?) sont à l'heure actuelle inconnus [40].

cepteurs membranaires de la famille Frz [13] et au co-récepteur LRP va induire le recrutement à la membrane de l'axine, déstabilisant le complexe de dégradation. La β-caténine s'accumule dans le cytoplasme et est transloquée au noyau pour induire la transcription de ses gènes cibles.

Au sein du lobule hépatique, il existe un gradient inverse entre l'expression d'un régulateur négatif de la voie Wnt/β-caténine, la protéine APC, qui est surtout exprimée par les hépatocytes périportaux et l'activité de l'acteur clé de cette voie, la β-caténine, qui est péricentrolobulaire [41, 42]. La β-caténine est donc active essentiellement dans les hépatocytes péricentrolobulaires. Pour la première fois, l'activité d'un activateur transcriptionnel a été montrée comme zonée ; des modèles murins présentant une activation constitutive ou une inactivation de la signalisation β-caténine spécifiquement dans le foie ont alors été créés afin de définir si la signalisation Wnt/β-caténine était effectivement un acteur essentiel de la mise en place du zonage métabolique lobulaire. Des souris invalidées pour *Apc* dans le foie (*i.e.* présentant une activation constitutive de β-caténine) présentaient un programme transcriptionnel de type péricentrolobulaire dans les hépatocytes de tout le lobule ; à l'inverse, des souris invalidées pour β-caténine dans le foie présentaient un programme transcriptionnel de type périportal dans les hépatocytes de tout le lobule (voir figure 1.9 page suivante). Ces modifications génétiques de l'activité hépatique de la β-caténine aboutissent donc à une perte quasi totale du zonage lobulaire, que l'on se réfère aux processus impliqués dans le métabolisme des glucides, de l'ammoniac ou des xénobiotiques [41, 43].

De façon opposée, la voie **Ha-RAS/MAPK** [44, 45] et le facteur de transcription **HNF4A** [46] sont également impliqués dans le contrôle transcriptionnel du zonage, tous deux responsables de l'acquisition d'un phénotype de type périportal. De façon intéressante, il est actuellement démontré que les voies Wnt/β-caténine et HNF4A collaborent pour la spécification métabolique des hépatocytes [47, 48].

Enfin, les **micro ARN** semblent également être impliqués dans le contrôle du zonage [14].

1.1.4 Bases de l'organogenèse hépatique et développement des canaux biliaires

Le foie est un dérivé endodermique [14]. Après la gastrulation, une partie de l'intestin antérieur va subir une spécification hépatique [15] et former le diverticule

13. De même, il existe dix gènes Frz chez la souris, dont huit sont exprimés dans le foie. Ceci rajoute un niveau de complexité afin de déterminer lequel ou lesquels des couples Wnt/Frz intervien(nen)t dans le zonage de l'activité β-caténine [40].

14. Une excellente description de la morphogenèse hépatique peut être lue dans [49].

15. vers e8.0 chez la souris

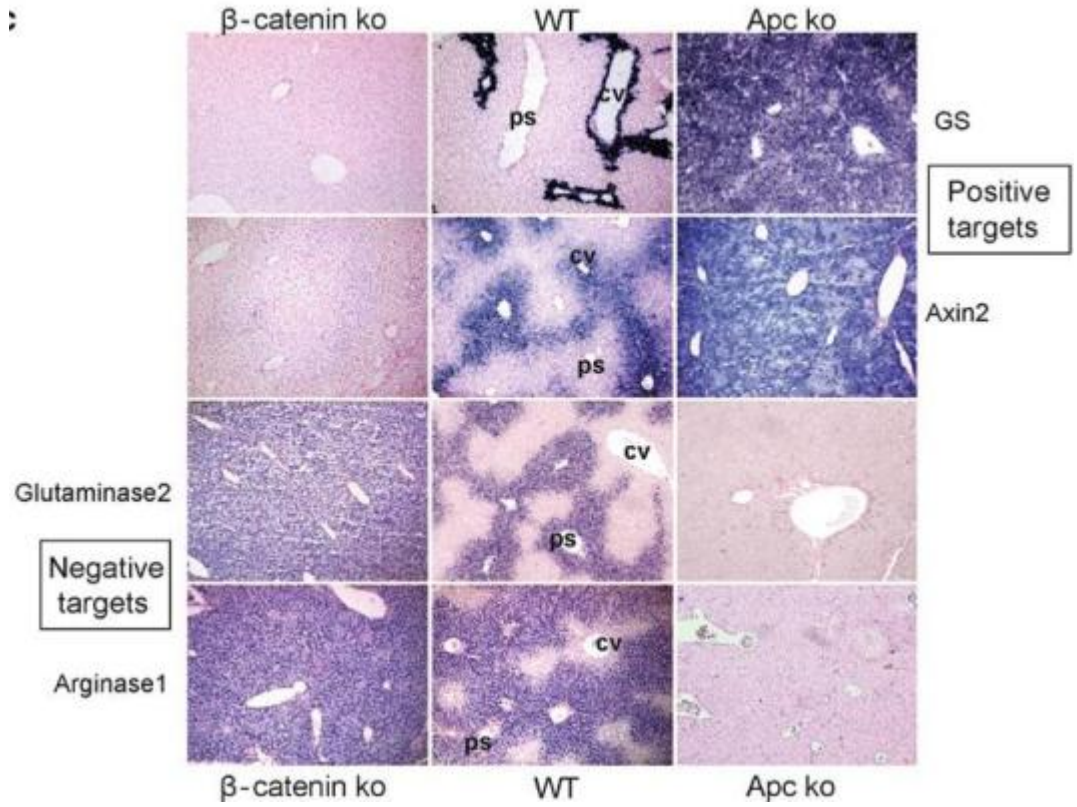


FIGURE 1.9 – La voie Wnt/β-caténine dans le zonage métabolique. Apports des modèles murins. **Au centre**, hybridation *in situ* des ARNm codant des protéines cibles positives de la β-caténine, de localisation péricentrolobulaire (**cv**), et cibles négatives, de localisation périportale (**ps**). **À gauche**, extinction du programme transcriptionnel péricentrolobulaire dépendant de β-caténine et extension totolobaire du programme transcriptionnel périportal, cible négative de β-caténine, dans un modèle murin d'inactivation hépatospécifique de *beta*-caténine. **À droite**, image en miroir dans un modèle murin d'activation constitutive hépatospécifique de β-caténine (*knock-out* du gène *Apc*). Issu de [12].

hépatique [16]. Les cellules de la partie antérieure de ce diverticule vont alors subir une délamination épithéliale et infiltrer le septum mésenchymateux transverse adjacent pour former le bourgeon hépatique [17]. Le bourgeon hépatique va ensuite augmenter rapidement de volume par le développement de sa vascularisation et sa colonisation par les cellules hématopoïétiques [18]. Progressivement, les progéniteurs hépatiques (les hépatoblastes), bipotents par nature, vont se différencier en hépatocytes et cholangiocytes.

16. vers e9.0 chez la souris
17. vers e9.5 chez la souris
18. de e10.0 à e15.0 chez la souris

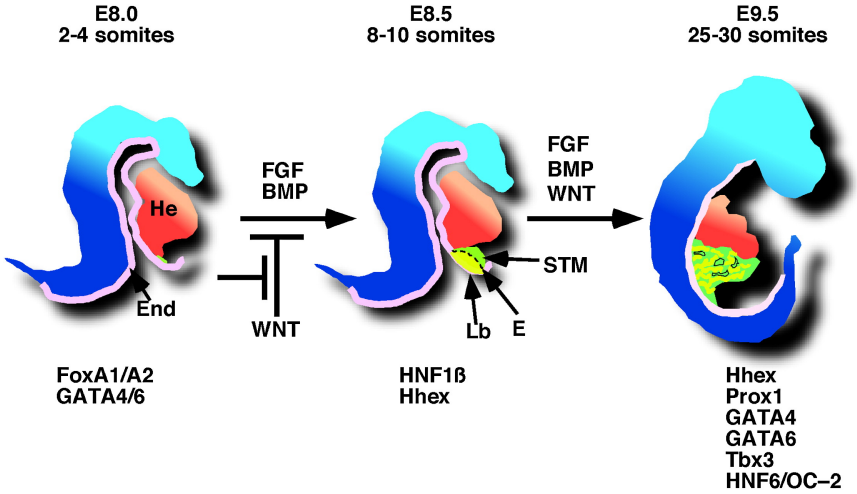


FIGURE 1.10 – Mécanismes contrôlant le développement hépatique précoce. Dans les étapes initiales, le signal Wnt induit l'identité endodermique postérieure aux dépens de l'antérieure (futur bourgeon hépatique) et doit être inhibé pour la mise en place du bourgeon hépatique. Secondairement, la voie Wnt est activée et agit de concert avec les voies FGF et BMP pour la spécification, l'expansion et la différenciation hépatiques. En rose, l'endoderme de l'intestin antérieur, en rouge, le cœur (He), en jaune, le bourgeon hépatique (Lb), en vert, le mésenchyme du septum transverse (STM) et en noir les cellules endothéliales (E). Issu de [49].

D'un point de vue moléculaire, l'induction du destin cellulaire hépatique est liée à la sécrétion des facteurs de croissance fibroblastiques de la famille FGF [19] par le mésoderme cardiaque, notamment FGF1, FGF2, FGF8 et FGF10. La sécrétion du morphogène osseux BMP4 [20] par les cellules mésenchymateuses du septum transverse est également un facteur important du développement du bourgeon hépatique. Le rôle de la voie Wnt/β-caténine est plus complexe : si son inactivation est initialement nécessaire pour la spécification du bourgeon hépatique, cette voie est requise avec les facteurs FGF et BMP4 pour les étapes suivantes du développement hépatique précoce. Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des progéniteurs hépatiques sont nombreux et listés dans la figure 1.10. Les activateurs transcriptionnels FOXA1 et FOXA2 ainsi que les facteurs de transcription à doigt de zinc GATA4 et GATA6 sont les « pionniers » de la différenciation hépatoblastique car capables de se fixer sur l'hétérochromatine pour initier l'expression de gènes du destin hépatoblastique, comme le gène *ALB* (codant l'albumine), marqueur précoce de la différenciation hépatoblastique. Les autres marqueurs classiques de la différenciation hépatoblastique puis hépatocytaire sont les gènes *TTR* (codant la transthyrétine), *AFP* (codant l'α-fœto-protéine) et *RBP* (codant la retinol binding protein-4). À part GATA4/GATA6 et FOXA1/FOXA2, les facteurs de

19. La famille des *Fibroblast Growth Factors* comprend chez l'homme 23 membres.
20. membre de la super-famille du TGFβ.

transcriptions impliqué dans l'élargissement du bourgeon hépatique et dans la différenciation hépatoblastique sont le facteur de transcription à homéoboîte HHEX, ONECUT1 [21] et ONECUT2. Plus tardivement, la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes va s'accompagner d'une modification du profil d'expression de ces facteurs de transcription et HNF4A va devenir le facteur de transcription primordial pour le destin hépatocytaire, orchestrant les autres facteurs de transcriptions majeurs que sont HNF1A, HNF1B, FOXA2, ONECUT1 et NR5A2.

Des autres étapes et aspects de l'embryogenèse hépatique, nous n'aborderons que le cadre bien particulier de la mise en place des voies biliaires intrahépatiques car sa connaissance est nécessaire à la compréhension d'une partie du phénotype que nous avons observé dans un des modèles murins utilisés dans le cadre de ce travail de thèse.

La description des mécanismes fins de l'histogenèse des voies biliaires intrahépatiques s'est faite grâce au développement d'immunomarqueurs spécifiques des cholangiocytes permettant la mise en évidence *in situ* des structures biliaires au cours de l'embryogenèse. Parmi les plus utilisés, citons la cytokératine 19 (KRT19, ou plus habituellement CK19), l'ostéopontine (OPN, codée par le gène *SPP1*), la E-cadhérine (codée par le gène *CDH1*), la tubuline acétylée (marqueur du cil primaire) et le facteur de transcription SOX9. Il a été montré que SOX9 est un marqueur très précoce et spécifique de la différenciation cholangiocytaire [50]. À l'inverse, les hépatocytes sont négatifs pour ces marqueurs et peuvent être mis en évidence par un immunomarquage dirigé contre le facteur de transcription HNF4A.

La formation des canaux biliaires intrahépatiques se fait selon plusieurs étapes successives (voir figure 1.11) et ne sera complète que quelques jours après la naissance. Il est à noter qu'à un instant t du développement embryonnaire, toutes les structures biliaires intrahépatiques ne sont pas toutes à la même étape développementale. En effet, le développement des canaux biliaires se fait du hile vers la périphérie du parenchyme hépatique ; dans un même embryon, l'analyse d'une coupe de parenchyme hépatique juxta-hilaire montrera donc des structures biliaires plus avancées dans leur développement que sur une coupe passant par le dôme hépatique. Ces différentes étapes sont :

1. La différenciation des hépatoblastes périportaux vers la lignée cholangiocytaire commence vers e14. Elle se caractérise notamment par l'acquisition très précoce du marquage nucléaire SOX9.
2. Les cellules cholangiocytaires s'organisent autour des espaces portes sous la forme d'une mono-couche quasi-continue de cellules. Cette structure porte le nom de plaque ductale.
3. L'étape suivante consiste en la mise en place des canaux asymétriques [50] vers e15.5. Se formant en plusieurs points de la plaque ductale, ces structures

21. communément appelé HNF6.

sont centrées par une lumière et sont bordées, sur leur versant portal, par les cellules ductales (SOX9+/ HNF4A−) et sur leur versant parenchymateux par des hépatoblastes non différenciés (SOX9−/ HNF4A+). De plus, la E-cadhérine n'est exprimée qu'à la membrane des cellules du versant portal et non de celles du versant parenchymateux. Le versant parenchymateux de ces structures compte cependant une polarisation apicobasale avec expression de SPP1 (ostéopontine) au pôle apical et présence de jonctions serrées.

4. La tubulogenèse va se poursuivre dans ces structures asymétriques par la différenciation progressive des hépatoblastes du versant parenchymateux vers la lignée cholangiocytaire avec expression de SOX9 et perte d'expression d'HNF4A, vers e18.5.
5. Concomitamment, et jusque aux premiers jours du *postpartum*, la maturation des canaux biliaires se poursuivra par la mise en place d'une membrane basale de laminine autour des tubes et leur intégration dans le mésenchyme des espaces portes. Les cellules de la plaque ductale qui n'ont pas participé à la tubulogenèse biliaire vont progressivement involuer selon un mécanisme indéfini actuellement.

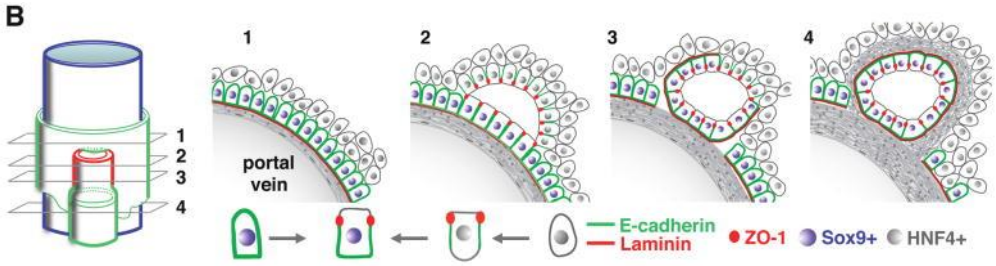


FIGURE 1.11 – Les différentes étapes de la tubulogenèse biliaire. **1** : stade « plaque ductale », **2** : stade « canal asymétrique », **3** : différenciation progressive cholangiocytaire du versant parenchymateux du canal asymétrique, **4** : canal biliaire définitif. Issu de [50].

Quels sont les voies de signalisation et facteurs de transcription impliquées dans le développement embryonnaire des voies biliaires intra-hépatiques ? La principale source de connaissance pour répondre à cette question est l'analyse phénotypique de modèles murins activés ou invalidés pour un gène donné. Ces modèles sont le plus souvent conditionnels, hépatospécifiques, selon la stratégie « Cre/LoxP ». Le choix du promoteur permettant la recombinase Cre permet de cibler différentes étapes du développement des canaux biliaires. L'analyse des différentes études vise à définir les conséquences de la perturbation génétique sur différents aspects de l'histogenèse biliaire, à savoir :

— Existe-t-il une modification de l'engagement des hépatoblastes vers la lignée cholangiocytaire ?

— Cet engagement est-il restreint à la zone périportale, permettant la formation de la plaque ductale ?
— Existe-t-il une perturbation de la tubulogenèse biliaire entravant la maturation de la plaque ductale vers les canaux asymétriques et les canaux biliaires définitifs ?

Deux voies de signalisation sont impliquées dans l'engagement cholangiocytaire et sa restriction périportale. La première est la voie du TGFβ [22]. Il existe un gradient décroissant d'expression des ligands TGFβ et ainsi d'activation des récepteurs au TGFβ de la branche portale de la veine porte vers les premières rangées hépatocytaires lobulaires [50, 51]. Quand la signalisation TGFβ est excessive, la différenciation cholangiocytaire s'ajoute à la différenciation hépatocytaire d'hépatoblastes distants de l'espace porte, conduisant à la formation de cellules hybrides hépatocholangiocytaires. Un dosage adéquat de la concentration en ligands et de l'activité TGFβ permettrait donc la différenciation correcte des hépatoblastes périportaux en cholangiocytes organisés sous la forme d'une plaque ductale.

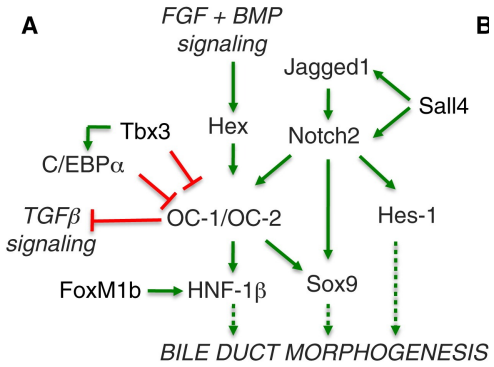


FIGURE 1.12 – Réseau moléculaire contrôlant le développement des voies biliaires intra-hépatiques. Issu de [49].

La seconde voie à avoir été identifiée , suite à la découverte des mutations perte-de-fonction des gènes *JAG1* et *NOTCH2* dans le syndrome d'ALAGILLE [23], lequel est caractérisé, entre autres, par une paucité des voies biliaires intra-hépatiques [52], est la voie Notch [53]. Cette voie de signalisation est juxtacrine et fait intervenir la fixation d'un ligand transmembranaire situé sur une cellule émettrice sur un récepteur transmembranaire situé sur une cellule réceptrice. L'étude de cette voie est rendue difficile par la présence de nombreux couples possibles entre ligands, faisant partie de la famille *Delta-like* (DLL1, DLL3 et DLL4) ou de la famille *jagged* (JAG1 et JAG2), et récepteurs *notch* (NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 et

22. *Transforming growth factor beta.*
23. OMIM : #118450 et #610205

NOTCH4) [54] La fixation du ligand sur son récepteur induit plusieurs clivages protéolytiques aboutissant à la libération du domaine intracellulaire de notch (NICD) qui est transloqué au noyau dans lequel il s'associe aux régulateurs transcriptionnels RBPJ [24] ou de la famille *mastermind* (MAML1, MAML2 et MAML3) pour induire l'expression de ses gènes cibles, dont les canoniques sont *HES1* et *HEY1*. Dans le cadre du développement des voies biliaires intra-hépatiques, la voie notch est impliquée dans la différenciation cholangiocytaire car des souris invalidées pour *Rbpj* dans le foie ont un nombre inférieur d'hépatoblastes se différenciant en cholangiocytes [55]. De plus, le profil d'expression du ligand JAG1 (mésenchyme portal) et de son récepteur NOTCH2 (plaque ductale) pousse à croire que la voie notch est également importante pour la restriction périportale de la différenciation cholangiocytaire [55–57]. D'autres voies de signalisation sont également impliquées dans la différenciation cholangiocytaire, comme la voie Wnt/β-caténine ; cependant leur rôle dans la restriction périportale de cette différenciation, s'il existe, est moins évident [58–61].

De nombreux facteurs de transcription, listés figure 1.12 page ci-contre, sont impliqués dans la différenciation cholangiocytaire. Parmi ceux-ci, ONECUT1 et ONECUT2, redondants, semblent notamment agir comme répresseur de la voie TGFβ sur la différenciation cholangiocytaire [51].

Concernant les étapes suivantes de l'histogenèse des voies biliaires intrahépatiques, *i.e.* la tubulogenèse biliaire, la voie notch apparaît encore comme étant le chef d'orchestre, de même que la voie TGFβ. Chez des souris invalidées pour *Hes1*, cible opérationnelle de la voie notch, les canaux biliaires ne se forment pas correctement [56] ; de même, l'inactivation de la voie notch à différentes étapes du développement biliaire bloque la maturation de la plaque ductale [55]. De façon intéressante, l'expression ductale du récepteur au TGFβ TGFBR2 est perdue dans les cholangiocytes au cours de la tubulogenèse.

Le cil primaire, présent sur les cholangiocytes matures et absent des hépatoblastes et hépatocytes est un des meilleurs marqueurs d'une différenciation cholangiocytaire aboutie. Il participe, comme chemo-, mécano- et osmo-senseur au contrôle de la prolifération cholangiocytaire. La mutation de gènes impliqués dans le cil primaire aboutis à la formation de kystes biliaires multiples par prolifération cholangiocytaire dérégulée [62].

1.2 Métabolisme glucidolipidique

Claude Bernard, avec la découverte de la *fonction glycogénique du foie* et l'élaboration du concept de *fixité du milieu intérieur*, a ouvert la voie de la

24. aussi appelé *Suppressor of hairless*.

connaissance de l'homéostasie énergétique au sein de l'organisme et du rôle central du foie dans le maintien de celle-ci. Chez les mammifères, la prise alimentaire n'étant pas continue, l'organisme a développé différents moyens afin de maintenir une concentration sanguine à peu près constante en substrats énergétiques. Les rôles du foie dans le métabolisme glucidolipidique corporel sont nombreux ; leur exécution est finement régulée par le statut nutritionnel [25].

1.2.1 Rôle du foie dans l'homéostasie glucidolipidique : l'état nourri.

Après un repas, la veine porte draine au foie un sang riche en glucides, acides aminés et lipides (sous la forme de chylomicrons). Les taux d'insuline circulante sont élevés. Les chylomicrons sont essentiellement stockés dans les adipocytes de la graisse blanche. Les acides aminés sont captés par les différentes cellules qui en ont besoin pour leurs synthèses et par le foie (voir la sous-section 1.2.3 page 34). Le glucose, sera soit stocké par le muscle strié squelettique sous forme de glycogène (pour son usage propre), soit pris en charge par les hépatocytes (voir figure 1.13 page ci-contre).

L'**entrée du glucose** dans l'hépatocyte est facilitée par le transporteur du glucose GLUT2 [26]. Contrairement à GLUT4 [27], il s'agit d'un transporteur bidirectionnel, non régulé par l'insuline. De forte capacité, mais de faible affinité, il n'est pas vu comme limitant et est très permissif, non saturable, pour l'entrée du glucose dans la cellule [65]. Le glucose intracellulaire est immédiatement phosphorylé en glucose 6-phosphate par la glucokinase (codée par le gène *GCK*), augmentant le gradient osmotique du glucose entre le sang et l'hépatocyte. Contrairement aux autres hexokinases, la glucokinase a une constante de Michaëlis élevée [28] et n'est pas inhibée par son produit réactionnel. La transcription de la glucokinase est activée par l'insuline *via* SREBP-1c [29] et inhibée par le glucagon. Surtout, la glucokinase est régulée par sa protéine chaperonne GCKR [30] qui la séquestre dans le noyau en conditions de faibles concentrations de glucose et de présence d'AMP cyclique. A l'état nourri, la présence de glucose et de fructose dissocie le complexe GCKR/GCK ; la glucokinase est libérée du noyau et migre vers le cytoplasme où elle est active. Ainsi, le système GLUT2/glucokinase, permet l'entrée rapide de grandes quantités de glucose dans les hépatocytes et sa phosphorylation en

25. Les données générales concernant l'aspect biochimique du métabolisme glucidolipidique sont issues de [63, 64].
26. *Glucose transporter 2*, codé par le gène *SLC2A2*
27. *Glucose transporter 4*, codé par le gène *SLC2A4*
28. K_m de $10\,\mathrm{mmol\,L^{-1}}$, *i.e.* bien supérieure à la valeur de la glycémie normale ($5.5\,\mathrm{mmol\,L^{-1}}$)
29. codée par le gène *SREBF1*
30. glucokinase (hexokinase 4) regulator

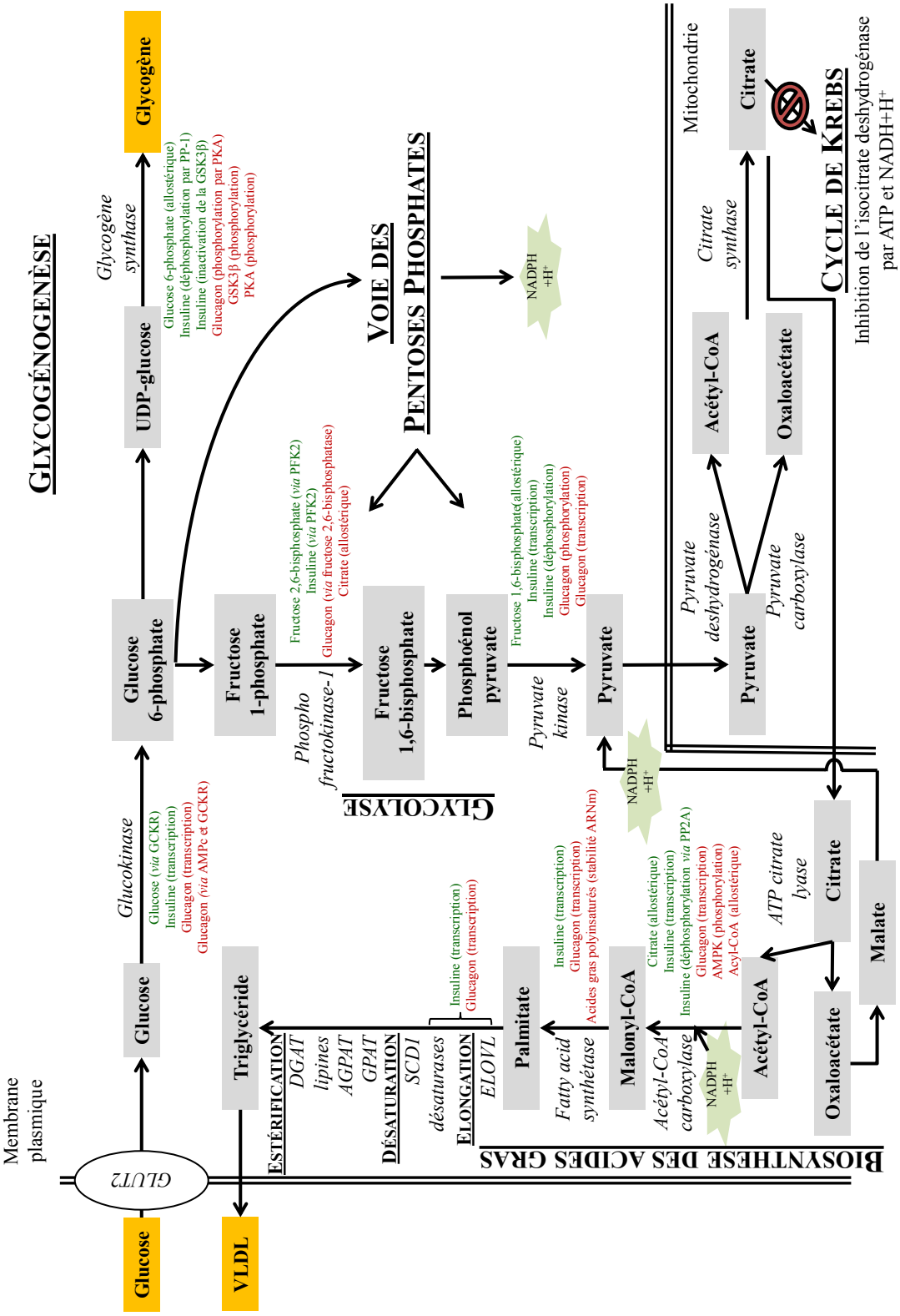


FIGURE 1.13 – Métabolisme glucidolipidique hépatocytaire à l'état nourri. Seules les étapes importantes sont figurées. En vert les régulations activatrices et en rouge les régulations inhibitrices.

glucose-6-phosphate, même à des glycémies post-absorptives élevées.

Le **glucose-6-phosphate** ainsi formé peut suivre deux destins métaboliques différents : il peut participer à la synthèse de glycogène ou alors être dirigé vers la voie de la glycolyse et des pentoses phosphates.

La **glycogénogenèse** permet de stocker le glucose sous forme d'un macromolécule polysaccharidique qu'est le glycogène. Cette voie, cytosolique, passe par la transformation du glucose 1-phosphate [31] en une forme activée, l'uridine diphosphate glucose, laquelle sera ajoutée par la glycogène synthase à une chaîne oligosaccharidique de glucose en $\alpha(1 \rightarrow 4)$. La chaîne ayant atteint la taille d'au moins 11 molécules de glucose, l'enzyme branchante va initier une nouvelle chaîne en transférant une partie de la chaîne en formation sur un glucose d'amont en créant une liaison $\alpha(1 \rightarrow 6)$. La glycogénogenèse est essentiellement régulée par des modifications post-traductionnelles de la glycogène synthase (voir figure 1.14 page suivante). Neuf résidus sérine peuvent être phosphorylés, aboutissant à l'inactivation de la protéine. Parmi les ser/thr kinases capables de phosphoryler et d'inactiver la glycogène synthase, les plus importantes sont la GSK3β [32], la protéine kinase A [33] et la phosphorylase kinase. La protéine phosphatase-1 permet la déphosphorylation et l'activation de l'enzyme. La signalisation insuline est la clef de voûte de cette régulation : à l'état nourri, l'insuline entraîne une inactivation de ces différentes kinases et une activation de la protéine phosphatase-1, activant donc la glycogène synthase. Par ailleurs, le glucose 6-phosphate est un activateur allostérique de l'enzyme.

Le glucose 6-phosphate non intégré sous forme de glycogène est dirigé vers deux autres voies métaboliques : celle de la glycolyse et celle des pentoses phosphates. La voie de la **glycolyse**, cytosolique, aboutit à la formation de pyruvate et génère deux molécules d'ATP et réduit deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide en NADH+H^+ [34]. La majeure partie de cette voie est bidirectionnelle et commune avec la voie de la néoglucogenèse. En plus de l'étape de la phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate par la glucokinase, deux étapes sont cependant irréversibles, unidirectionnelles et finement régulées : la phosphorylation du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-bisphosphate par la phosphofructokinase-1 (PFKL) et l'étape finale de la glycolyse qui est la transphosphorylation du phosphoénolpyruvate en pyruvate par l'isoforme hépatique de la pyruvate kinase (PKLR).

La phosphofructokinase-1, enzyme limitante engageant irréversiblement le glucose vers la glycolyse, est très finement régulée sur le plan allostérique. Le citrate (issu du cycle de Krebs) inhibe cette enzyme alors que le fructose 2,6-bisphosphate en est un puissant inducteur. L'enzyme régulant la formation du fruc-

31. issu de l'isomérisation du glucose-6-phosphate par la phosphoglucomutase.
32. glycogen synthase kinase 3 beta, codée par le gène *GSK3B*
33. dont la sous-unité catalytique est codée par le gène *PRKACA*
34. qui sera oxydé dans le complexe I de la chaîne respiratoire

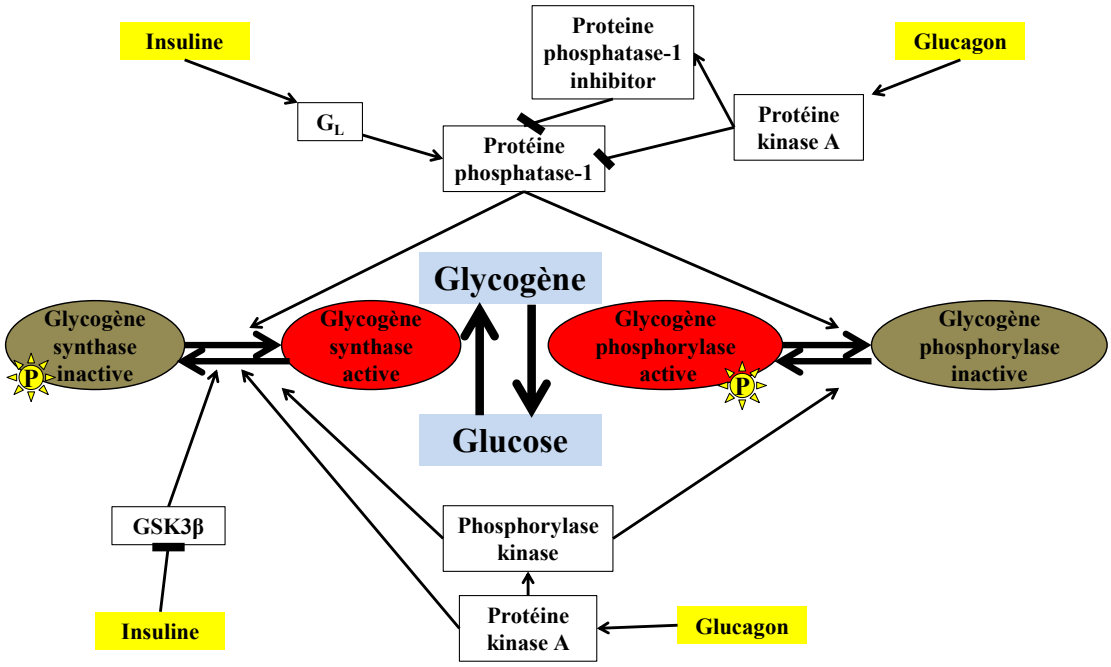


FIGURE 1.14 – Régulation du métabolisme du glycogène par l'insuline et le glucagon. La glycogène synthase est inactivée par sa phosphorylation par la protéine kinase A, La GSK3β et la phosphorylase kinase. La protéine phosphatase PP1, activée par l'insuline *via* le peptide G_L, permet la déphosphorylation de l'enzyme. A l'inverse, la glycogène phosphorylase est activée suite à sa phosphorylation par la phosphorylase kinase en réponse au glucagon.

tose 2,6-bisphosphate est l'enzyme bifonctionnelle phosphofructokinase-2/fructose 2,6-bisphosphatase. L'activité phosphofructokinase-2 de cette enzyme permet la phosphorylation du fructose 6-phosphate en fructose 2,6-bisphosphate lequel est un puissant inducteur de l'activité phosphofructokinase-1 (enzyme de la glycolyse) et un inhibiteur de l'activité fructose 1,6-bisphosphatase (enzyme importante de la néoglucogenèse). L'activité fructose 2,6-bisphosphatase de l'enzyme bifonctionnelle permet la réaction inverse. L'isoforme hépatique de cette enzyme bifonctionnelle comporte une activité phosphofructokinase-2 activée par l'insuline et une activité fructose 2,6-bisphosphatase activée par le glucagon. Par ce mécanisme, l'insuline active la glycolyse dans le foie tout en inhibant la néoglucogenèse.

L'expression de l'isoforme hépatique de la pyruvate kinase (PKLR) est activée par par le glucose et inhibée par le glucagon. Le glucagon, *via* la protéine kinase A, inactive par phosphorylation PKLR ; l'insuline active l'enzyme en permettant sa déphosphorylation. Enfin, le fructose 1,6-bisphosphate, produit de la

phosphofructokinase-1, est un activateur allostérique de PKLR.

Le pyruvate diffuse dans la mitochondrie *via* un transporteur et sera transformé en acétyl-CoA par la pyruvate deshydrogénase ou en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. La citrate synthase permet la synthèse de citrate à partir d'acétyl-CoA et d'oxaloacétate et constitue la première étape du cycle de Krebs. Ce dernier permet la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide en NADH+H^+ et du flavine adénine dinucléotide en $FADH_2$ qui seront respectivement oxydés par les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'ATP. Cependant, à l'état nourri, les concentrations mitochondriales élevées en ATP et NADH+H^+ inhibent l'isocitrate deshydrogénase, enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la décarboxylation de l'isocitrate en α-cétoglutarate [35]. En conséquence, le citrate, dont la concentration mitochondriale augmente, est redirigé vers le cytosol *via* la citrate translocase où il va avoir plusieurs fonctions :

- Le citrate va agir comme régulateur allostérique de la glycolyse, en inhibant l'activité de la phosphofructokinase-1 ; le flux des métabolites de la glycolyse sera redirigé vers la **voie des pentoses phosphates**. Cette voie, parallèle aux étapes initiales de la glycolyse, permet la formation de la forme réduite du nicotinamide dinucléotide phosphate (NADPH+H^+), qui est un coenzyme essentiel pour la biosynthèse des acides gras. Elle aboutit à la formation de glycéraldéhyde-3-phosphate qui pourra rejoindre la partie finale de la voie de la glycolyse, et de fructose 6-phosphate. Ce dernier est le substrat de la phosphofructokinase-1, dont l'inhibition allostérique par les fortes concentrations cytosoliques de citrate est cependant levée par l'effet stimulateur du fructose 2,6-bisphosphate, issu de l'activité phosphofructokinase-2 de l'enzyme bifonctionnelle induite par l'insuline.
- Le citrate cytoplasmique est clivé par l'ATP citrate lyase (ACLY) pour former acétyl-CoA et oxaloacétate. L'acétyl-CoA est le métabolite précurseur de la biosynthèse des acides gras. L'oxaloacétate sera reconverti en malate par la malate deshydrogénase puis en pyruvate par l'enzyme malique, générant, comme la voie des pentoses phosphates, du NADPH+H^+.
- Le citrate est un activateur allostérique de l'acétyl-CoA carboxylase, qui est la principale enzyme régulatrice de la biosynthèse des acides gras.

Ainsi, les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates collaborent dans le foie pour alimenter en acétyl-CoA et NADPH+H^+ la voie de la **biosynthèse des acides gras**. Cette voie, cytosolique, permet de stocker sous forme de lipides l'excès de glucose sanguin qui ne peut être stocké en glycogène. L'acétyl-CoA est le principal précurseur de cette voie et représente la source de tous les carbones

35. De plus, les besoins hépatocytaires en ATP sont préférentiellement pourvus par la β-oxydation des acides gras et non par glycolyse aérobie.

des acides gras. L'acétyl-CoA est tout d'abord carboxylé en malonyl-CoA [36] par l'acétyl-CoA carboxylase. La transcription de cette dernière est induite par l'insuline et le glucose et inhibée par le glucagon. D'un point de vue allostérique, cette enzyme est activée par le citrate et inhibée par les produits finaux de la biosynthèse des acides gras. A l'état de jeûne, l'acétyl-CoA carboxylase est inhibée par phosphorylation par l'AMPK ; à l'état nourri, l'insuline permet la déphosphorylation de l'enzyme, *via* la phosphatase PP2A. L'étape suivante, catalysée par la fatty acid synthase (FAS) permet la formation d'un acide gras saturé à 16 carbones, le palmitate, à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. La régulation de la fatty acid synthase est essentiellement transcriptionnelle, activée par l'insuline et inhibée par le glucagon. La stabilité des ARNm codant la fatty acid synthase est diminuée par les acides gras polyinsaturés. Cette étape nécessite le $NADPH+H^+$ dont la réduction a été assurée par la voie des pentoses phosphates et par la navette pyruvate/malate.

Les acides gras formés vont subir un processus d'**élongation** et de **désaturation**, à la surface du réticulum endoplasmique lisse, permettant la formation d'acides gras de longueur et de degrés d'insaturation variables. Ces étapes sont essentiellement régulées au niveau transcriptionnel, de la même manière que les enzymes de la biosynthèse des acides gras. L'élongation est assurée par des enzymes de la famille ELOVL [37]. La monoinsaturation des acides gras est catalysée par l'isoforme hépatique de la stéaroyl-CoA deshydrogénase (SCD1) ; la polyinsaturation est assurée par la famille des fatty acids desaturases.

Après élongation/désaturation, les acides gras sont **estérifiés en glycérolipides** en se liant à une molécule de glycérol par une liaison ester. En prenant comme exemple la formation de triglycérides (trois chaînes d'acide gras branchées sur un noyau de glycérol 3-phosphate), l'estérification va impliquer successivement une glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT, estérification du premier acyl-CoA sur le glycérol-3-phosphate, formant un acide lysophosphatidique), l'acylglycérol phosphate acyltransférase (AGPAT, estérification du second acyl-CoA, formant un acide phosphatidique), l'activité phosphatidique acide phosphohydrolase des lipines (permettant la déphosphorylation en diacylglycéride de l'acide phosphatidique) et enfin une diacylglycérol acyltransférase (DGAT, permettant la fixation du troisième acyl-CoA sur le diacylglycéride).

Les glycérolipides formés ne sont pas stockés dans l'hépatocyte, ils sont **exportés** dans la circulation générale sous la forme de lipoprotéines VLDL [38] qui seront

36. Le malonyl-CoA est un puissant inhibiteur de la carnitine palmitoyltransferase (CPT1A), principal régulateur de la β-oxydation des acides gras ; l'acétyl-CoA carboxylase empêche donc que la dégradation des acides gras se produise en même temps que leur synthèse.

37. Elongase Very Long Chain, famille de sept membres dont ELOVL5 et ELOVL6 semblent particulièrement importants dans le foie.

38. Very Low Density Lipoprotein.

utilisées par les organes périphériques, notamment la graisse blanche. Cet export est inhibé par l'insuline.

Pour résumer, à l'état nourri, sous l'influence de l'insuline, le glucose de la circulation sanguine est facilement pris en charge par l'hépatocyte pour stockage sous forme de glycogène et synthèse de lipides qui seront exportés dans la circulation générale.

1.2.2 Rôle du foie dans l'homéostasie glucidolipidique : le jeûne

À distance des repas, pour répondre à la diminution de la glycémie et sous l'influence du glucagon, le foie va assurer une fonction d'exportateur de glucose et de corps cétoniques (voir figure 1.15 page ci-contre).

Le premier mécanisme à se mettre en place est la **glycogénolyse**, c'est-à-dire la dégradation du glycogène en glucose 6-phosphate. L'enzyme clef de cette voie est la glycogène phosphorylase. Sa régulation est essentiellement post-traductionnelle (voir figure 1.14 page 27). Le glucagon, en se fixant sur son récepteur, active la protéine kinase A, laquelle active par phosphorylation la phosphorylase kinase. Cette dernière phosphoryle et active à son tour la glycogène phosphorylase. Parallèlement, la protéine kinase A phosphoryle et inactive la glycogène synthase, empêchant que la glycogénogenèse se produise en même temps que la glycogénolyse. En l'absence de signalisation insuline, la protéine phosphatase-1 est inactive, empêchant la déphosphorylation de ces différentes enzymes. La protéine kinase A inactive la protéine phosphatase-1 par phosphorylation inhibitrice et *via* la phosphorylation activatrice de son régulateur fonctionnel, le protein phosphatase inhibitor-1.

Pour être exporté dans la circulation sanguine, le glucose 6-phosphate doit être converti en glucose par la **glucose 6-phosphatase**. L'activité glucose 6-phosphatase fait intervenir un complexe multiprotéique localisé au réticulum endoplasmique. Son contrôle est essentiellement transcriptionnel, induit par le glucagon (*via* les facteurs de transcription FOXO1 et CREB1) et réprimé par l'insuline.

Une fois les réserves hépatocytaires en glycogène épuisées, un second mécanisme de production de glucose se met en place : la **néoglucogenèse**. Cette voie, qui nécessite l'équivalent réduit du nicotinamide adénine dinucléotide ($NADH+H^+$) permet la synthèse *de novo* de glucose à partir de précurseurs non glucidiques : le pyruvate, le lactate[39], le glycérol[40] et certains acides aminés dits glucoforma-

39. Le lactate est essentiellement issu de la glycolyse anaérobie musculaire. Le lactate formé les rhabdomyocytes est capté par le foie pour entrer dans la néoglucogenèse et être exporté sous forme de glucose, lequel pourra être re-capté par le muscle. Ce cycle entre les tissus musculaire et hépatique est plus connu sous le nom de cycle de Cori.

40. Le glycérol est issu de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et glycérol.

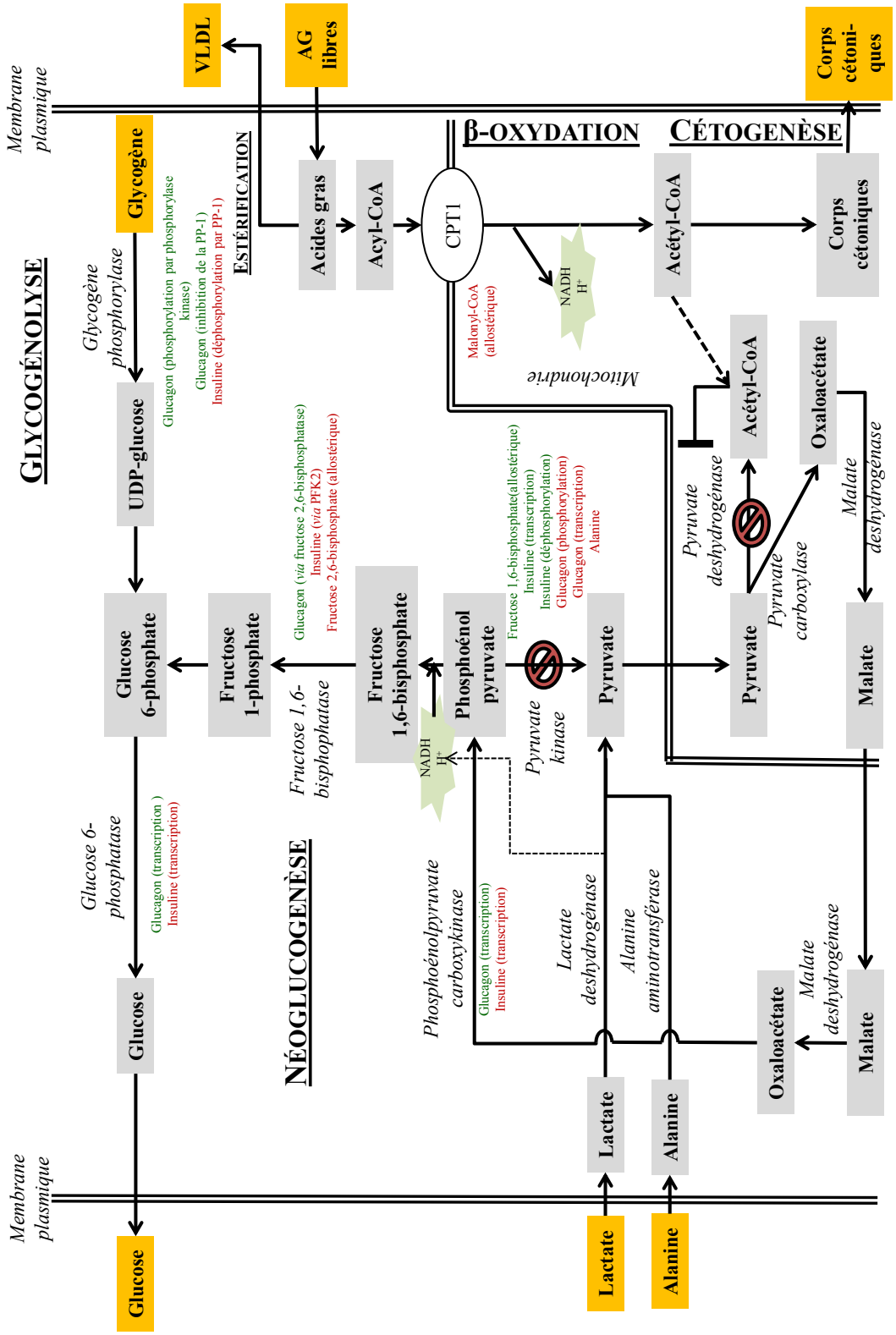


FIGURE 1.15 – Métabolisme glucidolipidique hépatocytaire à jeun. Seules les étapes importantes sont figurées. En vert les régulations activatrices et en rouge les régulations inhibitrices.

teurs [41]. Les acides aminés sont issus d'une protéolyse musculaire ; cependant, la proportion sérique en différents acides aminés ne reflète pas leur concentration relative dans les protéines musculaires. L'alanine et la glutamine sont les principaux acides aminés (environ 30%) libérés par le tissu musculaire lors du jeûne. L'alanine sera captée par le foie, la glutamine par l'intestin comme substrat énergétique et par le cortex rénal pour la néoglucogenèse et l'équilibre acidobasique sanguin. Le catabolisme des acides aminés dans l'hépatocyte aboutit à la formation de pyruvate, d'acétyl-CoA, de succinyl-CoA ou d'α-cétoglutarate en fonction de l'espèce de l'acide aminé. L'alanine, le principal acide aminé glucoformateur dans le foie, est en équilibre dans le cytoplasme hépatocytaire avec le pyruvate par l'activité enzymatique alanine aminotransférase. Le lactate est converti en pyruvate par la lactate deshydrogénase, générant du NADH+H^+. Le pyruvate est alors converti en oxaloacétate dans la mitochondrie par la pyruvate carboxylase et non en acétyl-CoA par la pyruvate deshydrogénase. En effet, lors du jeûne, les importantes concentrations mitochondriales en acétyl-CoA, produit par la β-oxydation des acides gras (voir plus loin) activent allostériquement la pyruvate carboxylase et inhibent la pyruvate deshydrogénase. Ces différents intermédiaires du cycle de Krebs aboutissent à la formation de malate, qui est exporté hors de la mitochondrie pour y être transformé en oxaloacétate. Les étapes suivantes suivent, en sens inverse, celles de la glycolyse, hormis trois étapes unidirectionnelles et limitantes. La première est la transformation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate par la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Celle-ci est essentiellement régulée au niveau transcriptionnel, de la même manière que l'est la glucose 6-phosphatase. La seconde étape limitante, la transformation du fructose 1,6-bisphosphate et fructose 1-phosphate par la fructose 1,6-bisphosphatase, est régulée allostériquement. De façon anti-parallèle à la régulation de la phosphofructokinase-1 de la glycolyse, la fructose 1,6-bisphosphatase est inhibée par le fructose 2,6-bisphosphate. Sous l'action du glucagon, qui active l'activité fructose 2,6-bisphosphatase de l'enzyme bifonctionnelle, les concentrations cytosoliques en fructose 2,6-bisphosphate sont très faibles, activant la fructose 1,6-bisphosphatase et inhibant la phosphofructokinase-1. La dernière étape de la néoglucogenèse à être régulée est la conversion du glucose 6-phosphate en glucose par la glucose 6-phosphatase, rendant cruciale cette dernière enzyme pour la production hépatique de glucose car située au carrefour final de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse.

Chez les mammifères, contrairement aux plantes, les acides gras ne peuvent pas être considérés comme des substrats de la néoglucogenèse. En effet, la β-oxydation des acides gras produit des acétyl-CoA, lesquels ne peuvent pas entrer directement dans la voie de la néoglucogenèse car l'étape de la pyruvate deshydrogénase (pyruvate $\rightarrow$ acétyl-CoA) est unidirectionnelle. Si l'acétyl-CoA peut être converti

41. Tous les acides aminés à part la lysine et la leucine sont potentiellement glucoformateurs.

en malate et entrer dans la néoglucogenèse, cette voie nécessite son entrée dans le cycle de KREBS où il subira deux étape étapes de décarboxylation [42], perdant ainsi ses deux atomes de carbone. Ainsi, chez les mammifères, il ne peut y avoir de production *nette* de glucose à partir d'acides gras [43]. Le squelette glycérol des triglycérides est en revanche un substrat néoglucogénique.

Afin de préserver le glucose d'origine hépatique aux organes glucodépendants (cerveau, cortex rénal, globules rouges, *etc*), le foie va aussi exporter dans la circulation générale d'autres substrats énergétiques que le glucose : les corps cétoniques (acétoacétate et β-hydroxybutyrate). Le substrat initial de la synthèse des corps cétoniques sont les acides gras libres, libérés par lipolyse adipocytaires sous l'action de la lipase hormonosensible et qui circulent dans le sang complexés à l'albumine. Après import hépatocytaire et activation en acyl-CoA, ces acides gras seront oxydés. Une partie des acides gras captés peut aussi être estérifiée et exportée sous forme de VLDL dont la synthèse hépatique est à peu près constante au cours du cycle nutritionnel. L'oxydation des acides gras a essentiellement lieu dans la mitochondrie **(β-oxydation)** [44] et produit des acétyl-CoA (substrats de la cétogenèse), des équivalents réduits NADH+H^+, et $FADH_2$, qui pourront être respectivement oxydés dans les complexes I et II de la chaîne respiratoire. Le NADH+H^+ est aussi un cofacteur de la néoglucogenèse. La β-oxydation est essentiellement régulée à l'étape de l'import mitochondrial des acyl-CoA par la navette carnitine dont l'acteur clef est la carnitine palmitoyltransferase CPT1A. L'expression de cette enzyme est régulée par l'état nutritionnel ; les acides gras favorisent sa transcription et stabilisent ses ARNm. Surtout, le malonyl-CoA, issu de l'activité acétyl-CoA carboxylase de la biosynthèse des acides gras, est un puissant inhibiteur de la CPT1A, empêchant à la β-oxydation de se produire en même temps que la biosynthèse des acides gras. La **cétogenèse** se fait par condensation d'acétyl-CoA et implique plusieurs activités enzymatiques. Les corps cétoniques semblent diffuser librement au travers des membranes cellulaires.

Pour résumer, à distance des repas, sous l'influence du glucagon, le foie est impliqué dans une production de glucose par glycogénolyse et par néoglucogenèse (à partir d'acides aminés d'origine musculaire notamment). Les acides gras d'origine adipocytaire sont captés par le foie pour être exportés sous forme de VLDL ou

42. isocitrate $\rightarrow$ α-cétoglutarate par l'isocitrate deshydrogénase et α-cétoglutarate $\rightarrow$ succinyl-CoA par l'α-cétoglutarate deshydrogénase.

43. Chez les plantes, dans le peroxysomes, deux activités enzymatiques (l'isocitrate lyase et la malate synthase) permettent la production de malate à partir de deux acétyl-CoA ; le malate est converti dans le cytoplasme en oxaloacétate puis en phosphoénolpyruvate pour entrer dans la néoglucogenèse. Ce cycle du glyoxylate permet donc la production *nette* de glucose à partir d'acétyl-CoA.

44. mais peut aussi avoir lieu dans le peroxysome (γ-oxydation) ou le réticulum endoplasmique (ω-oxydation).

pour être métabolisés en corps cétoniques par β-oxydation et cétogenèse.

1.2.3 Catabolisme hépatique des acides aminés

Le foie est un organe central pour le catabolisme des acides aminés. L'**origine** des acides aminés est double. A l'état nourri, les acides aminés d'origine intestinale peuvent soit être captés « tels quels » par les différents tissus pour les différentes synthèses protéiques, soit être recrutés par le foie pour synthèses de glucose, de glycogène, d'acides gras, *etc*, ou pour production d'énergie *via* leur catabolisme oxydatif par le cycle de Krebs. Le groupement amine des acides aminés est retiré par des activités transaminases et déaminases, essentiellement assurées par les hépatocytes périportaux. A distance des repas, la protéolyse musculaire est le principal pourvoyeur d'acides aminés. La transamination a lieu essentiellement dans le tissu musculaire (surtout pour les acides aminés ramifiés valine, leucine, isoleucine), aboutissant à un export musculaire d'acides aminés enrichi en alanine. Dans l'hépatocyte, l'alanine est convertie en pyruvate par l'activité alanine aminotransférase.

Les groupements NH_4^+ issu de la déamination des différents acides aminés sont pris en charge par l'α-cétoglutarate pour former du glutamate. Ce dernier permet l'excrétion du groupement amine par le **cycle de l'ornithine**[45]. Le glutamate peut être converti en citruline par la voie de la transdéamination ou en aspartate par la voie de la transamination. Ces deux voies aboutissent à la formation d'urée, excrétée par voie urinaire. La concentration plasmatique d'urée peut être vue comme un reflet du catabolisme hépatique des acides aminés[46].

Les acides aminés, sauf la lysine et la leucine, sont des substrats de la **néoglucogenèse** (voir figure 1.16 page ci-contre). Comme nous l'avons vu dans la sous-section précédente, **à distance des repas**, l'alanine d'origine musculaire est convertie dans le cytoplasme hépatocytaire en pyruvate, lequel entre dans la mitochondrie pour y être converti en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. En effet, l'acétyl-CoA issu de la β-oxydation des acides gras est un activateur allostérique de la pyruvate carboxylase et un inhibiteur de la pyruvate deshydrogénase, permettant de diriger le flux de pyruvate vers la néoglucogenèse et non vers son oxydation dans le cycle de Krebs. Après export cytoplasmique sous forme de malate et reconversion en oxaloacétate, l'étape limitante de la phosphoénolpyruvate carboxykinase intervient pour la formation du phosphoénolpyruvate et la poursuite de la néoglucogenèse. Le catabolisme des autres acides aminés glucoformateurs aboutit également *in fine* à la production d'oxaloacétate cytoplasmique. Lors de la **ré-alimentation**, le foie reste quelques temps dans un état néogluco-

45. Plus classiquement, mais improprement, appelé cycle de l'urée.
46. si la fonction rénale est normale !

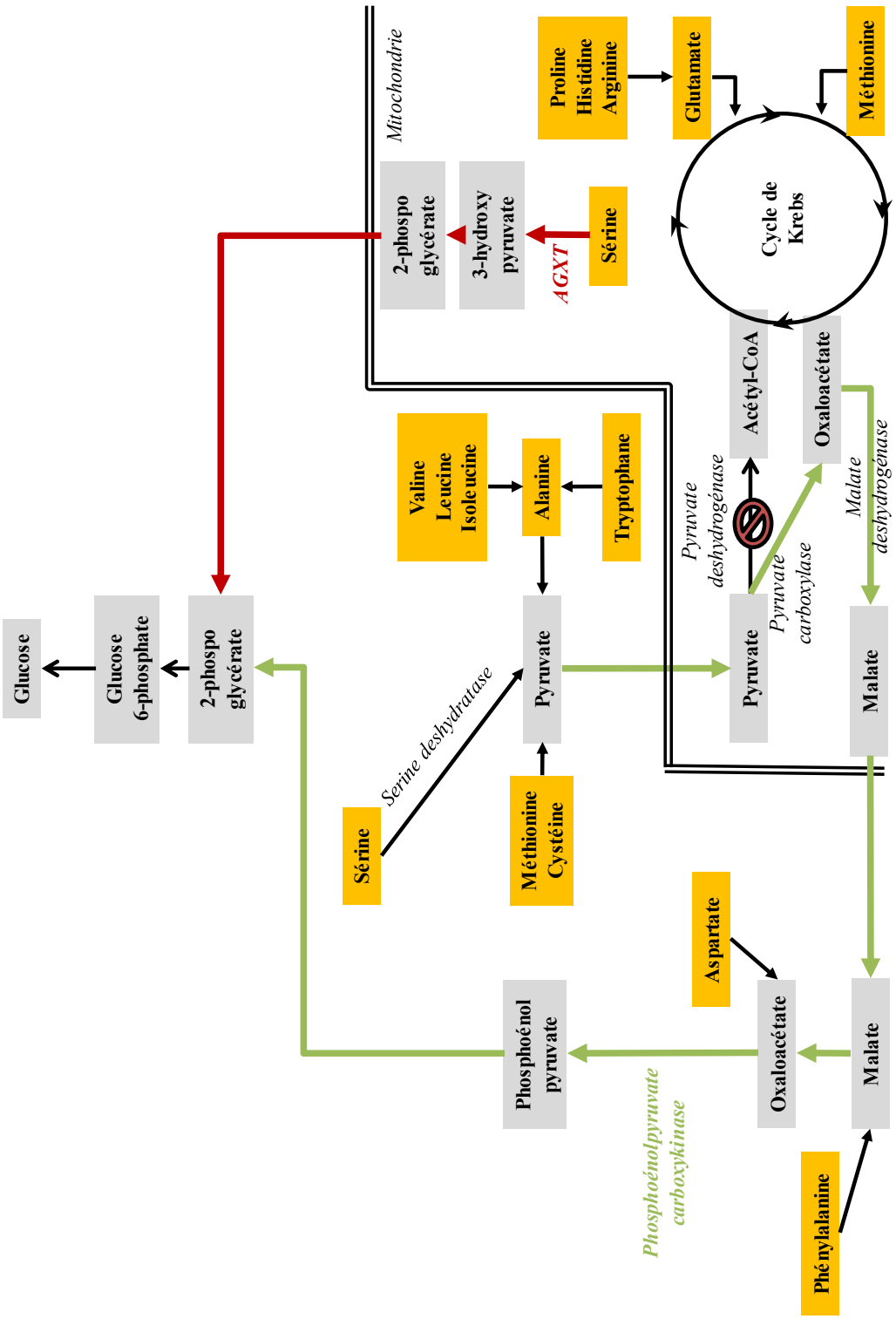


FIGURE 1.16 – Néoglucogenèse hépatique à partir de différents acides aminés. Schéma simplifié de la voie « classique » *via* la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (en vert). La sérine mitochondriale peut être un substrat glucoformateur selon une voie passant par AGXT et shuntant la PEPCK (en rouge). Adapté de [64].

génique : les acides aminés d'origine alimentaire sont alors catabolisés pour former les substrats de la néoglucogenèse. Pendant la même période, le tissu musculaire catabolise le glucose en lactate par glycolyse anaérobie. En effet, la βoxydation des acides gras dans le muscle, toujours active au début de la ré-alimentation, produit de grandes quantités d'acétyl-CoA bloquant l'oxydation du glucose dans la mitochondrie (inactivation de la pyruvate deshydrogénase par l'acétyl-CoA). Le lactate est converti en pyruvate dans le foie par la lactate deshydrogénase et suit la voie de la néoglucogenèse. Le glucose 6-phosphate produit selon ces deux mécanismes pourra être exporté sous forme de glucose, ou être stocké sous forme de glycogène selon la **voie alterne de la glycogénogenèse**.

À l'état nourri, les acides aminés participent à la biosynthèse des acides gras. Leur catabolisme aboutit à la formation d'acétyl-CoA (la pyruvate deshydrogénase n'est plus inhibée par l'acétyl-CoA), substrat de la biosynthèse des acides gras. L'apport en équivalents réduits du nicotinamide dinucléotide phosphate ($NADPH+H^+$) est assuré par la voie des pentoses phosphates et par l'activité de l'enzyme malique du cycle pyruvate/malate qui permet de faire cycler le pyruvate entre le cytoplasme et la mitochondrie.

Le cas de la **serine** est un peu particulier. Il s'agit d'un acide aminé non essentiel à trois atomes de carbone. Il peut être d'origine alimentaire ou biosynthétisé *de novo* par la « voie phosphorylée » à partir de 3-phosphoglycérate, un intermédiaire de la glycolyse et de la néoglucogenèse. Cette voie nécessite du glutamate qui sera transformé en α-cétoglutarate. Le destin de la serine cytoplasmique est double (voir figure 1.16 page précédente) :

— Elle peut être convertie en pyruvate par la sérine déshydratase SDS, lui permettant d'entrer dans la mitochondrie pour servir de substrat au cycle de Krebs *via* la pyruvate deshydrogénase ou à la néoglucogenèse *via* la pyruvate carboxylase.

— Elle peut aussi être convertie en glycine par la serine hydroxymethyltransférase, entrant donc dans le « pool des radicaux monocarbonés », impliqué, entre autres, dans la synthèse des bases puriques et du glutathion.

Dans la mitochondrie également, la sérine peut être convertie en glycine. Elle peut aussi être convertie en 3-hydroxypyruvate par la serine-pyruvate aminotransférase (codée par le gène *AGXT*) puis en glycérate et 2-phosphoglycérate lequel peut entrer dans la voie de la néoglucogenèse, en aval de l'étape limitante de la phosphoénolpyruvate carboxykinase.

La néoglucogenèse à partir de sérine peut donc se faire :

— soit *via* sa transformation en pyruvate par la sérine déshydratase SDS. Cette voie passe par l'étape limitante de la phosphoénolpyruvate carboxykinase.

— soit *via* sa transformation en 3-hydroxypyruvate par l'AGXT, permettant l'entrée dans la néoglucogenèse à l'étape du 2-phosphoglycérate, en aval de

l'étape limitante de la phosphoénolpyruvate carboxykinase. L'activité de l'AGXT est induite par les régimes pauvres en sucre et par le glucagon (de façon transcriptionnelle), soulignant son rôle dans la néoglucogenèse.

Les inhibiteurs de la phosphoénolpyruvate carboxykinase étant moins efficaces pour inhiber la néoglucogenèse à partir de sérine qu'à partir de lactate ou d'alanine, la néoglucogenèse à partir de sérine semble passer en partie indépendamment de l'activité phosphoénolpyruvate carboxykinase [66]. En pratique, la néoglucogenèse à partir de sérine se fait essentiellement par la voie SDS chez les rongeurs et par la voie AGXT chez l'homme, le chien et le lapin [66].

La serine apparaît donc comme un acide aminé particulier dans le métabolisme hépatique, capable à la fois d'être catabolisé dans le cycle de Krebs pour produire de l'ATP, d'être converti en glycine pour entrer dans le métabolisme monocarboné et de servir de substrat à la néoglucogenèse, *via* ou non, la phosphoénolpyruvate carboxykinase.

De façon intéressante, la sérine semble être un acide aminé crucial dans le cancer [67]. En effet, dans les cancers, il existe fréquemment une induction de la synthèse *de novo* de sérine à partir de 3-phosphoglycérate, la sérine est préférentiellement redirigée vers le métabolisme monocarboné *via* sa transformation en glycine pour assurer la synthèse des bases puriques et l'homéostasie acidobasique par le glutathion. La voie de la biosynthèse de la sérine est intimement liée au métabolisme du glutamate, qui sera transformé en α-cétoglutarate, facteur anaplérotique du cycle de Krebs.

AGXT [66] code l'activité alanine-glyoxylate aminotransférase, aussi appelée sérine-pyruvate aminotransférase [47]. Cette enzyme catalyse le transfert du groupement amine d'un acide aminé donneur (essentiellement sérine qui sera convertie en 3-hydroxypyruvate) vers le pyruvate qui sera converti en alanine. La localisation subcellulaire hépatocytaire de l'AGXT varie en fonction des espèces : elle est peroxysomale chez l'homme et les herbivores et essentiellement mitochondriale chez les carnivores. Chez la souris et le rat, elle se situe dans les deux organelles ; cependant seule l'activité AGXT mitochondriale est induite par le glucagon. Chez l'homme, la déficience en activité peroxysomale de l'AGXT est responsable d'une maladie héréditaire, l'hyperoxalurie primaire de type I [48]. L'accumulation d'oxalate caractérisant cette maladie est secondaire à la perturbation de la clairance du glyoxylate assurée par l'activité AGXT peroxysomale. Chez les herbivores, le glyoxylate est essentiellement d'origine alimentaire (le glycolate, précurseur du glyoxylate, est un intermédiaire de la photorespiration). L'activité AGXT peroxysomale des herbivores semble donc être nécessaire à l'excrétion du glyoxylate alimentaire. Chez les carnivores, le glyoxylate est un dérivé du métabolisme mi-

47. EC 2.6.1.51
48. OMIM : #259900

tochondrial de la L-hydroxyproline, d'origine alimentaire. L'activité AGXT mitochondriale des carnivores semble donc être nécessaire à l'excrétion du glyoxylate formé *in situ* par le métabolisme de la L-hydroxyproline. Chez l'homme, l'activité AGXT pour l'excrétion du glyoxylate doit être peroxysomale ; en effet, certaines mutations d'*AGXT* chez des patients souffrant d'hyperoxalurie de type I induisent une délocalisation aberrante de l'activité AGXT dans la mitochondrie. Au total, si l'activité de l'AGXT dans la néoglucogenèse semble être indépendante de la localisation subcellulaire de l'enzyme, son rôle dans le métabolisme du glyoxylate semble en être intimement dépendant.

1.2.4 Régulation moléculaire

Comme mentionné précédemment, les hormones pancréatiques insuline et glucagon jouent un rôle majeur dans la régulation du métabolisme glucidolipidique hépatocytaire.

L'**insuline** est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans. Le récepteur à l'insuline, codé par le gène *INSR*, est un récepteur membranaire homodimérique à activité tyrosine kinase. La fixation de l'insuline induit une autophosphorylation du récepteur et le recrutement d'adaptateurs moléculaires qui vont médier la signalisation insuline. Ces substrats intracellulaires font partie des familles *Insulin Receptor Substrate* (IRS) [49] et *Src Homology domain Containing* (Shc) [50]. Les voies de signalisation activées en aval sont nombreuses, les plus importantes étant les voies PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK. De mêmes, les conséquences physiologiques de l'activation de la voie insuline sont pléomorphes, allant du contrôle du métabolisme glucidolipidique à l'activation de la synthèse protéique et du cycle cellulaire [68]. Nous n'évoquerons ici que les effets sur le métabolisme glucidolipidique (voir figure 1.17 page ci-contre).

La phosphorylation des protéines IRS entraîne l'activation de la **PI3K** [51] et la génération de phosphatidilinositol 3,4,5-triphosphate (PIP_3), lequel recrute à la membrane des protéines à domaines d'homologie pleckstrine (PH), comme les ser/thr kinases PDPK1 et AKT (protéine kinase B). **AKT** joue un rôle central dans la transmission du signal insuline [69, 70]. En effet, des souris invalidées pour *Akt2*, principale isoforme d'AKT activée par l'insuline dans le foie, développent une insulinorésistance et un diabète [71]. En réponse à l'insuline, elle est tout d'abord phosphorylée sur son résidu Ser473 par le complexe mTORC2 [52] puis par

49. Cette famille comporte six membres dont ceux impliqués dans la signalisation insulinique hépatocytaire sont IRS1 et IRS2.

50. Trois gènes codent les protéines Shc. *SHC1* code trois isoformes différentes, exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme.

51. phosphatidylinositol-3-phosphate kinase

52. mammalian Target of Rapamycin Complex 2.

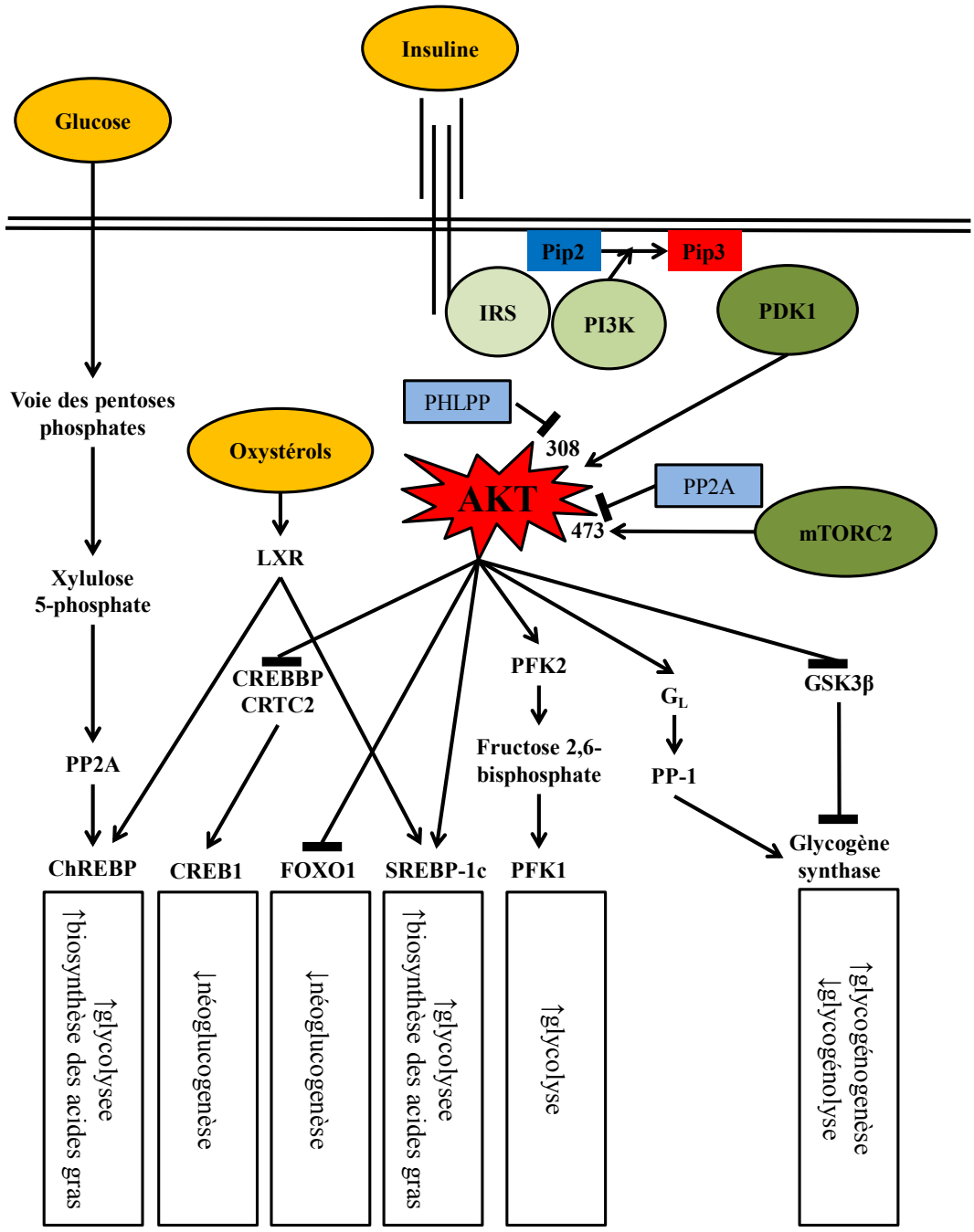


FIGURE 1.17 – Régulation du métabolisme à l'état nourri. L'activation de l'AKT est le nœud central de la signalisation insuline dans le métabolisme. Les conséquences sont l'activation directe d'acteurs clefs de la glycogénolyse et de la glycolyse, l'activation du facteur de transcription SREBP-1c et l'inhibition de FOXO1 et CREB1. Indépendamment de l'insuline, les facteurs de transcription ChREBP (par le glucose) et LXR (par les oxystérols) sont également activés à l'état nourri.

PDPK1 sur son résidu Thr308 [72]. À l'inverse, l'activité d'AKT est en partie régulée négativement par deux phosphatases : la protéine phosphatase 2A, qui déphosphoryle AKT sur son résidu Thr308 [73] et les phosphatases PHLPP1 et PHLPP2 qui déphosphorylent AKT sur son résidu Ser473 [74].

AKT inactive par phosphorylation la GSK3β, empêchant l'inactivation par phosphorylation de la glycogène synthase. En activant la synthèse de son co-activateur, le peptide G_L, l'insuline active la protéine phosphatase-1, maintenant dans un état déphosphorylé et actif la glycogène synthase et dans un état déphosphorylé et inactif la glycogène phosphorylase. L'insuline stimule donc la glycogénogenèse tout en inhibant la glycogénolyse.

Le facteur de transcription **SREBP-1c**, codé par le gène *SREBF1*, peut être considéré comme le médiateur transcriptionnel de l'insuline pour ses rôles sur le métabolisme lipidique. Parmi les gènes cibles de ce facteur de transcription, figurent le gène codant la première étape limitante de la glycolyse, *GCK*, les gènes clefs de la biosynthèse des acides gras : *ACACA* et *FASN* et des gènes de l'élongation, de la désaturation et de l'estérification des acides gras. SREBP-1c est donc à l'origine d'un programme transcriptionnel favorisant la conversion du glucose en acides gras. La régulation de SREBP-1c est complexe et multiétapes ; l'insuline favorise l'activité de ce facteur de transcription à plusieurs niveaux : (i) en favorisant sa transcription, (ii) en favorisant sa maturation protéique et (iii) en participant à la régulation des différentes phosphorylations controlant son activité. L'insuline stimule ainsi l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c, pour activer la biosynthèse des acides gras. Ce contrôle passe par la voie PI3K/AKT/mTORC1/S6K.

Enfin, l'insuline inactive les facteurs de transcriptions clefs de la néoglucogenèse : FOXO1 par phosphorylation et CREB1 par phosphorylation de ses partenaires CRTC2, EP300 et CREBBP, et active la glycolyse en favorisant l'activité phosphofructokinase-2 de l'enzyme bifonctionnelle.

À part SREBP-1c, deux autres facteurs de transcription sont particulièrement actifs à l'état nourri. **ChREBP** [75], codé par le gène *MLXIPL*, est un facteur de transcription se fixant aux éléments de type ChoRE [53]. ChREBP est ségrégué dans le cytoplasme suite à sa phosphorylation par la protéine kinase A (signalisation glucagon). Il est transloqué au noyau suite à sa déphosphorylation par la protéine phosphatase PP2A, laquelle est activée par le xylulose 5-phosphate, un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates. Cependant, il semble que ce soit en fait plutôt le glucose 6-phosphate, produit par la glucokinase, qui contrôle l'import nucléaire de ChREBP [76]. Ses gènes cibles sont ceux de la biosynthèse des acides gras et de la glycolyse, comme *PKLR*, *ACACA* et *FASN*. ChREBP est donc activé par le glucose, indépendamment de l'insuline, pour induire un programme transcriptionnel glycolytique et lipogénique. **LXR**, suite à son activation

53. carbohydrate responsive element

par les oxystérols, induit l'expression de ses gènes cibles dont *SREBF1*, *MLXIPL* et *FASN*.

À distance des repas, la diminution de la glycémie est à l'origine de la sécrétion pancréatique de glucagon. Dans le foie, le glucagon, en se fixant à son récepteur à sept passages transmembranaires couplé à la protéine G, entraîne la formation d'AMP cyclique (voir figure 1.18 page suivante). Le glucagon induit aussi l'activation de kinases dépendantes du calcium comme la protéine kinase C ou la calcium/calmoduline-dependant proteine kinase kinase (CaMKK) *via* la phospholipase C. La CaMKK est un activateur de l'AMPK, dont les rôles dans le contrôle du métabolisme glucidolipidique sont nombreux et abordés dans la troisième partie de cette introduction. L'AMPc active une cascade de phosphorylations entrainant l'activation successive de la protéine kinase A, de la phosphorylase kinase et le glycogène phosphorylase, aboutissant à l'activation de la glycogénolyse. La protéine kinase A inactive par phosphorylation la glycogène synthase. Le glucagon induit aussi la néoglucogenèse :

— en induisant l'activité fructose 2,6-bisphosphatase de l'enzyme bifonctionnelle. L'activité de la fructose 1,6-bisphosphatase est induite alors que l'activité phosphofructokinase-1 est inhibée.
— en inhibant l'enzyme finale de la glycolyse, la pyruvate kinase, *via* sa phosphorylation par la protéine kinase A.
— en phosphorylant, *via* la protéine kinase A, le facteur de transcription CREB1 [77], lequel interagit dans le noyau avec les formes déphosphorylées de ses partenaires CRTC2, CREBBP et EP300, induisant l'expression de gènes de la néoglucogenèse. En fait, l'essentiel du programme néoglucogénique induit par *CREB1* se fait par l'induction de la transcription du cofacteur transcriptionnel PGC1α (codé par le gène *PPARGC1A*). Ce dernier, interagissant avec différents facteurs de transcriptions comme FOXO1, induit l'expression de gènes de la néoglucogenèse comme *PCK1* et *G6PC*.

FOXO1 [78–80] est le facteur de transcription clef pour induire le programme transcriptionnel néoglucogénique. Son activité est finement régulée, de façon complexe et multiniveau, par son état de phosphorylation, d'acétylation et par son interaction avec ses partenaires transcriptionnels (voir figure 1.19 page 43).

— AKT est capable de phosphoryler FOXO1, le séquestrant dans le cytoplasme lié à la protéine 14-3-3. La protéine phosphatase PP2A est capable de déphosphoryler FOXO1, le libérant de son interaction avec 14-3-3 et lui permettant d'entrer dans le noyau et de se fixer sur les éléments de réponses de ses gènes cibles.
— la fixation de FOXO1 à l'ADN induit le recrutement de l'histone acétyltransférase EP300 qui favorise la transcription des gènes cibles de FOXO1 en acétylant les histones des nucléosomes.

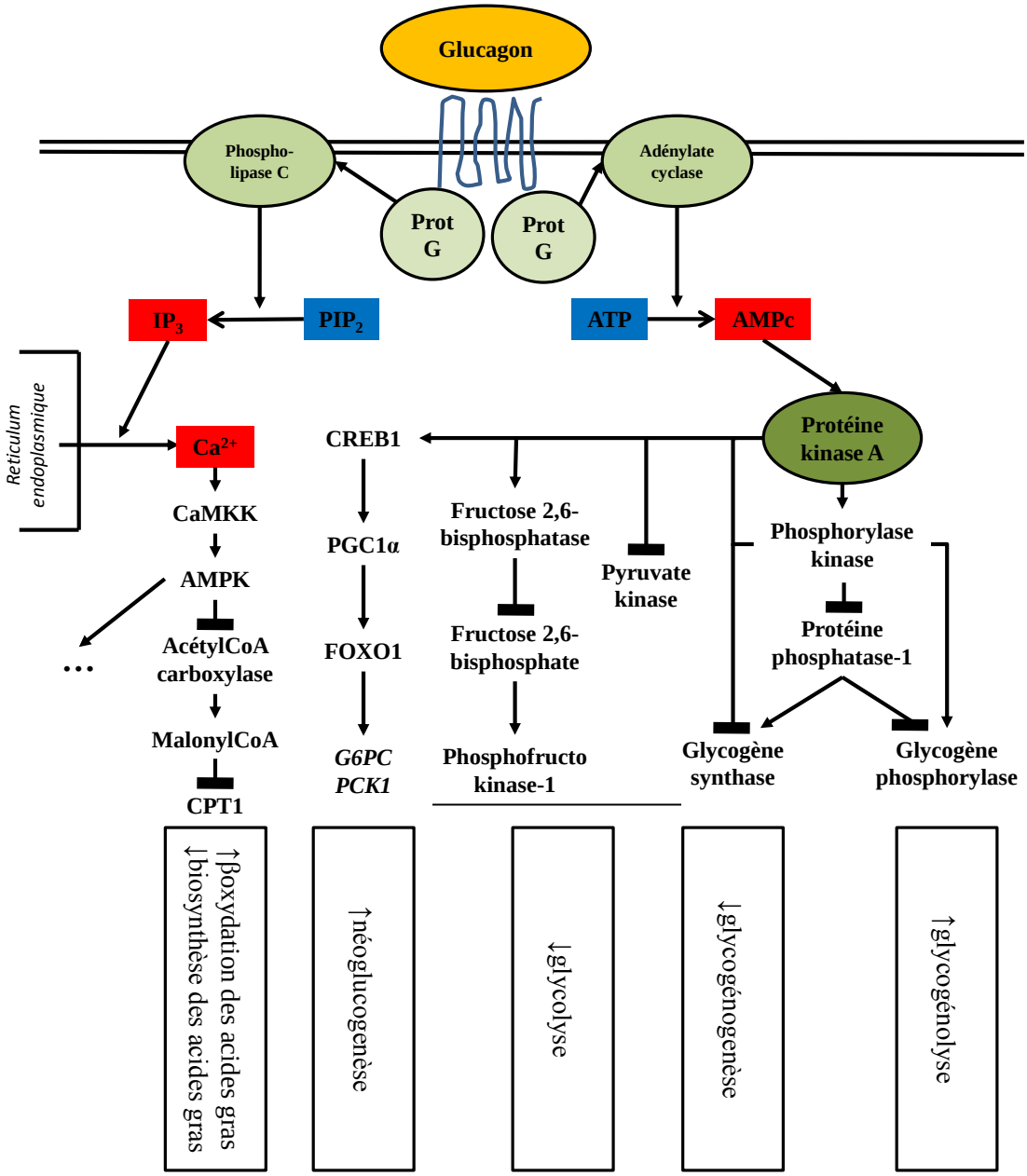


FIGURE 1.18 – Régulation du métabolisme à jeun. Le glucagon est l'hormone centrale pour la régulation du métabolisme glucidolipidique à jeun. En se fixant à son récepteur couplé à la protéine G, le glucagon active la phospholipase C, à l'origine d'un relargage cytoplasmique de calcium. Parmi les voies activées en aval, la plus importante est la voie CaMKK/AMPK, permettant l'inactivation de la biosynthèse des acides gras par phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase. La β-oxydation est activée car les faibles concentrations de malonyl-CoA ne permettent pas d'inhiber la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). Le glucagon active aussi l'adénylate cyclase, à l'origine de l'activation de la protéine kinase A par l'AMP cyclique. En aval, la protéine kinase A orchestre un jeu de phosphorylations aboutissant à l'activation de la glycogène phosphorylase et à l'inhibition de la glycogène synthase. La protéine kinase A inhibe la glycolyse en phosphorylant l'isoforme hépatique de la pyruvate kinase et en inhibant la phosphofructokinase-1 (conversion de l'activateur allostérique fructose 2,6-bisphosphate en fructose 6-phosphate). Enfin, la protéine kinase A active par phosphorylation le facteur de transcription CREB1, à l'origine d'un programme transcriptionnel néoglucogénique *via* PGC1α et FOXO1.

— cependant, pat un mécanisme de rétro-contrôle négatif, EP300 acétyle également FOXO1, empêchant sa liaison à l'ADN et le rendant vulnérable à sa phosphorylation par AKT, l'exportant du noyau lié à la protéine 14-3-3.
— la déacétylation de FOXO1 dans le cytoplasme est assurée par la déacétylase SIRT2.
— FOXO1 voit son activité transcriptionnelle activée par certains acteurs transcriptionnels comme PGC1α et β-caténine (en condition de stress oxydant notamment) et inhibée par PPARα et les récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes.

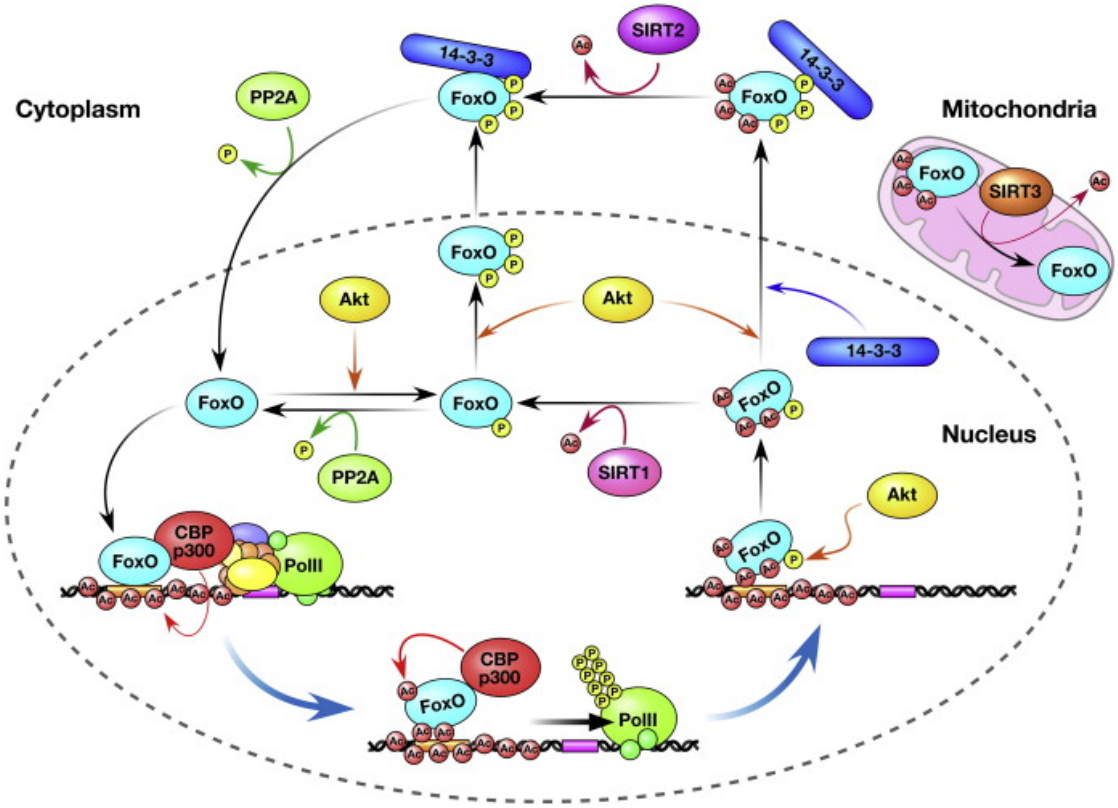


FIGURE 1.19 – Régulation de FOXO1 par son état de phosphorylation et d'acétylation. AKT phosphoryle FOXO1, le retenant dans le cytoplasme. La protéine phosphatase PP2A est capable de déphosphoryler FOXO1 qui peut être transloqué au noyau pour se fixer sur le promoteur de ses gènes cibles. Le recrutement de l'histone acétyl transférase EP300 (p300) permet l'activation de la transcription par l'acétylation des histones nucléosomales. Cependant, p300 acétyle secondairement FOXO1, l'empêchant d'interagir avec ses séquences cibles. AKT peut phosphoryler la forme acétylée de FOXO1 qui, interagissant avec la protéine 14-3-3, est exporté et séquestré dans le cytoplasme. SIRT2 peut déacétyler FOXO1. Issu de [80].

Au total, la régulation de la réponse enzymatique hépatocytaire glucidolipidique face aux modifications de l'état nutritionnel implique :

— à l'état nourri, un jeu de déphosphorylations par la signalisation insuline pour induire la glycogénogenèse et une activation de facteurs de transcription impliqués dans la glycolyse et la biosynthèse des acides gras *via* la signalisation insuline (SREBP-1c) ou indépendamment (ChREBP, LXR).
— à l'état de jeûne, un jeu de phosphorylations pour induire la glycogénolyse et une activation de facteurs de transcription impliqués dans la néoglucogenèse comme CREB/CRTC2/EP300, PGC1α et FOXO1. L'activité de FOXO1 est inhibée par sa phosphorylation par AKT et par son acétylation par EP300.

1.2.5 Zonage du métabolisme glucidolipidique

Le concept de zonage métabolique du lobule hépatique, introduit à la sous-section 1.1.3 page 10, concerne aussi les voies du métabolisme glucidolipidique. Cet aspect, revu en [14], est illustré dans le tableau suivant.

	Zone périportale	**Zone péricentrolobulaire**	Références
Glycogène	Glycogénolyse $\longrightarrow$ Glycogénogenèse à partir de lactate	$\longleftarrow$ Glycogénogenèse Glycogénogenèse à partir de glucose	[10] [81, 82]
Glucose	Néoglucogenèse	Glycolyse	[26, 81, 83, 84]
Acides gras	β-oxydation Import	Biosynthèse Estérification	[85–87] [85, 88, 89]

Tableau 1.1 – Zonage du métabolisme glucidolipidique dans le lobule hépatique. Lors du jeûne, la glycogénolyse commence dans les hépatocytes périportaux et se poursuit vers les hépatocytes péricentrolobulaires. A l'état nourri, la glycogénogenèse se fait dans le sens inverse.

Ce zonage du métabolisme glucidolipidique, contrairement à celui de la détoxication de l'ammoniac, est flexible. Certains gradients d'activités enzymatiques peuvent en effet varier en fonction de certaines conditions physiologiques et pathologiques [14, 86]. Le cas de la NAFLD [54], maladie se caractérisant par l'accumulation de lipides dans les hépatocytes sous forme de vésicules intracytoplasmiques illustre bien ce point. Les dépôts de lipides se situent essentiellement dans les hépatocytes péricentrolobulaires au début de la maladie et peuvent s'étendre aux zones intermédiaire et périportale à mesure que la maladie évolue [90, 91]. La NAFLD fait partie du syndrome métabolique [92], lequel intègre également la notion d'insulinorésistance. Cette dernière se caractérise dans le foie par l'incapacité de l'insuline à inhiber efficacement la production hépatique de glucose (néoglucogenèse et glycogénolyse). Cependant, stéatose et insulinorésistance ne semblent pas

54. Non-alcoholic fatty liver disease

directement liées dans le foie [14], la stéatose n'étant notamment pas suffisante en tant que telle pour induire une insulinorésistance hépatique globale. De plus, le zonage péricentrolobulaire de la stéatose et le zonage périportal de la néoglucogenèse laissent à penser que les deux mécanismes (induction de la biosynthèse des acides gras, non répression de la néoglucogenèse) sont indépendants dans la NAFLD. Comme l'insuline active la biosynthèse des acides gras (*via* SREBP-1c), une insulinorésistance hépatique devrait se caractériser par une diminution de la stéatose, ce qui n'est pas le cas [93].

Il existe donc un paradoxe quant aux conséquences hépatiques de l'insulinorésistance dans le syndrome métabolique ; l'insulinorésistance toucherait le rôle de l'insuline sur la néoglucogenèse, alors que la biosynthèse des acides gras resterait insulinosensible. L'insuline inhibe cependant la néoglucogenèse et induit la biosynthèse des acides gras par une même voie : la voie IRS/PI3K/AKT. En outre, l'invalidation hépatique du récepteur à l'insuline induit un phénotype d'hyperinsulinémie et d'hyperglycémie mais n'entraîne pas de stéatose [94]. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce paradoxe de la signalisation insuline dans le foie (revus en [14]). Le plus récent, et peut-être le plus séduisant même si encore peu étayé par des données expérimentales, est celui d'une sensibilité hépatocytaire à l'insuline variable selon l'axe porto-central lobulaire [14].

Selon ce modèle, chez les patients souffrant d'un syndrome métabolique, l'afflux portal postprandial en acides gras est augmenté (acides gras d'origine alimentaire, acides gras libres libérés par les adipocytes [55]). L'import hépatocytaire des acides gras étant plus important dans la zone périportale, les hépatocytes périportaux seraient insulinorésistants. En effet, les céramides, intermédiaires métaboliques du métabolisme lipidique, sont capables d'inactiver AKT à la fois en bloquant son recrutement membranaire (*via* la protéine kinase atypique Cζ (aPKCζ)) et en induisant sa déphosphorylation en activant la protéine phosphatase PP2A [95]. Les hépatocytes péricentrolobulaires, quant à eux, resteraient insulinosensibles, car moins exposés à l'influx sanguin d'acides gras. Les conséquences métaboliques seraient les suivantes (voir figure 1.20 page suivante) :

- Les hépatocytes périportaux :
  - sont physiologiquement impliqués dans la néoglucogenèse et la glycogénolyse,
  - Ces deux mécanismes sont normalement inhibés par l'insuline.
  - Leur sensibilité à l'insuline est faible.
  - En conséquence, ces hépatocytes périportaux seraient responsables d'une production hépatique de glucose accrue, telle observée dans le syndrome métabolique, par non répression de la néoglucogenèse et de la glycogé-

55. En présence d'une insulinorésistance, la lipase hormonosensible responsable de la libération des acides gras libres par les adipocytes n'est plus efficacement inhibée par l'insuline.

nolyse.

— Les hépatocytes péricentrolobulaires :
  — sont physiologiquement impliqués dans la biosynthèse et l'estérification des acides gras.
  — Ces deux mécanismes sont activés par l'insuline.
  — Leur sensibilité à l'insuline est conservée.
  — En conséquence, les hépatocytes péricentrolobulaires seraient responsables de la stéatose (biosynthèse des acides gars accrue) et de l'hyperlipidémie (export de VLDL accru) observées dans le syndrome métabolique.

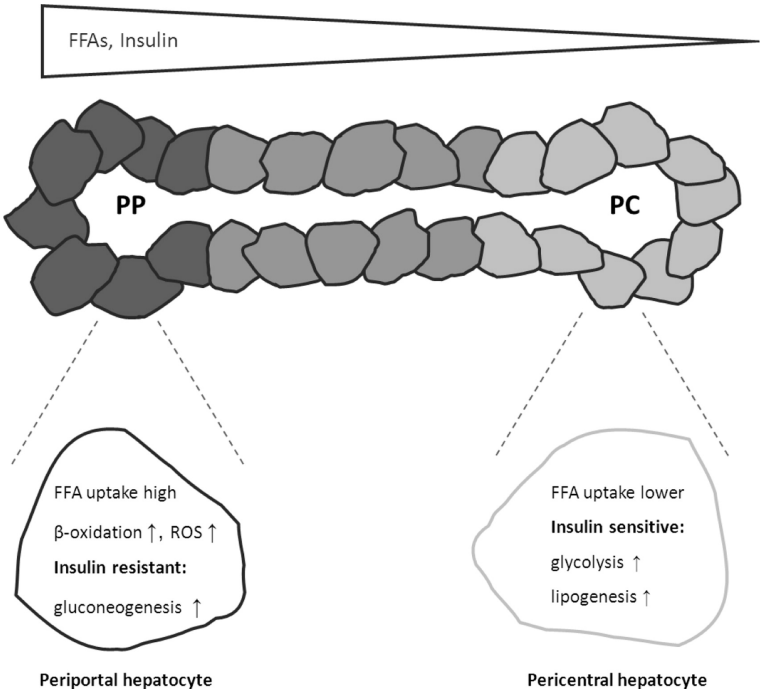


FIGURE 1.20 – Modèle de zonage de la signalisation insuline dans le foie.
PP : périportal, PC : péricentrolobulaire, FFA : free fatty acids (acides gras libres). Issu de [14].

Ce modèle pourrait s'appliquer, avec cependant des conséquences métaboliques peut-être moindres, à la physiologie normale de la régulation insulinique du métabolisme glucidolipidique du foie en dehors de tout processus pathologique.

Chapitre 2

Le carcinome hépatocellulaire

Le foie, comme tout organe, peut être le siège de tumeurs bénignes ou malignes. Le large éventail des types histologiques reconnus par l'Organisation Mondiale de la Santé est présenté dans le tableau 2 page suivante. Les tumeurs malignes du foie les plus fréquentes sont les métastases, notamment des adénocarcinomes colorectaux. Des tumeurs hépatiques malignes primitives, les carcinomes hépatocellulaires (CHC) sont de loin les plus prévalents (environ 90%), suivis des cholangiocarcinomes. Les CHC présentent une différenciation de type hépatocytaire plus ou moins complète et ont la particularité de survenir, dans plus de 80% des cas, sur un parenchyme cirrhotique [97, 98]. Les adénomes hépatiques sont les corrélats bénins des CHC, avec également une différenciation hépatocytaire. Les tumeurs malignes dérivant des cholangiocytes intrahépatiques se nomment cholangiocarcinomes intrahépatiques. Les hépatoblastomes sont des tumeurs blastémateuses hépatiques survenant chez l'enfant caractérisées par une abondance variable de différentes lignées cellulaires épithéliales et mésenchymateuses hépatiques. La lignée épithéliale reproduit le développement initial du foie avec des cellules immatures, des hépatoblastes de type fœtal et embryonnaires et des cellules plus matures de type hépatocytaire.

	Hepatocellular	Biliary	Uncertain origin
Benign	Hepatocellular adenoma	Bile duct adenoma	
	Focal nodular hyperplasia	Microcystic adenoma	
		Biliary adenofibroma	
Premalignant	Large cell change	Biliary IEN grade 3	
	Small cell change	IDPN with IEN	
	Dysplastic nodule, low grade	MCN with IEN	
	Dysplastic nodule, high grade		
Malignant	Hepatocellular carcinoma	Intrahepatic cholangiocarcinoma	Calcifying nested epithelial stromal tumour
	HCC, fibrolamellar variant	IDPN with invasive carcinoma	Carcinosarcoma
	HB, epithelial variants	MCN with invasive carcinoma	Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma
	Undifferentiated carcinoma		HB, mixed epithelial-mesenchymal
			Malignant rhabdoid tumour

Tableau 2.1 – Classification des tumeurs hépatiques selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Les tumeurs mésenchymateuses pures, les tumeurs germinales, les lymphomes et les métastases ont été omises. IEN : IntraEpithelial Neoplasia. IDPN : Intraductal papillary neoplasm. MCN : Mucinous cystic neoplasm. HCC : Hepatocellular carcinoma. HB : Hepatoblastoma. Adapté de [96].

2.1 Caractères généraux

2.1.1 Épidémiologie

Le CHC se situe au 7e rang des tumeurs malignes les plus fréquentes dans le monde (5e rang chez l'homme) avec une incidence de 782000 nouveaux cas par an dans le monde. Ce taux d'incidence est cependant extrêmement variable d'une région à l'autre du globe, avec des zones de très forte incidence comme l'Asie du sud-est, (la Chine cumulant 50% des nouveaux cas mondiaux) et l'Afrique subsaharienne, et des régions de faible incidence comme l'Europe du nord et l'Asie du sud [99]. Il existe une nette prédominance masculine avec un *sex ratio* de 2,4. Le CHC est la seconde cause de mortalité par cancer dans le monde, avec 746000 décès attribuables par an dans le monde. Le pronostic est donc assez sombre avec un rapport mortalité/incidence de 0,95 [96].

2.1.2 Étiologies

Le facteur de risque le plus fréquent du carcinome hépatocellulaire est l'**hépatite chronique virale** (85% au niveau mondial). La distribution mondiale des infections par les virus causaux principaux, le VHB et le VHC, reflète la distribution de l'incidence du CHC, avec une forte prévalence en Asie du sud-est et en Afrique du nord. L'incidence du CHC est 100 fois supérieure chez les patients atteints d'une hépatite chronique B, et le risque cumulé de développer un CHC au cours de la vie atteint 50% chez ces patients. Plusieurs arguments tendent à montrer que le VHB peut être à l'origine du CHC sans passer nécessairement par une étape de cirrhose. Par exemple, l'intégration chromosomique de l'ADN viral peut directement invalider un gène suppresseur de tumeur ou activer un proto-oncogène ; le gène viral *HBV X* code une protéine interférant et invalidant directement TP53 [100]. Les CHC paraissent plus fréquemment liés au VHC qu'au VHB en Europe, au Japon et aux États-Unis d'Amérique.

Aux États-Unis d'Amérique et en Europe du nord, l'**alcoolisme chronique** est la principale cause de maladie chronique du foie. Il induit un risque de développer un CHC deux fois plus important que dans la population générale. Il agit également comme cofacteur aggravant d'autres hépatopathies chroniques. Au niveau hépatique, l'alcool induit des lésions de stéatose, d'hépatite, de stéato-hépatite et de fibrose évoluant vers la cirrhose. La survenue d'un CHC dans un contexte d'alcoolisme chronique se fait presque exclusivement sur foie cirrhotique [96].

Le troisième facteur de risque de CHC, d'incidence croissante dans les pays industrialisés du fait de la modification des *habitus* alimentaires, est la stéatopathie non alcoolique[1]. Cette entité, liée au syndrome métabolique et à l'insulinorésis-

1. appelée *non-alcoholic fatty liver disease* par les anglo-saxons, NAFLD.

tance, comprend des lésions de stéatose simple et de stéatohépatite [2] pouvant évoluer vers la fibrose et la cirrhose et se compliquer de CHC. De façon intéressante, les CHC survenant dans un contexte de stéatohépatite non alcoolique semblent se développer assez fréquemment sur un foie peu fibreux et parfois à partir d'un adénome télangiectasique [96, 101].

Les autres facteurs de risque de CHC sont moins fréquents. Citons, l'hémochromatose héréditaire, le déficit en α1-antitrypsine, les hépatopathies autoimmunes comme la cirrhose biliaire primitive et les hépatites auto-immunes, et l'intoxication à l'aflatoxine B1 [96]. Cette dernière est produite par un champignon colonisant fréquemment les récoltes d'arachides, de maïs et de manioc en Afrique. C'est la seule étiologie liée à une altération moléculaire spécifique qui est une mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53* [102] [3].

La cirrhose est la principale lésion prédisposant au CHC. Ses étiologies sont notamment les mêmes que celles du CHC. Le risque relatif de développer un carcinome hépatocellulaire en cas de cirrhose est de l'ordre de 40 comparativement à la population générale [103]. Le dépistage systématique par échographie et dosage sérique de l'α-fœtoprotéine est la règle chez les patients cirrhotiques. Elle se définit microscopiquement par la présence d'une fibrose annulaire délimitant des nodules hépatocytaires de régénération, de façon diffuse dans le foie. La physiologie est de plus en plus clairement établie, avec un processus fibrogène exercé par les cellules stellaires et des fibroblastes et un caractère régénératif dépendant des hépatocytes et des progéniteurs hépatocytaires. Cette maladie chronique et progressive était considérée comme irréversible ; cependant de nombreux exemples tendent à montrer actuellement que la fibrose, et même la cirrhose, sont capables de régresser dans certaines circonstances grâce à un traitement étiologique bien conduit [104]. Elle apparaît également comme une maladie hétérogène, tant sur le plan morphologique [4] que clinique [5] [104].

Si la cirrhose, quelle que soit son étiologie, constitue le principal facteur de risque de CHC, elle n'est pas à proprement parler un état pré-cancéreux. Cependant, l'OMS reconnait actuellement des lésions précurseurs de CHC qui peuvent survenir sur cirrhose [96]. Ces lésions sont soit infra-millimétriques, alors appelées « foyers dysplasiques » soit macroscopiquement visibles, alors appelées « nodules dysplasiques ». Les foyers dysplasiques prennent le plus souvent l'apparence de foyers de dysplasie à petites cellules ou de foyers dépourvus d'hémosidérine dans

2. appelée *non-alcoholic steatohepatitis* par les anglo-saxons, NASH.

3. notamment des substitutions G>T sur le codon 249.

4. Les différentes étiologies peuvent conduire à des aspects morphologiques différents en termes de fibrose et de régénération.

5. Le spectre clinique s'étend de situations dans lesquelles la cirrhose n'impacte pas la qualité de vie (comme dans la cirrhose associée aux stéatohépatites non alcooliques) à des cirrhoses compliquées d'hypertension portale, d'insuffisance hépatocellulaire et de CHC.

le cadre d'une hémochromatose. La dysplasie à grandes cellules semble être plutôt vue comme un marqueur de risque d'apparition d'un CHC plutôt qu'une lésion prénéoplasique proprement dite [105]. Les nodules dysplasiques sont classés en bas ou haut grade en fonction de l'aspect microscopique [96].

2.1.3 Le cas des CHC survenant sans cirrhose

Comme mentionné ci-dessus, la cirrhose est associée au CHC dans environ 80% des cas, le reste des CHC survenant sur un foie tantôt dépourvu de toute fibrose, tantôt siège d'une fibrose d'intensité variable mais sans cirrhose constituée. Les étiologies classiques dans cette situation sont les hépatites virales (majoritairement B, plus rarement C), l'intoxication à l'aflatoxine, l'hémochromatose et l'adénome hépatocytaire (voir 2.1.4) [106]. La variante fibrolamellaire du CHC survient habituellement sur un foie non fibreux [96]. Le plus souvent, aucune étiologie particulière n'est trouvée [106]. Plus récemment, le syndrome métabolique est apparu comme étiologie importante, peut-être majoritaire, des CHC sans cirrhose [107] et pourrait expliquer une partie des 62% des CHC sans cirrhose dont aucune étiologie n'avait été identifiée.

Ces CHC sans cirrhose sont particulièrement intéressants car leur histogenèse moléculaire est probablement plus directe que celle des CHC survenant sur foie cirrhotique qui implique alors des processus répétés d'apoptose et de régénération hépatocytaires avec accumulation progressive d'évènements génétiques pro-tumoraux [108, 109].

2.1.4 Les adénomes hépatocytaires et leur risque de transformation en CHC

Un dernier facteur de risque de CHC, non lié à un processus fibrogène, est l'adénome hépatocytaire. Il peut être vu comme la contre-partie bénigne des CHC et est défini comme une « tumeur hépatique bénigne composée d'hépatocytes » [96]. Il existe une nette prédominance féminine avec un *sex ratio* de 1 : 9. La contraception orale normodosée est le principal facteur de risque et l'adénome hépatocytaire reste rare chez l'homme, l'enfant et les personnes âgées. Chez la femme, les adénomes n'évoluent plus et peuvent même régresser à la ménopause ou à l'arrêt de la contraception [96]. Les études moléculaires à haut débit couplées à des données cliniques, morphologiques et fonctionnelles ont permis de distinguer cinq sous-types morpho-moléculaires d'adénomes hépatocytaires (revus en [110]).

— Le sous type associé à des mutations perte-de-fonction du gène *HNF1A* (30−40% des cas). Il s'agit de mutations le plus souvent somatiques mais qui peuvent être également germinales dans le cadre du syndrome diabétique

héréditaire MODY3[6]. Ces adénomes se caractérisent par une inactivation de la néoglucogenèse et une activation de la glycolyse et de la biosynthèse des acides gras. Le corrélat morphologique, quoique non spécifique, est une importante stéatose avec diminution de l'immunoexpression de FABP1, une protéine impliquée dans le trafic et le métabolisme des acides gras.

— le sous-type associé à des mutations gain-de-fonction du gène *CTNNB1* ($5-10\%$ des cas). Ces mutations sont exclusives de celles d' *HNF1A*[7] et sont aussi observées dans le sous-type inflammatoire. Ce sous-type, qui peut être associé à la présence d'atypies cytonucléaires et à une architecture acinaire avec cholestase tumorale, est plus fréquemment observé chez les patients de sexe masculin. Par immunohistochimie, il existe un marquage nucléaire avec l'anticorps anti-β-caténine associé à l'expression cytoplasmique de sa cible GLUL.
— le sous-type inflammatoire, le plus fréquent ($40-50\%$ des cas), se caractérise par la présence d'un infiltrat inflammatoire polymorphe, la présence de vaisseaux dystrophiques et d'une dilatation sinusoïdale (ces adénomes sont aussi appelés télangiectasiques). L'activation de la voie JAK/STAT constitue la signature moléculaire de ces adénomes et peut être secondaire à des mutations de *IL6ST*, de *STAT3* ou de *GNAS*.
— le sous-type inflammatoire associé à des mutations gain-de-fonction de *CTNNB1* ($5-10\%$ des cas)
— et le sous-groupe des adénomes non classés (10% des cas).

Les adénomes hépatocytaires sont décrits comme ayant un risque de transformation en CHC de l'ordre de $5-10\%$. Dans une série étudiant 218 patients (dont 34 hommes) avec un adénome hépatocytaire, 23 comportaient des zones de transformation en CHC au sein de la lésion adénomateuse (dont 16 hommes) [111]. Ainsi, alors que rare chez les patients de sexe masculin, l'adénome hépatocytaire semble comporter un risque majeur de transformation en CHC. Un contexte de syndrome métabolique était apparu dans cette série comme élément majoritairement associé à la transformation maligne des adénomes survenant chez l'homme. Comme le syndrome métabolique voit sa fréquence augmenter dans la population générale, notamment en France [112], l'épidémiologie de ces lésions risque de se modifier dans ces prochaines années. Les autres facteurs de risque associés à la transformation maligne des adénomes hépatocytaires sont la taille supérieure à 5 cm et le sous-type morphomoléculaire. Concernant ce dernier, ce sont les mutations du gène *CTNNB1* qui sont associées à la transformation maligne. Une activation de la voie Wnt/β-caténine était notamment observée dans 64% des adénomes transformés et seulement dans $15-20\%$ des adénomes non transformés,

6. *Maturity Onset Diabetes of the young*, OMIM 600496.
7. mais peuvent s'associer à des mutations de *IL6ST* ou de *GNAS*

dans la série décrite précédemment [111]. De façon intéressante, ces CHC sont le plus souvent bien différenciés et peuvent se présenter soit sous la forme d'un nodule supra-centimétrique ou alors de multiples microfoyers au sein de l'adénome.

2.2 Une maladie hétérogène

Les facteurs de risque de CHC sont donc variés et conduisent au CHC généralement *via* une étape de cirrhose. Il a été vu que certains CHC peuvent survenir en dehors de tout contexte cirrhotique et que de rares cas peuvent se développer sur des adénomes hépatocytaires. Un degré supplémentaire de complexité réside dans la grande hétérogénéité des CHC, tant sur le plan morphologique que moléculaire.

2.2.1 Sur le plan morphologique

L'aspect morphologique des CHC est très variable tant sur le plan macroscopique que microscopique [3, 96].

Sur le plan macroscopique (voir figure 2.1 page suivante), les CHC se présentent le plus souvent sous une forme nodulaire. Dans un contexte de cirrhose, ces nodules sont le plus souvent encapsulés ; en revanche, sur foie non cirrhotique, la capsule tend à être manquante. Certains cas se présentent de façon multifocale ; la multifocalité se retient si les nodules tumoraux sont clairement séparés par du parenchyme non tumoral. Ils peuvent être vus soit comme des tumeurs indépendantes synchrones, soit comme des métastases intrahépatiques du nodule principal de CHC. Les CHC de type massif se caractérisent par une large masse tumorale, accompagnée ou non de nodules satellites. Le CHC de type diffus se caractérise par la présence de multiples petits nodules tumoraux dispersés dans le foie, selon un mode rappelant la cirrhose et lié le plus souvent à une injection veineuse portale. Enfin dans le rare CHC pédiculé, la tumeur est un nodule de croissance majoritairement extrahépatique. L'aspect peut varier en fonction de l'abondance relative des processus nécrotiques. Les caractéristiques cellulaires de la tumeur, avec des degrés variés de cholestase, d'accumulation de lipides ou de glycogène, sont à l'origine d'un spectre de couleur allant d'une tonalité isohépatique à une couleur verte ou blanche [3, 96].

Sur le plan microscopique (voir figure 2.2 page 56), les CHC varient en fonction de l'architecture tumorale. En effet, les cellules tumorales peuvent se disposer selon une architecture trabéculaire, dont l'épaisseur augmente avec le grade tumoral (micro- et macro-trabéculaire), pseudo-glandulaire ou acineuse, rarement pure et observée en association avec des structures trabéculaires, et enfin compacte, où la tumeur prend un aspect solide. D'un point de vue cytologique, les cellules peuvent ressembler étroitement à un hépatocyte normal ou alors devenir complètement

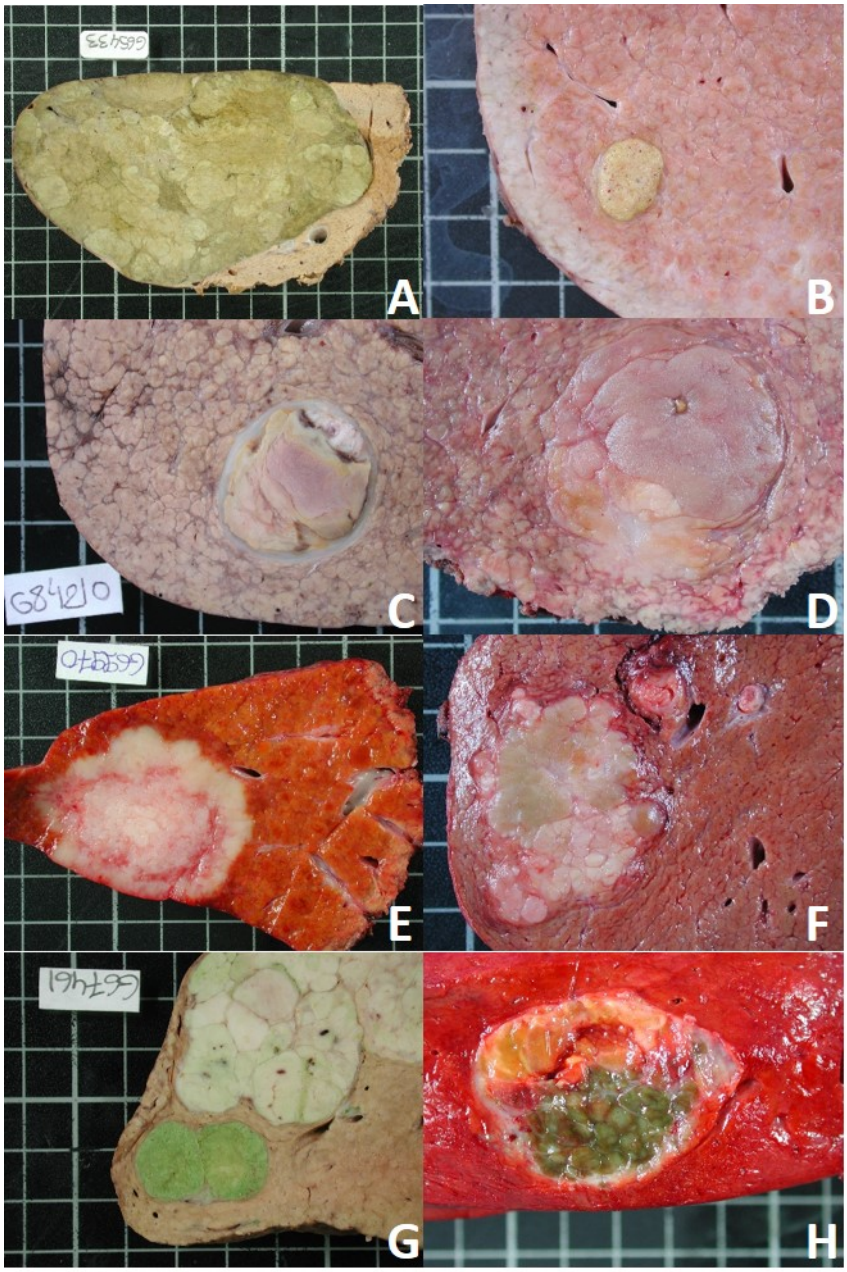


FIGURE 2.1 – Aspects macroscopiques des CHC. Quelques exemples. **A** : Grande tumeur, bien limitée de couleur verte. **B** : Petit nodule bien limité de couleur jaune. **C** : Nodule bien limité et encapsulé, nécrotique, au sein d'un parenchyme cirrhotique. **D** : Nodule de tonalité iso-hépatique ou jaune, assez mal limité, au sein d'un parenchyme cirrhotique. **E** : Tumeur de grande taille, blanche. **F** : Tumeur hétérogène en couleur, mal limitée, avec nodules satellites (emboles portes ?). **G** : Deux tumeurs proches, l'une de couleur blanche et l'autre de couleur verte. **H** : Tumeur présentant un territoire ocre et un territoire vert, adjacents.

pléomorphes, avec tout un *continuum* entre ces deux extrêmes. Leur contenu varie : les cellules tumorales peuvent être riches en glycogène et prendre un aspect clair, ou en lipides (stéatose tumorale, qui semble être plutôt l'apanage des petits CHC). Elles peuvent comporter des pigments biliaires, des corps de MALLORY ou des mitochondries géantes. Contrairement aux cholangiocarcinomes, le stroma est habituellement grêle. Les tumeurs présentant un abondant stroma fibreux s'avèrent être le plus souvent de type « progéniteur », avec un pronostic plus péjoratif [3, 96].

Des variantes sont décrites. Le CHC de type fibrolamellaire est une tumeur de l'enfant et de l'adulte jeune qui survient sur foie non cirrhotique. Les cellules tumorales ont un aspect oxyphile ou oncocytaire et le stroma est abondant fibreux, sous la forme de larges bandes séparant des travées de cellules tumorales. Le CHC de type squirreux, comporte également un abondant stroma fibreux, de disposition périsinusoïdale, s'accompagnant d'une atrophie variable des travées tumorales. Le CHC de type lympho-épithélial est constitué de cellules tumorales pléomorphes associées à un abondant infiltrat lymphocytaire. Enfin le CHC de type sarcomatoïde, rarement pur, comporte des cellules le plus souvent fusiformes dont la morphologie ne rappelle plus du tout celle d'un hépatocyte [3, 96].

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnait quatre catégories pour le grade tumoral (bien, moyennement, peu et in-différencié) ; ce grade s'appuie sur l'architecture tumorale et les atypies cytonucléaires. L'autre grade classiquement utilisé est celui d'EDMONDSON et STEINER et suit globalement le système de *grading* de l'OMS.

Enfin, de façon non exceptionnelle, une différenciation cholangiocytaire peut être observée, donnant naissance à des tumeurs composées ou hybrides hépatocholangiocarcinomateuses, dans lesquelles les deux composantes cholangiocytaires et hépatocytaires se mêlent selon des *patterns* très variés, avec ou non une composante de cellules de type progéniteur. Un démembrement de ces tumeurs mixtes a été proposé dans la dernière classification de l'OMS [96] mais reste et complexe et la reproductibilité entre pathologistes pour les identifier reste non évaluée, probablement faible [113].

2.2.2 Sur le plan moléculaire

La meilleure compréhension des mécanismes de l'oncogenèse et de l'histoire naturelle des CHC passe par leur meilleure caractérisation moléculaire. Celle-ci s'est faite progressivement à mesure que les outils de biologie moléculaire se sont développés. Les approches candidates ont permis d'identifier de grandes voies canoniques et les approches à haut débit ont raffiné les classification moléculaires.

Sur le **plan cytogénétique**, deux grandes classes de CHC sont démembrées [114] :

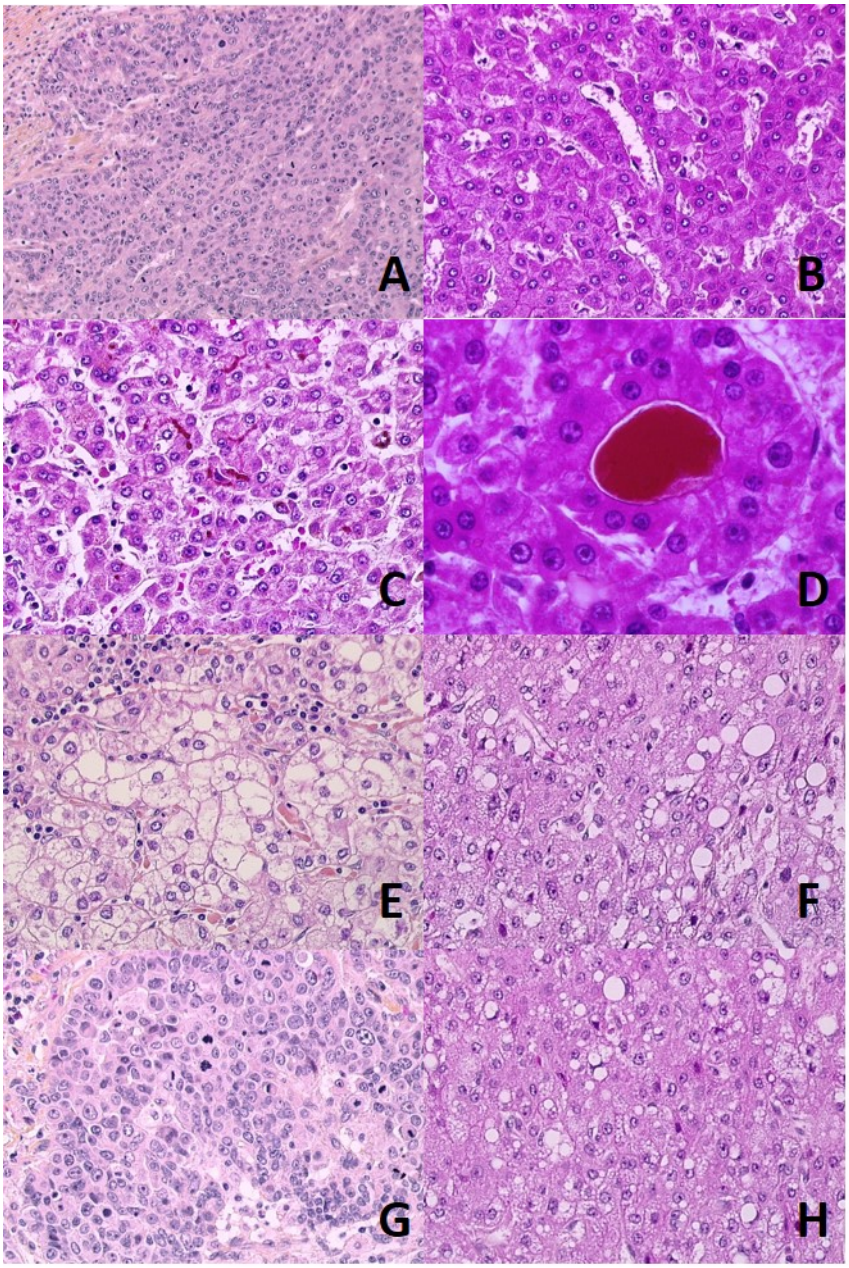


FIGURE 2.2 – Aspects microscopiques des CHC. Quelques exemples. A : CHC d'architecture macrotrabéculaire. B : CHC d'architecture microtrabéculaire constitué de cellules dont la morphologie est proche de celle d'un hépatocyte normal. C : Cholestase canaliculaire au sein d'un CHC microtrabéculaire. D : Accumulation de bile dans un structure acineuse. E : Aspect clarifié des cellules tumorales dans un CHC macrotrabéculaire. F : stéatose macro- et micro-vésiculaire. G : Cytologie de « haut grade » avec présence de nombreuses mitoses. H : Cytologie de « bas grade » avec certaine régularité des hépatocytes tumoraux. Noter la stéatose.

— un premier groupe se caractérise par une stabilité chromosomique ; les tumeurs présentent fréquemment des mutations de *CTNNB1* et des pertes en 8p.
— le second groupe se caractérise par la présence d'une grande instabilité chromosomique avec notamment des pertes alléliques en 1p, 4q, 6q, 9p, 13q, 16q et 17p et des mutations de *TP53* et d'*AXIN1*. Ces tumeurs sont fréquemment associées à une hépatite virale B.

.

Sur le **plan génétique**, plusieurs mutations récurrentes ont été identifiées, les gènes les plus fréquemment mutés étant *TP53* ($18-35\%$), *CTNNB1* ($10-32\%$) et *AXIN1*(15%) [115]. Ils sont listés dans la figure 2.3 page suivante. La découverte de ces mutations a permis de dresser quelques voies moléculaires impliquées dans le CHC.

Cependant, un essor considérable a été conduit par le développement des méthodes transcriptomiques qui ont permis de démembrer de façon non supervisée plusieurs sous-groupes homogènes de tumeurs. Une de ces études, celle de Boyault et coll., menée sur 120 tumeurs, a permis d'identifier 6 sous-groupes de CHC en fonction de leur profil transcriptomique, arbitrairement nommés G1 à G6. L'intégration de données cliniques, anatomopathologiques, mutationnelles et cytogénétiques a révélé d'importantes corrélations, représentées sur la figure 2.4 page 59 [116]. Les groupes G1 à G3 consistent en tumeurs chromosomiquement instables avec mutations de *TP53*(G2 et G3) et d'*AXIN1*(G1 et G2). Les groupes G1 et G2 s'associent à l'infection par HBV et présentent une signature moléculaire d'activation d'AKT. Les groupes G4 à G6 consistent en des tumeurs chromosomiquement stables. Les mutations de *CTNNB1* sont fréquentes dans les groupes G5 et G6, associées à une signature moléculaire d'activation de la voie Wnt (G5 et G6) et du métabolisme des acides aminés (G6).

Depuis, d'autres études transcriptionnelles ont été menées par d'autres équipes dans d'autres pays. Une importante méta-analyse de 603 tumeurs réalisée par Hoshida et coll. a conduit à l'identification de 3 sous-groupes transcriptomiques nommés S1 à S3. Ces données sont reprises dans la figure 2.5 page 60. Les groupes S1 et S2 sont en partie liés et partagent certaines caractéristiques clinicopathologiques (faible différenciation, taille élevée, mauvais pronostic, prolifération cellulaire) et moléculaires (invalidation de *TP53*, activation d'E2F1). Le groupe S1 se différencie par une activation des signalisations TGFβ et Wnt. Le groupe S2, quant à lui, se différencie par une activation des voies MYC et AKT, une inhibition de la voie interféron, un phénotype de type « progéniteur » (avec immunoexpression d'EpCAM) et des taux sériques élevés d'αfœtoprotéine. Le groupe S3 est complètement différent et regroupe des tumeurs bien différenciées, de plus petite taille et de meilleur pronostic. Le profil transcriptomique rejoint celui d'un hépatocyte ma-

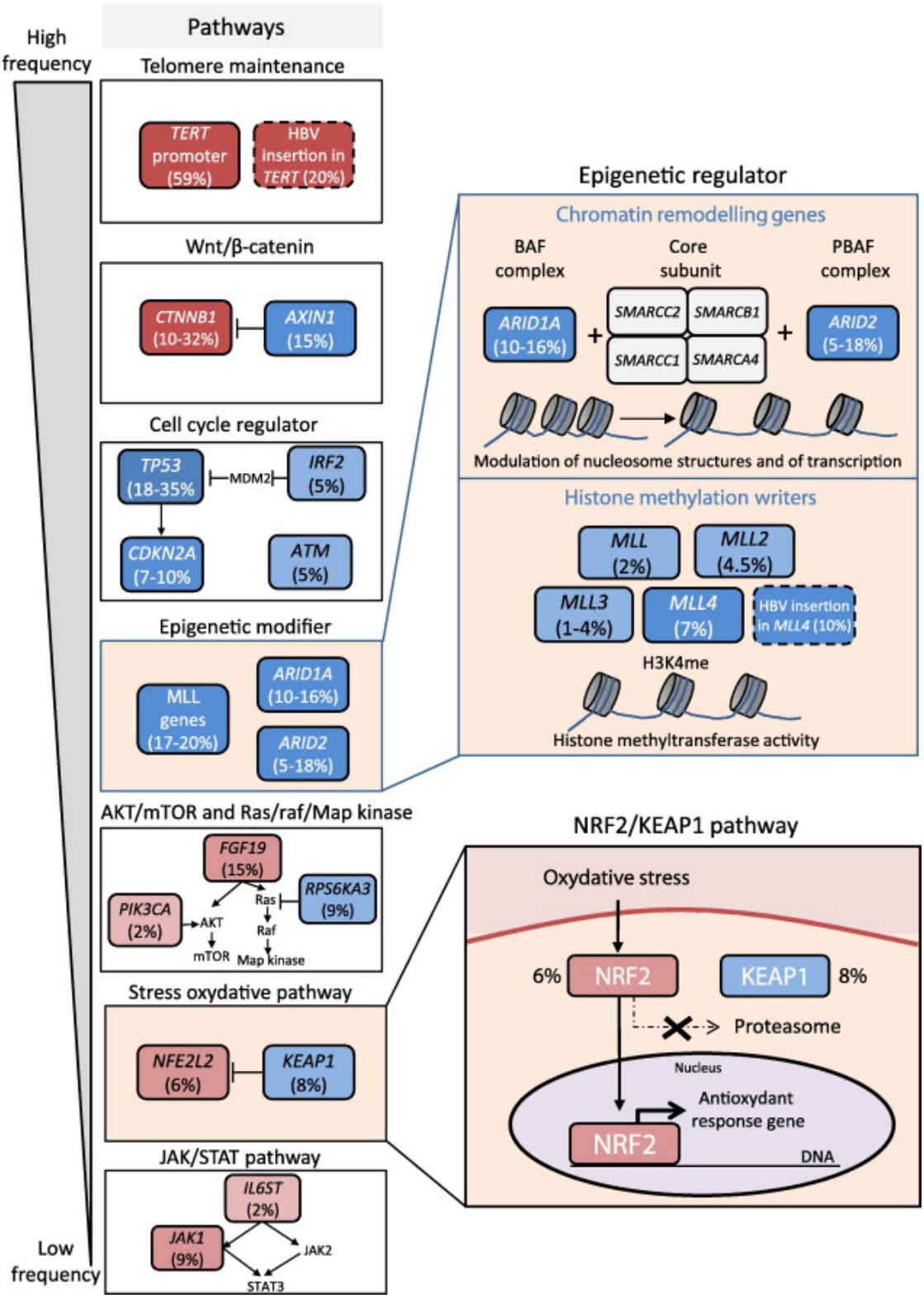


FIGURE 2.3 – Mutations récurrentes dans le CHC. Les mutations sont regroupées par voies fonctionnelles. Les oncogènes sont indiqués en rouges et les gènes suppresseurs de tumeurs en bleu. Issu de [115].

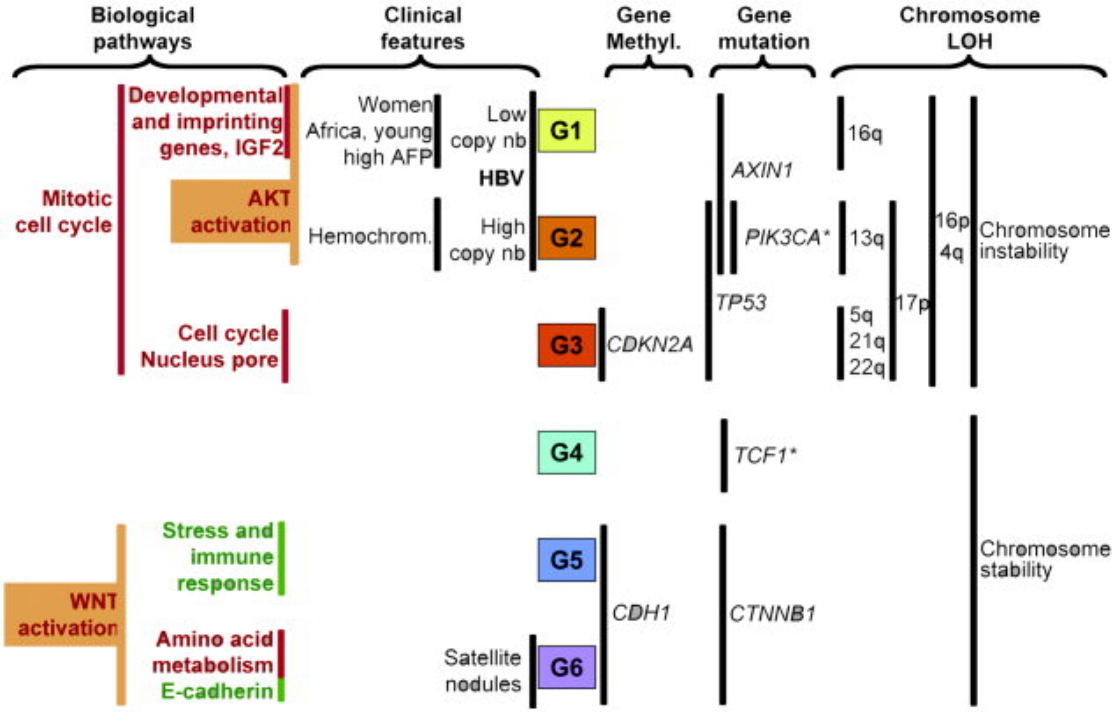


FIGURE 2.4 – Profils transcriptionnels des CHC : les sous-groupes G1 à G6. Six sous-groupes différents (G1 à G6) ont été définis par analyse transcriptionnelle. Les gènes surexprimés sont écrits en rouge et les gènes sous-exprimés en vert. * : rare. Issu de [116].

ture et une partie de ces tumeurs présente des mutations activatrices de *CTNNB1* [117].

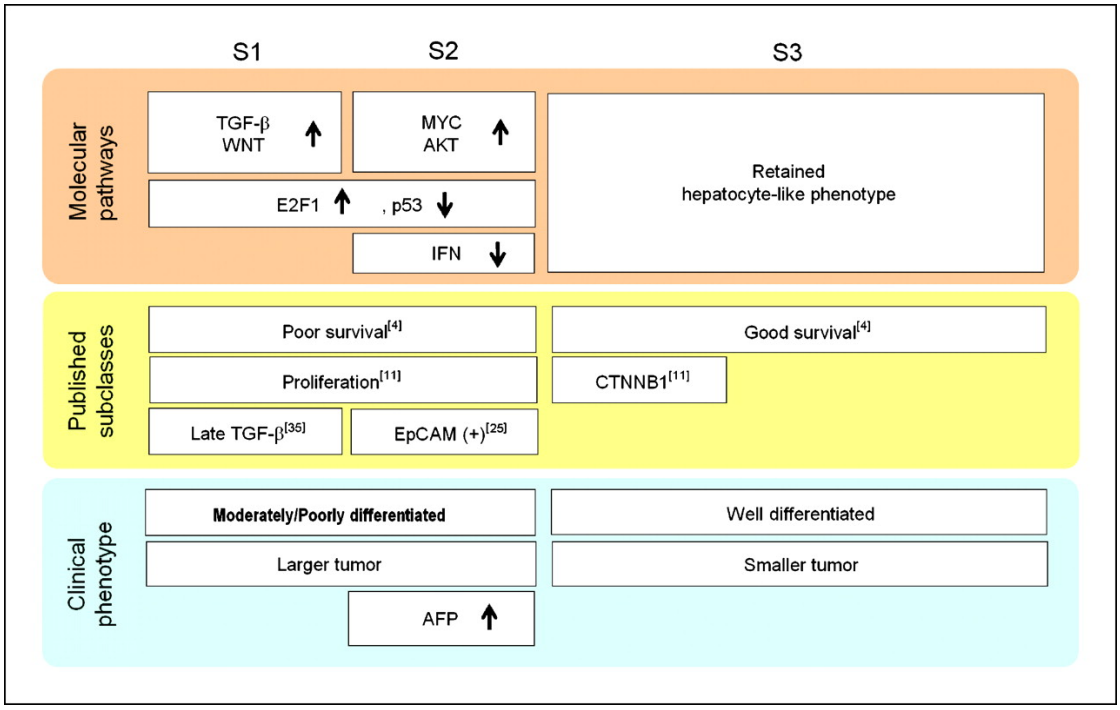


FIGURE 2.5 – Profils transcriptionnels des CHC : les sous-groupes S1 à S3. Trois sous-groupes différents (S1 à S3) ont été définis par méta-analyse de données transcriptomiques. Issu de [117].

2.3 Quelques voies moléculaires importantes

Le CHC est une maladie hétérogène et les données présentées dans la section précédente ont permis d'identifier des sous-groupes homogènes de tumeurs. Il s'agit essentiellement d'approches à haut débit qui ont le mérite de se faire *a priori* mais qui peuvent pêcher par un manque de *substratum* fonctionnel. Différentes études plus ciblées se sont néanmoins penchées sur une meilleure caractérisation fonctionnelle des CHC et ont permis de mettre l'accent sur certaines voies moléculaires majeures. Nous allons présenter ci-dessous quelques-unes d'entre elles, la voie Wnt/β-caténine sera traitée à part.

2.3.1 La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT a déjà été présentée dans la section décrivant le métabolisme glucidolipidique et la signalisation insuline. Une des cibles positives d'AKT dans l'hépatocyte est le complexe mTORC1, *via* l'inactivation de régulateurs négatifs de mTORC1 que sont TSC1 et TSC2. La voie mTOR sera abordée en détails dans la sous-section 3.3.4 page 106. D'une façon simplifiée, le complexe mTORC1 favorise la croissance cellulaire en conditions énergétiques et nutritionnelles favo-

rables, en réponse à la stimulation cellulaire par des facteurs de croissance. L'axe PI3K/AKT/mTOR est un régulateur majeur de l'anabolisme protéique et joue un rôle oncogénique dans de nombreux cancers (revus en [118]). Dans le CHC, une activation de cet axe est observée dans $45-50\%$ des cas [119–121] et est généralement associée à des CHC de mauvais pronostic et à une moins bonne survie [122]. Les mécanismes d'activation de la voie sont variés :

- surexpression de récepteurs membranaires en amont de la PI3K, comme MET [123],
- surexpression d'HGF, seul ligand connu de MET, dont l'activation constitutive a notamment permis l'initiation tumorale hépatique dans un modèle murin [124],
- activation de la signalisation insuline et IGF (voir sous-section suivante),
- et, plus rarement, des mutations gain-de-fonction de gènes codant des effecteurs de la voie dont *PIK3CA* et *MTOR* ou une invalidation de régulateurs négatifs comme *PTEN* [125].

Un modèle murin a permis de montrer qu'une activation chronique de mTORC1 s'accompagne de la survenue de CHC, dans un contexte d'hépatite et d'inflammation [126]. Étant associée à un mauvais pronostic [122] [121] et à des CHC de haut grade [122], l'activation de l'axe PI3K/AKT/mTOR semble plutôt accompagner la progression tumorale.

Concernant sa stratification dans les différents sous-groupes moléculaires décrits, les études sont rares. Hoshida associe la signature AKT au sous-groupe S2, caractérisé par ailleurs par une signature progéniteur, à une moins bonne survie, à une faible différenciation, à l'absence de mutation de *CTNNB1* et à la sécrétion d'αfœtoprotéine [117]. L'association αfœtoprotéine/activation d'AKT a également été observée par d'autres [120, 121]. Boyault associe la signature d'activation d'AKT à ses sous-groupes G1 et G2, associés par ailleurs à l'infection par le VHB (G1 et G2), des taux élevés d'αfœtoprotéine (G1), aux mutations de *TP53* (G2) et d'*AXIN1* (G1 et G2) et à l'instabilité chromosomique. Les rares CHC mutés *PIK3CA* clusterisaient dans le sous-groupe G2. Dans le sous-groupe G1, était également observée une surexpression d'IGF2, d'IGF1R, d'AKT et des formes phosphorylées d'AKT et de GSK3B.

Pour résumer, l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR apparaît comme fréquente dans le CHC, associée à un phénotype peu différencié morphologiquement et agressif cliniquement. Elle est également exclusive des mutations de *CTNNB1*.

Comme l'axe PI3K/AKT est également l'appareil moléculaire principal pour la transduction du signal insuline, un dialogue se dessine entre métabolisme et cancer dans le CHC. Ce *cross-talk* peut se voir selon trois angles différents :

- la genèse des CHC dans un contexte de diabète et de syndrome métabolique (voir sous-section suivante).

— les patients diabétiques de type 2 sont souvent traités par metformine, un anti-diabétique oral de la famille des biguanides. Son mode d'action est complexe et non encore totalement élucidé [127]. Une partie de son activité thérapeutique passe par la répression de la néoglucogenèse hépatique notamment *via* l'activation de l'AMPK [127] +/- de LKB1 [128], induisant une répression de mTORC1. De façon intéressante, certaines études ont montré une incidence moindre du CHC chez les patients traités par metformine [129, 130]. Ces études sont néanmoins soumises à controverses, du fait de nombreux biais d'analyse [131]. De façon plus large, la metformine et d'autres inhibiteurs de mTOR ont montré un certain effet thérapeutique dans le CHC *in vitro* et *in vivo* (revus en [132]). Par exemple, le sirolimus comme traitement anti-rejet, diminue le taux de récidive chez les patients transplantés pour CHC.
— enfin, il a été montré que le diabète impactait négativement la survie des patients ayant un CHC, sans qu'il ne soit possible d'attribuer ce comportement péjoratif à des mécanismes d'insulinorésistance, au contexte tissulaire hépatique dans lequel surviennent les tumeurs, à des facteurs confondants liés aux thérapeutiques au long cours suivies par ces patients, ou à la stimulation par l'insuline de voies oncogéniques en aval d'AKT [133].

2.3.2 La voie « métabolique »

Un indice de masse corporelle supérieur à 30 ou 35 kg/m^2 est associé à un risque relatif de décès par CHC de 4,5 [134] et d'incidence de CHC de 3,1 [135] par rapport à la population générale. Il apparaît même comme premier facteur de risque de CHC aux États-Unis d'Amérique [136]. Comme item du syndrome métabolique, l'obésité est donc associée à un sur-risque de CHC. Une traduction hépatique du syndrome métabolique est fréquemment observée sous la forme d'une « NAFLD » avec stéatose simple et de « NASH » avec nécrose hépatocytaire, inflammation et fibrose, à des degrés variables [137]. Le risque de CHC chez les patients ayant un syndrome métabolique est plus important chez ceux dont la maladie hépatique se complique de NASH [138]. L'obésité et le syndrome métabolique sont également des cofacteurs péjoratifs pour la survenue de CHC dans un contexte de cirrhose alcoolique et d'hépatites chroniques virales C et B.

L'analyse des CHC survenant chez des patients ayant un syndrome métabolique, sans autre cause identifiée de CHC (VHB, VHC, alcool, hémochromatose), montre que ces tumeurs sont plutôt bien différenciées, non rarement bilobaires et surviennent généralement chez l'homme. De façon surprenante, dans deux tiers des cas, le parenchyme hépatique adjacent est non ou peu fibreux (F0 à F2 selon Metavir). Ces tumeurs sont rarement associées à des mutations activatrices de *CTNNB1*. Elles pourraient se développer, pour certaines, à partir d'adénome hé-

patocytaire (sous-type inflammatoire/télangiectasique) [101]. Par CGH [8], ces tumeurs sont chromosomiquement instables [139] avec de plus fréquents gains en 6p21.1, 7p, 7q et de plus fréquentes pertes en 17p comparativement à une cohorte contrôle de CHC liés au VHC. Le gain de copie du locus 6p21.1 était associé à une fibrose plus élevée (F3-F4). Le gène *CUL7*, en 6p21.1, code un partenaire du complexe ubiquitine-ligase E3 est est apparu comme un gène candidat intéressant pour expliquer la genèse de ces CHC, de part ses rôles connus sur la résistance à l'apoptose et la prolifération cellulaire [139]. Nous avons également vu précédemment le cas particuliers des rares CHC qui se développent sur adénomes et la fréquente implication du syndrome métabolique comme co-morbidité principale associée à cette voie de tumorigenèse.

Quelles sont les pistes moléculaires expliquant l'histogenèse de ces CHC liés au syndrome métabolique ? Le syndrome métabolique induit un remodelage du tissu adipeux s'accompagnant d'une sécrétion systémique d'adipokines proinflammatoires. Par ailleurs, l'accumulation de lipides dans le foie induit un stress lipotoxique dans l'hépatocyte pouvant conduire à l'apoptose. En effet, l'import hépatocytaire d'acides gras libres étant excessif, la β-oxydation mitochondriale et peroxysomale est accrue avec production importante d'espèces réactives de l'oxygène. *Via* l'activation des macrophages résidents du foie, ces deux mécanismes entretiennent un état inflammatoire chronique du tissu hépatique, participant à la transformation tumorale de l'hépatocyte [107, 140]. Le stress du reticulum endoplasmique et un réseau complexe de miRNA jouent également des rôles majeurs [140], de même que l'accumulation hépatocytaire de fer [138].

Comme mentionné précédemment, le paradoxe de l'**insulinorésistance** hépatique [141] peut peut-être se transposer à la situation de l'hépatocarcinogenèse [107]. Dans un contexte d'insulinorésistance, il est connu que l'hépatocyte est insensible à l'action de l'insuline pour réprimer la néoglucogenèse ; cependant, il demeure sensible à l'insuline pour l'induction de la lipogenèse [141]. Dans un contexte de NAFLD/NASH, certaines cytokines comme le TNFα inhibent la signalisation insuline par phosphorylation inhibitrice d'IRS1 par la kinase MAPK8 (JNK). De la même manière, les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'inhiber la signalisation insuline *via* MAPK8. Cependant, il a également montré que ces espèces réactives de l'oxygène sont aussi capables d'activer la signalisation insuline en inhibant les phosphatase PTEN et PTPN1. Par ailleurs, le diabète et l'insulinorésistance induisent des taux élevés d'insuline et d'IGF1 dans la circulation. IGF1 et IGF2 sont des protéines sériques sécrétées par le foie, circulant essentiellement sous des formes complexées à des protéines chaperonnes (la famille des IGFBP [9]). Au niveau membranaire, outre le récepteur à l'insuline classique (INSR)

8. *Comparative Genomic Hybridization*
9. Insuline-like Growth Factor Binding Proteins

[142] (isoformes A et B), il existe tout un réseau de récepteurs dont l'IGF1R et des formes hybrides INSR/IGF1R. La transduction du signal en aval varie en fonction du couple ligand/récepteur, et la réponse cellulaire peut être métabolique ou promitotique (voir figure 2.6) [143]. La mise en place de ce réseau complexe pourrait être intégrée dans la sélectivité de la résistance à l'insuline classiquement observée dans les stéatopathies non alcooliques [142, 143]. Dans une étude de 104 CHC, 21

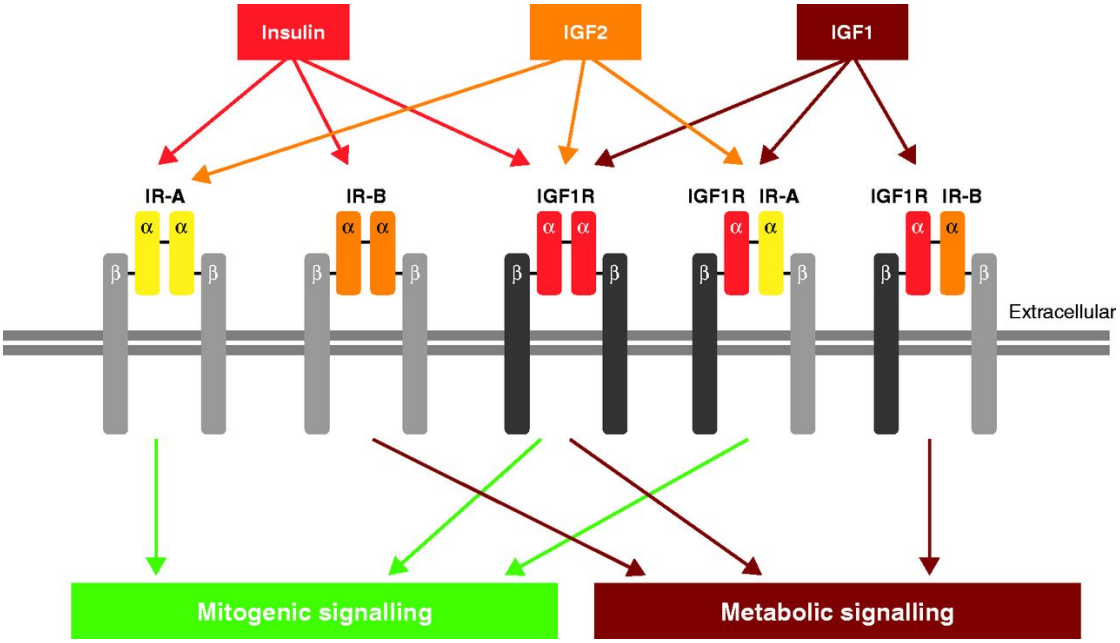


FIGURE 2.6 – Signalisation IGF : Différents ligands et différents récepteurs induisant des réponses cellulaires différentes. Issu de [143].

présentaient une activation de la signalisation IGF (surexpression d'IGF2, sous-expression d'IGFBP3, perte allélique sur le locus *IGF2R*). Les tumeurs comportant une activation de la voie IGF étaient enrichies dans un sous-groupe transcriptionnel de « prolifération » et n'étaient pas associées aux mutations de *CTNNB1* [144]. Ainsi, l'activation de l'axe IGF apparaît de plus en plus comme cardinale dans la NAFLD, la NASH et un sous-groupe de CHC, renforçant encore plus les liens entre métabolisme et cancer.

La signalisation insuline ayant des propriétés oncogéniques [68], l'insulinorésistance des hépatocytes dans le syndrome métabolique peut être vue comme un frein à l'hépatocarcinogenèse. Cependant, le réseau complexe de la signalisation IGF, la possible inactivation d'inhibiteurs de la voie PI3K/AKT par les espèces réactives de l'oxygène, et l'existence de voies oncogéniques insulinosensibles mais indépendantes d'AKT, comme la voie ATM [68], seraient autant de mécanismes potentiels pour *by-passer* cette insulinorésistance, la limitant au contrôle du métabolisme

glucidique et l'ignorant pour le métabolisme lipidique et l'oncogenèse.

2.3.3 Les voies de « différenciation »

Outre le parti pris « métabolique » vu ci-dessus avec les CHC sur syndrome métabolique et les CHC avec activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, une autre façon de voir les CHC est de considérer les grandes voies de signalisation impliquées dans le développement hépatique et la différenciation hépatocytaire. En effet, certains mécanismes ontologiques de morphogenèse et de différenciation cellulaire sont apparus comme intimement liés aux mécanismes de l'hépatocarcinogenèse.

La **voie notch** est impliquée, comme vu précédemment, dans la morphogenèse et la différenciation biliaire. Ses rôles métaboliques commencent à être découverts. Concernant le métabolisme glucidique, la voie Notch coopère avec FOXO1 pour l'induction de la néoglucogenèse. Le *knock-out* hépatospécifique de *Rbpj*, l'acteur final de la voie Notch, améliore la sensibilité à l'insuline de souris nourries sous un régime favorisant l'insulinorésistance ; à l'inverse un gain-de-fonction de *Notch1* favorise l'insulinorésistance et induit l'expression de la glucose-6 phosphatase [145]. Concernant le métabolisme lipidique, Notch active la lipogenèse *via* MTOR et SREBP-1c ; le *knock-out* de la voie empêchant la formation d'une stéatose [146]. Il s'agit d'une voie non *cell autonomous* car elle requiert l'interaction directe de deux cellules pour être activée. Son étude dans le CHC est contradictoire. Certains auteurs la considèrent comme suppressive de tumeurs dans le CHC en induisant apoptose et arrêt du cycle cellulaire *via* TP53 [147, 148]. De même, l'activation de Notch dans un modèle murin de CHC induits par une perte-de-fonction de *Rb1* ralentit la progression tumorale et la forte expression de *NOTCH1* est associée à des CHC de meilleur pronostic [149]. Cependant, d'autres rapportent son rôle oncogénique dans le foie. Dans un modèle murin, la surexpression de NICD1 (domaine intracellulaire de Notch, actif) dans l'hépatoblaste conduit à la formation de CHC entre 6 à 12 mois de vie. Ces tumeurs sont plus ou moins bien différenciées ; certaines mêlent des éléments tumoraux de nature cholangiocytaire et présentent certains aspects de type progéniteur. La signature transcriptomique des tumeurs de ces souris est observée dans environ 30% de CHC humains, essentiellement de type « cycle cellulaire » et « prolifération ». Ces CHC présentent fréquemment une immunoexpression de SOX9 et sont rarement mutés pour *CTNNB1*. De façon intéressante, une activation de l'axe IGF est fréquemment associée à ces tumeurs [150]. D'autres modèles murins ont également montré l'activité oncogénique de la voie Notch dans le foie (revus en [151]). Cependant, les tumeurs observées étaient rarement des CHC, mais plutôt des cholangiocarcinomes intrahépatiques, en accord avec les rôles connus de la voie Notch dans le développement biliaire. Certains modèles aboutissaient à la formation de tumeurs hybrides hépatocholangiocarcinomateuses, ou de type progéniteur. Ces différentes données illustrent bien que

l'implication de la voie Notch dans l'hépatocarcinogenèse est complexe et dépend du contexte tissulaire et cellulaire. Elle n'est pas suffisante pour l'initiation tumorale et nécessite des « hits » supplémentaires pour la transformation tumorale de l'hépatocyte/hépatoblaste. IGF2 et SOX9 ont été par exemple identifiés comme partenaires oncogéniques de la voie Notch. Ces deux acteurs sont étroitement associés aux cellules progénitrices hépatiques et aux cellules initiatrices de cancer [152]. La voie Notch participerait donc à la survenue de tumeurs hépatiques en induisant l'expansion des cellules progénitrices (puis des cellules souches cancéreuses) et/ou en induisant une transdifférenciation des hépatocytes vers un phénotype progéniteur.

Ces **CHC de type « progéniteur »** ont fait l'objet d'études spécifiques. Ils sont apparus comme une catégorie bien à part de tumeurs dans des études transcriptomiques. Par exemple, dans l'étude de Lee *et al.*, 14 de 61 CHC ségrégeaient avec des hépatoblastes normaux de rats alors que les autres tumeurs ségrégeaient avec des hépatocytes normaux de rats et des CHC issus de différents modèles murins [153]. Ces CHC étaient de mauvais pronostic et comportaient une activation de la voie Jun. De leur parenté moléculaire avec les hépatoblastes normaux, la genèse de ces tumeurs semblait se faire à partir de progéniteurs hépatiques et non à partir d'hépatocytes matures. Ces cellules progénitrices hépatiques sont capable de se multiplier pour repeupler le foie en condition d'hépatite chronique. Bipotentes par nature, elles peuvent se différencier à la fois vers les lignées hépatocytaires et cholangiocytaires. L'existence d'une catégorie de CHC présentant une expression plus ou moins marquée de marqueurs biliaires (comme les cytokératines 7 et 19) a été un argument supplémentaire pour considérer la cellule progénitrice tissulaire hépatique comme cellule initiatrice de ces cancers. L'existence dans certains CHC d'une population de cellules de type initiatrices de cancer, avec expression de marqueurs « souche » a confirmé ce point de vue [154]. Les voies de signalisations impliquées dans ces cellules initiatrices de cancer sont généralement communes à celles impliquées dnas le développement hépatique et dans la maintenance/activation du compartiment progéniteur ; les plus importantes sont les voies Wnt/β-caténine, la voie EPCAM, la voie du TGFβ, la voie Notch, la voie SALL4, *etc* [155]. En ce sens, l'étude des rares tumeurs hybrides CHC/cholangiocarcinome montre également une signature de type progéniteur hépatique, expliquant leur double différenciation. De façon intéressante, leur profil transcriptomique se rapproche de celui des CHC peu différenciés et de ceux de type progéniteurs. La voie du TGFβ est particulièrement enrichie de même que la signalisation Wnt/β-caténine, mais avec un programme transcriptionnel différent de celui de l'hépatocyte mature [156].

Une autre voie développementale impliquée dans le CHC est la **voie Hippo**. Il s'agit d'une voie très conservée dans le règne animal, dont le principal rôle connu est de contrôler la taille des organes et de relayer les signaux d'inhibition de contact

[157]. Très schématiquement, le noyau de la signalisation Hippo est constitué des kinases STK4/STK3 (Mst1/2) et LATS1/LATS2. L'activation de la voie Hippo peut se faire selon de nombreux mécanismes, intégrant des signaux extracellulaires, la polarité épithéliale, le cytosquelette et les contraintes mécaniques. Quand elle est activée, la voie Hippo aboutit à la séquestration cytoplasmique de deux régulateurs transcriptionnels, YAP et WWTR1(TAZ), suite à leur phosphorylation par LATS1/LATS2. Il existe également un pool membranaire de YAP et WWTR1 complexé aux jonctions serrées et adhérentes. YAP et WWTR1 sont associées à des protéines du cytosquelette permettant leur trafic entre noyau, cytoplasme et membrane. Le programme transcriptionnel des formes déphosphorylées de YAP et WWTR1 est un programme de survie et de prolifération cellulaires. Ainsi, *STK3*, *STK4*, *LATS1* et *LATS2* sont considérés comme des gènes suppresseurs de tumeurs alors que *YAP* et *WWTR1* sont vus comme des oncogènes.

Les rôles de la voie Hippo dans le foie sont pléomorphes. L'inactivation de la voie Hippo (*i.e.* une activation de YAP) se traduit par une sortie de quiescence et une dédifférenciation des hépatocytes en cellules de type progéniteur. La voie Notch est apparue comme une cible majeure de YAP dans ce contexte [158] et a été confirmée par d'autres [159]. La voie est impliquée dans le contrôle de la taille du foie : l'invalidation de la voie Hippo (YAP actif) entraîne une hépatomégalie ; cependant le *knock-out* de *Yap* n'entraîne pas de réduction de la taille du foie mais un blocage de la maturation biliaire (arrêt du développement biliaire au stade plaque ductale) [160]. L'inactivation de la voie Hippo dans le foie adulte permet l'apparition de CHC entre 8 et 14 semaines. De façon intéressante, ces tumeurs présentaient une activation de la voie AKT/mTOR [161]. En revanche, quand la voie Hippo est inactivée au stade embryonnaire, les tumeurs sont à la fois des CHC peu différenciés et des cholangiocarcinomes, avec expansion préalable du compartiment des cellules progénitrices hépatiques [162]. Dans les CHC humains, il a été observé une inhibition de la voie Hippo avec accumulation nucléaire de YAP dans environ $50-60\%$ des cas. Ces tumeurs sont de haut grade nucléaires et sont associées à des taux élevés d'αfœtoprotéine et à un mauvais pronostic [161, 163, 164]. L'ensemble de ces données suggèrent qu'une partie des CHC, notamment ceux de mauvais pronostic, peuvent suivre une voie de carcinogenèse de type « progéniteur ». Certains suggèrent que ces tumeurs dériveraient de progéniteurs hépatiques dont l'activation de YAP induirait la prolifération et la transformation maligne [164].

De façon intéressante, il existe une corrélation directe entre l'activation de YAP et de la signalisation AKT dans le CHC [165]. Par des approches fonctionnelles chez la drosophile et dans des lignées cellulaires humaines, les auteurs ont établi que la signalisation insuline/IGF était capable d'activer YAP et que ce dernier était requis pour transduire l'activité proliférative de l'insuline/IGF. A l'inverse,

YAP est capable d'activer la voie PI3K/AKT/mTOR, établissant un véritable dialogue bidirectionnel entre les deux voies [165]. Il a été par la suite montré que YAP active AKT en induisant l'expression de miR-29, un miRNA répresseur de *PTEN* [166]. La voie Hippo semble donc orchestrer un programme de différenciation/dédifférenciation et de métabolisme dans un sous-groupes de CHC.

Outre les voies AKT et Notch, il a été montré que la voie Hippo dialoguait avec de nombreuses autres voies de signalisation (revues en [164]), dont les signalisations TGFβ et Sonic/Hedgehog. La voie Wnt/β-caténine est aussi intimement liée à la signalisation Hippo. Les études sont récentes (revues en [167]) et les conclusions encore incertaines. Il en ressort néanmoins que YAP ou WWTR1 seraient capables d'inhiber la signalisation Wnt, soit en bloquant l'activation de Dvl, soit en séquestrant la β-caténine dans le cytoplasme. À l'inverse, la signalisation Wnt régulerait aussi le niveau de YAP/WWTR1 : en l'absence de Wnt, la forme phosphorylée de β-caténine servirait de plateforme pour induire la dégradation protéasomale de WWTR1. En présence de Wnt, la déphosphorylation de la β-caténine s'accompagnerait d'une sortie de la β-caténine et de WWTR1 de leur complexe de dégradation pour induire l'expression de leurs programmes transcriptionnels respectifs. L'inverse serait également vrai, YAP/TAZ apparaissant comme essentiel à la formation du complexe de dégradation de la β-caténine. Ces différentes données sont généralement issues de modèles cellulaires particuliers et il est encore loin d'être certain qu'elles s'appliquent à tous les tissus quelque soit le contexte cellulaire. Dans le foie tumoral, une étude récente a montré que la co-expression nucléaire de la β-caténine et de YAP n'existait que dans 4% des CHC et 3% des cholangiocarcinomes intrahépatiques ; cependant, elle était présente dans 80% des hépatoblastomes étudiés [168]. En étudiant plusieurs lignées hépatoblastomateuses ou hépatocarcinomateuses, les auteurs ont confirmé que les voies Wnt et Hippo ne coopéraient que dans l'hépatoblastome ; YAP étant nécessaire à la transcription d'un *set* spécifique de gènes cibles de β-caténine et β-caténine étant nécessaire à la transcription d'un *set* spécifique de gènes cibles de YAP. Chez la souris, des vecteurs codant des formes constitutivement actives de β-caténine et de Yap n'étaient pas isolément tumorigènes dans le foie ; cependant, en association, ils l'étaient avec une pénétrance de 100% à 11 semaines. Les tumeurs observées avaient la morphologie d'hépatoblastomes et semblaient dériver d'hépatocytes matures et présentaient une induction des marqueurs d'hépatoblastes ou d'hépatocytes immatures/dédifférenciés. Au niveau des ARNm, les gènes cibles de YAP étaient induits dans les tumeurs. En immunohistochimie, les tumeurs présentaient un marquage nucléaire de la β-caténine, avec surexpression de la cycline D1. En revanche, aucun immunomarquage n'était observé pour Glul(glutamine synthétase), indiquant que le programme transcriptionnel de β-caténine n'était pas activé dans son ensemble. Cette étude est la seule illustrant une collaboration entre les voies Hippo et Wnt

dans le tissu hépatique. Cependant, comme toute voie développementale, l'implication de ce dialogue est limitée à un contexte cellulaire et tumoral particulier, lié au stade de développement.

N'ont été présentées ici que quelques voies moléculaires importantes dans la tumorigenèse hépatique. Malgré leur nombre limité, une incroyable complexité apparaît, avec une interaction fréquente de différentes voies de signalisation et une imbrication croissante entre métabolisme, développement et cancer. Beaucoup de données suggèrent que l'implication relative de ces différentes voies de signalisation est profondément soumise au contexte tissulaire et cellulaire. Appuyées par les différentes études transcriptomiques, des sous-classes à peu près homogènes de tumeurs semblent s'extraire et qui seraient, d'un point de vue tout à fait personnel :

— un groupe de CHC de type « progéniteur » : ces tumeurs dériveraient de cellules précurseurs hépatiques et se caractériseraient par la présence de marqueurs « souches » (EpCAM+, SALL4+) et une morphologie dédifférenciée avec un possible engagement vers un destin cholangiocytaire. Les voies Notch, TGFβ, Wnt/β-caténine et Hippo seraient impliquées dans ces tumeurs de mauvais pronostic.
— un groupe probablement moins homogène de CHC de type « métabolique » caractérisés par une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR *via* la signalisation insuline/IGF et/ou par leur survenue dans un contexte de syndrome métabolique. Il s'agit de tumeurs chromosomiquement instables, de mauvais pronostic, avec fréquente sécrétion d'αfœtoprotéine. Les mécanismes de la transformation tumorale impliqueraient un contexte d'hépatite chronique avec dérégulation du métabolisme hépatocytaire induisant une dérégulation de la voie AKT. Ces tumeurs apparaissent comme agressives avec une signature transcriptomique de prolifération cellulaire.
— un groupe de CHC comportant des altérations gain-de-fonction de *CTNNB1*. Il s'agit de tumeurs de bon pronostic, qui sont apparues dans les différentes études présentées jusqu'à présent comme constituant un groupe bien à part de tumeurs, associées à un profil transcriptomique différent, à une stabilité chromosomique, une absence d'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR et l'absence de signature « progéniteur ». Ces tumeurs résulteraient de la transformation tumorale de l'hépatocyte mature et seront détaillées dans la section suivante.
— les CHC qui n'entrent pas dans les catégories précédentes, peut-être majoritaires et probablement encore à démembrer.

2.4 Les carcinomes hépatocellulaires mutés pour le gène codant la β-caténine : un groupe homogène de tumeurs

Nous avons vu dans la section précédente que les approches « métabolique » et « développementale » permettaient d'appréhender la carcinogenèse de certains sous-groupes de CHC. Située au carrefour du métabolisme, du développement et du cancer, une des voies les plus étudiées, redondante dans le CHC, est la voie Wnt/β-caténine.

2.4.1 Activation différentielle de la voie Wnt/β-caténine en fonction du tissu et du stade de développement

La voie Wnt/β-caténine canonique intègre les signaux extracellulaires Wnt pour bloquer la dégradation protéasomale de la β-caténine. Cette dernière va agir comme transactivateur transcriptionnel à l'origine d'un programme d'expression génique de prolifération et de différenciation cellulaire variant en fonction du stade de développement et du contexte cellulaire (pour revue [39, 169, 170]). En effet, en prenant le foie comme exemple, les conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie varient en fonction du contexte développemental et cellulaire :

- à l'état embryonnaire, sa participation est essentielle pour la mise en place et le développement du bourgeon hépatique ainsi que dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération des lignées hépatocytaire et cholangiocytaire [49, 171].
- en postnatal et à l'état adulte, la voie joue un rôle majeur dans l'établissement et le maintien du zonage métabolique lobulaire [11, 41].
- dans un contexte de régénération hépatique, la voie est impliquée dans la prolifération des hépatocytes ou des cellules progénitrices lorsque la prolifération de l'hépatocyte mature est bloquée [169, 171, 172].
- enfin, son implication est majeure dans les tumeurs hépatiques malignes de l'adulte (CHC) ou de l'enfant (hépatoblastome).

Le programme d'induction génique varie en accord avec ces différentes situations avec des sets de gènes impliqués dans la prolifération (*MYC*, *CCND1*, *etc.*) et/ou dans le métabolisme (*GLUL*, *etc.*) et/ou dans le rétro-contrôle négatif de la voie (*AXIN2*, *etc.*). La voie Wnt/β-caténine dialogue également avec d'autres voies de signalisation comme les voies Notch, Hippo, EpCAM, TGFβ, *etc*, expliquant peut-être la variabilité de ces programmes transcriptionnels. De plus, les gènes cibles de β-caténine varient en fonction du tissu ; en effet, le set de gènes induits spécifiquement dans le foie est différent de celui observé dans d'autres tissus [30, 48, 172, 173]. Les gènes cibles positifs témoins de l'activation de β-caténine

dans le foie sont, entre autres, *GLUL*, *LECT2*, *TBX3*, *LGR5*, *SLC1A2*(GLT-1), *AXIN2*, *SP5*, *CYP2E1*, *NKD1* et *AQP9*, les gènes cibles négatifs étant, entre autres, *ARG1*, *GLS2* et *HAL*. Il existe aussi certainement une signature Wnt progénitrice qui reste à déterminer. *MYC* est un gène cible classique de β-caténine dans de nombreux organes mais pas dans le foie [30]. Le contrôle de MYC est compliqué dans le foie mais MYC constitue un nœud particulièrement important dans la physiologie et dans la tumorigenèse. Notamment, MYC semble collaborer avec l'activation de β-caténine dans de nombreux hépatoblastomes [174] et dans un sous-groupe très particulier de CHC, de mauvais pronostic.

2.4.2 Multiples mécanismes d'activation de la voie WNT/β-caténine dans le CHC

L'extrême variabilité de l'implication de la voie Wnt/β-caténine dans l'organisme et dans le foie se reflète par son implication différentielle dans le CHC. Plusieurs modes d'activation de la voie existent et résultent en des tumeurs appartenant à des catégories morpho-moléculaires différentes.

Le principal mécanisme d'activation de la voie dans le CHC est le **gain de fonction du gène *CTNNB1***, codant la β-caténine. Ce gain de fonction résulte dans l'extrême majorités des cas de mutations situées dans les codons 32 à 45 de *CTNNB1* qui codent le domaine de phosphorylation par GSK3B et *CSNK1A1* (CK1). Des délétions dans les premiers codons du gène sont aussi décrites avec une fréquence plus rare et touchent également ce domaine de phosphorylation. Identifiée pour la première fois en 1998 [175], elles ont été par la suite confirmées par d'autres équipes et surviennent dans $20-40\%$ des cas [172]. Le séquençage est le *gold standard* pour l'identification des mutations et des délétions sur *CTNNB1*. L'étude immunohistochimique de l'accumulation nucléaire de β-caténine est très souvent proposée dans les articles mais est sujette à des variabilités de résultats en fonction des techniques et des critères de positivité utilisés. Ainsi, l'étude immunohistochimique des gènes cibles de β-caténine dans le foie sont couramment utilisés comme témoin de la présence de mutations de *CTNNB1*. Comme un des premiers gènes cibles hépatiques de β-caténine à avoir été identifié [30], la surexpression de *GLUL* est le meilleur témoin des mutations de *CTNNB1*. Avec d'excellentes sensibilité et spécificité pour la détection des mutations gain-de-fonction de *CTNNB1* [2, 173], l'immunohistochimie dirigée contre GLUL (glutamine synthase) est utilisée de façon routinière dans le CHC. Dans le foie normal, l'immunomarquage se limite aux hépatocytes péricentrolobulaires alors que dans les tumeurs hépatiques mutées pour *CTNNB1*, l'immunomarquage est intense et diffus dans toutes les cellules tumorales, les tumeurs non mutées ne présentant généralement pas de marquage ou alors un marquage de faible intensité et de distribution hétérogène.

Comme second mécanisme d'activation sont les **mutations perte-de-fonction d'un régulateur négatif de la voie, l'*AXIN1***. Elles ont une fréquence beaucoup plus faibles que les mutations de *CTNNB1*, environ $10-15\%$. De façon très inattendue, la comparaison de CHC mutés *AXIN1* à des CHC mutés *CTNNB1* a montré que ces deux types de CHC n'étaient pas équivalents, résultants en des profils transcriptionnels complètement différents [116], notamment en ce qui concerne les gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine. Dans des modèles cellulaires, l'activité transcriptionnelle de β-caténine était notamment beaucoup plus faible dans les cellules mutées *AXIN1* que dans les cellules mutées *CTNNB1* [173]. L'implication d'AXIN1 dans d'autres voies de signalisation que la voie Wnt/β-caténine, comme les voies du TGFβ et Jun [176] expliquerait l'oncogenèse de ces tumeurs qui n'impliquerait que très faiblement la signalisation β-caténine.

Les **altérations perte-de-fonction d'un autre régulateur de la voie, *APC***, sont rarissimes dans le CHC, alors que très fréquentes et *drivers* dans le carcinome colorectal [177]. Elles ne font l'objet que de quelques rares *cases reports* dans la littérature, parfois dans un contexte de polypose adénomateuse familiale [10] [178].

Enfin, différentes études transcriptomiques ont permis de mettre en évidence un profil d'activation de la voie Wnt/β-caténine sans que les tumeurs ne présentent de mutations gain-de-fonction de *CTNNB1* ou perte-de-fonction d'*AXIN1* [117]. Cette sous classe de **CHC Wnt+ sans mutations des acteurs de la voie Wnt/β-caténine** est liée à la signalisation du TGFβ et ne présente pas d'induction transcriptionnelle des gènes cibles hépatospécifiques de β-caténine (comme *GLUL*, *LGR5*, *LECT2* et *TBX3*). Au contraire, les gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine induits dans ces tumeurs sont des gènes cibles ubiquitaires, liés à la prolifération (*MYC*, *CCND1*) [117]. Dans le même sens, la sous classe « progéniteur » des CHC (EpCAM+) présente également une activation de la signalisation Wnt avec un programme transcriptionnel de β-caténine non hépatospécifique [179, 180]. Dans une étude transcriptionnelle de 91 CHC, deux groupes de tumeurs liées à la signalisation Wnt/β-caténine sont apparus : celles classées « CTNNB1 » ($n = 24$) et celles classées « Wnt/TGFβ » ($n = 23$). Ces deux groupes présentaient respectivement une dérégulation de l'expression de 36 et 48 gènes cibles de la β-caténine ; de façon intéressante, seuls quatre gènes étaient communément dérégulés, de plus est, de façon inverse. Les gènes cibles hépatospécifiques de β-caténine n'étaient induits que dans le groupe « CTNNB1 » et les cibles non hépatospécifiques ne l'étaient que dans le groupe « Wnt/TGFβ ». En étendant leur analyse à d'autres CHC et à des jeux de données transcriptomiques publiés, les CHC classés « CTNNB1 » (20%) étaient associés au sous-groupe S3 d'Hoshida et présentaient un immunomarquage de GLUL alors que les CHC classés « Wnt/TGFβ » (28%) s'associaient

10. OMIM 175100

au sous-groupe S1, sans immunoexpression de GLUL [181]. Le programme transcriptionnel de ces CHC Wnt+ sans mutation de *CTNNB1* pourrait s'expliquer par le dialogue qui existe entre la voie Wnt/β-caténine et la signalisation du TGFβ et HGF.

Si les différents modes d'activation de la voie ne sont pas fonctionnellement équivalents dans le CHC, l'étude des hépatoblastomes a montré que l'implication de la voie Wnt/β-caténine était différentielle en fonction du développement, même dans un contexte tumoral. Les mutations activatrices de *CTNNB1* sont la règle dans les hépatoblastomes ; cependant elles n'induisent pas le même profil d'expression génique. En effet, les hépatoblastomes présentant un immunomarquage membranaire de β-caténine exprimaient GLUL , avaient un programme transcriptionnel de type « hépatoblaste avancé dans le développement », avec induction des gènes cibles hépatospécifiques de β-caténine, un faible niveau d'instabilité chromosomique et un meilleur pronostic. En revanche, le groupe présentant un immunomarquage nucléaire de β-caténine n'exprimait pas GLUL, avait un programme transcriptionnel de type « hépatoblaste à des stades précoces du développement », avec induction des gènes cibles non hépatospécifiques de β-caténine, une forte instabilité chromosomique, une fort indice de prolifération et un pronostic péjoratif. Il était notamment associé à la signalisation MYC [174].

Ainsi, la voie Wnt/β-caténine est impliquée dans la majeure partie de CHC et la quasi totalité des hépatoblastomes. Cependant, à l'instar de ses rôles physiologiques pléomorphes, les différents mécanismes d'activation de la voie résultent en des CHC de types moléculaires différents. Dans les nombreuses études menées jusqu'à présent, les CHC comportant une mutation de *CTNNB1* sont invariablement apparus comme constituant un sous-groupe bien à part de CHC, ne se superposant pas aux CHC non mutés *CTNNB1* même si ceux-ci peuvent parfois présenter une activation de la voie Wnt/β-caténine.

2.4.3 Les modèles murins d'hépatocarcinogenèse liée à β-caténine

Différents modèles murins ont par la suite confirmé le rôle majeur des mutations de *Ctnnb1* dans l'hépatocarcinogenèse. Dans les modèles dans lesquels la tumorigenèse est induite par des carcinogènes chimiques, des mutations gain-de-fonction de *Ctnnb1* sont observées de façon récurrente dans les tumeurs, souvent « sélectionnées » par le phénobarbital. Elles semblent constituer un évènement précoce de la tumorigenèse hépatique car également observées dans des lésions adénomateuses [182]. De la même manière, dans un modèle de transgenèse additive hépatospécifique de *Myc*, des tumeurs étaient observées et présentaient pour la plupart des mutations de *Ctnnb1* [175].

De façon surprenante, différents modèles murins de surexpression du gène *Ctnnb1* sauvage ou muté [11] n'ont pas permis l'observation de tumeurs [172]. L'apparition de tumeurs nécessite une activation conjointe d'autres oncogènes comme *Hras* ou *Myc* [184] ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur comme *Lkb1* [185]. Les mutations de *Ctnnb1* apparaissent donc comme un *hit* majeur, mais non suffisant dans l'hépatocarcinogenèse murine.

En revanche, les modèles murins de perte-de-fonction de deux régulateurs négatifs de la voie, *Apc* [186] et d'*Axin1* [187], permettent le développement de CHC, soulignant encore plus les rôles différentiels de la voie Wnt/β-caténine en fonction de son mode d'activation.

2.4.4 Les caractéristiques cliniques et morphologiques des CHC mutés *CTNNB1*

Comme nous l'avons vu, les CHC mutés *CTNNB1* appartiennent à des catégories transcriptomiques bien à part dans presque toutes les études. Elles sont également associées à une stabilité chromosomique [114, 116, 188]. Elles ne sont pas statistiquement associées à l'infection par le VHB [114, 116, 189].

Sur le plan morphologique, elles apparaissent dans quelques études comme étant de plus grande taille que les autres CHC [2, 114]. Il existe également une tendance à l'apparition sur un foie non cirrhotique [190–192].

Surtout, ces tumeurs sont le plus souvent bien différenciées [2, 189]. Une signature morphologique distinctive a également été associée à ces tumeurs. V. Audard et coll. ont en effet montré, sur une série française de 202 CHC opérés, que ces CHC mutés *CTNNB1* avaient une architecture acineuse et/ou microtrabéculaire dans 85% des cas (*vs.* 26% des CHC non mutés *CTNNB1*) et que cette architecture était homogène dans la tumeur (93% d'homogénéité architecturale *vs.* 50%). La cholestase intratumorale était très fréquente (84% *vs.* 14%) alors que la stéatose des cellules tumorales était rarement observée (2% *vs.* 30%). La cholestase, qui était responsable de la couleur macroscopiquement verte des tumeurs, était toujours extracellulaire, essentiellement dans la lumière des structures acineuses. Elle pourrait s'expliquer soit par un défaut d'excrétion extratumorale de la bile en raison de l'absence d'un réseau de drainage biliaire fonctionnel soit par la dérégulation de l'expression de gènes codant des transporteurs biliaires [1]. L'étude de ces structures acineuses a montré que les cellules les constituant avaient une polarité apicobasale de type simple (i.e. différent de la polarité hépatocytaire normale) avec immunolocalisation apicolatérale de la claudine-2 (marqueur de jonctions serrées) et apicale du transporteur biliaire ABCG2. Dans les tumeurs non mutées

11. Par exemple, le modèle Cre/LoxP de *knock-in* de *Ctnnb1* dont l'exon 3 (qui code le domaine de phosphorylation par Gsk3b) est flanqué de sites LoxP [183]

CTNNB1, cet immunomarquage était soit perdu, soit observé tout le long de la membrane plasmique, sans renforcement apical [2] (voir figure 2.7). Ces données ont été confirmées dans une autre série biopsique [193].

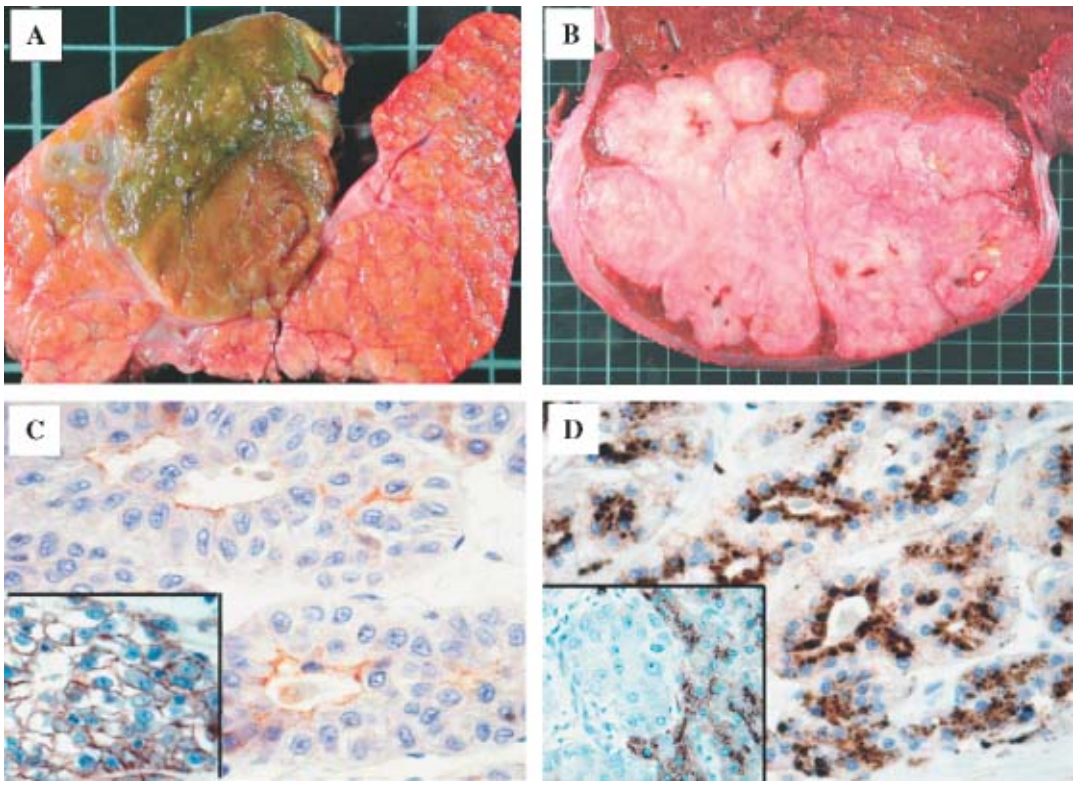


FIGURE 2.7 – Caractéristiques morphologiques des CHC mutés *CTNNB1*. **A** : aspect macroscopiquement vert d'un CHC muté *CTNNB1* en rapport avec une cholestase intratumorale, contrastant avec l'aspect généralement blanchâtre des autres CHC (**B**). **C** : Immunoexpression apicale du transporteur biliaire ABCG2 dans les structures acineuses d'un CHC muté *CTNNB1* ; encart : marquage membranaire circonférentiel dans une macrotravée d'un CHC non muté *CTNNB1*. **D** : Immunoexpression latéroapicale du marqueur des jonctions serrées claudine-2 dans les structures acineuses d'un CHC muté *CTNNB1* ; encart : absence de marquage dans une macrotravée d'un CHC non muté *CTNNB1*. Issu de [2].

Concernant le pronostic, les études sont contradictoires (revues en [194]) ; ceci est peut être dû au fait de l'association préférentielle des CHC mutés *CTNNB1* à un foie peu fibreux, autorisant une prise en charge thérapeutique chirurgicale plus fréquente. Il ressort cependant que même si parfois associées à une taille plus grande et à des facteurs de mauvais pronostics comme des emboles tumoraux, que le pronostic est relativement meilleur dans les CHC mutés *CTNNB1* [116, 117, 194].

2.4.5 Comment expliquer l'aspect morphologique distinctif des CHC mutés *CTNNB1* ?

Pour expliquer cette signature morphologique particulière de polarité et de métabolisme observée dans les CHC porteurs d'une mutation de *CTNNB1*, il peut être intéressant de se pencher sur les rôles physiologiques de β-caténine dans le foie en terme de polarité et de métabolisme.

Un lien entre voie Wnt/β-caténine et le métabolisme glucidique commence à être aperçu. Des polymorphismes ou mutations germinales sur des gènes codant des acteurs de la voie sont décrits comme associés au diabète de type 2 ou au syndrome métabolique comme *TCF4* [195], *LRP6* [196] ou *WNT5B* [197]. D'un point de vue fonctionnel, la voie Wnt/β-caténine est apparue, même si encore controversé, comme capable de contrôler l'expression de gènes de la néoglucogenèse en réponse au jeûne [198, 199]. La β-caténine servirait de cofacteur transcriptionnel de FOXO1 [200]. [12]. Concernant le métabolisme lipidique, les données restent encore vagues : des rôles sont surtout rapportés pour le métabolisme biliaire et du cholestérol [48, 202]. Le répertoire transcriptionnel de β-caténine dans le foie laisse à penser qu'un de ses rôles physiologiques hépatiques serait d'inhiber la lipogenèse et d'activer l'export des triglycérides [48].

Le lien entre signalisation β-caténine et polarité est probablement moins clair encore. Le pool membranaire de β-caténine participe aux jonctions adhérentes, jouant un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire. Elle constitue le lien entre la E-cadhérine et le cytosquelette. Cependant, contrairement aux résidus fréquemment mutés dans les CHC mutés *CTNNB1*, la phosphorylation contrôlant la liaison à l'E-cadhérine est le codon Y654 [203]. Peu d'études ont rapportés un rôle direct de β-caténine dans le contrôle de la polarité hépatocytaire. Le *knock out* de *Ctnnb1* dans le foie murin induit une perte d'expression de la la claudine-2, cependant associée à des jonctions serrées encore fonctionnelles. La polarisation hépatocytaire est respectée, cependant le pôle apical présente quelques anomalies caractérisées par un réseau canaliculaire biliaire dilaté et tortueux avec perte des microvillosités [204].

Ainsi, si quelques rôles de β-caténine sont décrits dans le métabolisme glucidolipidique hépatique et la polarité hépatocytaire, ils apparaissent cependant trop ténus pour expliquer à eux seuls la signature morphologique des CHC mutés *CTNNB1*. La mise en place de ce phénotype tumoral distinctif passerait plus vraisemblablement par l'induction d'une voie de signalisation intégrative. Un acteur potentiel intéressant est apparu comme la Ser/Thr kinase LKB1, impliquée à la fois dans le contrôle de la polarité épithéliale et du métabolisme énergétique

12. À l'inverse, il semble que de fortes glycémies soient capables d'activer la signalisation β-caténine, suggérant même que dans la cellule cancéreuse, la translocation nucléaire de β-caténine duite par Wnt ne puisse se produire qu'en présence de fortes concentrations de glucose [201]

cellulaire.

Chapitre 3

LKB1 : un gène suppresseur de tumeurs codant une kinase multi-tâches

La sérine/thréonine kinase LKB1, codée par le gène *STK11*, a été initialement identifiée par l'étude des patients porteurs du syndrome de Peutz-jeghers. Ce syndrome constitue une maladie autosomique dominante rare liée à une invalidation germinale d'un des allèles de *LKB1* et se traduisant cliniquement par la présence d'une polypose intestinale, de macules pigmentées péribucales et accrales et d'un sur-risque de développer des cancers. LKB1 joue un rôle majeur dans la physiologie cellulaire en couplant le contrôle de la polarité et du métabolisme au statut énergétique cellulaire. Sa principale cible est l'AMPK mais de nombreuses autres kinases de la famille de l'AMPK sont capables d'être activées par LKB1, étendant encore plus ses rôles pléïotropes dans la physiologie cellulaire. Intégrant les signaux du stress énergétique, LKB1 joue également un rôle majeur dans de nombreuses maladies et dans le cancer. En ce sens, *LKB1* est généralement considéré comme un gène suppresseur de tumeurs ; cependant, comme nous allons le voir, *LKB1* semble également jouer un rôle oncogénique dans certaines situations.

3.1 LKB1 et syndrome de Peutz-Jeghers

3.1.1 Contexte historique

Le syndrome de Peutz-Jeghers a été initialement identifié par Johannes Peutz en 1921 qui rapportait le cas d'un enfant de 15 ans qui présentait de nom-

breux polypes rectaux et un tableau d'invagination intestinale aiguë [205] [1]. L'étude des apparentés lui a permis de retrouver des polypes rectaux également chez ces patients ainsi que des polypes nasaux et une hyperpigmentation péribuccale. La première observation de macules pigmentées des lèvres et de la cavité buccale aurait en fait été réalisée en 1896 par un médecin britannique, J.T. Conner, chez deux sœurs jumelles, par ailleurs anémiques [206]. En 1949, Harold Jeghers a poursuivi la caractérisation clinique en compilant plusieurs familles et a émis l'idée qu'un gène pléïotrope unique devait être responsable de l'ensemble du tableau clinique, à la fois des polypes et des anomalies de la pigmentation [207]. La première utilisation de l'éponyme « syndrome de Peutz-jeghers » remonte à 1954.

Ce n'est que cinquante ans plus tard que le locus de prédisposition a été identifié sur le bras court du chromosome 19 (en 19p13) par l'analyse CGH de polypes de Peutz-Jeghers [208]. L'intense recherche de mutations de gènes situés dans ce locus chromosomique a finalement permis d'identifier les mutations perte-de-fonction de *STK11* comme responsables du syndrome de Peutz-Jeghers [209, 210]. La séquence de *LKB1* était en fait déjà déposée depuis 2 ans dans GenBank par un chercheur japonnais, J. Nezu, sous la référence *U*63333 mais n'était alors pas affiliée à un locus chromosomique particulier. Ce gène présentait une forte homologie avec le gène *XEEK1* de *Xenopus laevis* [209] qui avait été caractérisé deux ans plus tôt et classé comme codant une Ser/Thr kinase [211]. Il était alors connu que *LKB1* ne présentait qu'un faible niveau d'homologie avec d'autres kinases identifiées chez l'Homme.

L'homologue chez *Caenorhabditis elegans* de *STK11* est *par-4*. Il a été identifié en 2000 dans un crible génétique visant à identifier les acteurs de la division asymétrique [212]. Ainsi, les rôles de la kinase LKB1 chez les mammifères étaient initialement étudiés sous l'angle de la polarité cellulaire.

En 2003, deux équipes qui travaillaient sur *Snf1*, l'homologue de l'AMPK chez la levure, ont simultanément montré que, chez le mammifère, *LKB1* était capable d'activer par phosphorylation l'AMPK, considéré comme le senseur énergétique majeur de la cellule [213, 214]. Ceci a ouvert le champ à une intense recherche sur les fonctions de LKB1, au carrefour du métabolisme et de la polarité cellulaires.

3.1.2 Structure du gène et de la protéine

LKB1 s'étend sur 23 kb et est composé de 10 exons dont 9 sont codants. Il est transcrit dans un sens télomère vers centromère. La protéine LKB1, d'environ 50 kDa, comporte 433 résidus chez l'homme (436 chez la souris). Le domaine catalytique est codé par les codons 49 à 309, ce qui correspond à environ la moitié

1. Une traduction en langue anglaise de cet article peut être lue à l'url : « http ://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7027/ ».

du premier exon plus l'ensemble des exons II à VII. Il présente peu d'homologie protéique avec d'autres familles de kinases, expliquant une position plutôt centrale dans le dendrogramme du kinome. Cependant, les résidus du domaine kinase sont très conservés dans le règne animal. De part et d'autre du domaine kinase, se situent deux domaines régulateurs, NRD [2] et CRD [3]. Il existe deux domaines de localisation nucléaire (NLS) situés respectivement dans le NRD et dans la partie toute N-terminale du domaine kinase et qui permettent à LKB1 d'être localisée au noyau à l'état basal [215]. Le CRD comporte sur le résidu 436 un domaine de farnésylation. Quatre sites de phosphorylation et quatre sites d'autophosphorylation sont présents dans le domaine kinase et les deux domaines régulateurs. Les résidus entourant ces sites sont pour la plupart assez bien conservés entre les espèces [216, 217].

Une seule isoforme protéique de LKB1 a été identifiée jusqu'à présent et résulte d'un épissage alternatif en C-terminal. Contrairement à la forme conventionnelle de LKB1 qui a une expression ubiquitaire dans les différents tissus de l'organisme, cette isoforme, appelée *short isoform* ou *testis isoform* a une expression limitée au testicule, et plus particulièrement à la lignée germinale. Elle a une taille inférieure (48 kDa) et comporte 404 résidus chez l'homme (412 chez la souris). Cette isoforme n'a pas montré de différences fonctionnelles par rapport à l'isoforme conventionnelle quant à sa régulation, son activité kinase et son spectre de kinases cibles. Elle est apparue comme requise pour la spermatogenèse et son invalidation s'accompagne d'une infertilité masculine [218, 219].

3.1.3 Profil d'invalidation de *LKB1* dans le syndrome de Peutz-Jeghers

Dans près de 90% des familles souffrant d'un syndrome de Peutz-Jeghers [4], des altérations génétiques hétérozygotes de *LKB1* sont identifiées. Comme nous le verrons plus tard, des altérations sont également observées de façon sporadique dans différents cancers. Ces altérations sont prédites comme entrainant une perte-de-fonction de la protéine car aboutissant généralement à une invalidation du domaine kinase. Un aspect très troublant est qu'il existe environ 150 altérations génétiques différentes décrites, qui plus est, sans véritable *hot spot* identifié (revue en [216]). Il s'agit essentiellement de mutations non-sens et faux sens et de délétions modifiant le cadre de lecture. Des mutations des sites d'épissage et des délétions plus ou moins étendues dans le domaine kinase sont également décrites. L'immense majorité de ces altérations génétiques ne sont pas caractérisées sur le

2. *N-terminal regulatory domain*
3. *C-terminal regulatory domain*
4. OMIM 175200

plan fonctionnel mais elles sont prédites comme inactivant l'activité kinase de la protéine. Cependant, à la vue du spectre mutationnel très étendu, il n'est pas impossible que, mise à part l'activité Ser/Thr kinase au sens strict, d'autres fonctions de LKB1 soient fonctionnellement importantes.

De nouvelles autres altérations germinales de *LKB1* sont régulièrement décrites dans le syndrome de Peutz-Jeghers. Par ailleurs, hors contexte mutationnel, des variants ARNm sont décrits, par exemple la délétion des exons V-VII et de la partie proximale du VIII [220], ou la conservation dans l'ARNm de l'intron IV [221]. La signification fonctionnelle de ces variants transcriptionnels n'est pas connue.

3.1.4 Aspects cliniques du syndrome de Peutz-Jeghers

Le syndrome de Peutz-Jeghers est une maladie familiale autosomique dominante assez rare dont l'incidence est comprise entre 1 : 50000 et 1 : 200000 naissances. Il comporte trois volets cliniques différents [222].

Des **lésions pigmentées cutanéomuqueuses** sont observées dans 95% des cas et apparaissent au cours de l'enfance autour de la bouche, sur les lèvres, les narines, dans la zone périanale, sur les doigts et orteils ainsi que sur les faces palmaires et dorsales des mains et des pieds. Elles peuvent disparaitre à la puberté sauf pour les lésions de la région buccale. Elles ne sont pas spécifiques car elles peuvent être observées dans d'autres syndromes génétiques comme le complexe de Carney. Leur physiopathologie reste obscure mais ces lésions pourraient être secondaires à un blocage du transfert de mélanine entre les mélanocytes et les kératinocytes.

Les **polypes intestinaux** peuvent se situer tout au long du tractus digestif mais ils sont beaucoup plus fréquents dans l'intestin grêle et le colon. Exceptionnellement, ils peuvent se localiser dans des sites extra-intestinaux comme la vésicule biliaire, les bronches, l'uretère et la vessie. Ils peuvent se compliquer de saignements, d'infarcissement et d'invagination intestinale aiguë. Les polypes apparaissent dans l'enfance avec une prévalence de 33% à l'age de 10 ans et de 50% à l'age de 20 ans. L'aspect anatomopathologique de ces polypes et les controverses associées à leur risque de transformation maligne seront détaillés dans la sous-section suivante.

Enfin, le syndrome de Peutz-Jeghers est reconnu comme syndrome de **prédisposition au cancer** avec un risque relatif d'environ 18 par rapport à la population générale [223, 224]. Les cancers les plus fréquents sont les adénocarcinomes du tractus intestinal (estomac, colon, intestin grêle), les carcinomes pancréatiques et les carcinomes mammaires. Dans une moindre mesure, il existe également un sur-risque de cancer de l'endomètre, de l'ovaire, du testicule et du col de l'utérus. Les carcinomes de la sphère digestive n'ont pas de caractéristiques anatomopathologiques particulières. Cependant, un type de tumeurs de l'ovaire parait être

préférentiellement associé au syndrome de Peutz-Jeghers : il s'agit de la tumeur des cordons sexuels avec tubules annulaires. Un tiers de ces tumeurs est associé au syndrome de Peutz-Jeghers ; elles sont alors volontiers bilatérales, calcifiées, sous la forme de *tumorlets* dispersés dans le parenchyme ovarien plutôt que d'une masse individualisée ; l'évolution est indolente. De même, le syndrome de Peutz-Jeghers apparaît comme s'associant préférentiellement aux tumeurs à cellules de Sertoli du testicule et aux adénocarcinomes à déviation minime (*adenoma malignum*) du col utérin [96, 222].

3.1.5 Corrélations génophénotypiques dans les syndrome de Peutz-Jeghers

Certains auteurs ont suggéré que le tableau clinique des patients atteints d'un syndrome de Peutz-Jeghers pouvait varier en fonction du type de l'altération germinale de *LKB1*. Cependant, la plupart des études menées l'ont été sur des effectifs limités de patients, limitant l'impact des conclusions proposées. Certaines sont reprises dans le tableau suivant.

Effectif	**Type de mutation**	**Phénotype**	**Réf**
32	Mutation non sens	Symptomatologie tardive	[225]
41	Alt. non sens exons I-VIA	Peu associées au cancer	[226]
	Alt. faux sens exons VIB-VIII	Associées au cancer	
	Mutations tronquantes	Cancer du sein	
170		Pas de corrélation	[227]
297		Pas de corrélation	[223]

Tableau 3.1 – Corrélations génotype phénotype dans le syndrome de Peutz-Jeghers. Alt. : Altération génétique.

Ainsi, aucune corrélation génotype phénotype ne peut être clairement établie, même si certaines études suggèrent que la position génique de l'altération sur *LKB1* peut influencer le risque de développer un cancer, suggérant que les différentes parties de la protéine n'ont pas forcément les mêmes propriétés suppressives de tumeur.

3.1.6 Le polype de Peutz-Jeghers.

Les polypes de Peutz-Jeghers ont un aspect morphologique particulier, généralement facilement identifiable. Ils peuvent se voir tout le long du tractus intestinal, par ordre de fréquence : jéjunum, iléon, colon, estomac, duodénum et

appendice cæcal. L'aspect macroscopique est peu spécifique : les polypes sont pédiculés ou sessiles, ont une surface externe lisse et lobulée et peuvent mesurer de quelques millimètres à 7 cm.

Au microscope, ces polypes correspondent à des hamartomes [5]. La composante épithéliale est du même type que la muqueuse avoisinante. Les polypes grêliques, fers de lance de la description, sont constitués de cryptes, glandes et villosités de taille variable séparées les unes des autres par une arborescence de faisceaux musculaires lisses. À la manière des ramifications d'un arbre, l'architecture est complexe et l'épaisseur des faisceaux musculaires décroit à mesure qu'ils se rapprochent de la surface du polype. La prolifération musculaire lisse n'est pas spécifique des polypes de Peutz-Jeghers car elle peut s'observer non rarement dans des polypes d'autre nature, comme les adénomes colorectaux ou les polypes juvéniles [228]. Le chorion est d'aspect normal. Les glandes peuvent prendre un aspect kystique ou parfois festonné. L'épithélium est généralement constitué d'entérocytes, de cellules caliciformes et de cellules de Paneth selon une répartition comparable à la muqueuse saine adjacente ; un certain type cellulaire, surtout les cellules caliciformes, peut néanmoins prédominer en certains secteurs. La surface externe est souvent érodée avec réaction inflammatoire aigüe et aspect régénératif de l'épithélium [6].

Les polypes coliques ont généralement le même aspect mais avec une arborescence souvent moins complexe et une prédominance de cellules caliciformes. Récemment, un nouveau critère diagnostique a été proposé pour ces polypes coliques. L'arborisation complexe caractéristique est en effet absente dans plus de la moitié des cas dans cette localisation. Au contraire, comme élément distinctif, était observée une organisation lobulaire des glandes hamartomateuses. Ces lobules étaient circonscrits par un délicat réseau de fibres musculaires lisses, qui nécessitait, parfois, une étude immunohistochimique complémentaire pour être mis en évidence. Alors que des leïomyocytes en nombre augmenté peuvent aussi être observés dans des polypes coliques d'autres natures comme les adénomes tubuleux conventionnels, ils ne prennent jamais cette disposition arciforme autour des lobules glandulaires. Cette architecture lobulée n'est cependant observée que dans la moitié des polypes de Peutz-Jeghers grêliques [229]. Les polypes de Peutz-Jeghers présentent donc généralement, quelle que soit leur localisation, une morphologie distinctive, avec une étroite relation topographique entre les composantes épithéliale et musculaire lisse.

Deux types de remaniements, classiques, peuvent faire porter à tort un diagnostic de transformation maligne. Il s'agit de l'aspect régénératif de l'épithélium après son érosion mécanique, et les faux aspects infiltrants en cas de malposition

5. Agencement anormal de cellules normales normalement présentes dans le tissu atteint, en proportion similaire.

6. qui ne doivent pas être pris pour des lésions dysplasiques.

épithéliale dans la paroi digestive [228, 230]. Ces phénomènes de pseudo-invasion ou de malposition épithéliale peuvent s'observer dans les polypes, notamment grêliques (10% des cas) sous la forme de glandes, non dysplasiques, s'étendant à la sous-muqueuse, à la musculeuse voire à la sous-séreuse. La composante luminale exophytique peut même parfois être manquante, la lésion étant réduite à un nodule mural ou à des raptus mucineux pariétaux ; on parle alors d'*enteritis cystica profunda*. Elle pourrait être secondaire à un enfouissement glandulaire suite à un traumatisme du polype. Il parait important de prendre en compte ces potentiels écueils diagnostiques lors de la lecture des articles décrivant la potentielle transformation maligne des polypes de PEUTZ-JEGHERS.

3.1.7 Apport des modèles murins.

Des modèles murins d'inactivation constitutive (dans toutes les cellules de l'organisme) de *Lkb1* ont été créés. Le *knock-out* des deux allèles (souris $Lkb1^{-/-}$) s'accompagne d'une létalité embryonnaire vers $e8.5 - e9.5$ avec des anomalies développementales de l'aorte, du tube neural et du placenta. La signalisation VEGF [7] est apparue comme impliquée dans ce phénotype [231–234].

En revanche, lorsqu'un seul allèle de *Lkb1* est invalidé, également de façon constitutive (souris $Lkb1^{+/-}$) [8], les souris naissent viables et développent un phénotype proche du syndrome de PEUTZ-JEGHERS, avec l'apparition de nombreux polypes hamartomateux intestinaux vers l'âge de 8 mois [231, 232, 234, 235]. Si l'aspect morphologique des polypes était superposable à celui observé chez l'homme, la distribution le long du tractus intestinal était différente, avec une nette prédominance gastrique, alors que la localisation est plutôt grêlique chez l'homme [9].

Une des grandes questions qui ont été posées sur ces modèles murins d'inactivation monoallélique de *Lkb1* est la suivante. L'inactivation du second allèle est-elle nécessaire à la genèse des polypes ? Les réponses apportées ont été contrastées. La plupart des auteurs ont observé que le niveau d'expression de Lkb1 dans les polypes murins était d'environ la moitié de celui observé dans le tissu normal adjacent, suggérant que l'inactivation du second allèle n'était pas requise et qu'une simple haploinsuffisance de *Lkb1* était suffisante pour la polypogenèse [231, 232, 235]. Cependant, un autre groupe a montré qu'environ un quart des polypes observés avaient perdu le second allèle de *Lkb1* et que, dans la moitié des autres polypes, l'expression protéique de Lkb1 était nulle, suggérant une inactivation épigénétique

7. *Vascular Endothelial Growth Factor*

8. reproduisant la génétique du syndrome de PEUTZ-JEGHERS

9. Les modèles murins de délétion monoallélique d'*Apc*, gène responsable de la polypose adénomateuse familiale, s'accompagne également d'une distribution différente des polypes adénomateux le long du tractus intestinal, soulignant la non complète fidélité aux maladies humaines des modèles murins de polypose [236].

du second allèle de *Lkb1*. Selon cette dernière équipe, l'invalidation du second allèle est apparue comme importante, mais non absolument nécessaire, pour induire la polypogenèse [234].

Ces différents modèles ont été menés avec des invalidations constitutives et non conditionnelles du gène, ne permettant pas de répondre à une seconde question majeure : quel est le type cellulaire à l'origine de ces polypes ? Une étude a montré qu'une invalidation monoallélique de *Lkb1* spécifiquement dans les cellules musculaires lisses était suffisante pour induire la polypogenèse [237]. Ainsi, à l'image de l'aspect microscopique des polypes de Peutz-Jeghers montrant une étroite relation topographique entre les contingents épithélial et musculaire lisse, ce modèle murin souligne la nature hamartomateuse de ces polypes et leur genèse non *cell-autonomous*, impliquant un dialogue entre différents types cellulaires.

Quelles voies moléculaires sont impliquées dans la polypogenèse de ces différents modèles ? La voie mTORC1 est inhibée par l'AMPK, principale cible positive de LKB1. De façon intéressante, elle est activée dans la plupart des polypes issus des modèles murins $Lkb1^{+/-}$ [238] et dans certains polypes de Peutz-Jeghers humains [230]. Le traitement par la rapamycine (un inhibiteur pharmacologique de mTORC1) s'accompagne d'une nette réduction de la taille des polypes chez la souris [238]. Une autre voie incriminée est celle du TGFβ, impliquée notamment dans le dialogue entre le tissu mésenchymateux et le tissu épithélial [239]. Dans le modèle de délétion monoallélique de *Lkb1* spécifiquement dans le tissu musculaire lisse, une production diminuée de TGFβ par les cellules musculaires lisses était observée, résultant en une diminution de l'état de phosphorylation de sa cible positive Smad2 dans les cellules épithéliales avoisinantes. La même observation a pu être faite sur des polypes de Peutz-Jeghers humains, avec une inactivation de la signalisation TGFβ dans les cellules épithéliales au contact des fibres musculaires lisses [237]. La signalisation LKB1 serait donc capable, dans certains types cellulaires, d'inhiber la sécrétion de TGFβ, responsable d'une activité non *cell-autonomous*. Cependant, le dialogue entre les voies mTORC1 et TGFβ n'est pas encore clairement établi [240], ce qui aurait permis de lier ces deux voies dans la polypogenèse de Peutz-Jeghers [10].

3.1.8 Une séquence hamartome→cancer dans le syndrome de Peutz-Jeghers ?

Comme mentionné, les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers ont un risque accru de développer des cancers, notamment du tractus intestinal. A l'image de la séquence adénome→cancer dans le cancer colorectal sporadique

10. Ces deux voies ne sont par ailleurs pas associées aux CHC mutés *CTNNB1* dans les différentes études transcriptomiques.

et chez les patients porteurs d'une polypose adénomateuse familiale [241], il est tentant de considérer le polype de Peutz-Jeghers comme une lésion précurseur de l'adénocarcinome intestinal chez ces patients.

Cependant, dans les modèles murins *Lkb1*$^{+/-}$, aucun adénocarcinome intestinal n'est survenu ; de plus, les polypes observés ne présentaient jamais de lésions dysplasiques ou adénomateuses [234], allant contre l'hypothèse d'une séquence hamartome→cancer dans ces modèles.

Chez l'homme, deux visions s'opposent. Celle, classique, et la plus acceptée, considère que les adénocarcinomes intestinaux chez les patients atteints d'un syndrome de Peutz-Jeghers ne se développent pas directement à partir des polypes hamartomateux, ceux-ci n'étant que des épiphénomènes annexes à la carcinogenèse [228, 242]. En effet, même s'ils sont parfois de grande taille, les polypes ne présentent presque jamais de zone de dysplasie et de transformation adénomateuse [228, 243, 244], rendant le polype hamartomateux peu à même d'être le précurseur de la lésion carcinomateuse. La fréquence de la transformation adénomateuse au sein d'un polype de Peutz-Jeghers est estimée à 2% [230]. De plus, les adénocarcinomes intestinaux survenant chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers ne présentent généralement pas de reliquat d'un potentiel hamartome précurseur [230].

Les partisans de l'hypothèse inverse rappellent que, chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers, la fréquence relative des cancers le long du tractus intestinal suit la distribution des polypes (*i.e.* plus souvent grêliques que colorectaux) alors que les adénocarcinomes intestinaux sporadiques sont dans la grande majorité des cas colorectaux. L'existence, même peu fréquente, de lésions adénomateuses au sein d'un polype de Peutz-Jeghers plaide en faveur de l'acquisition secondaire d'un second *hit* génétique pour induire la carcinogenèse.

Ce second *hit* n'est pas la mutation gain-de-fonction de *KRAS* ni un phénotype d'instabilité microsatellite car ceux-ci sont rarement observés dans les hamartomes et les adénocarcinomes chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers [230, 234, 245], contrairement aux adénocarcinomes colorectaux sporadiques. Ce n'est pas non plus l'invalidation d'*APC* car les rares fois où une activation de la voie Wnt/β-caténine est observée dans les polypes et adénocarcinomes chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers elle est secondaire à des mutations activatrices de *CTNNB1* [230, 245, 246]. Ceci suggère que l'histogenèse moléculaire des adénocarcinomes intestinaux des patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers passe par des voies différentes que celles observées dans les adénocarcinomes colorectaux sporadiques ; elle semble notamment indépendante de l'activation de la voie Wnt/β-caténine.

Ce second *hit* pourrait être l'inactivation du second allèle de *LKB1*, soit par

LOH [11], soit de façon épigénétique par hyperméthylation du promoteur. Comme nous l'avons vu, la réponse à cette question n'a pas été claire dans les modèles murins et une conclusion acceptable qui peut être actuellement retenue est que la perte du second allèle n'est pas requise pour la polypogenèse même si cette perte pourrait éventuellement conférer un avantage de croissance au polype. Chez l'homme, les résultats ont également été très variables, avec une fréquence de LOH comprise entre 25 et 38% dans les polypes de Peutz-Jeghers et entre 50 et 100% dans les adénocarcinomes intestinaux survenant chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers (revue en [247]). Ainsi, la perte du second allèle de *LKB1* pourrait être à l'origine d'au moins une partie des adénocarcinomes intestinaux survenant chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers.

Cette inactivation secondaire du second allèle de *LKB1* se produit-elle pour autant au sein du polype hamartomateux et pas en muqueuse non polypoïde ? Peu d'études sont disponibles car elles sont techniquement difficiles du fait de la rareté des lésions adénomateuses au sein des polypes dePeutz-Jeghers et de la nécessité d'utiliser des méthodes de microdissection. Une LOH du locus *LKB1* a pu être néanmoins observée dans 3/5 cas dans le foyer adénomateux du polype. Si des mutations de *TP53* avec LOH et accumulation nucléaire de la protéine pouvaient être observées, aucune mutation de *KRAS* n'a pu être mise en évidence. De même, un immunomarquage nucléaire de β-caténine n'était que rarement observé. Les conclusions qui peuvent être portées sur cette micro-série est que la perte du second allèle de *LKB1* n'est pas absolument requise pour l'apparition des foyers adénomateux au sein des polypes ; la genèse moléculaire semble de plus passer préférentiellement par l'inactivation de *TP53* plutôt que par les autres voies habituellement impliquées dans la carcinogenèse colorectale sporadique (perte d'*APC*, mutation gain de fonction de *KRAS*) [230].

Ainsi, les données disponibles actuellement plaident plutôt contre une séquence hamartome→cancer dans le syndrome de Peutz-Jeghers. Les foyers de transformation adénomateuse qui sont très rarement observés dans les polypes hamartomateux ne seraient que fortuits. À noter que, outre le polype adénomateux, aucune lésion précurseur de l'adénocarcinome intestinal survenant chez les patients atteints d'un syndrome de Peutz-Jeghers n'a pus être identifiée, de même que dans les cancers extra-intestinaux survenant chez ces patients.

3.1.9 Une théorie possible pour expliquer la carcinogenèse intestinale.

Un élégant modèle pour expliquer la carcinogenèse intestinale chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers a été récemment proposé par

11. *Loss Of Heterozygoty*

Marnix Jensen. Il s'est basé sur le postulat que, au sein d'une même crypte intestinale, différents clones progéniteurs coexistent pour donner naissance aux différentes lignées cellulaires différenciées [248]. Cependant, ces différents clones subissent entre eux un processus de compétition, faisant émerger au sein de chaque crypte un clone prédominant [249]. M. Jensen a pu observer que dans une muqueuse intestinale non hamartomateuse issue de patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers, le compartiment progéniteur était étendu en hauteur, avec une sélection clonale diminuée. Cet état des choses était vu comme pouvant favoriser statistiquement la carcinogenèse intestinale car il induirait une incidence accrue de mutations stochastiques non sélectionnées dans le compartiment progéniteur, augmentant le risque d'acquisition d'une mutation oncogénique conférant ainsi un avantage prolifératif au sein d'un clone progéniteur [228]. LKB1 serait donc requis pour le contrôle spatial du compartiment intestinal souche. Ce modèle est essentiellement théorique mais permettrait aisément d'expliquer la genèse des lésions adénomateuses au sein des polypes de Peutz-Jeghers et surtout des adénocarcinomes sur muqueuse saine chez les patients porteurs d'un syndrome de Peutz-Jeghers. Allant également dans le sens d'une participation centrale des cellules souches intestinales, a été l'observation d'une différenciation anormale dans les polypes de Peutz-Jeghers gastriques et intestinaux qui présentaient une raréfaction de certaines lignées cellulaires [250].

Pour conclure sur cette section, *LKB1* a été identifié dans le bien caractérisé syndrome de Peutz-Jeghers, de surcroit adossé à des modèles murins assez fidèles. Contrastant avec ceci, de très (trop ?) nombreuses inconnues subsistent concernant les mécanismes de la carcinogenèse chez ces patients. *LKB1* ne respecterait peut-être pas les canons des gènes suppresseurs de tumeurs et les mécanismes de la carcinogenèse médiée par la perte de *LKB1* ne suivraient pas ceux habituellement impliqués dans le carcinome colorectal sporadique, faisant de *LKB1* un gène suppresseur de tumeurs tout à fait singulier.

3.2 L'axe LKB1/AMPK.

Le syndrome de Peutz-Jeghers constitue un modèle particulièrement intéressant de l'étude de LKB1 mais n'a pas permis d'appréhender un des rôles majeurs de LKB1 qui est le contrôle du métabolisme énergétique cellulaire *via* l'AMPK. Nous détaillerons ici les quelques données prouvées concernant les mécanismes d'activation de LKB1 et de ses rôles dans le contrôle de l'AMPK et de ses fonctions physiologiques.

3.2.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression de LKB1.

Étrangement, peu de données existent quant à la régulation transcriptionnelle de *LKB1*. Seules les signalisations œstrogène ERα et androgène ont été montrées comme pouvant moduler l'expression transcriptionnelle de *LKB1*. Cependant, les différentes conclusions ont montré que cette régulation était dépendante du contexte cellulaire. Dans la lignée mammaire MCF-7, le 17β-œstradiol diminue le niveau d'expression transcriptionnel et protéique de *LKB1* [251] et le *knock-out* de *ESR1* (gène codant ERα) augmente le niveau d'expression de LKB1 [252]. Cependant, dans l'adipocyte, le 17β-œstradiol augmente l'expression de LKB1 de façon dose dépendante [253]. La signalisation androgène joue un rôle superposable à celle d'ERα dans l'adipocyte.

Dans le contexte du cancer, il a aussi été montré que l'hyperméthylation du promoteur de *LKB1* pouvait être observée, s'accompagnant d'un diminution de la transcription du gène. Ceci a été montré dans des lignées cellulaires [254, 255], dans des modèles murins [234], dans des tumeurs issues de patients porteurs du syndrome de Peutz-Jeghers [255] ainsi que dans certains cancers sporadiques [256].

Si la méthylation du promoteur peut être un mécanisme d'inactivation de *LKB1* dans le cancer, le peu de données obtenues sur sa régulation transcriptionnelle dans un contexte physiologique laissent à penser que sa régulation fonctionnelle est essentiellement post-transcriptionnelle.

3.2.2 Modifications post-traductionnelles de LKB1.

LKB1 est sujet à plusieurs modifications post-traductionnelles. Tout d'abord, plusieurs résidus peuvent être phosphorylés. Cependant, même si ces résidus sont pour la plupart bien conservés entre les espèces, leur état de phosphorylation ne semble pas modifier de manière majeure l'activité kinase de la protéine [216]. Quatre sites sont autophosphorylés par LKB1 (Thr185, Thr189, Thr336 et Ser404) et quatre autres (Ser31, Ser325, Thr366 et Ser431) sont phosphorylés par des kinases en amont telles que ATM, PRKACA et RP6KA3. Seules les invalidations du site d'autophosphorylation Thr336 et du site de phosphorylation Ser431 par PRKACA et RP6KA3 sont capables d'inhiber la croissance de la lignée mélanomateuse G361 [217, 257, 258]. La phosphorylation du site Thr366 est dépendante d'ATM et nécessite une exposition aux radiations ionisantes pour être effective [216]. Dans la signalisation glucagon, la phosphorylation par PRKACA permet d'activer LKB1 dans un modèle de foie de rat perfusé [259].

Un site de farnésylation est présent dans le domaine C-terminal de la protéine, permettant un adressage membranaire. La prénylation de LKB1 ne semble cependant pas jouer de rôle majeur dans le contrôle de l'activité de la protéine [258, 260].

Cependant, des travaux récents suggèrent que LKB1 est surtout présent à l'état farnésylé dans la cellule et que cette farnésylation est importante pour l'activation de l'AMPK mais pas des autres kinases en aval de LKB1 [261].

Une acétylation de la protéine est également possible sur différentes lysines, dont le résidu K78. Cette acétylation semble réguler l'interaction de LKB1 avec ses partenaires, dont STRAD. La déacétylase SIRT1 régule très probablement le niveau d'acétylation de la protéine [262]. Les conséquences fonctionnelles varient en fonction du tissu. SIRT1 régule négativement LKB1 dans la cellule endothéliale [263] mais positivement dans les cellules rénales embryonnaires 293T [262], hépatomateuses HepG2 et hépatocytaires primaires [264].

Aussi, il apparaît que le principal mode de régulation de LKB1 passe par le contrôle de sa stabilité et de son interaction physique avec ses partenaires et ses cibles. Comme nous allons le voir dans la sous-section suivante, l'activité de LKB1 est également contrôlée par sa localisation intracellulaire, nucléaire ou cytoplasmique.

3.2.3 LKB1 dans un complexe.

LKB1 peut être localisée dans le noyau, où elle est considérée comme inactive [12] et dans le cytoplasme, où elle est considérée comme active car située dans le même compartiment cellulaire que ses cibles [265]. La translocation de LKB1 est médiée par deux partenaires que sont STRAD (surtout STRADA) et Mo25 [213, 266]. LKB1 ne semble être active que liée à ces deux partenaires sous la forme d'un complexe hétérotrimérique 1 : 1 : 1. L'importance de la localisation nucléaire de LKB1 est cependant remise en question actuellement. En effet, cette localisation nucléaire s'observe dans des expériences de surexpression de *LKB1* alors que la protéine endogène semble être majoritairement cytosolique et membranaire. En ce sens, alors que le gène *LKB1* est très conservé dans le règne animal, la séquence de localisation nucléaire n'est pas présente dans les homologues de *LKB1* chez la drosophile et *Caenorhabditis elegans*. Plusieurs données suggèrent par ailleurs que LKB1 est constitutivement active et que la régulation des différents mécanismes physiologiques qu'elle contrôle dépend de sa localisation subcellulaire [267].

STRAD, dont il existe deux isoformes (STRADα et STRADβ [13]), est une pseudokinase. Elle est catalytiquement inactive [268] mais conserve des sites de liaisons à l'ATP et à l'ADP, qui peuvent lui attribuer un rôle de senseur énergétique [269]. Mo25, dont il existe également deux isoformes (Mo25α et Mo25β [14]) est une protéine d'échafaudage interagissant directement avec LKB1 et STRAD, stabilisant

12. tout du moins en ce qui concerne son activité catalytique...
13. codées par les gènes *STRADA* et *STRADB* respectivement.
14. codées par les gènes *CAB39* et *CAB39L* respectivement.

l'interaction entre ces deux partenaires du complexe d'activation de LKB1 [266, 270].

Outre le classique complexe d'activation LKB1 : STRAD : Mo25, d'autres complexes sont décrits (revus en [271]). D'importance, figure l'interaction de LKB1 avec HSP70 [15] et CDC37, permettant la stabilisation cytoplasmique de LKB1 et empêchant sa dégradation protéasomale [272–274]. Cependant, il semble que, paradoxalement, la liaison de LKB1 à HSP70 et CDC37 inactiverait son activité catalytique [272].

Ainsi, STRAD et Mo25 d'une part et HSP70 et CDC37 d'autre part, sont capables de stabiliser LKB1 dans le cytoplasme, mais avec des conséquences différentes sur l'activation de la protéine.

3.2.4 l'AMPK, principale cible de LKB1.

Une des principales cibles de LKB1 est l'AMPK. Pour reprendre une comparaison de Grahame Hardie [16], la cellule comporte, comme tout appareil électronique, une batterie rechargeable. Cette batterie est formée des nucléotides ATP et ADP, interchangeables selon la réaction chimique $ATP \leftrightarrow ADP + Pi$. Le catabolisme cellulaire et la chaîne respiratoire mitochondriale permettent de recharger cette batterie, qui sera déchargée par la cellule pour les réactions nécessitant de l'énergie. La génération d'ATP devrait être équivalente à son utilisation et un mécanisme de mesure des concentrations en ATP et ADP est nécessaire. Les adénylates kinases permettent de régénérer l'ATP à partir d'ADP, mais en produisant de l'AMP ($2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$). Ainsi, l'utilisation d'ATP se traduit par une augmentation des concentrations cellulaires en ADP et AMP. Même si les concentrations cellulaires en ADP sont presque toujours supérieures aux concentrations en AMP, la cinétique d'apparition de l'AMP est plus rapide (voir figure 3.2 page 94). Aussi, un système efficace de détection du stress énergétique devrait être capable de suivre à la fois le rapport ADP/ATP et le rapport AMP/ATP. Ceci est réalisé au niveau cellulaire par l'AMPK [17]. Basiquement, le rôle de l'AMPK est d'orchestrer la réponse cellulaire au stress énergétique en inhibant les voies métaboliques consommatrices d'énergie et en activant celles qui en produisent. Sa régulation est bien entendu très complexe et nous allons en présenter ici les principaux mécanismes.

Dans la cellule, l'AMPK se présente sous la forme d'un complexe hétérotrimérique (voir figure 3.1 page ci-contre) constitué :

— d'une sous-unité catalytique α, à activité Ser/Thr kinase. Il existe deux isoformes, $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Trois domaines sont présents : un domaine catalytique

15. *heat shock 70kDa protein*
16. un des spécialistes actuels de l'AMPK
17. *AMP-activated protein kinase.*

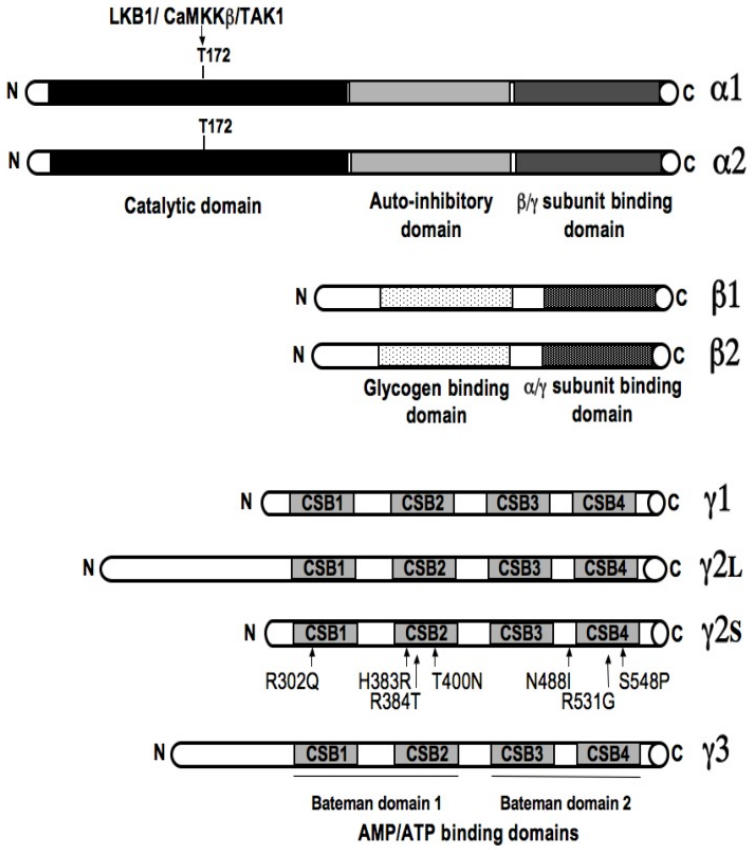


FIGURE 3.1 – Les différentes isoformes des sous-unités α, β et γ de l'AMPK. Issu de [275].

comportant un site de phosphorylation sur le résidu Thr172, un domaine d'autoinhibition et un domaine de liaison à la sous-unité β.

— d'une sous-unité régulatrice β dont il existe deux isoformes, $\beta 1$ et $\beta 2$. Deux domaines sont reconnus : un domaine de liaison au glycogène dont la signification n'est pas encore bien établie et un domaine de liaison aux sous-unités α et γ. Il existe aussi dans le domaine N-terminal un site de myristoylation.

— et d'une sous-unité γ, dont il existe trois isoformes, $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$. Dans chacune de ces isoformes, quatre domaines CBS (CBS1 et CBS2, CBS3 et CBS4) répétés en deux tandems sont présents ; ils forment deux domaines BATEMAN et leur rôle est de lier les nucléotides ATP, ADP et AMP.

Chacune des isoformes des sous-unités α, β et γ sont codées par des gènes différents avec des profils d'expression variant en fonction des tissus [276], avec douze combinaisons théoriques [18]. Des variants d'épissage sont également possibles. Ce profil

18. Cependant, seulement certaines sont observées physiologiquement.

d'expression particulier permettrait d'adapter l'activité et les modes d'activation de l'AMPK en fonction du tissu et de ses contraintes énergétiques.

3.2.5 Activation de l'AMPK.

L'activation de l'AMPK dépend de deux mécanismes coopératifs (voir figure 3.2) [276–278].

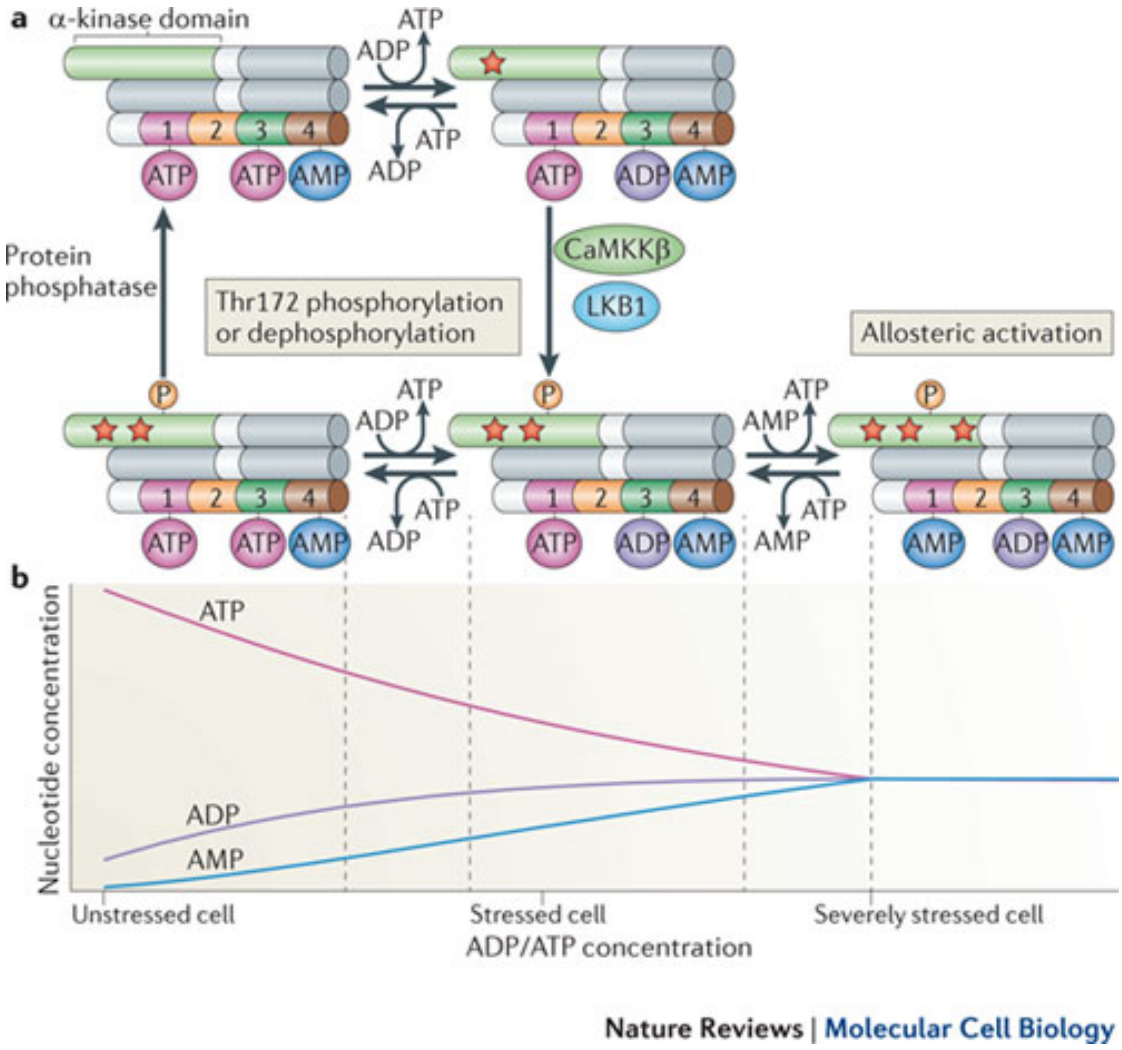


FIGURE 3.2 – Schéma classique de l'activation de l'AMPK **a** : Activation progressive de l'AMPK de façon allostérique par fixation différentielle des nucléotides ADP et AMP sur les différents sites CBS de la sous-unité régulatrice γ et par phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité catalytique α par LKB1 ou CAMKK2. Le nombre d'étoiles indique le niveau d'activité kinase de l'AMPK. **b** : Variation des concentrations intracellulaire en ATP, ADP et AMP en fonction du stress énergétique. Issu de [277].

Le premier est la fixation différentielle des différents nucléotides ATP, ADP et AMP sur les différents sites CBS de la sous-unité γ de l'AMPK. Le site CBS2 n'a pas la capacité de se lier à un de ses nucléotides et le site CBS4 est toujours lié à l'AMP. En revanche, le site CBS1 peut lier l'ATP ou l'AMP et le site CBS3 peut lier l'ATP ou l'ADP. Les sites CBS1 et CBS3 constituent donc respectivement les senseurs des ratios cellulaires AMP/ATP et ADP/ATP. À l'état basal, ces deux sites CBS1 et CBS3 sont liés à l'ATP. Un premier niveau d'activation survient lors d'un stress énergétique modéré avec élévation du ratio ADP/ATP : l'ATP est remplacé par l'ADP sur le site CBS3. Cette modification va permettre la phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité α, nous y reviendrons ci-dessous. Un second niveau d'activation survient dans des conditions de stress énergétique plus marqué avec de forts ratios ADP/ATP et AMP/ATP : l'ATP du site CBS1 est remplacé par une molécule d'AMP, augmentant encore plus l'activité kinase de l'AMPK. Selon ce modèle, l'ADP et l'AMP agissent comme des activateurs allostériques de l'AMPK.

Le second mécanisme nécessaire à l'activation de l'AMPK est la phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité α. Cette phosphorylation ne peut se produire qu'après l'échange nucléotidique $ATP \rightarrow AMP$ sur le site CBS3. Cette phosphorylation est assurée par LKB1 et accessoirement par CAMKK2. Elle permet d'augmenter d'un facteur 100 le niveau d'activité de l'AMPK. LKB1 a une activité basale importante [279] et la phosphorylation sur le résidu Thr172 se produit quand le site CBS est lié à l'ATP. En revanche, CAMKK2 nécessite une augmentation du contenu intracellulaire en Ca^{2+} pour phosphoryler ce résidu.

Le retour à l'état basal se fait par le remplacement progressif des nucléotides échangés sur les sites CBS1 et CBS3 par des nucléotides ATP, ce qui permet la déphosphorylation du résidu Thr172 [277].

Une étude récente vient un peu nuancer cette vision des choses. Il semble que ce soit l'AMP et non l'ADP sur la sous-unité γ qui soit capable d'induire la phosphorylation du résidu Thr172 par LKB1. De même, l'AMP semble plus efficace que l'ADP pour inhiber la déphosphorylation de ce résidu [280]. L'AMP serait donc le régulateur central de l'AMPK : activateur allostérique, favorisant la phosphorylation et inhibant la déphosphorylation.

Plus récemment, un nouveau paradigme semble se dessiner (voir figure 3.3 page suivante). Si la phosphorylation de l'AMPK par LKB1 peut se faire simplement *in vitro*, rendant ce mécanisme indépendant des organelles cellulaires, quelques travaux récents suggèrent que cette interaction est facilitée quand l'AMPK et LKB1 sont adressés à la membrane du lysosome. En effet, une équipe a montré que la phosphorylation de l'AMPK par LKB1 était facilitée par le recrutement de ces deux protéines sur l'AXIN1 et que la mise en place de ce complexe AMPK/LKB1/AXIN était initiée par l'AMP [281]. De plus la même équipe a montré que le complexe

lysosomal v-ATPase-ragulator, un activateur de mTORC1, était essentiel pour l'activation de l'AMPK. Selon leurs données, en condition de stress énergétique, le complexe v-ATPase-ragulator recrute AXIN/LKB1 au lysosome facilitant la phosphorylation de l'AMPK par LKB1. Dans le même temps, l'Axine inhiberait l'activité GEF [19] de ragulator, inactivant mTORC1. Ces données offrent une place de choix au lysosome pour la régulation du métabolisme cellulaire, orchestrant le *switch* entre anabolisme et catabolisme en conditions de stress énergétique [282].

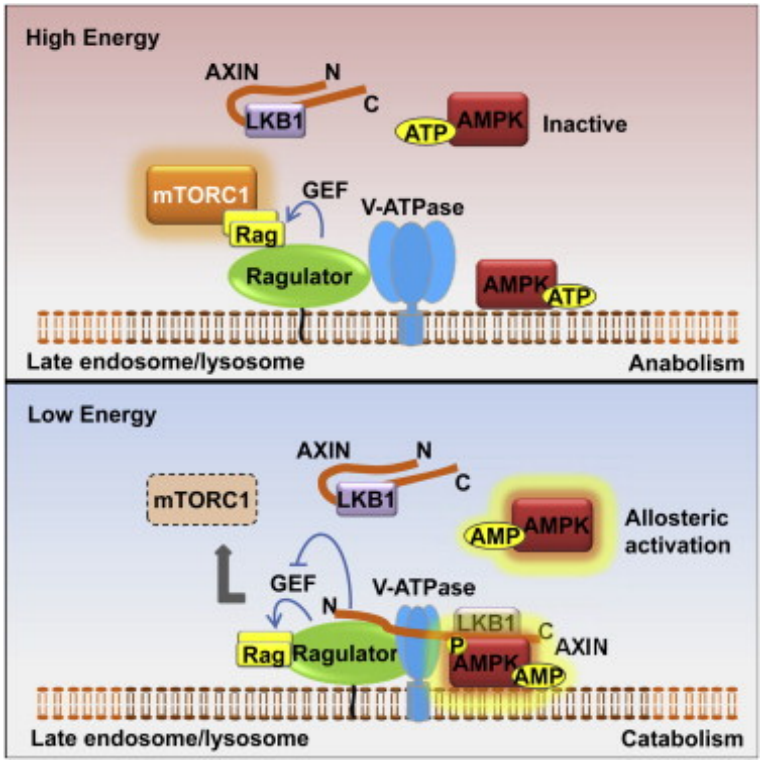


FIGURE 3.3 – v-ATPase-Ragulator orchestre le *switch* entre les signalisations mTORC1 et AMPK à la membrane lysosomale. Quand les nutriments sont abondants dans le cellule, la v-ATPase est active et stimule l'activité GEF de Ragulator envers Rags. mTORC1 est donc activé, orchestrant un programme anabolique. En condition de stress énergétique, la v-ATPase et Ragulator sont inactifs et accessibles à une fixation de l'Axine qui va inhiber l'activité GEF de Ragulator, dissociant le complexe mTORC1 du lysosome. Les concentrations élevées d'AMP accompagnant le stress énergétique facilitent la liaison de l'AMPK au complexe LKB1/Axine et sa phosphorylation sur le résidu Thr172 par LKB1. Une partie de l'AMPK est donc recrutée au lysosome pour être activée, orchestrant un programme catabolique. Issu de [282].

Les rôles propres de l'AMPK sont nombreux et concernent aussi bien le métabolisme glucidique, lipidique et protéique que la biogenèse mitochondriale, l'autopha-

19. guanine nucleotide exchange factor

gie, la polarité cellulaire, le cycle cellulaire, *etc.* Ils sont détaillés dans d'excellentes revues [276–278] et seront en partie repris dans la section suivante.

3.3 Une kinase multi-tâches

3.3.1 Contrôle des kinases de la famille ARK

Outre l'AMPK, LKB1 est capable d'activer au moins douze autres kinases (voir figure 3.4 page suivante). Ces kinases appartiennent toutes à la famille de l'AMPK dans le dendrogramme du kinome, leur valant le nom générique d'*AMPK-related kinases* (ARK). En particulier, elles partagent la même séquence peptidique que l'AMPKα dans leur boucle d'activation. De façon intéressante, l'activité catalytique de ces différentes kinases est augmentée d'un facteur 50 suite à leur phosphorylation par LKB1, est quasiment nulle dans les cellules n'exprimant pas *LKB1* et n'est pas modifiée par des activateurs classiques de l'AMPK comme la phenformine ou l'AICAR [283, 284]. Cette découverte a permis de placer LKB1 au rang de kinase maître, en amont de tout un réseau de kinases aux fonctions physiologiques différentes. Ces kinases sont les suivantes : BRSK1 [20], BRSK2 [21], NUAK1 [22], NUAK2 [23], SIK1, SIK2 [24], SIK3 [25], MARK1, MARK2, MARK3, MARK4 et SNRK. Huit autres kinases de la famille ARK ne sont pas phosphorylées par LKB1. Une raison possible pour leur non activation est qu'elles ne possèdent pas la séquence préférentielle de phosphorylation par LKB1, laquelle est la présence d'un résidu leucine en position $n-2$ du résidu thréonine à phosphoryler [216].

3.3.2 Contrôle du métabolisme glucidolipidique.

LKB1 joue un rôle majeur dans le métabolisme énergétique cellulaire, en orchestrant la réponse métabolique au stress énergétique. Ce rôle est essentiellement relayé par l'AMPK, principal senseur énergétique de la cellule et cible positive canonique de LKB1 (voir figure 3.5 page 99). Cette action se fait essentiellement par phosphorylation ou par régulation directe d'enzymes du métabolisme :

— l'AMPK favorise l'import de glucose dans la cellule. Le transporteur de glucose GLUT4, exprimé dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, n'est pas constitutivement actif. Il est en effet présent à l'état basal au sein de vésicules cytoplasmiques, qui sont transloquées à la membrane suite à

20. aussi appelée SAD-A
21. aussi appelée SAD-B
22. aussi appelée ARK5
23. aussi appelée SNARK
24. aussi appelée QIK
25. aussi appelée QSK

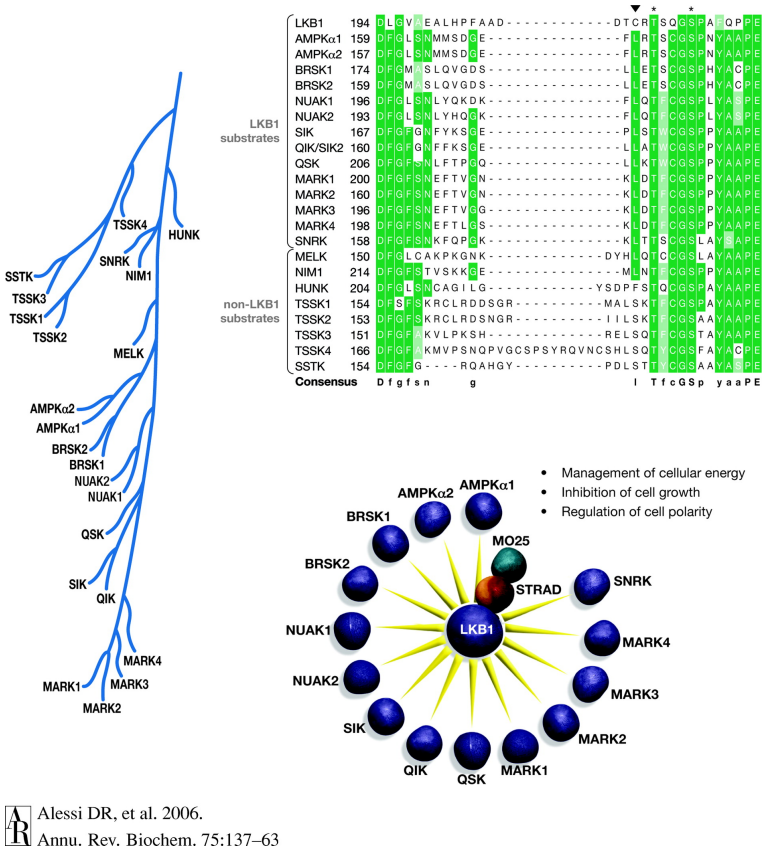


FIGURE 3.4 – Activation de la famille des *AMPK-related kinases* par LKB1. **À gauche** : Dendrogramme de la branche des *AMPK-related kinases* dans le kinome humain. **En haut et à droite** : Alignement multiple des séquences peptidiques de la boucle d'activation des différentes *AMPK-related kinases*. En vert foncé, les résidus totalement conservés. En vert clair, les résidus conservés dans plus de 50% des séquences. Les astérisques marquent les résidus thréonine et serine de la boucle d'activation, et la tête de flèche indique le résidu leucine conservé dans toutes les cibles de LKB1. **En bas et à droite** : Représentation schématique de l'activation des deux isoformes de l'AMPKα et des douze autres *AMPK-related kinases* par le complexe LKB1 :STRAD :Mo25. Issu de [216].

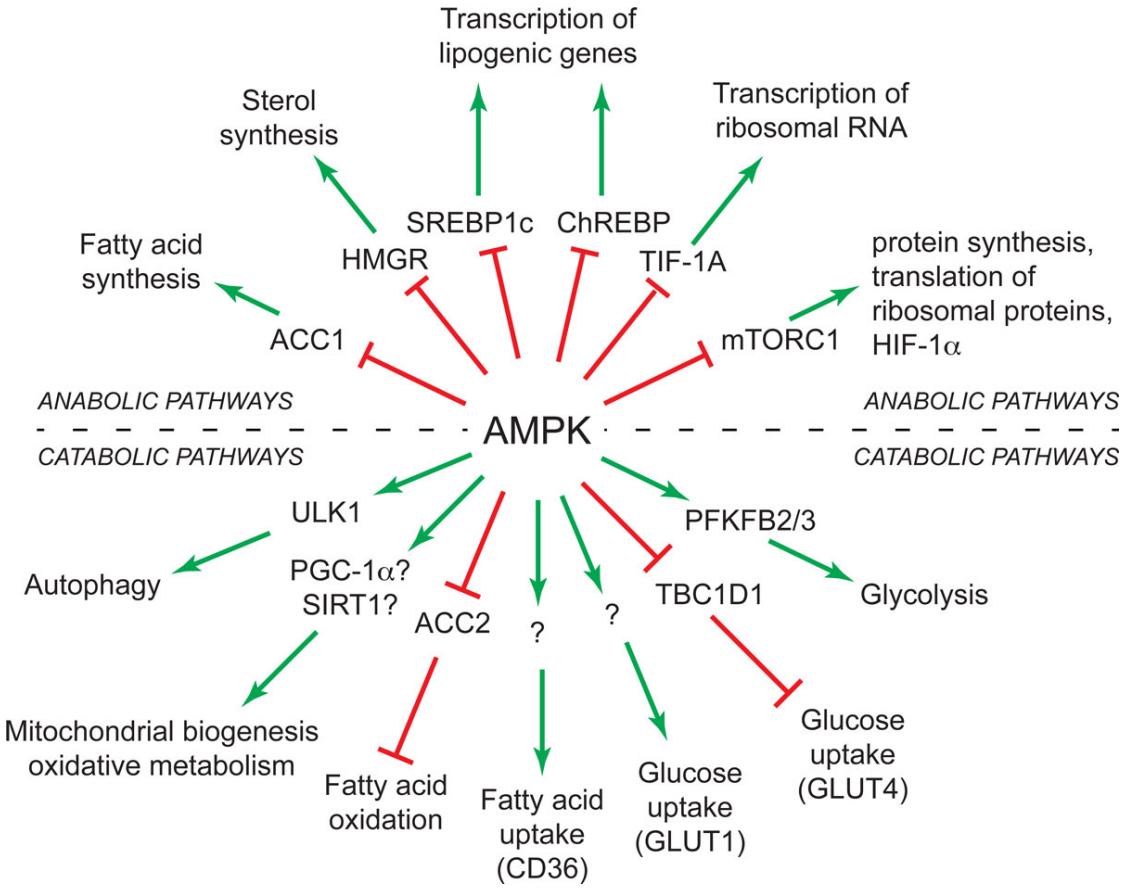


FIGURE 3.5 – Rôles métaboliques de l'AMPK. Issu de [277].

une stimulation insuline. Il a été montré que l'AMPK, en l'absence d'insuline, pouvait également activer l'exocytose de GLUT4. En effet, l'AICAR et l'exercice musculaire favorisent l'entrée du glucose selon un mécanisme indépendant de la voie PI3K/AKT. Ceci passe notamment par le contrôle de Rab GTPases [276]. Dans le muscle, l'AMPKα2 peut transloquer au noyau, notamment lors d'un exercice prolongé ; cette isoforme pourrait avoir des effets d'activateurs transcriptionnels sur le gène *GLUT4* [276, 277, 285].

— l'AMPK favorise la glycolyse. En effet, l'AMPK est capable d'activer par phosphorylation l'activité phosphofructokinase-2 de l' enzyme bifonctionnelle, permettant la phosphorylation du fructose 6-phosphate en fructose 2,6-bisphosphate, lequel est un puissant inducteur de l'activité phosphofructokinase -1 (enzyme clé de la glycolyse). Cet effet est cependant limité aux isoformes II (cardiaque) et III (ubiquitaire) de l'enzyme bifonctionnelle et non à l'isoforme hépatique qui est contrôlée par l'insuline et le glucagon

[286, 287].

— l'AMPK inhibe la glycogénogenèse et active la glycogénolyse. En effet, l'AMPK est capable d'inhiber par phosphorylation la glycogène synthase, enzyme de la glycogénogenèse et d'activer par phosphorylation la phosphorylase kinase, enzyme de la glycogénolyse [276, 288].
— l'AMPK favorise l'import des acides gras en favorisant la translocation à la membrane du transporteur CD36, selon un mécanisme non encore élucidé [289].
— l'AMPK active la β-oxydation des acides gras et inhibe la lipogenèse. Ceci est secondaire à l'inhibition par phosphorylation des deux isoformes de l'acétylCoA-carboxylase, enzyme clef de la biosynthèse des acides gras. Le produit réactionnel de ces enzymes, le malonyl-CoA est un puissant inhibiteur allostérique de la carnitine palmitoyltransferase CPT1A. La CPT1A favorise l'import mitochondrial des acides gras qui est l'étape limitante de la β-oxydation [290, 291].
— l'AMPK inhibe l'estérification des acides gras en inhibant l'activité glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT) [292].
— l'AMPK inhibe la biosynthèse du cholestérol, en inhibant par phosphorylation l'HMGCR, enzyme clef de la voie du mévalonate [293].

Cependant, il a été montré que l'implication de l'AMPK dans le métabolisme passait également par un contrôle cette fois transcriptionnel de l'expression de différentes enzymes. L'AMPK est en effet capable de phosphoryler et d'inactiver SREBF1 (SREBP-1c) dont le rôle est d'induire un programme transcriptionnel favorisant la biosynthèse des acides gras [26] [294]. De même, l'AMPK phosphoryle et inactive CRTC2, co-activateur transcriptionnel de CREB1, lequel contrôle un programme de néoglucogenèse [27] [128, 295]. Un niveau supplémentaire de complexité réside en l'inactivation par phosphorylation des HDAC [28] de classe IIa, résultant en leur séquestration cytoplasmique par liaison aux protéines 14-3-3. En réponse au glucagon, ces HDAC peuvent être déphosphorylées et, une fois dans le noyau, induisent la déacétylation des facteurs de transcription de la famille FOXO, à l'origine d'un programme transcriptionnel de néoglucogenèse [296]. L'AMPK active également une autre HDAC qui est SIRT1 [29]. Cette activation semble être secondaire à l'augmentation de la concentration cellulaire en NAD^+ [30]. Une des fonctions métaboliques de SIRT1 est de déacétyler et d'activer le facteur de transcription PPARGC1A, impliqué dans la biogenèse mitochondriale et dans la néoglucogenèse [297].

26. induction de *FASN* et *ACACA*
27. induction de *PCK1* et de *G6PC*
28. *Histone DeACetylases*
29. SIRT1 fait partie de la classe III des HDAC.
30. car la β-oxydation est activée par l'AMPK dans un contexte de stress énergétique

L'ensemble de ces données suggère que l'AMPK, en aval de LKB1, orchestre un programme métabolique de réponse au stress énergétique en favorisant le catabolisme et en inhibant l'anabolisme. Cependant, plusieurs modèles murins ont montré que les choses n'étaient pas si simples et que les rôles physiologiques *in vivo* de Lkb1 et de l'Ampk n'étaient pas complètement superposables (pour revue [285, 298, 299]. Par exemple, dans le muscle strié squelettique, les rôles métaboliques de Lkb1 semblent être relayés par Ampkα2 et non par Ampkα1 [298]. De plus, la délétion hépatospécifique de *Lkb1* s'accompagne d'une diminution de l'activité Ampk et d'une hyperglycémie. Cette hyperglycémie est secondaire à une production hépatique de glucose accrue suite à la non séquestration cytoplasmique de Crtc2. De plus, l'hyperglycémie ne répondait pas à la metformine, activateur de l'Ampk [128]. En revanche, la délétion de *Lkb1* spécifiquement dans le muscle s'accompagne d'une meilleur tolérance au glucose et d'une meilleure sensibilité à l'insuline [300]. De même, l'invalidation de *Lkb1* spécifiquement dans le foie ou le muscle strié s'accompagne respectivement d'une augmentation [128] et d'une diminution [300] de l'expression de *Ppargc1a*. Si ceci peut peut-être se voir comme secondaire à la distribution tissu-spécifique des différents hétérotrimères $\alpha\beta\gamma$ de l'AMPK [285], il est également possible que tous les effets métaboliques de LKB1 ne passent pas exclusivement par l'AMPK, mais impliquent au contraire les différentes autres kinases de la famille ARK en aval de LKB1 et qui ont aussi une distribution variable en fonction des tissus [238, 301]. L'expression de *LKB1* varie également en fonction des organes et du stade de développement [216]. Pour aller dans ce sens, l'invalidation hépatospécifique d'*Ampk* (sous-unités α1 et α2) [302] ne phénocopie pas celle de *Lkb1* [128] décrite ci-dessus : en effet, alors que l'activité d'Ampk est quasi nulle, les animaux présentent une glycémie normale que ce soit à jeun ou à l'état nourri et répondaient comme les animaux contrôle à la metformine alors que l'invalidation de *Lkb1* s'accompagne également d'une activité Ampk quasi nulle mais les animaux présentent une hyperglycémie insensible à la metformine. Pour expliquer ce fait, des données récentes suggèrent que l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique induite par LKB1 serait en fait relayée par les kinases de la famille SIK et non par l'AMPK [303].

Les modèles murins ont montré un rôle important de l'axe LKB1/AMPK hépatique et musculaire pour le contrôle du métabolisme à l'échelle de l'organisme entier. Il en est de même pour le pancréas où Lkb1 a été montré comme régulant négativement la taille/masse des cellules β et la sécrétion d'insuline. Les animaux *Lkb1 KO* montraient une meilleure tolérance au glucose et des insulinémies plus élevées [304, 305]. De même l'axe LKB1/AMPK est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire au niveau central [277, 278]. Enfin, l'axe LKB1/AMPK est impliqué dans le dialogue métabolique interorgane médié par les hormones comme l'adiponectine, la leptine, la ghréline et le système activine/resistine [276].

Il apparaît que LKB1 est également impliqué dans le contrôle des réserves énergétiques de l'organisme. Une étude chez *Caenorhabditis elegans* a montré que *par-4*, l'homologue de *LKB1*, était important lors d'un stade larvaire particulier appelé *dauer*. Pendant ce stade, la larve est soumise à des conditions environnementales difficiles et entre dans un état de diapause. Avant d'entrer dans cette phase, les larves constituent d'importantes réserves glucidiques et lipidiques. Pendant la phase *dauer*, elle reste active et mobile mais ne se nourrit plus et restreint ses stocks énergétiques avec augmentation de la durée de vie. L'invalidation totale de *par-4* s'accompagne d'un épuisement très rapide des réserves énergétiques, notamment en lipides avec un net raccourcissement de la survie [306]. Le même mécanisme a été montré chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) chez lequel l'invalidation totale de *lkb1* induisait une épuisement rapide des réserves énergétiques et la mort des animaux une fois les réserves du sac vitellin échues [307]. Ainsi, dans ces deux organismes modèles, LKB1 est nécessaire pour le rationnement des réserves énergétiques en cas de stress métabolique.

Chez les mammifères, il est difficile de connaitre la réponse à cette question car l'invalidation constitutive de *Lkb1* est létale *in utero*. En revanche certains signaux nous indiquent que Lkb1 pourrait avoir le rôle inverse, *i.e.* de favoriser l'amaigrissement. En ce sens, des souris invalidées pour la tyrosine kinase *Fyn* présentent une réduction de leur masse grasse associée à une β-oxydation et une dépense énergétique accrues avec activation de l'Ampk dans le tissu adipeux et musculaire strié squelettique [308]. Il a été montré que Fyn était capable de phosphoryler Lkb1 sur les résidus Tyr261 et Thyr365, séquestrant Lkb1 dans le noyau et empêchant son export cytoplasmique. L'inhibition de Fyn résulterait en la translocation au cytoplasme de Lkb1 et en l'activation de l'Ampk et de la dépense énergétique, induisant l'amaigrissement [309].

LKB1 joue également un rôle important dans le contrôle de l'autophagie, notamment de la mitophagie. La voie moléculaire particulièrement impliquée est la voie AMPK/ULK1 [310]. L'autophagie est le processus cellulaire de recyclage des composants cytoplasmiques qui sont dysfonctionnels ou surnuméraires, par leur encerclement dans des vacuoles autophagiques qui fusionnent secondairement avec les lysosomes. Le processus est particulièrement important en conditions de stress énergétique ou de jeûne pour subvenir aux besoins cellulaires en acides aminés et substrats énergétiques catabolisables. Parallèlement, l'axe LKB1/AMPK favorise également la biogenèse mitochondriale, notamment *via* l'induction transcriptionnelle de *PPARGC1A* (PGC1α). Les mécanismes possibles sont nombreux et encore flous [310]. D'un point de vue finaliste, l'axe LKB1/AMPK jouerait donc un rôle important dans le contrôle de la masse mitochondriale intracellulaire, pourvoyeuse à la fois d'acides aminés et de substrats énergétiques *via* la mitophagie et d'ATP *via* la biogenèse mitochondriale et l'augmentation de la capacité globale de la chaîne

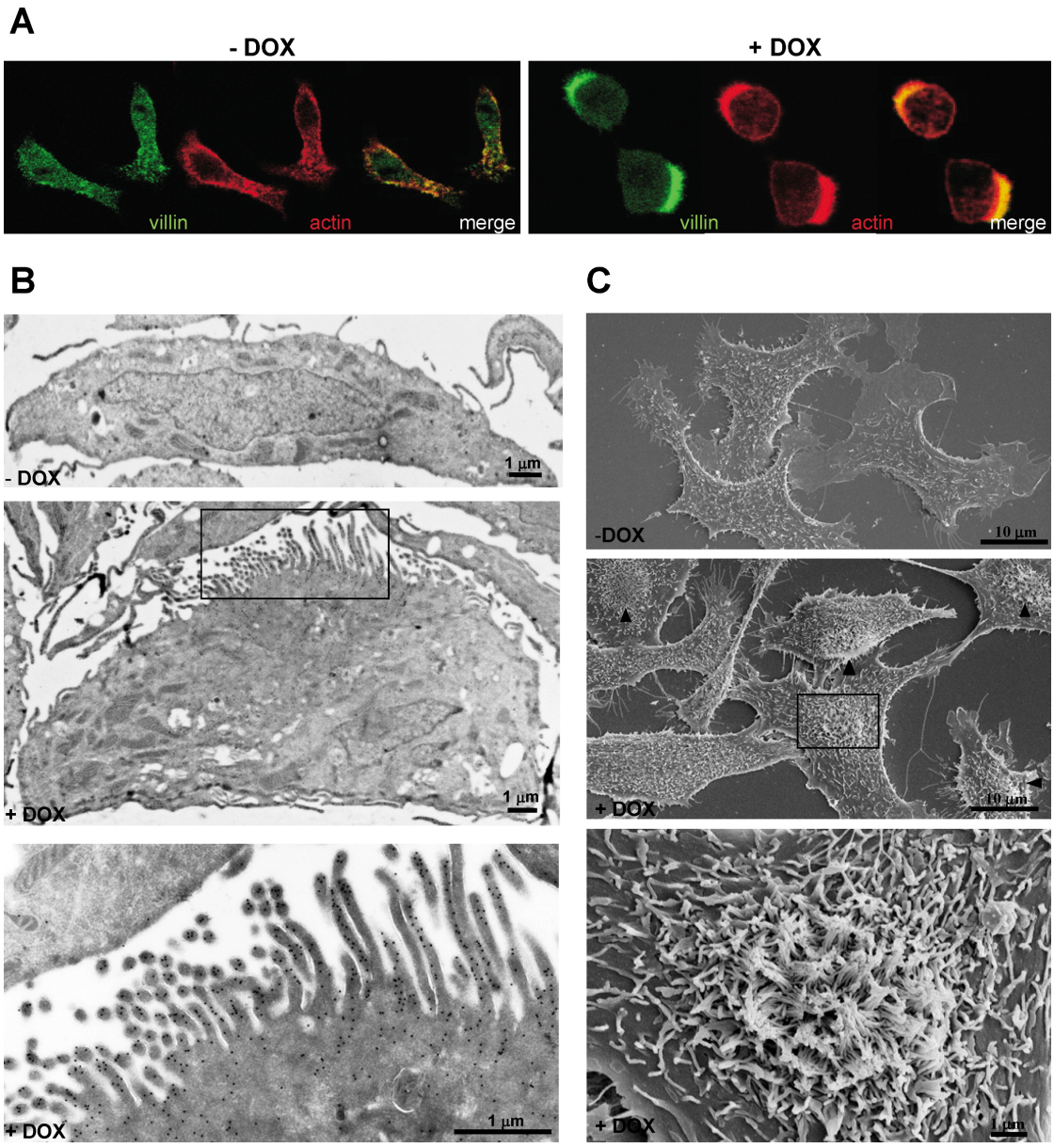
respiratoire [310]. Dans le muscle, l'activation de l'AMPK conduit à une biogenèse mitochondriale accrue avec une meilleure endurance à l'effort [311].

3.3.3 Contrôle de la polarité cellulaire.

LKB1 est un acteur essentiel pour la mise en place de la polarité cellulaire et de la division asymétrique chez *Caenorhabditis elegans* [212, 312] et *Drosophilia melanogaster* [313, 314]. Chez le mammifère, une expérience *princeps* a été réalisée sur la lignée carcinomateuse colique LS174T qui n'exprime presque pas *LKB1* et qui ne présente pas de polarisation épithéliale, même à confluence. Après transfection de ces cellules avec un plasmide codant *STRADA*, inductible par la doxycycline, et un plasmide codant *LKB1*, l'ajout de doxycycline au milieu de culture permet l'accumulation cytoplasmique de LKB1 et la mise en place d'une complète polarisation apicobasale avec formation d'une bordure en brosse au pôle apical. Cette polarisation cellulaire se fait en dehors de tout contact intercellulaire, de façon *cell autonomous*. De plus, il existe une ségrégation correcte des marqueurs apicaux et basolatéraux de même que des complexes jonctionnels autour de la bordure en brosse (voir figure 3.6 page suivante) [315].

De la même manière, LKB1 est nécessaire à la formation d'axones dans des neurones en culture [316] mais aussi dans des modèles murins d'invalidation neurospécifique de *Lkb1* ou de deux kinases en aval, (*Brsk1* et *Brsk2*) [317]. Un autre exemple dans lequel LKB1 a montré ses rôles dans la polarité cellulaire est celui du pancréas. La délétion de *Lkb1* spécifiquement dans le pancréas entraîne le remplacement progressif des structures acineuses du pancréas exocrine en structures canalaires ; il existe de plus une certaine altération de la polarité cellulaire qui, sans être complètement perdue, montre quelques défauts d'adressage membranaire de certains marqueurs apicaux ou basolatéraux [318]. Dans les cellules β-langerhansiennes, la perte de *Lkb1* induit une modification de la polarité cellulaire, qui passe d'un type hépatocytaire à un type apicobasal simple. Dans ce modèle, la taille des cellules est augmentée, et des modifications de la position du noyau et du cil primaire sont observées. Les fonctions métaboliques sont également modifiées car ce phénotype de polarité s'accompagne d'une hypersécrétion d'insuline par ces cellules [304]. LKB1 joue également un rôle important dans le contrôle de la migration cellulaire en inhibant notamment la polymérisation des microtubules [319].

Cependant, en dehors de ces quelques exemples, le rôle de LKB1 dans la polarité cellulaire semble être assez modeste chez les mammifères. En effet, l'invalidation constitutive de *Lkb1* est létale *in utero* sans que les embryons ne présentent de défauts évidents de polarisation cellulaire [233]. De même, dans les différents modèles murins de syndrome de Peutz-Jeghers, même au sein des polypes hamartomateux, il n'est pas observé d'altération de la polarité épithéliale. En culture



.

FIGURE 3.6 – Polarisation cellulaire induite par LKB1. La lignée cellulaire intestinale colorectale LS174T n'exprime pas *LKB1* et ne présente pas de polarité cellulaire en culture. Après transfection avec un plasmide codant LKB1 et un plasmide inductible par la doxycycline codant STRADA, l'ajout de doxycycline permet l'apparition d'une bordure en brosse. **A** : Marquage de la villine et de l'actine en présence et en l'absence de doxycycline. **B** : microscopie électronique par transmission avec cryofracture et immunomarquage de l'actine (particule d'or), montrant l'apparition de microvillosités après traitement par la doxycycline. **C** : microscopie électronique à balayage, montrant l'apparition de microvillosités après traitement par la doxycycline. Issu de [315].

cellulaire, l'invalidation de *LKB1* dans deux lignées hautement polarisées, MDCK et CaCo2, ne s'accompagne que d'un retard modéré dans la mise en place de la polarité cellulaire [267].

D'une façon générale, à part pour l'axonogenèse qui semble passer *via* BRSK1 et BRSK2, les signaux de polarité induits par LKB1 sont essentiellement relayés par l'activation des kinases de la famille MARK [31] [298]. Cependant l'AMPK est aussi apparue comme étant impliquée, dans certaines conditions, dans la mise en place de la polarité épithéliale, liant polarité et métabolisme.

Par exemple, chez la drosophile, lkb1 n'est nécessaire à la polarisation des cellules épithéliales folliculaires ovariennes qu'en conditions de stress énergétique (restriction en glucose et en extrait de levure), et ce d'une manière ampk dépendante [320]. Les cellules LS174T sont capables de se polariser, également d'une manière AMPK dépendante, quand elles sont traitées avec du 2-deoxy-D-glucose, un inducteur du stress énergétique [321]. De plus, dans ces cellules, et chez la drosophile, l'invalidation de *LKB1* phénocopie celle de l'*AMPK*, indiquant que les deux acteurs fonctionnent de concert [321]. LKB1 semble donc important dans la polarité cellulaire en condition de stress énergétique, selon une modalité passant par l'AMPK.

Le fait que les différents modèles murins d'invalidation de *Lkb1* ne présentent pas de phénotype majeur en termes de polarité cellulaire peut s'expliquer par la certaine redondance du système moléculaire contrôlé par Lkb1 et/ou par Ampk [322]. En effet, des quatorze kinases contrôlées par LKB1, toutes ont virtuellement la capacité d'activer la mise en place ou la maintenance de la polarité cellulaire, notamment les deux isoformes de la sous-unité α de l'AMPK, BRSK1, BRSK2 et les 4 membres de la familles MARK [323]. De plus, l'AMPK peut être activée par CAMKK2 en l'absence de LKB1, en intégrant la signalisation Ca^{2+} [32].

Les rôles de LKB1 dans la polarité hépatocytaire ont surtout été étudiés dans des modèles de culture primaire « en sandwich » d'hépatocytes de rat (revus en [326]). Dans ce modèle, l'invalidation de *Lkb1* empêche la formation d'un réseau canaliculaire biliaire, d'une façon dépendante de l'AMPK car le 2-deoxy-D-glucose et l'AICAR, activateurs de l'AMPK, sont capables de corriger ce phénotype. *In vivo*, le phénotype dépend du moment auquel *Lkb1* est invalidé. Quand *Lkb1* est invalidé dans le foie adulte, aucun phénotype de polarité hépatocytaire n'est observé [128]. Quand il l'est au cours du développement, le phénotype de polarité hépatocytaire est discret, caractérisé par une dilatation canaliculaire et un défaut d'adressage membranaire de certains marqueurs comme la radixine ou des transporteurs biliaires [327]. S'y associe une cholestase biologique [33].

31. *MAP/microtubule affinity-regulating kinase*

32. Ceci a été très bien montré dans le modèle de *calcium switch* dans la lignée rénale canine MDCK (Madin Darby *canine kidney*) [324, 325].

33. Cette cholestase est cependant essentiellement à bilirubine libre, laissant à penser que

Si LKB1 semble être requis pour la polarité cellulaire en conditions de stress énergétique, il semble que ce soit également le cas en conditions de stress oncogénique. De plus certaines données suggèrent que la polarité cellulaire induite par LKB1 exerce des fonctions anti-prolifératives. En effet, les cellules mammaires MCF10A développent des structures acineuses quand elles sont cultivées dans du *Matrigel*. L'invalidation de *LKB1* par interférence par l'ARN conduit à une perte de la polarité de ces cellules ; cette perte de polarité s'accompagne alors de la levée d'un frein sur la prolifération cellulaire induite par *MYC*. La perte de leur polarité est ainsi nécessaire à leur prolifération par l'oncogène MYC [328]. Ce rôle particulier de LKB1 n'est cependant pas observé quand ces cellules sont cultivées en deux dimensions (culture conventionnelle sur plaques) [329].

3.3.4 Contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaires.

Les rôles négatifs de LKB1 sur la croissance cellulaire ont surtout été bien caractérisés dans l'inhibition de la voie mTOR. mTOR est une Ser/Thr kinase qui est présente dans le cytoplasme au sein de deux complexes différents (voir figure 3.7 page ci-contre) :

— le complexe mTORC1, comprenant MTOR, RPTOR (Raptor), AKT1S1, MLST8 et DEPTOR, est partiellement inhibé par la rapamycine. mTORC1 intègre de nombreux signaux transduisant l'activité de facteurs de croissance et les quantités locales en nutriments et énergie pour promouvoir la croissance cellulaire quand les conditions sont favorables, ou le catabolisme en condition de stress énergétique. Les activités biologiques contrôlées positivement par mTORC1 sont la traduction de protéines, la résistance à l'autophagie, la biogenèse ribosomale, le métabolisme mitochondrial et la lipogenèse.

— le complexe mTORC2, comprenant MTOR, RICTOR, MLST8, MAPKAP1 (Sin1), PRR5 et PRR5L (Protor-1 et -2) et DEPTOR. Il promeut, entre autres, la survie cellulaire en activant AKT. La rapamycine est capable également d'inactiver mTORC2, cependant seulement en administration chronique et dans certains types cellulaires [330].

La signalisation mTOR est impliquée dans de nombreux mécanismes physiopathologiques dont le cancer, les maladies cardiovasculaires et métaboliques [331]. Suite à son activation par AKT, mTORC1 phosphoryle deux cibles importantes impliquées dans la traduction des ARN : l'activateur traductionnel RPS6KB1 (p70 S6 kinase) est activé suite à sa phosphorylation alors que le répresseur traduction-

l'origine de l'hyperbilirubinémie n'est pas uniquement secondaire à un défaut de sécrétion hépatocytaire de bile.

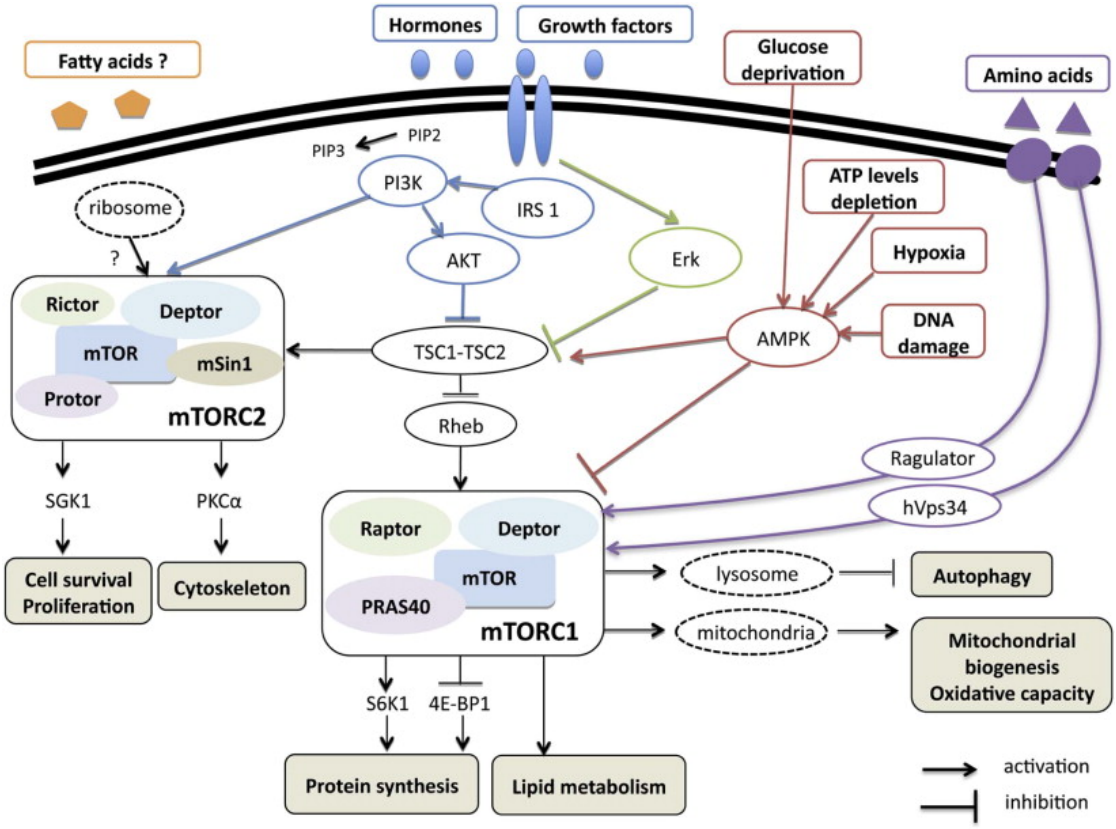


FIGURE 3.7 – Signalisation mTOR : les complexes mTORC1 et mTORC2. Issu de [331].

nel et EIF4EBP1 (4E-BP1) est inhibé par sa phosphorylation. L'activation de mTORC1 résulte donc en une induction de la synthèse protéique, notamment de protéines oncogéniques comme MYC, HIF1A et CCND1 (cycline D1).

mTORC1 est régulé négativement par le complexe TSC1[34]/TSC2[35]/TBC1D7. Ce complexe est inhibé par sa phosphorylation par AKT, MAPK ou RSK, transduisant la signalisation de différents facteurs de croissance comme EGF, IGF et insuline. A l'inverse, ce complexe est activé suite à sa phosphorylation par l'AMPK, empêchant l'activation de mTORC1 en conditions de stress énergétique. AMPK inhibe également mTORC1 en phosphorylant RPTOR. Cependant, l'activation de mTORC1 ne peut avoir lieu qu'en présence de quantités suffisantes d'acides aminés, notamment en leucine. Les mécanismes cellulaires impliqués dans le *sensing* des acides aminés sont encore mal caractérisés ; ils impliquent notamment les GTPases Rag, le complexe Ragulator et la v-ATPase, tous localisés à la membrane

34. hamartine
35. tubérine

lysosomale [332]. Cette régulation complexe de mTORC1 permet que son activation par les facteurs de croissance et la signalisation AKT ne soit effective qu'en présence de conditions favorables en termes d'énergie et de contenu intracellulaire en acides aminés.

Le principal rôle de mTORC2 est de phosphoryler AKT sur le résidu Ser473, augmentant fortement son activité. L'autre résidu dont la phosphorylation est requise pour l'activation d'AKT est la Thr308, phosphorylé par la PI3Kinase. mTORC2 phosphoryle et active également PRKCA (PKCα) et SGK1. La résultante est une stimulation de la croissance et de la prolifération cellulaires. mTORC2 est également impliqué dans le cytosquelette. Sa régulation est encore peu connue ; l'insuline semble l'activer mais les intermédiaires ne sont pas encore définis [332].

Des mécanismes de rétro-contrôle négatif existent. mTORC1 est capable de freiner la signalisation des facteurs de croissance en promouvant la dégradation d'IRS1 ou la stabilisation de GRB10, un frein à la signalisation des facteurs de croissance. RPS6KB1, cible positive de mTORC1 exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant par phosphorylation la PI3K et le complexe mTORC2 (sur RICTOR et MAPKAP1 (Sin1)).

In vivo, il a été montré que LKB1, *via* l'AMPK, contrôle négativement la voie mTORC1. La délétion de *Lkb1* spécifiquement dans le pancréas s'accompagne d'une augmentation du volume des cellules β-langerhansiennes, phénomène disparaissant suite à un traitement par la rapamycine, inhibiteur de mTORC1 [304, 305]. Le même phénomène est observé quand *Lkb1* est invalidé spécifiquement dans le cœur avec apparition d'un phénotype d'hypertrophie myocardique, corrigé également par la rapamycine [333]. De même, la voie mTORC1 est activée dans les polypes de Peutz-Jeghers [238, 334, 335] et dans les cancers du poumon avec perte-de-fonction de *LKB1* [336, 337].

Les rôles de LKB1 dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaires ne se limitent pas au contrôle négatif du complexe mTORC1. LKB1 est impliqué dans l'apoptose en contrôlant positivement TP53 [338] et CDKN1A [36] [339, 340] selon des mécanismes actuellement peu clairs. D'autres acteurs sont également identifiés [240, 323]. À noter qu'ATM, kinase impliquée dans le *check point* du dommage de l'ADN, est capable d'activer LKB1 par phosphorylation [257].

Enfin, des rôles de LKB1 dans le processus mitotique en tant que tel ont aussi été rapportés et semblent passer essentiellement *via* l'AMPK. L'AMPK est en effet capable de bloquer la phase S du cycle cellulaire quand les conditions énergétiques sont défavorables et est apparue également comme régulateur de la phase M, avec une implication dans l'orientation du fuseau mitotique et dans la cytokinèse (cytodiérèse) et une association topographique au centrosome et au fuseau [341–

36. qui code, P21, inhibiteur de kinases cycline-dépendantes.

344]. De façon importante, la perte de fonction de l'ampk chez la drosophile induit aneuploïdie et instabilité chromosomique [320, 321].

3.3.5 *LKB1* : oncogène ou gène suppresseur de tumeur ?

Les rôles physiologiques de LKB1 sont de limiter l'anabolisme, la croissance et la prolifération cellulaires tout en favorisant le catabolisme et la polarité. L'intégration du contexte énergétique cellulaire permet à LKB1 de lier ces différentes fonctions à l'état nutritionnel de la cellule. S'agissant là de fonctions cellulaires canoniques classiquement dérégulées dans le cancer [345], il n'est pas surprenant d'observer que *LKB1* est considéré comme un gène suppresseur de tumeurs. Conceptuellement, différents auteurs ont attribué les rôles de LKB1 dans la polarité [346], le métabolisme [310] et la croissance cellulaire [323] comme autant de freins potentiels à la tumorigenèse.

Chez l'Homme, plusieurs points supportent ce rôle de suppresseur de tumeurs. Tout d'abord, l'invalidation germinale de *LKB1* cause le syndrome de Peutz-Jeghers, syndrome de prédisposition au cancer avec un risque relatif d'environ 18 par rapport à la population générale [223, 224]. Le sujet épineux de la nécessité de l'invalidation du second allèle a déjà été abordé précédemment. De plus, *LKB1* est également muté de façon somatique dans certains cancers sporadiques comme les adénocarcinomes bronchopulmonaires (environ $10-40\%$) [337, 347–351], les adénocarcinomes biliaires et pancréatiques (environ 5%) [352] ou les carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus (environ 20%, avec une progression tumorale plus rapide) [353]. Les mutations de *LKB1* restent rares dans les autres types tumoraux [240]. Les études anciennes souffrent cependant de limites méthodologiques pour la détection des mutations [37] [240]. L'invalidation épigénétique de *LKB1* par hyperméthylation de son promoteur est également une modalité classique d'inactivation de LKB1 dans les cancers [255] mais n'a malheureusement pas été étudiée de façon extensive. À noter que les mutations des gènes codant les protéines situées en aval de LKB1, sont rarissimes dans le cancer, probablement en raison de la redondance fonctionnelle de ces différents acteurs [323].

L'apport des modèles murins a cependant nuancé ce rôle suppresseur de tumeurs de *LKB1* (pour revue [354]). En effet, le modèle $Lkb1^{+/-}$ constitutif s'accompagne d'une polypogenèse hamartomateuse intestinale, mais sans apparition de cancers intestinaux [231, 232, 234, 235, 237, 238]. Des cancers touchant d'autres organes surviennent cependant, mais avec une pénétrance faible et une latence assez longue (voir tableau 3.2), suggérant que d'autres *hits* oncogéniques sont nécessaires pour induire la carcinogenèse.

37. La technique MLPA (*Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification*) est le *gold standard* actuel [240].

Organe	Pénétrance	Âge	Commentaires	Réf.
Foie	70%(♂) 20%(♀)	40 semaines	LOH Morphologie variée*	[355]
Endomètre	$25-50\%$	50 semaines	AK bien diff.**	[356]
Os	$2-100\%$	40 semaines	T. ostéogéniques ?	[357]

Tableau 3.2 – Tumeurs malignes chez les souris $Lkb1^{+/-}$. *CHC et adénomes.** Adénocarcinomes bien différenciés.

Avec des approches spécifiques d'organe, l'invalidation totale (biallélique) de *Lkb1* dans l'endomètre (pénétrance : 65%, latence : 36 semaines) [356] et le sein (pénétrance : 20%, latence : 46-85 semaines) [358] s'accompagne de l'apparition de carcinomes infiltrants ; cependant, dans la prostate [359] et le pancréas [318, 340], seules des tumeurs bénignes ou de simples lésions pré-néoplasiques sont observées, et dans d'autres organes, aucun processus tumorigène ne se produit.

En revanche, la perte de *Lkb1* accélère la tumorigenèse induite par la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs comme *Tp53* et *Pten* ou par le gain de fonction d'oncogènes comme *Kras* muté. Les exemples incluent le carcinome bronchopulmonaire (modèle $Lkb1^{lox/+}$ / $Lkb1^{lox/lox}$; $Kras^{G12D}$ + AdV-*Cre*[38] en aérosols[39]) [337], le CHC (modèle $Lkb1^{+/-}$; $Tp53^{-/-}$[40]) [360], l'adénocarcinome pancréatique (modèle $Lkb1^{lox/+}$; $Kras^{G12D}$; *Pdx1-Cre*[41]) [340], les tumeurs papillaires urothéliales (modèle $Lkb1^{lox/lox}$; $Pten^{lox/lox}$; *Ah-CreER*^{T2}) [240], *etc.*

Ces différents modèles illustrent le rôle suppresseur de tumeurs de *LKB1* essentiellement dans le cadre d'une oncogenèse médiée par la perte d'un autre gène suppresseur de tumeurs ou par l'activation d'un oncogène. Isolément, son invalidation biallélique ne semble pas suffisante pour induire l'apparition de cancers. En ce sens, les mutations de *LKB1* dans les adénocarcinomes bronchopulmonaires humains sont très souvent associées à des mutations inactivatrices de *TP53* ou activatrices de *KRAS* [337, 347–351]. Ils permettent en outre d'appréhender une question actuellement encore en suspens : qui de la perte totale ou de l'haploinsuffisance de*LKB1* est importante dans l'oncogenèse ? Les divergences de réponses apportées dans la littérature peuvent s'expliquer en partie par des écueils méthodologiques : microdissection ou non des cellules tumorales, technologie employée (immunohistochimie, western blot, expression des ARNm...). Certains auteurs proposent que c'est finalement le *dosage* absolu en LKB1 qui serait important, la perte

38. Adnéovirus codant la recombinase Cre

39. Par rapport aux souris hétérozygotes, les souris homozygotes pour l'invalidation de *Lkb1* présentent une latence diminuée pour l'apparition des cancers pulmonaires, avec un spectre microscopique plus large

40. Probable LOH *Lkb1* dans les CHC

41. Absence de LOH *Lkb1* dans les tumeurs infiltrantes

totale s'accompagnant éventuellement d'une progression plus rapide mais l'hémizigotie n'étant pas pour autant complètement neutre [298]. *LKB1* ne suivrait donc pas *stricto sensu* un modèle d'invalidation « à la KNUDSON » caractérisant les gènes suppresseurs de tumeurs classiques mais plutôt une modulation progressive de son niveau d'expression à la manière d'un rhéostat [361].

À l'inverse, certains travaux suggèrent que *LKB1* peut également se comporter dans certaines situations comme un véritable oncogène. En effet, les fibroblastes embryonnaires (MEF) issus d'embryons de souris $Lkb1^{-/-}$ sont résistants à la transformation induite par différents oncogènes comme *HRAS* ou l'antigène *T* de SV40 [234]. De même, LKB1 semble également être requis pour la survie des cellules tumorales en conditions de stress énergétique comme une privation en glucose du milieu de culture [362, 363].

Le métabolisme des tumeurs est souvent différent de celui de leur tissu d'origine. Le terme générique d'« effet WARBURG » a été proposé pour illustrer un type d'adaptation métabolique particulier par les cellules tumorales. De façon schématique, l'effet WARBURG permet la redirection des différents substrats métaboliques non pas vers le catabolisme, producteur d'énergie, mais vers l'anabolisme, producteur de biomasse. En effet, la croissance tumorale dépend plus de la biodisponibilité en substrats bioformateurs [42] qu'en substrats énergétiques [43]. Le *switch* entre catabolisme et anabolisme implique de nombreux mécanismes différents, aboutissant basiquement à une glycolyse accrue non couplée au métabolisme oxydatif mitochondrial, même en conditions aérobies. On parle volontiers de « glycolyse aérobie ». En d'autres termes, les atomes de carbone des différents substrats ne sont pas dirigés vers l'oxydation et leur transformation en CO_2 dans la mitochondrie, mais vers la synthèse de précurseurs bioformateurs protidiques, lipidiques et nucléotidiques dans le cytoplasme [364].

Comme principal régulateur du *switch* anabolisme→catabolisme en conditions de stress énergétique, plusieurs travaux décrivent l'implication de l'axe LKB1/AMPK dans l'adaptation métabolique de la cellule cancéreuse (revus en [365]). La perte de l'activité AMPK est observée dans plusieurs types tumoraux et coopère avec les altérations moléculaires oncogéniques *drivers* pour faciliter la croissance et la prolifération cellulaire en favorisant l'anabolisme. La perte de *LKB1* permet de promouvoir l'effet WARBURG dans les cellules tumorales [366]. En revanche, l'activation de l'AMPK peut aussi conférer, dans certains contextes, un avantage de survie aux cellules tumorales en permettant une plasticité de l'adaptation métabolique cellulaire, notamment en conditions de stress énergétique. De telles conditions peuvent s'observer quand la néovascularisation tumorale n'est pas encore

42. pour permettre les synthèses protéiques, lipidiques, nucléotidiques, *etc.* nécessaires à la formation de deux cellules filles à partir d'une seule cellule mère.

43. les besoins énergétiques d'une cellule tumorale sont en effet généralement moindres qu'une cellules spécialisée non-tumorale.

mise en place ou alors fonctionnellement incompétente pour subvenir aux besoins métaboliques de la cellule tumorale. En effet, dans différentes lignées cellulaires carcinomateuses, le stress énergétique induit l'apoptose ds cellules invalidées pour LKB1 ou AMPK [367, 368].

D'un point de vue conceptuel, *LKB1*/AMPK peut être considéré comme jouant un rôle duel dans la tumorigenèse (voir figure 3.8) :

— de par le contrôle négatif de LKB1 sur la croissance et l'anabolisme et la prolifération cellulaire et son rôle positif sur la polarité cellulaire et la structure épithéliale, l'invalidation biallélique de *LKB1* serait importante pour permettre l'acquisition d'un phénotype prolifératif, invasif et métastatique. Un *switch* métabolique vers l'anabolisme aux dépens du catabolisme et l'activation de mTORC1 participerait également à la formation de la biomasse tumorale, selon l'effet Warburg.

— cependant, LKB1 pourrait être requis dans d'autres contextes afin de permettre l'adaptation métabolique et la survie de la cellule cancéreuse en conditions de stress énergétique.

— enfin, l'hémizygotie *LKB1* constituerait un état intermédiaire entre ces deux situations, où la question du « dosage » cellulaire en LKB1 pourrait intervenir.

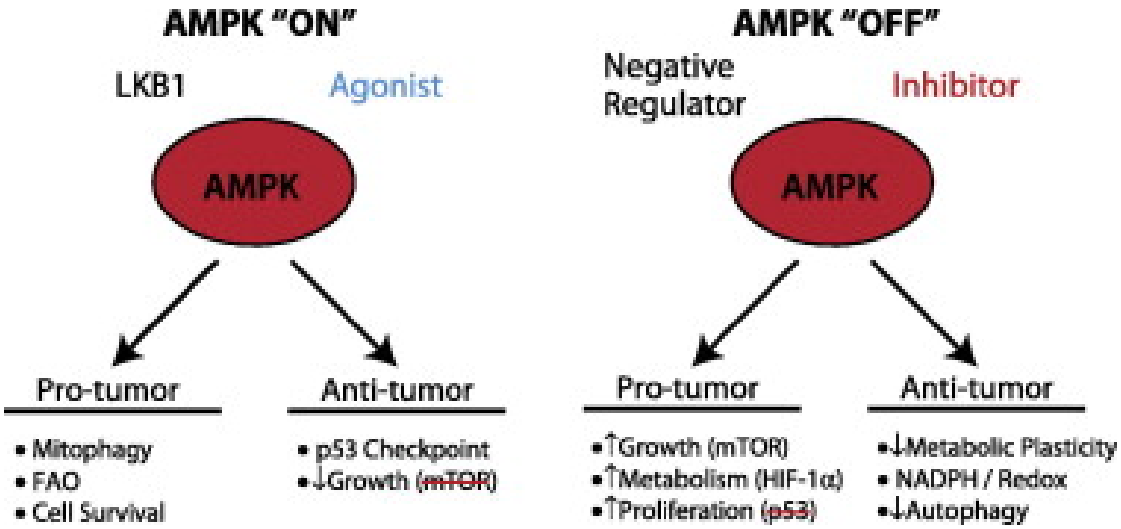


Figure 3.8 – Rôles duels de l'axe LKB1/AMPK dans le cancer. Issu de [365].

Ce modèle pourrait expliquer les discordances qui sont parfois observées entre les différents modèles murins et la longue latence de l'apparition de cancers constitués dans les modèles murins haploinsuffisants ou hypomorphes pour *Lkb1*.

3.3.6 LKB1 et autres voies

Différentes études ont fait état d'un dialogue entre la signalisation LKB1 et d'autres voies de signalisation comme les voies Wnt/β-caténine, Notch et Hippo. Certaines données suggèrent également que LKB1 pourrait se localiser au cil primaire, participant à la signalisation Sonic/Hedhehog [369, 370]. Les éléments bibliographiques seront développés dans les parties « Résultats » et « Conclusion » de ce mémoire.

Chapitre 4

Hypothèse de travail et plan expérimental

Le chapitre 2 de cette introduction nous a permis de présenter l'incroyable diversité morphologique et moléculaire des CHC et de définir le groupe des CHC porteurs d'une mutation activatrice de *CTNNB1* comme constituant une entité morphologique à part, très homogène. Homogène sur le plan moléculaire car constituant invariablement un groupe distinct de tumeurs dans les analyses à haut débit et dans les études moléculaires plus ciblées. Homogène également sur le plan morphologique avec un phénotype propre contrastant nettement avec celui des autres CHC. Ce phénotype se caractérise notamment par :

- une absence d'instabilité chromosomique,
- une non-association statistique aux facteurs étiologiques du VHB et de la NASH,
- l'appartenance à un groupe transcriptomique caractérisé par une signature « métabolisme des acides aminés » et une régulation négative de la signature « stress »,
- la possible apparition sur un foie non cirrhotique,
- la non association aux signatures / groupes de CHC « AKT/mTOR » et « progéniteur »,
- une architecture microtrabéculaire ou acineuse avec acquisition d'une polarité apicobasale de type simple dans les structures acineuses,
- un métabolisme particulier conduisant à l'absence d'accumulation intracytoplasmique de lipides (absence de stéatose),
- un relatif meilleur pronostic, même si cela reste incertain.

Comme nous l'avons vu dans la section 2.4.5 page 76, ce phénotype est peu à même d'être directement expliqué par la seule activation de la β-caténine dans ces tumeurs, pointant la nécessité d'un acteur intermédiaire.

Par approche candidate, nous avons émis l'hypothèse que ce candidat pouvait être LKB1.

En effet, LKB1 pourrait à lui seul expliquer l'ensemble du tableau morphomoléculaire des CHC mutés *CTNNB1*, par ses rôles physiologiques dans le métabolisme, la polarité et la croissance cellulaires et dans le maintien de l'intégrité génomique. De plus, *LKB1* étant habituellement considéré comme un gène suppresseur de tumeurs, son activation dans les CHC mutés *CTNNB1* pourrait expliquer leur relatif meilleur pronostic.

Peu d'études ont analysé l'implication de LKB1 dans le CHC. Le modèle murin $Lkb1^{+/-}$ permet l'apparition de CHC au bout de 40 semaines avec une pénétrance de 20 à 70% en fonction du sexe. De manière intéressante, le spectre morphologique est très varié, incluant même des adénomes hépatocytaires. Cependant, le délai assez long de l'apparition des tumeurs sous-entend que l'invalidation de *Lkb1* facilite l'apparition ou la progression de tumeurs mais qu'elle n'est pas pour autant suffisante et requiert des *hits* oncogéniques supplémentaires. En ce sens, quand *Tp53* est invalidé, la délétion de *Lkb1* permet une oncogenèse plus rapide (modèle $Lkb1^{+/-}$; $Tp53^{-/-}$). Chez l'homme, contrairement aux carcinomes bronchopulmonaires, les mutations de *LKB1* sont très rares dans le CHC. Le CHC ne figure notamment pas comme un des cancers classiquement associés au syndrome de Peutz-Jeghers. Dans une série de 80 CHC, une seule mutation faux sens de *LKB1* a été observée ; la perte allélique du locus *LKB1* était observée dans 22% des cas et alors toujours associée à une étiologie VHB [371]. Malheureusement, aucune précision quant à la morphologie de ces tumeurs n'a été apportée. De plus, l'hyperméthylation du promoteur de *LKB1* semble être un évènement rarissime dans le CHC [372]. Cependant, une étude plus récente a montré par immunohistochimie qu'environ 40% des CHC présentaient une perte de l'expression protéique de LKB1 ; ces tumeurs étaient associées à une moins bonne survie, à des grades et stades plus élevés ainsi qu'à la présence d'une invasion vasculaire [373]. L'ensemble de ces données tend à suggérer que dans une partie des CHC, *LKB1* se comporte comme un gène suppresseur de tumeurs. Cependant, il n'est pas connu si ce groupe de CHC inclut ceux mutés *CTNNB1*.

Selon notre hypothèse, les mutations activatrices de *CTNNB1* dans le CHC induiraient l'activation de LKB1 dans les cellules tumorales pour conférer à ces tumeurs leurs caractéristiques phénotypiques propres. *LKB1* serait requis pour l'hépatocarcinogenèse médiée par les mutations activatrices de *CTNNB1*, ne jouant donc pas un rôle de gène suppresseur de tumeurs. Cette hypothèse sous-entend deux questions différentes :

— Existe-t-il un dialogue entre les voies de signalisation Wnt/β-caténine et LKB1 dans l'hépatocyte normal et tumoral ? En d'autres termes, β-caténine est-elle capable d'induire l'activation de LKB1 et LKB1 est-il nécessaire à

la signalisation de β-caténine dans le foie et les CHC mutés *CTNNB1* ?

— Les rôles de LKB1 dans le foie sont-ils compatibles avec le phénotype des CHC mutés *CTNNB1* ? En d'autres termes, LKB1 est-il capable d'empêcher l'accumulation de lipides (*i.e.* l'apparition d'une stéatose) dans le foie normal et les CHC mutés *CTNNB1* ?

Pour répondre à la première question, nous avons utilisé plusieurs approches qui nous ont permis de discerner un lien fort entre les deux voies de signalisation, β-caténine et LKB1. Le dialogue entre ces deux voies est cependant apparu comme étant fonction du type cellulaire, du stade de développement et du contexte oncogénique. Les résultats sont présentés dans le premier chapitre de la partie « Résultats ».

La seconde question a été abordée grâce à deux modèles murins d'invalidation hépatospécifique de *Lkb1*, l'un dont l'invalidation se produit au cours du développement embryonnaire, l'autre dont l'invalidation se produit dans le foie adulte. Les résultats obtenus ont identifié, comme attendu [128], un rôle répresseur de Lkb1 sur la néoglucogenèse et la biosynthèse des acides gras. Cependant, les voies moléculaires impliquées dans ces fonctions n'ont pas été celles habituellement en aval de Lkb1 comme l'Ampk. Au contraire, nous avons mis en évidence un dialogue inattendu avec la voie Insuline/Akt. Ces données sont présentées dans le second chapitre de la partie « Résultats ».

Enfin, le troisième chapitre des « Résultats » présente la caractérisation biochimique et fonctionnelle d'une nouvelle isoforme de LKB1 que nous avons identifiée (ΔN-LKB1). Les rôles différentiels de cette isoforme sur l'activité de l'isoforme habituelle de LKB1 en termes de polarité, de métabolisme et de prolifération cellulaire, nous ont permis de lui attribuer des rôles physiologiques et oncogéniques particulièrement intéressants dans certains tissus. Cependant, même si nous l'avons initialement mise en évidence dans des lignées hépatomateuses comme contrôlée négativement par β-caténine, elle ne semble pas jouer de rôle majeur dans le contexte de l'hépatocarcinogenèse car nous n'avons pas pu la mettre en évidence dans des CHC humains, quel que soit leur statut mutationnel *CTNNB1*.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 1

Dialogue entre LKB1 et la voie Wnt/β-caténine dans le foie.

1.1 Introduction

Ce chapitre décrit les résultats que nous avons obtenus concernant l'existence éventuelle d'un dialogue entre les voies de signalisation LKB1 et Wnt/β-caténine dans le foie. Selon notre hypothèse de travail, l'activation de β-caténine devrait être en effet capable d'induire l'activité LKB1 dans les CHC mutés *CTNNB1* afin de leur conférer leurs caractéristiques phénotypiques propres.

Dans une petite série de quatorze CHC humains (sept mutés *CTNNB1* et sept non mutés) avec pour chacun un fragment apparié de tissu hépatique non tumoral, nous avons tout d'abord observé par *western blot* une fréquente induction de l'expression protéique de LKB1 et de son partenaire Mo25 dans les CHC mutés *CTNNB1* par rapport au tissu non tumoral adjacent, alors qu'une telle induction était rarement observée dans les CHC non mutés *CTNNB1* (Figure 1A).

En utilisant des ARN interférents dirigés contre *CTNNB1* dans deux lignées hépatomateuses humaines comportant des altérations gain-de-fonction du gène *CTNNB1*, HuH6 et HepG2, nous avons pu montrer que l'expression protéique de LKB1 diminuait suite à l'inactivation de β-caténine oncogénique dans ces lignées, selon un mécanisme post-transcriptionnel (Figure 2). Cette expérience nous a de plus permis d'identifier une nouvelle isoforme de LKB1 qui sera détaillée dans le 3^{e} chapitre des « Résultats ».

Pour aller un peu plus loin dans la compréhension de ce dialogue entre LKB1 et la voie Wnt/β-caténine, nous avons développé deux modèles murins d'invalidation hépatospécifique de *Lkb1* selon la stratégie *Cre/LoxP* :

— l'un permettant l'invalidation fonctionnelle de *Lkb1* dans le foie embryonnaire, vers e10.5, alors que les cellules ciblées sont au stade hépatoblaste.

Dans ce modèle, les exons III à VI de *Lkb1*[1] sont flanqués de sites LoxP [234] et une recombinase Cre constitutivement active est placée sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur hybride *Albumine-αfœtoprotéine* [374](*AlFp-Cre*), réalisant le modèle $Lkb1^{lox/lox}$;*AlFp-Cre*, ci-après nommé LKBKO^{livemb}.

— le second modèle permet l'invalidation fonctionnelle de *Lkb1* dans le foie adulte, après injection de tamoxifène. La construction *Lkb1* est la même que dans le modèle précédent mais la recombinase *Cre* utilisée est inductible par le tamoxifène et est placée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur hépatospécifique de la transthyrétine [375] ($Ttr\text{-}CreER^{T2}$), réalisant le modèle $Lkb1^{lox/lox}$;$Ttr\text{-}CreER^{T2}$, ci-après nommé LKBKO^{livad}.

Le phénotype observé entre ces deux modèles était très différent. Si les animaux LKBKO^{livad} ne présentaient pas de phénotype global patent, si ce n'est une hyperglycémie modérée à jeun, les animaux LKBKO^{livemb} naissaient de façon mendélienne mais présentaient un retard de croissance postnatale s'installant vers l'âge de 12 jours et mourraient entre $J25$ et $J30$ dans un contexte de cachexie et de cholestase biologique (Figure 3A-D).

Le degré de prolifération hépatocytaire (immunomarquage Ki67) était également différent entre les deux modèles. Si elle était induite chez les animaux KO dans le modèle LKBKO^{livad}, en accord avec le rôle suppresseur de tumeur connu pour LKB1, elle était inhibée dans le modèle LKBKO^{livemb} (Figure 3E-F).

Par analyse transcriptomique, 122 gènes étaient différentiellement exprimés ($p<0.05$ et *fold change*>1.2) entre KO et contrôles dans le modèle LKBKO^{livad} [2] et 253 ($p<0.01$ et *fold change*>1.5) dans le modèle LKBKO^{livemb} [3]. Seuls 5 gènes étaient communs aux deux listes [4], dont *Agxt* (impliqué dans le métabolisme énergétique des acides aminés et dont nous reparlerons dans le 2e chapitre des « Résultats » (Figure 3G).

L'ensemble de ces données indique que les rôles de LKB1 dans le foie ne sont pas les mêmes au cours du développement et à l'age adulte, la délétion de *Lkb1* dans l'hépatoblaste ne conduisant pas au même phénotype que sa délétion dans l'hépatocyte mature.

Nous avons ensuite étudié les conséquences de l'invalidation de *Lkb1* sur l'activation de β-caténine dans nos deux modèles, afin de savoir si Lkb1 était requis à la signalisation β-caténine dans le foie.

Concernant le zonage lobulaire hépatique dépendant de β-caténine, dans le modèle LKBKO^{livad}, il n'était pas observé d'anomalie de la distribution zonale de l'expression de *Glul*, gène cible classique de β-caténine dans le foie et d'expres-

1. qui codent la majeure partie du domaine kinase de Lkb1.
2. sacrifice une semaine après injections de tamoxifène et après 16h de jeûne.
3. sacrifice à 5 jours de vie.
4. *Agxt*, *Ces3a*, *Esr1*, *Gramd1c* et *Slpi*.

sion habituellement péricentrolobulaire (Figure 4C). À l'inverse, dans le modèle LKBKO^{livemb}, l'expression centrolobulaire de *Glul* était presque absente (Figure 4A-B), indiquant que l'invalidation de *Lkb1* pourrait avoir des conséquences fonctionnelles importantes sur le programme transcriptionnel hépatique de β-caténine si effectuée au stade d'hépatoblaste et non à un stade d'hépatocyte mature.

Parallèlement, par RT-PCRq, le programme transcriptionnel de β-caténine était profondément affecté dans le modèle LKBKO^{livemb} dès 8 jours de vie et encore plus à l'âge de 14 jours, avec répression des gènes cibles positifs [5] et induction des gènes cibles négatifs [6] de β-caténine (Figure 4E).

Dans le modèle LKBKO^{livad}, ce programme n'était altéré que pour un *set* particulier de gènes cibles de β-caténine ; de plus, ce programme spécifique était directement dépendant du statut nutritionnel, avec un plus grand nombre de gènes cibles de β-caténine qui étaient altérés [7], et de façon plus marquée, chez les animaux à l'état nourri par rapport aux animaux à jeun (Figure 4D).

Ceci est particulièrement intéressant car, chez des souris normales, *Axin2* et *Sp5* montrent une expression transcriptionnelle très dynamique en fonction de l'état nutritionnel avec une expression plus forte à jeun qu'à l'état nourri ; l'expression de *Nkd1* est quant à elle plus stable (Figure supplémentaire 1).

Ainsi, LKB1 est apparu comme requis pour l'activation complète du programme transcriptionnel de β-caténine dans le foie mais de façon dépendante du stade de développement et du contexte nutritionnel.

Afin d'expliquer la cholestase biologique de type obstructif observée dans le modèle LKBKO^{livemb} (Figure 5A-B), nous nous sommes penchés sur le réseau canalaire biliaire intrahépatique de ces animaux. À l'âge de 3 semaines de vie, les structures biliaires portales demeuraient à un état immature de « plaque ductale » (Figure 5C). Pour en savoir un peu plus, des femelles gestantes issues du modèle LKBKO^{livemb} ont été sacrifiées vers e17.5-e18.5. À ce stade de développement embryonnaire, les animaux *Lkb1 KO* présentaient une maturation biliaire portale bloquée à un stade de « plaque ductale » et de canaux asymétriques, alors que les animaux contrôles présentaient un engagement beaucoup plus avancé vers la tubulogenèse biliaire avec présence de canaux symétriques (Figure 5D et Figure supplémentaire 2). En ce sens, les acteurs clés de la tubulogenèse biliaire, et dont l'invalidation dans le foie embryonnaire conduit à un phénotype de paucité des voies biliaires (Hnf1b [376], Hnf6 [377], Yap [160] et la voie Notch [55–57] (voir page 1.1.4 page 22 et suivantes)) n'étaient exprimés que sur le versant portal des canaux biliaires asymétriques chez les animaux mutants alors que ce marquage était circonférentiel dans les structures biliaires des animaux contrôles (Figures

5. *Axin2*, *Sp5*, *Glul*, *Lect2*, *Cyp2e1*, *Nkd1* et *Aqp9*.
6. *Gls2*, *Hal* et *Arg1*.
7. dont *Axin2*, *Sp5*, *Lect2*, *Cyp2e1*, *Arg1* et *Gls2*, mais pas *Glul* ni *Nkd1*.

supplémentaires 3 et 4). Il n'était cependant pas possible de déterminer, sur la base de l'analyse morphologique, si la distribution asymétrique de ces différents acteurs était secondaire ou causale u blocage de la maturation des canaux biliaires intrahépatiques chez les animaux *KO*.

Nous nous sommes intéressés à la voie Notch car nous avons observé par RT-PCR quantitative que l'expression de gènes cibles positifs de la voie Notch (*Hes1*, *Heyl*, *Hey1* et *Nrarp*) était diminuée chez les animaux LKBKO^{livemb} *KO* à 8 et 14 jours de vie par rapport aux contrôles (Figure 6A). Pour aller plus loin, nous avons sacrifié à 5 jours de vie des souris invalidées pour la voie Notch dans le foie embryonnaire (modèle *Rbpj*$^{lox/lox}$;*AlFp-Cre* [55, 57], nommé NotchKO^{livemb} par la suite) ainsi que des souris du même âge issues du modèle LKBKO^{livemb}. De façon intéressante, l'expression protéique de Lkb1 était diminuée dans le foie des souris NotchKO^{livemb} *KO* par rapport aux souris contrôles (Figure B). Des puces transcriptomiques ont été réalisées et ont révélé la présence de 253 gènes différentiellement exprimés entre souris sauvages et *KO* dans le modèle LKBKO^{livemb} (voir précédemment) et 237 pour le modèle NotchKO^{livemb} ; de façon intéressante, un grand nombre de gènes (55 gènes, soit environ $20-25\%$ de chaque liste) étaient communs aux deux listes (Figure 6C). Nous avons alors étudié par *GSEA*[8] ces deux modèles et avons observé que la signature « *Lkb1* » était significativement enrichie dans le profil génique des souris NotchKO^{livemb} et *vice versa* (Figure 6D). Ces données suggèrent que LKB1 et la voie Notch dialoguent entre elles dans le foie embryonnaire, notamment pour la mise en place de la tubulogenèse biliaire.

Après avoir montré que β-caténine activée contrôlait l'expression protéique de LKB1 et que LKB1 était nécessaire à l'activation complète du programme transcriptionnel de β-caténine dans le foie, nous avons cherché à savoir si LKB1 était également requis pour la survie hépatocytaire dans un contexte β-caténine activé, comme il peut se voir dans les CHC mutés *CTNNB1*. Pour répondre à cette question, nous avons croisé le modèle LKBKO^{livemb} avec un modèle dans lequel l'exon III de *Ctnnb1*[9] est flanqué de sites LoxP [378], aboutissant en un modèle dans lequel une activation du signal β-caténine coexiste avec une invalidation de *Lkb1*. Alors que la probabilité mendélienne était de 1/4, aucun animal n'est né avec le double génotype parmi 21 souriceaux nés. En sacrifiant une femelle gestante, nous avons observé que le double génotype induisait une mortalité *in utero* avant e17.5 avec présence de foyers de nécrose hépatocytaire (Figure 7A), indiquant la nécessité de la présence dans le foie de Lkb1 dans ce contexte embryonnaire hépatique β-caténine activé.

Nous avons aussi croisé le modèle LKBKO^{livad} avec un modèle murin de carcinome hépatocellulaire. Dans ce dernier modèle, l'oncogène *Myc* est placé sous

8. *Gene Set Enrichement Analysis*
9. qui code le domaine de dégradation de β-caténine.

le contrôle transcriptionnel du promoteur de l'isoforme hépatique de la pyruvate kinase (*Pklr-Myc*) [379]. Ces souris développent des carcinomes hépatocellulaires dont la grande majorité présente des mutations activatrices de *Ctnnb1* [175]. Nous avons obtenu des souris $Lkb1^{lox/lox}$;$Ttr\text{-}CreER^{T2}$;*Pklr-Myc* dans lesquelles l'invalidation de *Lkb1* peut être obtenue dans les tumeurs hépatiques après injection de tamoxifène. Parmi les tumeurs que nous avons analysées, la perte de *Lkb1* s'accompagnait d'une grande altération de la cytologie avec fréquente apoptose des cellules tumorales, confirmant l'importance de l'expression hépatocytaire de Lkb1 dans un contexte tumoral β-caténine activé (Figure 7B).

Enfin, les orthologues humains ont été attribués à la liste des 253 gènes différentiellement exprimés dans le modèle $LKBKO^{livemb}$ et nous avons intégré 3 souris *Lkb1 KO* et 3 souris sauvages pour *Lkb1* à un jeu librement accessible de données transcriptomiques de CHC annotés sur le plan mutationnel [116]. De façon intéressante, les 3 souris sauvages pour *Lkb1* étaient retrouvées dans le groupe des CHC mutés *CTNNB1* alors que les 3 souris *Lkb1 KO* l'étaient dans celui des CHC non mutés *CTNNB1*, montrant la présence d'une signature transcriptionnelle d'activation de LKB1 dans les CHC mutés *CTNNB1* (Figure 1B).

1.2 Résultats

Les résultats détaillés sont présentés sous la forme d'un article en préparation.

Complex cross-talk between kinase LKB1 and beta-catenin signaling pathways during liver development and tumorigenesis.

Pierre-Alexandre JUST[1-5], Alexis PONCY[6], Massiré TRAORE[1-4], Roland TEBOUL[1-4], Rajae DAHMANI[1-4], Valérie DROUET[1-4], Solenne MARMIER [1-4], Hélène GILGENKRANTZ[1-4], Sabine COLNOT[1-4], Benoit TERRIS[1-5], Cédric COULOUARN[7], Frédéric LEMAIGRE[6], Christine PERRET[1-4]

[1]INSERM, U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France.

[2]CNRS, UMR8104, F-75014 Paris, France.

[3]Université Paris Descartes, F-75014 Paris, France.

[4]Equipe labellisée LNCC.

[5]APHP, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, Hôpital Cochin, Pathology department, F-75014 Paris, France.

[6] de Duve Institute and Université catholique de Louvain, LPAD, B-1200 Brussels, Belgium.

[7]INSERM, UMR991, Université de Rennes 1, F-35033 Rennes, France.

.

***Corresponding author :** Christine Perret, Inserm U1016, Institut Cochin, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 PARIS, FRANCE.

Fax : 33 1 44 41 24 21 ; E-mail: christine.perret@inserm.fr

Phone : 33 1 44 41 25 64

Key words : Hepatocellular carcinoma ; Liver ; CTNNB1 ; LKB1 ; NOTCH.

Abstract

Background & aims:

Hepatocellular carcinomas (HCC) with activating mutations of the gene encoding for beta-catenin (*CTNNB1*) constitute a very homogeneous group of tumors. In a candidate approach, we tested if liver kinase B1 (LKB1) encoded by the *STK11* gene, could be a potential mediator of the singular phenotype of *CTNNB1*-mutated HCCs.

Methods

We used hepatoma cell lines to knock down *CTNNB1* with small interfering RNA and developed two transgenic mouse models in which *Lkb1* was specifically deleted in the liver both during development and in the adult after tamoxifen injections. The phenotype of these mice were analyzed by biological analysis, immunohistochemistry and micro-arrays.

Results

We showed that the proteic expression LKB1 is controlled by beta-catenin signaling, and that, in return, LKB1 drives a specific *CTNNB1* genetic program in the embryonic and adult liver. We also demonstrated that LKB1 is required for the development of the hepatic metabolic zonation, but is dispensable in the adult although it differently impacted the beta-catenin transcriptional program during different nutritional stages. We also observed that LKB1 is required for the intrahepatic bile duct development during the tubulogenesis step. Finally our result indicated that LKB1 is required for the survival of beta-catenin-activated embryonic hepatoblasts as well as beta-catenin-activated tumor hepatocytes.

Conclusion

These data showed that LKB1 is required for full activation and repression of a subset of beta-catenin target genes in the liver, pointing out a complex cross-talk between LKB1 and beta-catenin signaling depending on the developmental stage and nutritional status.

Introduction

Among the large histological and molecular heterogeneity of hepatocellular carcinomas (HCC), tumors with activating mutations of the gene encoding beta-catenin (*CTNNB1*) constitute a very homogeneous subgroup of tumors [1]. Indeed, *CTNNB1*-mutated HCCs frequently display a microtrabecular or acinar growth pattern, with acquisition of a simple-type apico-basal polarity and are almost never steatotic [1]. Oppositely, non *CTNNB1*-mutated HCC are often macrotrabecular, with conservation of a hepatocyte-type polarity, or complete loss of cell polarity, and are frequently steatotic [1]. About one third of HCC carry *CTNNB1* activating mutations [2] and these tumors were also described to be well-differentiated, cholestatic [1], chromosomally stable [3, 4, 5] and to have a relatively better prognosis [6]. They are not associated with hepatitis B virus infection [3] and can arise in non-cirrhotic livers [7].

The role of beta-catenin signaling in the liver physiology is important and varies depending on the developmental stage (for review [8]). In the adult liver, it is a key actor of the liver lobular zonation inducing the peri-venous metabolic fate of hepatocytes while inhibiting the periportal one [9]. In the liver development, the impact of the Wnt/beta-catenin pathway is less understood [10]. It has been shown that beta-catenin signaling impedes on the cell fate of hepatoblasts inducing their commitment to the cholangiocyte lineage [11].

In a candidate-gene approach, we identified liver kinase B1 (LKB1), encoded by the *STK11* gene, as a potential mediator of the singular phenotype of *CTNNB1*-mutated HCCs. LKB1, in a heterotrimeric complex LKB1/STRAD/Mo25, is a multi-task serine/threonine kinase that controls cell metabolism, polarity and proliferation (for review [12]). One of the main targets of LKB1 in the control of metabolism is the AMP-kinase. In a context of energetic stress, a high AMP/ATP ratio induces AMPK activation to favor energy-producing catabolic pathways and to inhibit energy-consuming anabolic pathways. In that sense, LKB1 negatively controls the synthesis of lipid in the liver although the exact mechanism is still unclear [13]. In addition,

LKB1 is a pivotal determinant of apical epithelial cell polarity [14] in a cell-autonomous manner [15]. Finally, LKB1 is implied in the control of cell proliferation, growth and death through at least the AMPK/mTOR and TP53 pathways [12]. Thus, the morphologic specificities of *CTNNB1*-mutated HCCs (the lack of steatosis and the presence of an apical polarity) suggest that LKB1 could be a *bona fide* candidate to explain their singular phenotype. Furthermore, *STK11* is recognized as a tumor-suppressor gene [16] and could thus account for the better prognosis of *CTNNB1*-mutated HCCs. In our hypothesis, in *CTNNB1*-mutated HCCs, activated beta-catenin signaling would induce LKB1 expression to confer to these tumors their singular phenotype.

In this work, we showed that a LKB1 signature is indeed expressed in *CTNNB1*-mutated HCCs and we describe a complex cross-talk between beta-catenin and LKB1 signaling pathways in the liver. We found that activation of LKB1 is required for the survival of *CTNNB1*-activated hepatic progenitors as well as *CNNTB1*-activated tumor hepatocytes. We also found LKB1 as a new actor of bile duct morphogenesis, through a probable crosstalk with the Notch pathway.

Patients, material and methods

Tumor specimens

We retrospectively selected fourteen patients treated for liver cancer in Cochin Hospital (Paris, France). All tumor samples were frozen after surgery in accord with French law and ethical guidelines. The mutational activation status for *CTNNB1* gene was assessed both by the characterization of the mutation and by the induction of glutamine synthetase expression by immunostaining of paraffin sections, as previously described [1]. For each patients, both tumour and non-tumour liver samples were studied.

Animals

Mice carrying two floxed alleles on the exons III to VI of the *Lkb1* gene (*Stk11*$^{lox/lox}$)[19] were interbred with *Ttr-CreER*^{T2} (LKB1^{livad}) [9] or *AlFp-Cre* (LKB1^{livemb}) [20] mice. *Stk11*$^{lox/lox}$;*Ttr-CreER*^{T2} mice were also crossed with *Pklr-Myc* transgenic mice, which express the oncogene c-myc in the liver under the control of liver pyruvate kinase regulatory regions [2]. All animal procedures were carried out according to French legal regulations and approved by an ethical committee. All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and food pellets (A03 diet, SafeDiets), except otherwise specified. Intra-peritoneal Tamoxifen injections (1.5 mg/day, 3 consecutive days) were performed in inducible models both in mutant and control mice and sacrificed by cervical dislocation at indicated times. Only male mice were studied in the LKB1^{livad} model.

Cell culture, transfection assay

HepG2 and HuH6 cells were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) with 4.5g/L glucose supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 100U/ml penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO2. For siRNA transfections, cells were seeded in 6-well plate (0.3x106 cells per well) and reverse-transfected with 100 pmol of siRNA in the presence of Lipofectamine RNAimax reagent (Life

Technologies), according to the procedure provided by the manufacturer. The siRNA obtained from Life Technologies were for *CTNNB1 Stealth Selected RNAiTM* siRNA named HSS102460, HSS102461, HSS102462. StealthTM RNAi negative control duplex (referred as SC) was used as negative control for sequence independent effect. Cells were collected 72h after transfection. Protein and mRNA were respectively extracted in 2X Laemmli buffer (Sigma) and Trizol reagent (LifeTechnologies), according to the manufacturer instructions.

RNA extraction and RT-PCR.

Total RNA was extracted from mouse tissues and cell lines with Trizol Reagent (Life technologies) according to manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed from 1 µg of total RNA using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) and random hexamer as primers. Quantitative PCR reactions were run using the Light Cycler 480 Sybr Green I Master kit (Roche) and specific primers (Eurogentec) on a Light Cycler 480 thermocycler (Roche). Values were normalized with *Rn18s* ribosomal RNA.

Primers sequences are indicated in the following table.

Species	Gene		Sequence
Human	*AXIN2*	Fwd	gctgacggatgattccatgt
		Rv	actgcccacacgataaggag
Human	*STK11*	Fwd	caacgaagagaagcagaaag
		Rv	tttcctgcatgccacaca
Mouse	*Axin2*	Fwd	gagagtgagcggcagagc
		Rv	cggctgactcgttctcct
Mouse	*Sp5*	Fwd	aggacaggaaactgggtcgt
		Rv	gatggctcggactttgga
Mouse	*Glul*	Fwd	ctcgctctcctgacctgttc

		Rv	ttcaagtgggaacttgctga
Mouse	*Lect2*	Fwd	cccacaacaatcctcatttca
		Rv	gttagcccatggtcctgcta
Mouse	*Cyp2e1*	Fwd	ccaccagcacaactctgagata
		Rv	cccaataaccctgtcaatttctt
Mouse	*Nkd1*	Fwd	cactgttggtcgaggcact
		Rv	cacttctaggggggaagtcgtc
Mouse	*Aqp9*	Fwd	cctgaagagctgtctggctaa
		Rv	gcttgagcaatagagccaca
Mouse	*Gls2*	Fwd	gtatgacttctcgggccagt
		Rv	tcctgacacagctgacttgg
Mouse	*Hal*	Fwd	ttcatgatagcccactgcac
		Rv	agatgaagggtggcacagag
Mouse	*Hes1*	Fwd	tgccagctgatataatggagaa
		Rv	ccatgataggctttgatgacttt
Mouse	*Hey1*	Fwd	catgaagagagctcacccaga
		Rv	cgccgaactcaagtttcc
Mouse	*Heyl*	Fwd	catgaagagagctcacccaga
		Rv	cgccgaactcaagtttcc
Mouse	*Nrarp*	Fwd	gctacacatcgccgcttt
		Rv	ttggccttggtgatgagata

Immunoblot analysis

Total protein extracts from various mouse and human tissues were obtained from 20-200 mg of frozen tissue that was bead-mill homogeneized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 mM AEBSF, 1% Triton X-100, supplemented with a mixture of protease and phosphatase inhibitors (Roche) in a 10µL/µg ratio using a TissueLyser disruption system (Qiagen, Hilder, Germany). Samples were centrifuged at 13,000 g for 10min at 4°C and supernatant was collected and kept at -80°C until analysis. Proteins were resolved by SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose and blocked with 5% BSA or 5% milk. Blots were incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C, washed, incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (CellSignaling) and developed by enhanced chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Images were recorded using a super CCD camera of 3.2 megapixels driven by the LAS 4000 mini device (GE Healthcare). Primary antibodies were from SantaCruz (LKB1, clone Ley37D/G6), Cell Signaling Technologies (LKB1, clone D60C5, Mo25, gamma-tubulin and beta-actin) and BD Biosciences (beta-catenin and glutamine synthase).

Blood biochemistry

Capillary glucose was measured from tail blood using an AccuCheck device with corresponding strips. Bilirubin and ALAT levels were measured from plasma using the Bilirubin SF and ALAT SF kits from Diasys according to the manufacturer instructions.

Immunohistochemistry and *in situ* hybridization

Mouse liver were minced in 3mm-thick sections and fixed in 10%formalin for 12 hours and embedded in paraffin. For morphological analysis, dewaxed 2µm sections were stained with hemalun and eosin. The protocol for glutamine sythetase immunohistochemistry and in situ hybridization has been previously described [9].

CK19 and Ki67 immunostaining procedures were performed on 5µm thick dewaxed tissue section, boiled in pH6 citrate buffer for 40 minutes and incubated for 1h at room temperature

with primary antibody (CK19: gift from Sylvie Germain, Ki67/MIB1 : Dako). After incubation with biotinylated secondary antibody, an avidin-biotin amplification step was performed (Jackson laboratories) followed by a diaminobenzidine-based revelation (Jackson laboratories) and counterstaining in hemalun.

For immunostaining of developping bile ducts, embryos were fixed at 4°C for 4h in 4% paraformaldehyde in PBS, washed overnight in PBS and embedded in paraffin. Tissue sections were retrivaled by boiling for 10 min in pH6 citrate buffer, permeabilized for 15 minutes with 0.3% Triton X-100-PBS, and blocked in 3% milk/10% BSA/0.3% Triton X-100 in PBS for 45 minutes at room temperature. Primary antibodies were purchased from Sigma (Lamin), SantaCruz (HNF4, HNF6 and HNF1beta), BD biosciences (E-cadherin), Chemicon (Sox9), R&D systems (osteopontin) and Epitomics (Yap). Anti-HES1 and Notch2-ICD antibodies were provided by B. Stanger's lab. Incubation of primary antibodies was performed in 3% milk/10% BSA/0.3% Triton X-100 in PBS for 1 hour at 37°C. Washes were done with 0.1% Triton X-100 in PBS three times for 5 minutes each. Secondary antibodies Alexa Fluor® conjugated (LifeTechnologies). Washes were repeated with 0.1% Triton X-100-PBS three times for 5 minutes each and slides were mounted in Dako® fluorescent mounting medium (Dako). Fluorescence was immediately observed with a Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope. All the pictures were taken using a Coolpix 995 digital camera (Nikon).

Genome wide expression analysis

Three hundred ng of total RNA were reverse transcribed following the Genechip Whole transcript (WT) Sense Target labelling assay kit (Affymetrix). The resulting cDNA was used for *in vitro* transcription with T7 RNA pol. After purification, 10 µg of cRNA was used for reverse transcription with random primers. The cDNA obtained was purified and fragmented. After the control of fragmentation using 2100 Bioanalyzer, cDNA was end-labelled with biotin using Terminal Transferase (WT terminal labelling kit, Affymetrix). cDNA was then

hybridized to GeneChip® human Gene (Affymetrix) at 45°C for 17 hours. Chips were washed on the fluidic station FS450 following specific protocols (Affymetrix) and scanned using the GCS3000 7G. The image was analyzed with Expression Console software (Affymetrix) to obtain raw data (cel files) and metrics for Quality Controls.

Statistical analysis of microarray data

Microarray data were analyzed using R-based BRB-ArrayTools. Briefly, differentially expressed genes were identified by a univariate two-sample t-test with a random variance model. Individual genes were selected on the basis of both statistical significance ($p<0.001$) and fold change difference between the compared groups. Permutation p-values for significant genes were computed based on 10,000 random permutations. For class comparison analysis, the false discovery rate was below 0.5%. Class prediction was performed using 7 algorithms (compound covariate predictor, 1- and 3-nearest neighbors, nearest centroid, support vector machines and Bayesian compound covariate) and misclassification rate was computed using a leave-one-out cross-validation method. Multidimensional scaling of tissue samples was done with BRB using the default options. Clustering analysis was performed with Cluster 3.0 software using the uncentered correlation and average linkage options. Data were further visualized with TreeView 1.6.

Results

Oncogenic beta-catenin drives LKB1 expression in liver cancer cells.

We first analyzed LKB1 expression in a small series of 14 human HCCs selected from the files of the pathology department of our institution according to their *CTNNB1* mutational status (7 with *CTNNB1* mutation and 7 without *CTNNB1* mutation). Total proteins were extracted from cryoconserved tumor samples and from matched non-tumor liver sample for each patient. We observed that, in *CTNNB1*-mutated HCCs, the proteic expression of LKB1, as well as its partner Mo25, was frequently enhanced when compared to matched non-tumor liver samples. The very high protein expression of glutamine synthase (GLUL), a well-known beta-catenin target in the liver [17] confirmed that the beta-catenin pathway was indeed activated in these tumors. In non *CTNNB1*-mutated HCCs, such findings were rarely observed (figure1A). Our results indicate that LKB1 protein is accumulated in a large subset of *CTNNB1*-mutated HCC.

We then addressed the question of whether mutated beta-catenin was able to control LKB1 expression in liver tumor cells. HuH6 and HepG2 are two hepatoma cell lines with gain-of-function alterations of *CTNNB1* (respectively p. G32V mutation and p.25_140 deletion, both in the DNA sequence encoding for the degradation domain of beta-catenin)[2]. In both cell lines, siRNA against *CTNNB1* resulted in a decrease of LKB1 protein expression paralleling beta-catenin invalidation (Figures 2A and 2C). This was not related to a non-specific effect of the siRNA strategy because scramble RNA in both cell lines and siRNA number #2 (which targeted the deleted p.25_140 mRNA *CTNNB1* sequence) in HepG2 cells did not modify LKB1 protein expression when compared to control cells (Figure 2C). beta-catenin silencing also induced a large increase of the short deltaN isoform of LKB1 we recently described [18] (Figure 2A). However, this short isoform should not play any substantial role in the liver physiology and carcinogenesis because it is not expressed in the normal liver parenchyma neither in HCCs (Figure 1A). By RT-qPCR, mRNA expression of *LKB1* did not change upon beta-catenin

silencing while the expression of the canonical beta-catenin-target gene *AXIN2* was strongly reduced (Figure 2B). These results indicate that oncogenic beta-catenin positively controls the LKB1 protein expression in liver tumor cells at a post-transcriptional level.

LKB1 differently controls the beta-catenin genetic program in the adult and embryonic livers.

To better understand the role of LKB1 in the liver, we specifically deleted *Lkb1* in the embryonic liver as well as in the adult liver by a Cre-LoxP strategy using dedicated *Cre* mice. We used the *Lkb1*$^{lox/lox}$ mouse model in which exons III to VI of *Lkb1* (encoding for the main part of the kinase domain) were flanqued with LoxP sites [19]. In the *AlFp-Cre* model, *Lkb1* was deleted in embryonic liver as soon as E10.5 [20], animals were named LKBKO^{Livemb}. The adult liver model was created using the tamoxifen-inducible tool, *Ttr-Cre-ER*^{T2} mice [9] and produced animals that we named LKBKO^{Livad} mice. After confirming that *Lkb1* was efficiently deleted in the liver of the two models (Figure 3A), we studied the phenotype of these mice. As expected, as LKB1 is known to suppress liver neoglucogenesis [13, 21] mutant LKBKO^{Livad} mice displayed a weak hyperglycemia during fasting but did not reveal major abnormality (Figure 3D and data not shown). At the opposite, LKBKO^{Livemb} revealed a very different and dramatic phenotype. Mice were born in a mendelian frequency, but showed a severe growth retardation beginning at post-natal day 12 leading to the early death of the KO mice between day 25 and day 30 (Figure 3B and 3C). Furthermore, they were cholestatic, as previously described [22], as evidenced by elevated serum bilirubin levels (Figures 5A and 5B).

Regarding hepatocyte proliferation, as evidenced by Ki67 immunostaining, we observed that both models also resulted in different phenotypes. Hepatocyte proliferation was induced in LKBKO^{Livad} mutant mice (Figure 3E), in line with the tumor suppressive functions of LKB1, but was strongly repressed in LKBKO^{Livemb} mutant mice, whereas LKBKO^{Livemb} control mice experienced the normal period of postnatal hepatocyte proliferation (Figure 3F).

We then analyzed by microarray the genetic program controlled by LKB1 both in the LKBKO^{Livemb} mice when animals were 5 days old, and in the liver of fasted LKBKO^{Livad} mice one week after Tamoxifen injection. 253 non redundant genes were found to be differentially expressed between the mutant and control in the embryonic model (fold change >1.5, $p<0.001$)

(Supplementary table 1) while 122 were found in the liver of fasted LKBKO^{Livad} mice (fold change >1.2, p<0.05) (Supplementary table 2). Surprisingly, only five genes including *Agxt,* a gene specifically expressed in the liver that is involved in the gluconeogenesis from the amino-acid serine [23], were commonly regulated between the mutant and control mice in both models (Figure 3G and Supplementary table 3), pointing out the strong implication of the developmental stage when studying the role of LKB1 in the liver.

To address whether LKB1 is required for the beta-catenin signaling in the liver, we examined the liver zonation in our both models of *Lkb1* liver invalidation. We observed that Lkb1 was required for the development of zonation in the early stage of liver development, but was not required for its maintenance in the adult liver. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization for Glul (glutamine synthase) [9, 17] showed that *Lkb1* deletion strongly affected liver zonation in immature liver of LKBKO^{Livemb} mice, with almost complete loss of the perivenous expression of Glul (Figures 4A and 4B). Accordingly, by RT-qPCR, the expression of different positive beta-catenin target genes (*Axin2, Sp5, Nkd1, Glul, Cyp2e1, Lect2* and *Aqp9*) was strongly reduced in KO mice and the expression of negative beta-catenin target genes was induced (*Gsl2*, *Arg1*, *Hal*) (figure 4E), as soon as postnatal day 8 and even more evidently at postnatal day 14.

In contrast, LKB1 appeared to be dispensable for the control of liver zonation in the adult liver as evidenced by a normal glutamine synthase immunostaining in the LKBKO^{Livad} mice (Figure 4C). However, we observed that LKB1 affected the beta-catenin transcriptional program in hepatocytes during the fasted-fed transition. We showed by RT-qPCR that several positive target genes (*Axin2*, *Sp5*, *Lect2* and *Cyp2e1*) were strongly reduced and that negative target genes (*Arg1* and *Gls2*) were induced in KO mice in the fed state. In contrast, only the expression of *Lect2*, *Cyp2e1*, *Arg1*, *Gls2* and *Hal* were perturbed during fasting. A small subset of beta-catenin target genes (*Glul*, *Nkd1* and *Aqp9*) was not impeded by *Lkb1* invalidation whatever the

nutritional status (Figure 4D). Interestingly, in normal mice, the expression of *Axin2* and *Sp5* (deregulated only in fed $LKBKO^{Livad}$ mutant mice) showed a very dynamic expression according to the nutritional cycle, whereas the expression of *Nkd1* (not deregulated in $LKBKO^{Livad}$ mutant mice whatever their nutritional status) was relatively stable during feeding and fasting (Supplementary Figure 1).

These data show that LKB1 is required for full activation and repression of a subset of beta-catenin target genes in the liver. These results also point out the complex cross-talk between the LKB1 and beta-catenin signaling and highlighted the key role of the developmental stage and nutritional status in this dialog.

LKB1 is a new actor of bile duct development.

To investigate the etiology of cholestasis (Figures 5A and 5B) in the LKBKO^{Livemb} model, we examined the intrahepatic bile duct system. During the normal development, hepatic progenitor cells adjacent to the portal vein undergo a ductal commitment and form a monolayer structure known as the ductal plate. Then, prior to birth, tubulogenesis occurs at discrete points along the ductal plates giving rise to asymmetric ducts, symmetric ducts and then to mature bile ducts. Asymmetric ducts are lined by Sox9+/CK19+ (cholangiocyte-like) cells on their portal layer and by HNF4+ (hepatoblast-like) cells on their parenchymal layer [24]. We stained biliary epithelial cells with cytokeratine 19, an excellent marker of cholangiocytes. In control livers, one to two mature bile ducts were integrated into the portal mesenchyme of each portal tract at postnatal day 21. In contrast, CK19-positive cells were visible as ductal plate-like structures in the mutant animals, indicating that tubulogenesis did not occurred (Figure 5C).

We then analyzed the bile ducts morphogenesis at e18.5, an important developmental stage for the bile duct development [25]. We observed that at this developmental stage, bile ducts were symmetric in control mice and mainly asymmetric in mutant mice (Figure 5D and Supplementary figure 2). These results identified LKB1 as a new actor of bile duct morphogenesis, crucial for the transition of asymmetric ducts to symmetric ducts.

Intrahepatic bile duct morphogenesis is a complex developmental process that requires the cooperation of several actors [10, 24]. Besides Hnf1beta, Hnf6 and Yap, all described to give rise to a bile duct paucity phenotype when invalidated in the embryonic liver [26, 27, 28], the Notch pathway also plays major roles in the bile duct morphogenesis ; mice invalidated for *Rbpj*, a key component of the Notch pathway, in the embryonic liver display severe cholestasis with postnatal persistence of ductal plate-like structures and an absence of mature bile ducts [29, 30, 31]. At e18.5, Hnf6, Hnf4 and Yap were normally expressed in the portal layer of asymmetric ducts in mutant mice (Supplementary Figure 3) as well as the Notch pathway

components Notch2-ICD and Hes1 (Supplementary Figure 4). It was however impossible to determine by morphological analysis alone if this asymmetric distribution of these different actors was the cause or the consequence of the altered bile duct tubulogenesis.

We decided to focus on the Notch pathway as several of its target genes (*Hes1*, *Hey1*, *Heyl* and *Nrarp*) were down regulated in the liver of LKBKO^{Livemb} mutant mice at post-natal days 8 et 14 (Figure 6A). To check if LKB1 indeed dialogues with the Notch pathway in the developmental liver, we used the NOTCHKO^{livemb} model (*Rbpj$^{lox/lox}$;AlFp-Cre*) [31]. We sacrificed mice 5 days after birth while mutant animals were grossly cholestatic. Interestingly, the proteic expression of Lkb1 in the liver of mutant animals was reduced when compared to control mice (Figure 6B). We analyzed on microarray chips the liver transcriptomics of these mice and compared it with that of LKBKO^{Livemb} mice sacrificed at the same post-natal day. In the LKBKO^{Livemb} model, 253 non redundant genes were differentially expressed between mutant and control mice and 237 in the NOTCHKO^{livemb} model. Interestingly, a large number of genes (55 genes, *i.e.* 20-25% of each list) were common between both lists (Figure 6 C). By a Gene Set Enrichement Analysis (GSEA) approach, the NOTCHKO^{livemb} dataset was significantly enriched in the LKBKO^{livemb} signatures, and *vice versa* (Figure 6D). Such data highlight an interesting crosstalk between LKB1 and Notch signaling in the developing liver.

LKB1 is required for the survival of *Ctnnb1*-activated hepatocytes both during development and oncogenesis.

Having shown that *CTNNB1* mutations were able to positively control LKB1 expression in human tumor liver cells, we thought to analyze whether LKB1 was required for the survival of beta-catenin-activated hepatocytes both during development and tumorigenesis. We crossed the LKBKO^{Livemb} mice with beta-catenin inducible mice in which *Ctnnb1* exon 3, which encodes for the degradation domain of beta-catenin, was flanqued by LoxP sites [32]. This model allows for simultaneous *Stk11* invalidation and beta-catenin hyperactivation in the embryonic liver. Among 21 born mice, none had the double genotype of *Stk11* invalidation and *Ctnnb1* activation, whereas the Mendelian expected number should have been five, indicating a potential embryonic lethality. We sacrificed a pregnant mice at e17.5. Among the 14 embryos, three were dead and had the double genotype, activation of beta-catenin signaling and inactivation of *Lkb1*. Histological analysis of the liver of 2/3 mice was difficult because of autolytic whole-body processes. The third one had not yet already undergone autolysis and we observed numerous hepatocyte necrotic foci in the liver whereas other organs were morphologically normal (*i.e.* without autolysis) (Figure 7A). These results show that LKB1 is required for the survival of beta-catenin- activated hepatic progenitors.

To know if LKB1 was also required for the survival of *CTNNB1*-activated hepatoctyes in a tumor context, we used a mouse model of HCC: *Pklr-Myc*. In this model, a transgene encoding for the proto-oncogene *Myc* is controlled by a liver-specific promoter (promoter of the liver isoform of the pyruvate kinase gene, *Pklr*). These mice develop HCCs within 6 to 12 months, which interestingly are *Ctnnb1*-mutated [33]. We crossed these mice with the LKBKO^{Livad} mice in which deletion of *Lkb1* is inducible in the adult stage by tamoxifen injection. When 12 months old, mice were sacrificed 1 week after tamoxifen injection and tumors were compared according to their *Lkb1* status. Western blot analysis confirmed that *Stk11* was invalidated in

tumors from *Pklr-Myc; Stk11*$^{lox/lox}$*;Ttr-CreER*^{T2} mice and still expressed in tumors from *Pklr-Myc; Stk11*$^{lox/lox}$ mice. Interestingly, in *Lkb1* control mice, *Myc*-induced HCCs were well differentiated, microtrabecular and with little cytological atypia. In contrast, when *Lkb1* was invalidated in these tumors, the tumor morphology dramatically changed. Tumor cells evidenced marked dystrophic changes and numerous apoptotic cells were observed along the tumors (Figure 7B). It indicates that LKB1 is required for the survival of *CTNNB1*-activated hepatocytes also in a tumor context.

Since we observed an accumulation of LKB1 protein in *CTNNB1*-mutated human HCCs, we search if we can also find a LKB1 transcriptomic signature in such tumors. We integrated the LKBKO^{Livemb} datasets in a publically available transcriptomic dataset of human HCCs that were characterized for the *CTNNB1* status [5]. Among the 253 mouse genes differentially expressed between control and mutant mice in the LKBKO^{Livemb} mice, we found 135 human orthologous genes in the human HCCs dataset. An unsupervised analysis was run, integrating three mutant and three control mice into the human HCC dataset. Interestingly, the 3 control mice perfectly clustered with *CTNNB1*-mutated HCCs whereas the 3 *LKB1*-KO mice perfectly clustered with non-*CTNNB1*-mutated HCCs, indicating that a positive LKB1 liver signature was associated with *CTNNB1* mutations in HCCs and suggesting that a LKB1 program is expressed in *CTNNB1*- mutated HCCs (Figure 1B).

Discussion

Our results suggest that LKB1 is required to sustain activated beta-catenin signaling to ensure tumor cell survival in *CTNNB1*-mutated HCC. This is of particular interest as *LKB1* is known as a tumor suppressor gene. Indeed, germline heterozygous invalidation of *STK11* is causative of the cancer-predisposing Peutz-Jeghers syndrome [34, 35] and *STK11* is often found to be mutated in some sporadic cancers such as lung cancer [36]. However, other works also reported a potential oncogenic role for LKB1. For instance, *Stk11*-invalidated MEF (mouse embryonic fibroblasts) are resistant to transformation induced by various oncogenes such as Ha-Ras or LT from SV40 [19]. Such oncogenic properties for LKB1 could be related to its role in the control of energy metabolism and substrate utilization [13]. Indeed, it has been shown that LKB1 is required for tumor cell survival in a context of energy deprivation [37].

LKB1 can be considered as playing a dual role in carcinogenesis: it should be required in some tumor contexts (such as *CTNNB1*-mutated HCC), or at the first steps of oncogenesis, to allow the metabolic adaptation of cancer cells. In other contexts, or during tumor progression, LKB1 should be lost because of its tumor-suppressor properties linked to cell growth and polarity [38]. LKB1 is a negative regulator of epithelial polarity and is likely a limiting for epithelial-mesenchymal transition involved in tumor invasion and metastatic course [14].

We have also shown that in HCC, beta-catenin controls LKB1 protein expression and that a LKB1 program is reexpressed in *CTNNB1*-mutated HCCs. We recently described that *CTNNB1*-mutated HCCs harbor a specific metabolic program [39]. It is so tempting to suggest that LKB1 is involved in the metabolic control of *CTNNB1*-mutated HHCs. We also evidenced a new cross-talk between LKB1 and Notch signaling in the liver that could be crucial for the intrahepatic bile ducts development.

References

1. Audard V, Grimber G, Elie C, et al. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. J Pathol 2007;212:345-52.
2. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:8847-51.
3. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. Gastroenterology 2001;120:1763-73.
4. Legoix P, Bluteau O, Bayer J, et al. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. Oncogene 1999;18:4044-6.
5. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology 2007;45:42-52.
6. Monga SP. .Role of Wnt/β-catenin signaling in liver metabolism and cancer. Int J Biochem Cell Biol 2011;43:1021-9.
7. Cieply B, Zeng G, Proverbs-Singh T, et al. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. Hepatology 2009;49:821-31.
8. Cavard C, Colnot S, Audard V, et al. Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. Future Oncol 2008;4:647-60.
9. Benhamouche S, Decaens T, Godard C, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev Cell 2006;10:759-70.
10. Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. Curr Opin Genet Dev 2004;14:582-90.
11. Decaens T, Godard C, de Reynies A, et al. Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. Hepatology 2008;47:247-58.

12. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. Nat Rev Cancer 2009;9:563-75.

13. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science 2005;310:1642-6.

14. Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ, et al. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. Physiol Rev 2009;89:777-98.

15. Baas AF, Kuipers J, van der Wel NN, et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. Cell 2004;116:457-66.

16. Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. Annu Rev Biochem 2006;75:137-63.

17. Cadoret A, Ovejero C, Terris B, et al. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene 2002;21:8293-301.

18. Dahmani R, Just PA, Delay A, et al. A novel LKB1 isoform enhances AMPK metabolic activity and displays oncogenic properties. Oncogene 2014.

19. Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF, et al. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. Nature 2002;419:162-7.

20. Kellendonk C, Opherk C, Anlag K, et al. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. Genesis 2000;26:151-3.

21. Patel K, Foretz M, Marion A, et al. The LKB1-salt-inducible kinase pathway functions as a key gluconeogenic suppressor in the liver. Nat Commun 2014;5:4535.

22. Woods A, Heslegrave AJ, Muckett PJ, et al. LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice. Biochem J 2011;434:49-60.

23. Ichiyama A. Studies on a unique organelle localization of a liver enzyme, serine:pyruvate (or alanine:glyoxylate) aminotransferase. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2011;87:274-86.

24. Raynaud P, Carpentier R, Antoniou A, et al. Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. Int J Biochem Cell Biol 2011;43:245-56.

25. Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, et al. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. Gastroenterology 2009;136:2325-33.

26. Coffinier C, Gresh L, Fiette L, et al. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. Development 2002;129:1829-38.

27. Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, et al. The onecut transcription factor {H}{N}{F}6 is required for normal development of the biliary tract. Development 2002;129:1819-28.

28. Zhang N, Bai H, David KK, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. Dev Cell 2010;19:27-38.

29. Zong Y, Panikkar A, Xu J, et al. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. Development 2009;136:1727-39.

30. Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, et al. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. Gastroenterology 2004;127:1775-86.

31. Hofmann JJ, Zovein AC, Koh H, et al. Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development: insights into Alagille syndrome. Development 2010;137:4061-72.

32. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, et al. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. EMBO J 1999;18:5931-42.

33. de La Coste A, Mignon A, Fabre M, et al. Paradoxical inhibition of c-myc-induced carcinogenesis by Bcl-2 in transgenic mice. Cancer Res 1999;59:5017-22.

34. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. Gut 2010;59:975-86.

35. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, et al. STK11 status and intussusception risk in Peutz-Jeghers syndrome. J Med Genet 2006;43:e41.

36. Sanchez-Cespedes M. The role of LKB1 in lung cancer. Fam Cancer 2011;10:447-53.

37. Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. Nature;485:661-5.

38. Partanen JI, Nieminen AI, Makela TP, et al. Suppression of oncogenic properties of c-Myc by LKB1-controlled epithelial organization. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:14694-9.

39. Gougelet A, Torre C, Veber P, et al. T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. Hepatology 2014;59:2344-57.

Figures legends

Figure 1: Activation of LKB1 in *CTNNB1*-mutated HCCs. **A:** LKB1 accumulates in a large subset of *CTNNB1*-mutated HCCs. WB analysis of LKB1, of its partner Mo25, and GLUL (glutamine synthase, a beta-catenin target gene in the liver) in 14 HCCs (T) , selected according to their *CTNNB1* mutational status. NT indicates matched non tumor liver tissue for each HCC sample. **B**: The LKB1 transcriptomic signature associates with *CTNNB1*-mutated HCCs. The transcriptomic data (converted into human orthologues) of six LKBKO^{livemb}mice (3 KO and 3 control) were intergrated into a publically available transcriptomic dataset of Human HCCs [5] and an unsupervised clustering analysis was run. G1-G6 indicate transcriptomic categories defined in [5] and *CTNNB1* indicates *CTNNB* activating mutations.

Figure 2: Oncogenic beta-catenin drives LKB1 proteic expression. **A**: beta-catenin drives LKB1 proteic expression and repress deltaN-LKB1 in HuH6 cells. HuH6 cells were treated with lipofectamine, scramble siRNA or three different siRNAs against *CTNNB1* mRNA, and were collected 72h after transfection. Western blot analysis of beta-catenin, LKB1 (antibody #1: clone D60C5, #2: clone Ley37D/G6) and gamma-tubulin (loading control). **B**: beta-catenin drives LKB1 proteic expression at a post-transcriptionnal level. RT-qPCR analysis of *Axin2* and *Lkb1* gene expression in the same setting as in A. Mean from three independent experiments. Error bars: standard deviations. **C**: *CTNNB1*-controlled expression of *LKB1* relies on *CTNNB1* oncogenic alterations. HuH6 and HepG2 cells were treated as in A and western blot analysis of beta-catenin, LKB1 and beta-actin (loading control) was performed 72h after transfection. The panel on the right depicts the localization of the different siRNA along beta-catenin and the deleted *CTNNB1* sequence in HepG2 cells.

Figure 3: *Lkb1* deletion in the liver results in different phenotypes if performed during development or in the adult mouse. **A**: LKBKO^{livad} and LKBKO^{livemb} mouse models results in an efficient invalidation of Lkb1 proteic expression in the liver. Western blot analysis of Lkb1

and beta-actin (loading control) of liver lysates from control and mutant mice in the LKBKO^{livemb} (2-week old mice) and LKBKO^{livad} (one week after Tamoxifen injection) models. **B**: Deletion of *Lkb1* in the embryonic liver causes postnatal growth retardation beginning at day 12. Weight curves from birth to post-natal day 30 in the LKBKO^{livemb} model. Mice genotype were determined at postnatal day 5. N=15 control and 8 mutant mice. Error bars: standard deviations. **C**: LKBKO^{livemb} mutant mice are hypomorphic. Gross appearance of a control and mutant LKBKO^{livemb} mice at postnatal day 28. **D**: LKBKO^{livad} mutant mice present a mild fasting hyperglycemia but without significant liver damage. ALAT (alanine aminotransferase), bilirubin and glucose blood levels of 16h-fasted LKBKO^{livad} mice two weeks after Tamoxifen injections. n=6 control and 12 mutant mice. Error bars: SEM. **E-F:** Differential roles of Lkb1 towards hepatocyte proliferation. E: measurement of Ki67-positive hepatocytes in twenty consecutive high-power fields (x400) in the LKBKO^{livad}mouse model at the indicated times after Tamoxifen injections. n=4-5 per group. Error bars: standard deviations. F: Representative images of Ki67 immunostaining in 4-weekold LKBKO^{livemb} mice. **G**: Little overlap between LKBKO^{livad} and LKBKO^{livemb} models for differentially expressed genes between control and mutant mice. Venn diagram of differentially expressed genes ($p<0.05$, fold change>1.5) on micro-array transcriptomic chips between mutant and control mice in the LKBKO^{livad} (one week after Tamoxifen injections) and LKBKO^{livemb} (5-day old) models.

Figure 4: Lkb1 is required for full activation of the beta-catenin program in the liver. **A-B**: LKBKO^{livemb} mutant mice have an altered zonation of the liver lobule. Representative images of *Glul* (Glutamine synthase) expression by immunohistochemistry (A) and *in situ* hybridization (B) in LKBKO^{livemb} control and mutant 3-week old mice. **C**: Conserved zonation of the liver lobule zonation when *Lkb1* is deleted in the adult liver. Representative images of Glul immunostaining in LKBKO^{livad} control and mutant 16h-fasted mice, 2 weeks after Tamoxifen injections. **D**: Lkb1 is required for the expression of a subset of beta-catenin target

genes in the adult liver during feeding. RT-qPCR analysis of different positive (*Axin2*, *Sp5*, *Glul*, *Lect2*, *Cyp2e1*, *Nkd1* and *Aqp9*) and negative (*Arg1*, *Gls2* and *Hal*) beta-catenin target genes in the LKBKO^{livad} model in 16h-fasted and fed (3h after light switched off in a 12h-12h controlled light cycle) mutant and control mice. Fasted: n=6 control and 12 mutant mice. Fed: n=4 control and 6 mutant mice. Error bars: SEM. **E**: Lkb1 is required for the activation of the beta-catenin transcriptional program in the LKBKO^{livemb} model. RT-qPCR analysis of different positive (*Axin2*, *Sp5*, *Glul*, *Lect2*, *Cyp2e1*, *Nkd1* and *Aqp9*) and negative (*Arg1*, *Gls2* and *Hal*) beta-catenin target genes in 8- and 14-day old control and mutant LKBKO^{livemb} mice. N=3-4 per group. Error bars: SEM.

Figure 5: Lkb1 controls intrahepatic bile duct tubulogenesis. **A-B**: Obstructive cholestasis in LKBKO^{livemb} mutant mice. A: gross aspect of serum from a control and mutant LKBKO^{livemb} mice at postnatal day 19. B: Blood levels of conjugated bilirubin in LKBKO^{livemb} control and mutant mice at postnatal day 19. n=6 control and 4 mutant mice. Error bars: standard deviations. **C**: Lkb1 is required for intrahepatic bile ducts tubulogenesis. Representative images of 3-week old control and mutant LKBKO^{livemb} mice liver, stained for cytokeratin 19 (cholangiocyte marker). Note the well-formed and mature bile duct in the control mouse and the ductal plate-like structure around a portal tract in a mutant mouse. **D**: Lkb1 is required for the transition from an asymmetric bile duct to a symmetric bile duct in the developing liver. LKBKO^{livemb} embryos were sampled at e18.5 and liver sections were stained for the hepatoblast marker Hnf4, and for the cholangiocyte markers Sox9 and E-cadherin. Note the symmetrical localization of Sox9 and E-cadherin around the bile duct in control mice whereas Sox9 and E-cadherin were only expressed in the portal layer of the asymmetric bile ducts (and not the parenchymal layer) in mutant mice.

Figure 6: Invalidation of *Lkb1* and Notch in the embryonic liver share common molecular features. **A**: Lkb1 is required for full activation of Notch signaling in the developing liver. RT-

qPCR of different Notch positive target genes (*Hey1*, *Heyl*, *Hes1* and *Nrarp*) in 8- and 14-day old control and mutant LKBKO^{livemb} mice. N=3-4 per group. Error bars: SEM. **B**: Notch is required for Lkb1 proteic expression in the developing liver. Liver lysates from 5-day old NOTCHKO^{livemb} control and mutant mice were analyzed by western blot for Lkb1 beta-actin (loading control) proteic expression. **C**: NOTCHKO^{livemb} and LKBKO^{livemb} models share a common transcriptomic signature. Up: Venn diagram of differentially expressed genes ($p<0.05$, fold change>1.5) on micro-array transcriptomic chips between mutant and control mice in the LKBKO^{livemb} and NOTCHKO^{livemb} (5-day old) models. Down: supervised clustering of the 55-gene common signature of control and mutant mice of both models. **D**: The Lkb1 transcriptomic signature is enriched in the NOTCHKO^{livemb} model and *vice versa*. Gene Set Enrichement analysis according to the different datasets. All gene sets were significantly enriched at nominal p-value<1%.

Figure 7: Lkb1 is required for the survival of beta-catenin-activated hepatocytes. **A**: *Lkb1* loss causes embryonic death and liver necrosis when beta-catenin is overactivated in the liver. Representative hematein-eosin stained liver sections from a control mouse and a *Lkb1$^{lox/lox}$;Ctnnb1$^{lox(ex3)/wt}$;AlFp-Cre* mouse at e17.5.Note the foci of hepatoblast necrosis in the double mutant mouse (dotted line). **B**: *Lkb1* loss causes apoptosis in *Ctnnb1*-muated HCCs. Pklr-Myc +/- LKBKO^{livad} were studied when 12-18 months old, one week after Tamoxifen injections. Representative images of observed HCCs, without (left) or with (right) *Lkb1* genetic invalidation. Top: Immunohistochemistry for Glul showing that beta-catenin signaling is activated in these tumors. Bottom: Hematein-eosin stained sections. Note the dysmorphic atypia and the numerous apoptotic bodies (arrow heads) in the *Lkb1* invalidated tumors.

Supplementary figures legends

Supplementary Figure 1: Some beta-catenin target genes in the liver shows dynamic trasncriptionnal regulation according to the nutritional state. C57Bl6/J normal male mice were sacrificed at the indicated times during a normal alimentary nycthemeral cycle and prolonged fasting. T0 indicates a 3h-fed condition (3hours after light switched off during a controlled 12h-12h light cycle). RT-qPCR of positive beta-catenin target genes (*Axin2* and *Sp5*, top) and of *Pck1* (Pepck, phosphoenol pyruvate carboxykinase, as control of feeding and fasting, bottom). n=5 per group. Error bars: SEM.

Supplementary Figure 2: Asymmetrical bile ducts in mutant LKBKO^{livemb} mice. LKBKO^{livemb} embryos were sampled at e18.5 and liver sections were stained for the cholangiocyte markers Ostepontin (Opn) and E-cadherin and for basement membrane (Laminin). Note the symmetrical localization of Opn and E-cadherin in the bile duct of control mice with circonferential laminin staining. In mutant mice, these markers were only expressed in the portal layer of the asymmetric bile ducts (and not the parenchymal layer).

Supplementary Figure 3: HNF1beta, HNF6 and YAP expression are restricted to the portal layer of asymmetrical bile duct in LKBKO^{livemb} mutant mice. LKBKO^{livemb} embryos were sampled at e18.5 and liver sections were stained for the indicated markers.

Supplementary Figure 4: Hes1 and Notch2-ICD expression are restricted to the portal layer of asymmetrical bile duct in LKB1 KO mice. LKBKO^{livemb} embryos were sampled at e18.5 and liver sections were stained for the indicated markers.

Supplementary Figure 5: Effective invalidation of *Lkb1* in tumors from *Pklr-Myc*;*Lkb1*$^{lox/lox}$;*Ttr-CreER*^{T2} mice. Western blot analysis of Lkb1 expression in non-tumor and tumor samples from *Pklr-Myc*;*Lkb1*$^{lox/lox}$;*Ttr-CreER*^{T2} and *Pklr-Myc*;*Lkb1*$^{lox/lox}$ mice one week after Tamoxifen injections.

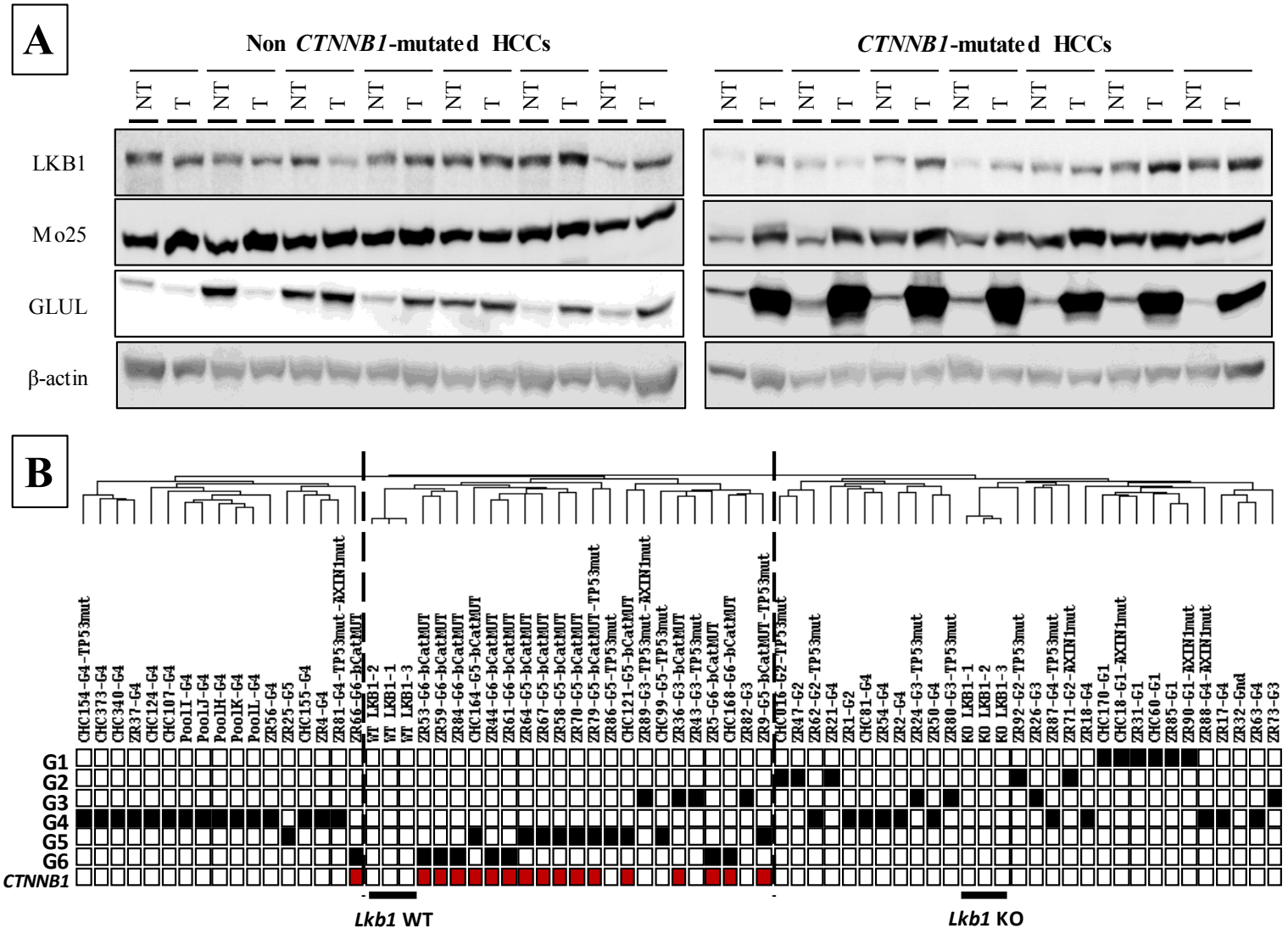

A
Non CTNNB1-mutated HCCs
CTNNB1-mutated HCCs
NT
T
LKB1
Mo25
GLUL
β-actin
B
G1
G2
G3
G4
G5
G6
CTNNB1
Lkb1 WT
Lkb1 KO

Figure 1

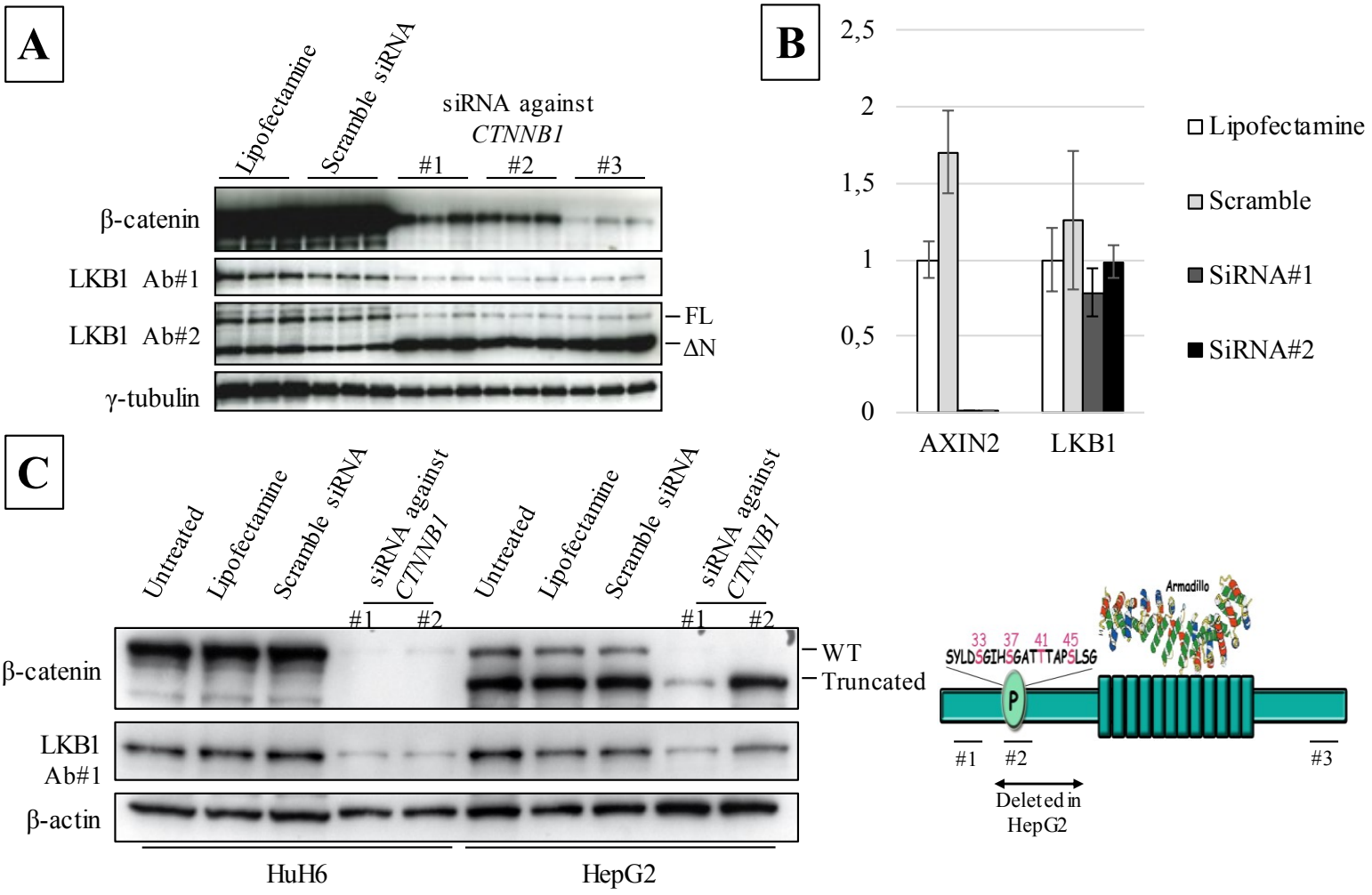

A
Lipofectamine
Scramble siRNA
siRNA against CTNNB1
#1
#2
#3
β-catenin
LKB1 Ab#1
LKB1 Ab#2
γ-tubulin
FL
ΔN
B
2,5
2
1,5
1
0,5
0
AXIN2
LKB1
Lipofectamine
Scramble
SiRNA#1
SiRNA#2
C
Untreated
Lipofectamine
Scramble siRNA
siRNA against CTNNB1
#1
#2
β-catenin
LKB1 Ab#1
β-actin
WT
Truncated
HuH6
HepG2
Armadillo
33 37 41 45
SYLDSGIHSGATTTAPSLSG
P
#1
#2
#3
Deleted in HepG2

Figure 2

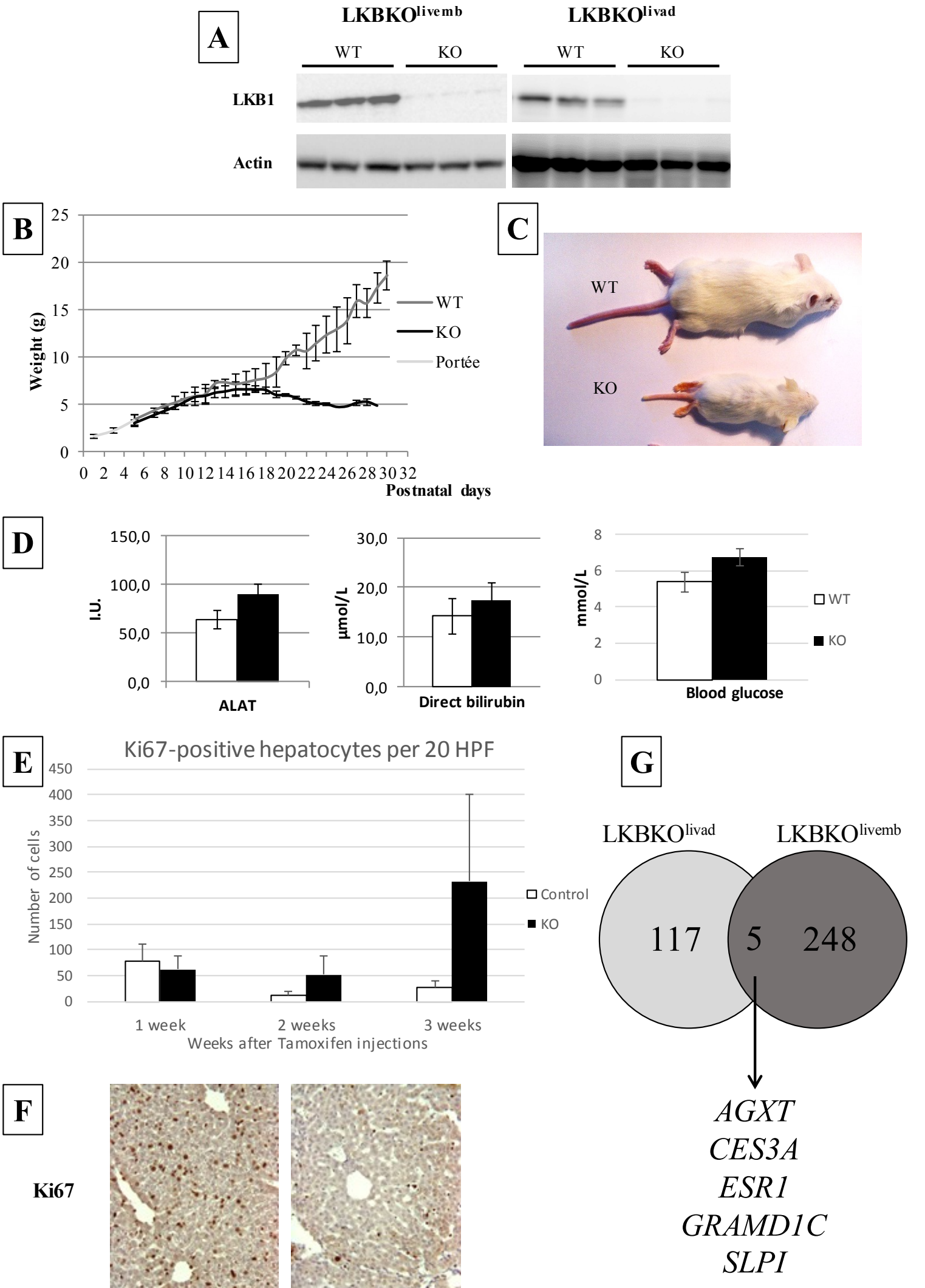

A
LKBKO livemb
LKBKO livad
WT
KO
WT
KO
LKB1
Actin
B
Weight (g)
Postnatal days
WT
KO
Portée
C
WT
KO
D
I.U.
ALAT
µmol/L
Direct bilirubin
mmol/L
Blood glucose
WT
KO
E
Ki67-positive hepatocytes per 20 HPF
Number of cells
1 week
2 weeks
3 weeks
Weeks after Tamoxifen injections
Control
KO
G
LKBKO livad
LKBKO livemb
117
5
248
AGXT
CES3A
ESR1
GRAMD1C
SLPI
F
Ki67
WT
KO

Figure 3

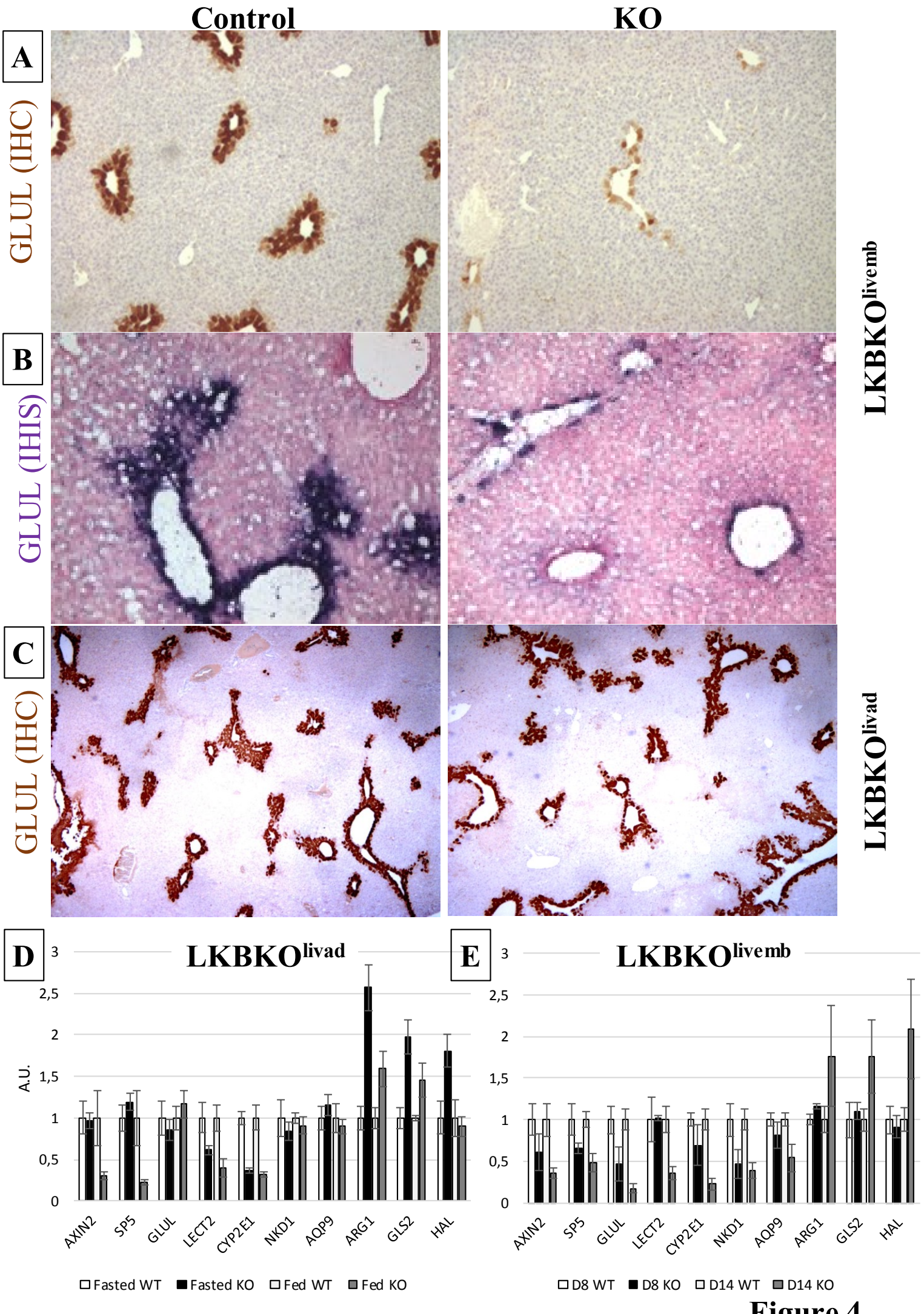

Control
KO
A
GLUL (IHC)
B
GLUL (IHIS)
C
GLUL (IHC)
LKBKOlivemb
LKBKOlivad
D
LKBKOlivad
A.U.
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
AXIN2
SP5
GLUL
LECT2
CYP2E1
NKD1
AQP9
ARG1
GLS2
HAL
Fasted WT
Fasted KO
Fed WT
Fed KO
E
LKBKOlivemb
D8 WT
D8 KO
D14 WT
D14 KO

Figure 4

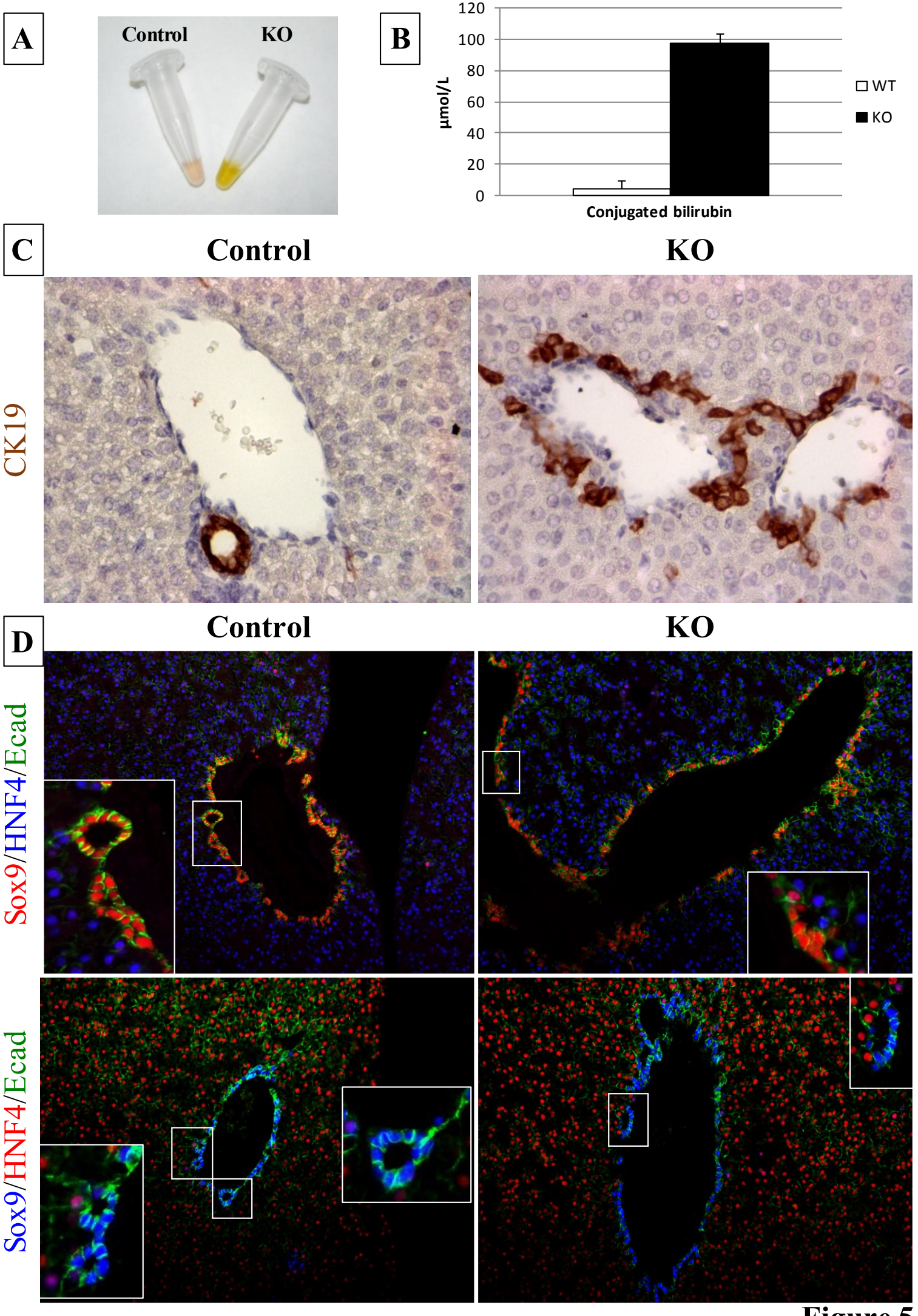

A
Control
KO
B
120
100
80
60
40
20
0
µmol/L
WT
KO
Conjugated bilirubin
C
Control
KO
CK19
D
Control
KO
Sox9/HNF4/Ecad
Sox9/HNF4/Ecad

Figure 5

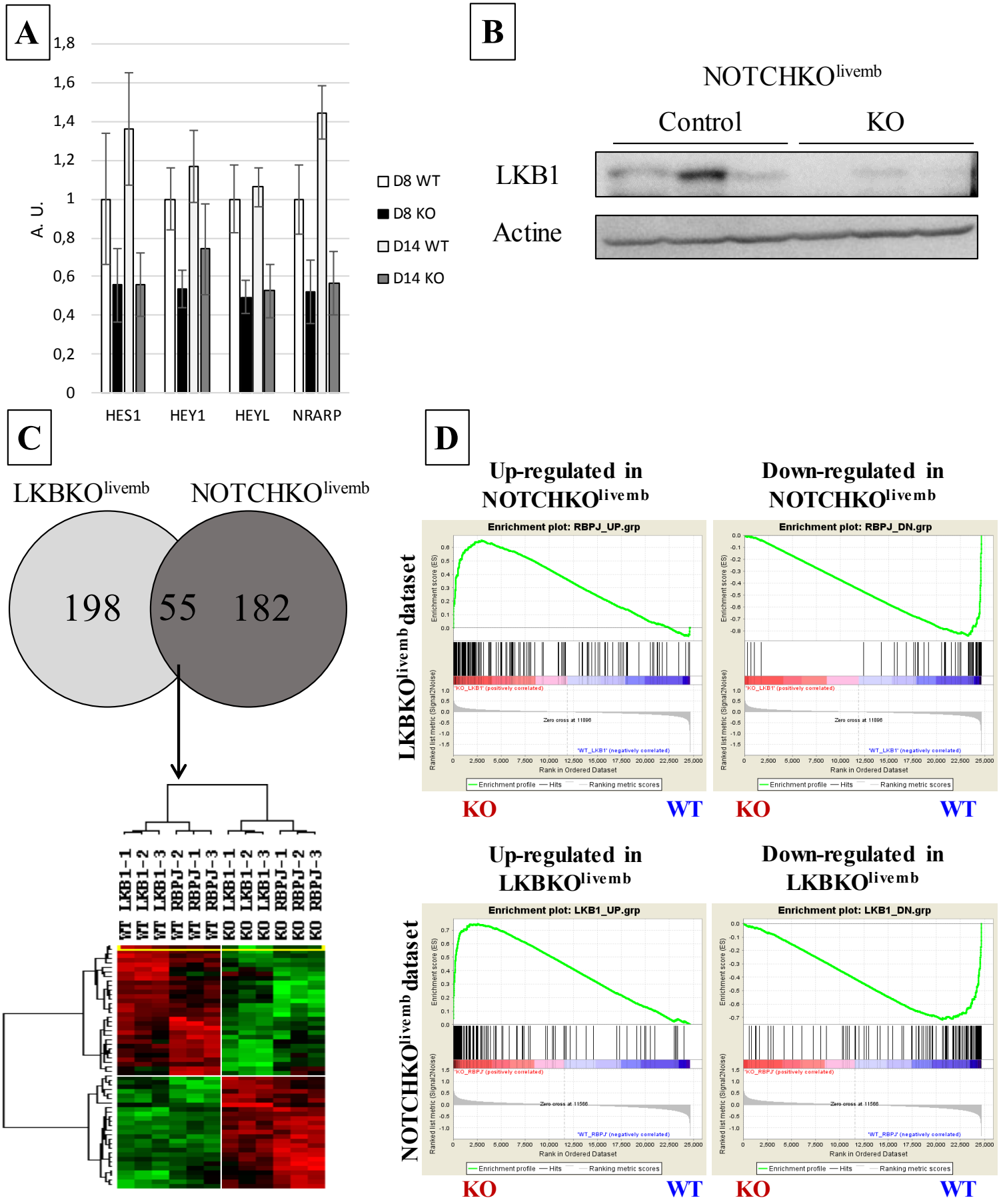

A
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
A. U.
HES1
HEY1
HEYL
NRARP
D8 WT
D8 KO
D14 WT
D14 KO
B
NOTCHKOlivemb
Control
KO
LKB1
Actine
C
LKBKOlivemb
NOTCHKOlivemb
198
55
182
WT LKB1-1
WT LKB1-2
WT LKB1-3
WT RBPJ-2
WT RBPJ-1
WT RBPJ-3
KO LKB1-1
KO LKB1-2
KO LKB1-3
KO RBPJ-1
KO RBPJ-2
KO RBPJ-3
D
Up-regulated in NOTCHKOlivemb
Down-regulated in NOTCHKOlivemb
LKBKOlivemb dataset
Enrichment plot: RBPJ_UP.grp
Enrichment plot: RBPJ_DN.grp
KO
WT
Up-regulated in LKBKOlivemb
Down-regulated in LKBKOlivemb
NOTCHKOlivemb dataset
Enrichment plot: LKB1_UP.grp
Enrichment plot: LKB1_DN.grp
KO
WT

Figure 6

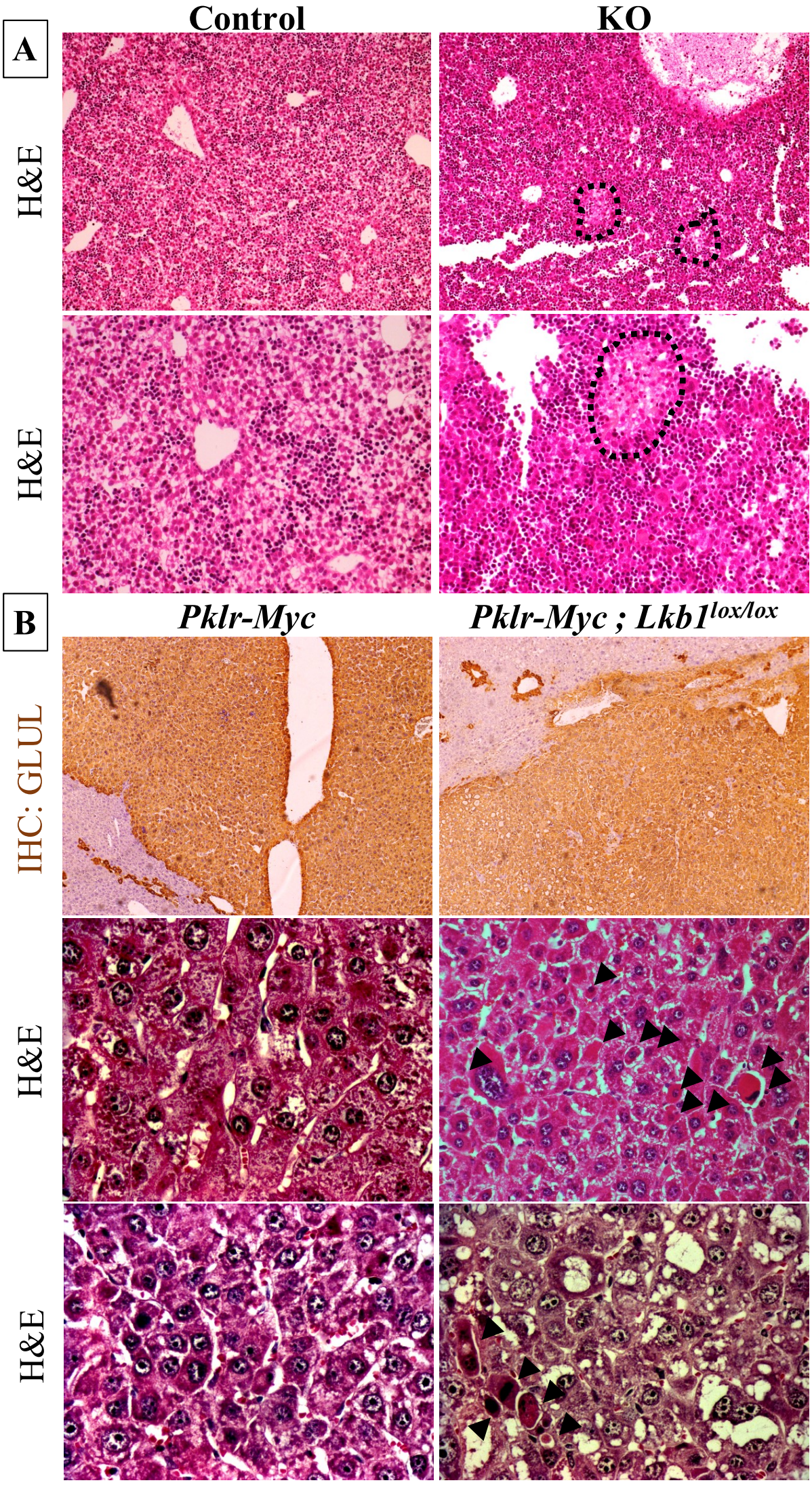
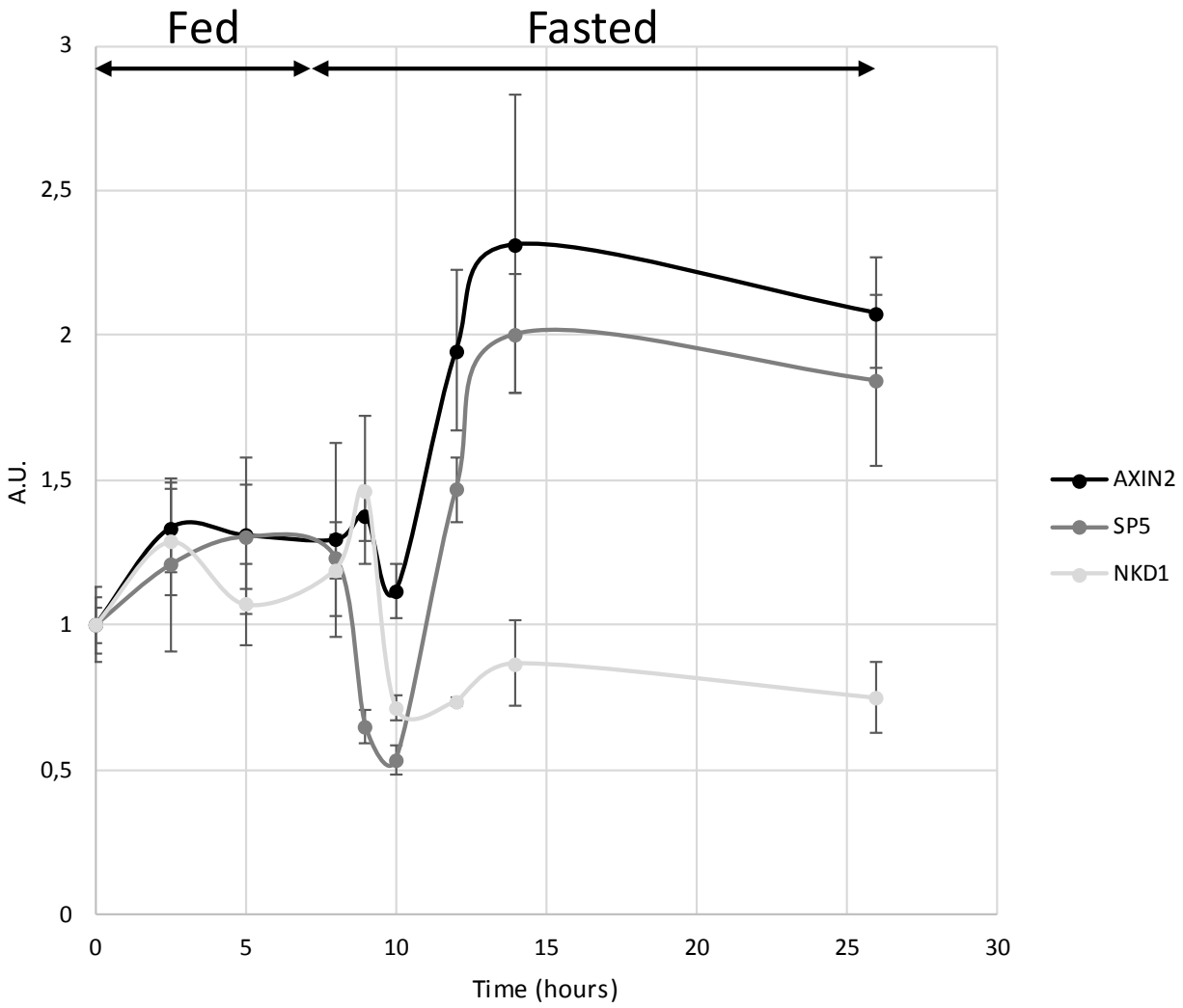
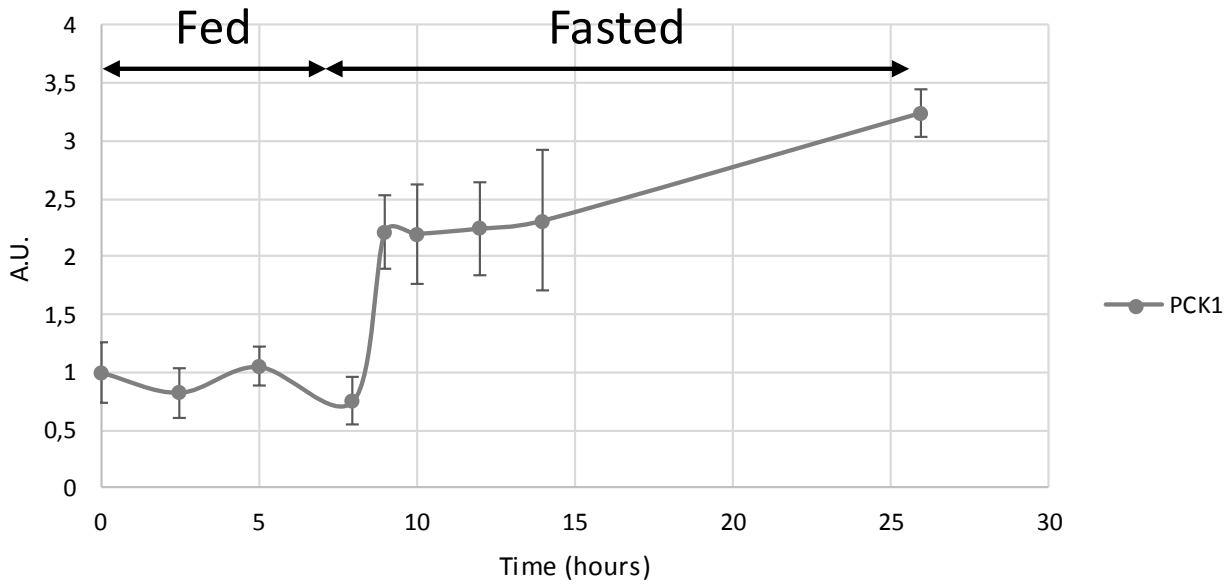
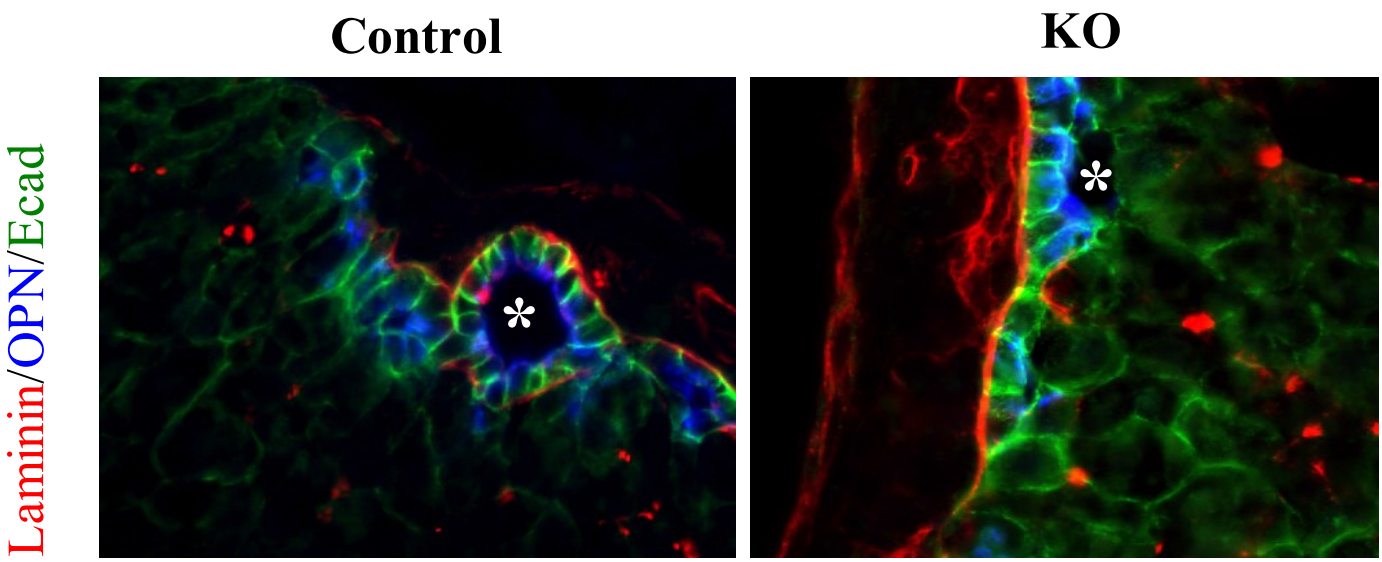

A
Control
KO
H&E
H&E
B
Pklr-Myc
Pklr-Myc ; Lkb1lox/lox
IHC: GLUL
H&E
H&E

Figure 7

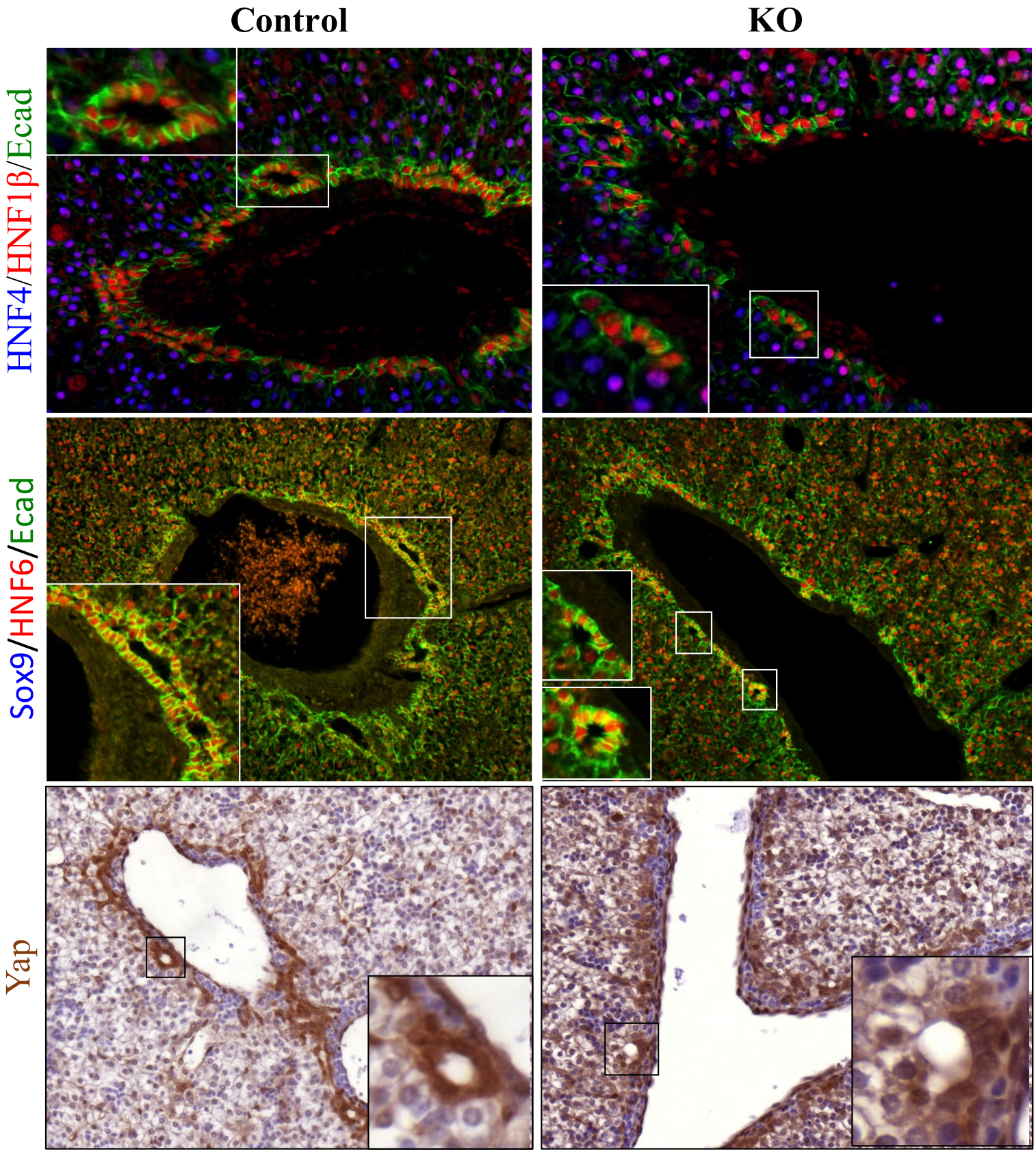




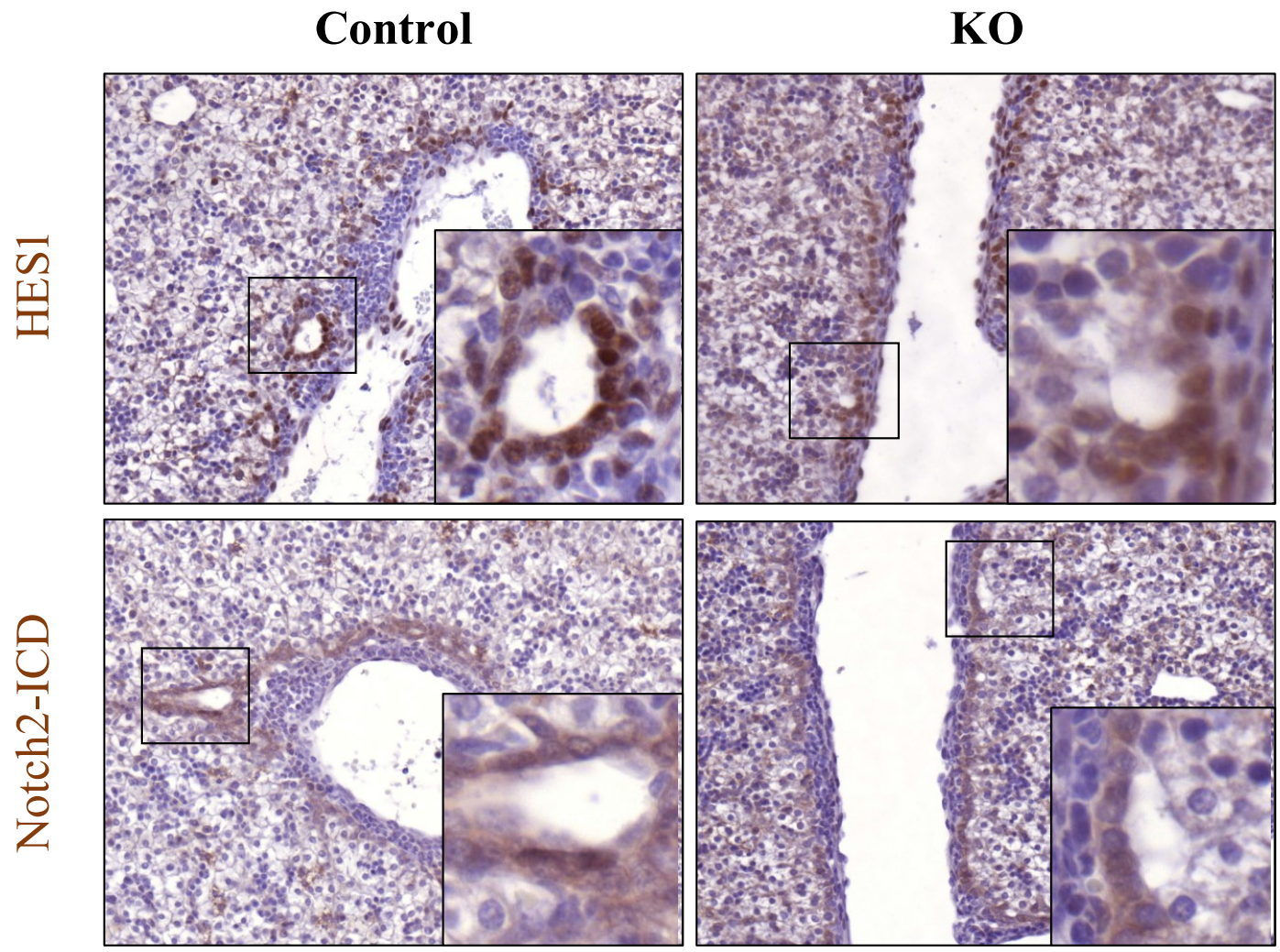
Supplementary figure 1



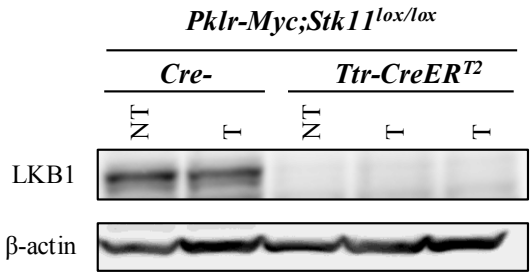
Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Supplementary figure 5

Supplementary table 1: List of 253 non-redundant genes differentially expressed in KO vs WT (LKBKOlivemb) mice

* p<.001 ; ** fold-change >1.5

Gene symbol	Gene name	Accession	Entrez ID	Parametric p-value *	Geom mean of intensities in KO_LKB1	Geom mean of intensities in WT_LKB1	Fold-change LKB1 KO/WT **
Cyp2c55	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	NM_028089	72082	< 1e-07	126,43	12,64	10
Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_011414	20568	< 1e-07	1170,11	151,28	7,73
Tff3	Trefoil factor 3, intestinal	ENSMUST00000024827	21786	< 1e-07	983,32	141,66	6,94
Ubd	Ubiquitin D	NM_023137	24108	1,50E-06	89,98	20,83	4,32
Ttyh1	Tweety homolog 1 (Drosophila)	ENSMUST00000129423	57776	7,00E-07	169,21	39,52	4,28
Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	NM_009127	20249	4,50E-06	182,13	42,89	4,25
Glod5	Glyoxalase domain containing 5	NM_027227	69824	0,0006232	47,82	13,06	3,66
Serpina6	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6	ENSMUST00000044159	12401	2,00E-07	1302,5	357,97	3,64
Tnfrsf12a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	NM_013749	27279	1,00E-07	108,38	31,52	3,44
Nipal2	NIPA-like domain containing 2	NM_145469	223473	4,00E-07	27,17	8,3	3,27
Gstm3	Glutathione S-transferase, mu 3	ENSMUST00000106678	14864	1,00E-07	126,95	39,46	3,22
Gucy2c	Guanylate cyclase 2c	NM_001127318	14917	1,00E-07	85,43	26,68	3,2
Cox7a1	Cytochrome c oxidase, subunit VIIa 1	NM_009944	12865	7,00E-07	96,74	31,43	3,08
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_001044384	21857	2,79E-05	39,69	13,1	3,03
Sytl5	Synaptotagmin-like 5	NM_177704	236643	6,36E-05	45,13	17,86	2,53
Aldh1a7	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	NM_011921	26358	2,44E-05	80,92	32,36	2,5
Pcdh20	Protocadherin 20	NM_178685	219257	1,02E-05	30,13	12,24	2,46

Cacna1b	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	ENSMUST00000070864	12287	9,70E-06	156,17	63,89	2,44
Elovl7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	NM_029001	74559	1,97E-05	62	25,72	2,41
Jun	Jun oncogene	NM_010591	16476	0,0001015	87,09	36,42	2,39
Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	NM_130450	170439	1,73E-05	141,1	59,61	2,37
Ifi27l2b	Interferon, alpha-inducible protein 27 like 2B	NM_145449	217845	6,10E-06	20,6	8,9	2,32
Snord13		NR_028522		0,0004569	397,76	175,12	2,27
BC016579	CDNA sequence, BC016579	NM_145389	212998	0,0001465	34,25	15,12	2,26
Dapl1	Death associated protein-like 1	NM_029723	76747	9,00E-07	26,7	11,8	2,26
Mup20	Major urinary protein 20	NM_001012323	381530	0,0002115	15,5	7,06	2,2
Guca2b	Guanylate cyclase activator 2b (retina)	NM_008191	14916	2,70E-06	46,57	21,24	2,19
Cldn7	Claudin 7	NM_016887	53624	2,13E-05	41,66	19,18	2,17
Flrt3	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	NM_001172160	71436	8,00E-06	32,95	15,29	2,16
Gpt2	Glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	NM_173866	108682	5,99E-05	110,99	51,31	2,16
Akr1b7	Aldo-keto reductase family 1, member B7	NM_009731	11997	1,50E-06	553,19	260,45	2,12
Sstr2	Somatostatin receptor 2	ENSMUST00000106630	20606	0,0001507	66,87	31,47	2,12
Scd2	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	NM_009128	20250	1,02E-05	261,67	125,49	2,09
Acot1	Acyl-CoA thioesterase 1	NM_012006	26897	0,0004176	98,71	47,38	2,08
Spon2	Spondin 2, extracellular matrix protein	NM_133903	100689	1,83E-05	215,55	107,96	2
Cdc42ep5	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5	ENSMUST00000076831	58804	9,48E-05	40,65	20,44	1,99
Dak	Dihydroxyacetone kinase 2 homolog (yeast)	NM_145496	225913	0,0001024	914,72	469,63	1,95
Dcdc5	Doublecortin domain containing 5	BC141310	329482	0,0003006	32,68	16,78	1,95

Acot2		NM_134188		5,10E-05	71,54	36,8	1,94
Ociad2	OCIA domain containing 2	NM_026950	433904	7,29E-05	95,21	49,41	1,93
Gtdc1	Glycosyltransferase-like domain containing 1	ENSMUST00000049051	227835	0,0002232	119,59	62,2	1,92
2510049J12Rik	RIKEN cDNA 2510049J12 gene	NM_001101431	70291	2,85E-05	146,61	76,6	1,91
C730027H18Rik		NR_038040		4,71E-05	29,68	15,53	1,91
B4galt5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	NM_019835	56336	5,62E-05	246,18	131,5	1,87
Gas2	Growth arrest specific 2	NM_008087	14453	0,0001795	96,81	51,68	1,87
Cdhr5	Cadherin-related family member 5	NM_001114322	72040	3,09E-05	165,6	89,27	1,86
Baiap2l2	BAI1-associated protein 2-like 2	NM_177580	207495	1,39E-05	54,84	29,62	1,85
Robo1	Roundabout homolog 1 (Drosophila)	NM_019413	19876	6,86E-05	251,95	136,39	1,85
Sdsl	Serine dehydratase-like	ENSMUST00000031594	257635	1,34E-05	122,34	66,28	1,85
Tmem82	Transmembrane protein 82	NM_145987	213989	4,07E-05	177,27	95,75	1,85
1700027D21Rik	RIKEN cDNA 1700027D21 gene	NM_029661	76573	0,0001245	191,83	104,07	1,84
Slc30a3	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	NM_011773	22784	1,44E-05	67,53	36,89	1,83
Slc7a2	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	ENSMUST00000057784	11988	0,0004085	522,56	286,02	1,83
Steap2	Six transmembrane epithelial antigen of prostate 2	NM_001103157	74051	0,0001078	72,99	39,9	1,83
Tm4sf4	Transmembrane 4 superfamily member 4	ENSMUST00000029377	229302	9,90E-05	1199,15	657,68	1,82
Pnpla3	Patatin-like phospholipase domain containing 3	NM_054088	116939	0,0001643	84,2	46,89	1,8
Zfp827	Zinc finger protein 827	NM_178267	622675	4,13E-05	53,23	29,8	1,79
Olfml1	Olfactomedin-like 1	NM_172907	244198	0,0001845	112,9	63,43	1,78
Epn2	Epsin 2	ENSMUST00000108712	13855	1,42E-05	122,67	69,36	1,77
Hnmt	Histamine N-methyltransferase	NM_080462	140483	6,58E-05	26,06	14,74	1,77

Neu3	Neuraminidase 3	NM_016720	50877	0,0001019	69,4	39,21	1,77
Slc25a22	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, glutamate), member 22	NM_026646	68267	0,0001631	480,12	270,86	1,77
Tmprss2	Transmembrane protease, serine 2	NM_015775	50528	0,0001308	80,45	45,4	1,77
Mir467f		NR_035420		0,0009883	53,01	30,14	1,76
Prr15l	Proline rich 15-like	ENSMUST00000107636	217138	2,14E-05	95,68	54,43	1,76
BC090627		NR_004843		0,000247	72,29	41,24	1,75
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NM_010444	15370	0,000243	105,71	60,84	1,74
Sdr16c5	Short chain dehydrogenase/reductase family 16C, member 5	NM_181989	242285	0,0001042	11,59	6,68	1,74
Dopey2	Dopey family member 2	NM_027293	70028	1,81E-05	113,28	65,33	1,73
Sgk2	Serum/glucocorticoid regulated kinase 2	ENSMUST00000018012	27219	0,0001271	99,1	57,33	1,73
Tmem27	Transmembrane protein 27	ENSMUST00000112280	57394	9,28E-05	15,09	8,72	1,73
1700024P16Rik	RIKEN cDNA 1700024P16 gene	NM_001162980	242594	0,0005802	75,75	44,09	1,72
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	ENSMUST00000141916	13360	3,23E-05	164,68	95,85	1,72
Egln3	EGL nine homolog 3 (C. elegans)	NM_028133	112407	0,0005152	175,36	102,74	1,71
Cidec	Cell death-inducing DFFA-like effector c	ENSMUST00000113091	14311	0,0007608	44,2	25,99	1,7
Ugdh	UDP-glucose dehydrogenase	ENSMUST00000031103	22235	0,000177	124,54	73,34	1,7
C630016N16Rik	RIKEN cDNA C630016N16 gene	AK049951	791088	8,90E-05	85,23	50,49	1,69
Tmem98	Transmembrane protein 98	ENSMUST00000040865	103743	0,0001015	84,77	50,05	1,69
Cxadr	Coxsackie virus and adenovirus receptor	ENSMUST00000023572	13052	5,68E-05	223,79	133,64	1,67
Kl	Klotho	NM_013823	16591	0,0008132	26,99	16,19	1,67
Mtmr7	Myotubularin related protein 7	NM_001040699	54384	0,0002391	29,94	17,93	1,67
Plin5	Perilipin 5	NM_025874	66968	0,0004831	79,66	47,74	1,67
Bex1	Brain expressed gene 1	NM_009052	19716	0,0001535	953,2	573,06	1,66
Dab1	Disabled homolog 1 (Drosophila)	ENSMUST00000080139	13131	0,0007441	24,16	14,63	1,65

Fdps	Farnesyl diphosphate synthetase	NM_001253751	110196	0,0009014	399,14	241,43	1,65
Gria3	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	NM_016886	53623	0,0009677	77,98	47,19	1,65
Myo7b	Myosin VIIB	ENSMUST00000134663	17922	0,0001927	65,24	39,44	1,65
Acmsd	Amino carboxymuconate semialdehyde decarboxylase	NM_001033041	266645	0,000591	121,96	74,4	1,64
Bicc1	Bicaudal C homolog 1 (Drosophila)	ENSMUST00000143791	83675	7,05E-05	131,83	80,53	1,64
Csrp2	Cysteine and glycine-rich protein 2	NM_007792	13008	4,60E-05	176,07	107,5	1,64
Rps11		NM_013725		0,0008517	50,48	30,82	1,64
Adat2	Adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog (S. cerevisiae)	NM_025748	66757	0,0003834	93,61	57,42	1,63
Baiap2l1	BAI1-associated protein 2-like 1	NM_025833	66898	8,13E-05	273,11	167,86	1,63
Retsat	Retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)	ENSMUST00000070597	67442	9,67E-05	353,14	217,22	1,63
Sds	Serine dehydratase	NM_145565	231691	0,000747	91,64	56,2	1,63
Jund	Jun proto-oncogene related gene d	BC094068	16478	0,0001121	419,49	258,79	1,62
Me1	Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	NM_008615	17436	0,0008051	46,55	28,82	1,62
Cbr1	Carbonyl reductase 1	ENSMUST00000039659	12408	0,0002541	272,58	169,09	1,61
Otud1	OTU domain containing 1	NM_027715	71198	0,0004744	59,05	36,75	1,61
Rcan3	Regulator of calcineurin 3	NM_022980	53902	0,0004771	74,96	46,54	1,61
Neurl1b	Neuralized homolog 1b (Drosophila)	NM_001081656	240055	0,0001211	28,71	17,99	1,6
Atp4a	ATPase, H+/K+ exchanging, gastric, alpha polypeptide	NM_018731	11944	0,0008522	43,93	27,56	1,59
Enpep	Glutamyl aminopeptidase	NM_007934	13809	0,00015	145,47	91,44	1,59
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_010941	18194	0,000531	315,52	200,07	1,58
Sgk1	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1	NM_011361	20393	0,0001745	139,02	87,86	1,58
Vcan	Versican	NM_001081249	13003	0,0002897	35,56	22,49	1,58

Gstp1	Glutathione S-transferase, pi 1	NM_013541	14870	0,0002174	2640,33	1678,08	1,57
Itih5	Inter-alpha (globulin) inhibitor H5	NM_172471	209378	0,0002634	83,78	53,51	1,57
Rras	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R	NM_009101	20130	0,0005139	199,08	126,93	1,57
Gpd2	Glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	NM_001145820	14571	0,0001124	158,77	101,8	1,56
Lsr	Lipolysis stimulated lipoprotein receptor	NM_017405	54135	0,0007803	208,82	133,66	1,56
Myof	Myoferlin	NM_001099634	226101	0,0004506	61,25	39,25	1,56
Pfkp	Phosphofructokinase, platelet	ENSMUST00000138703	56421	0,0003677	59,42	38,01	1,56
Ripk2	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	ENSMUST00000037035	192656	0,0003899	50,56	32,47	1,56
Frmd5	FERM domain containing 5	NM_172673	228564	0,0004162	41,18	26,58	1,55
Lysmd2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	NM_027309	70082	0,0009181	56,39	36,46	1,55
Nedd9	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9	NM_001111324	18003	0,0004137	111,19	71,57	1,55
Car14	Carbonic anhydrase 14	ENSMUST00000036181	23831	0,0005567	211,79	138,22	1,53
D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	BC027314	110956	0,000832	186,54	121,52	1,53
Pklr	Pyruvate kinase liver and red blood cell	NM_013631	18770	0,0001455	303,45	197,96	1,53
Acsl4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	NM_207625	50790	0,0003735	231,17	152,37	1,52
Gpr133	G protein-coupled receptor 133	NM_001081342	243277	0,0005968	20,36	13,41	1,52
Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	NM_007431	11647	0,0005501	154,5	102,45	1,51
Gstp2	Glutathione S-transferase, pi 2	BC094623	14869	0,0001634	602,25	398,96	1,51
Uqcrb	Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	NM_026219	67530	0,0003048	56,11	37,08	1,51

Hsd17b13	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	NM_001163486	243168	0,0003957	1588,63	1057,94	1,5
1700034I23Rik	RIKEN cDNA 1700034I23 gene	NR_045380	73297	0,0008239	14,01	21,05	0,67
Aqp9	Aquaporin 9	ENSMUST00000113570	64008	0,0008393	254,91	382,77	0,67
Dnm3	Dynamin 3	NM_001038619	103967	0,0007888	8,57	12,88	0,67
Agxt2l1	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	NM_027907	71760	0,0003064	234,49	354,06	0,66
Epb4.1l4b	Erythrocyte protein band 4.1-like 4b	NM_019427	54357	0,0002278	27,05	41	0,66
Gabbr2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	ENSMUST00000107749	242425	0,0002223	34,55	52,61	0,66
Lce3b	Late cornified envelope 3B	NM_025501	66344	0,0003553	6,74	10,19	0,66
Masp1	Mannan-binding lectin serine peptidase 1	ENSMUST00000023605	17174	0,0006394	346,36	520,85	0,66
Rgn	Regucalcin	NM_009060	19733	0,0001396	1111,25	1679,68	0,66
1700039E15Rik	RIKEN cDNA 1700039E15 gene	NM_001033176	76713	0,0002272	14,27	22,02	0,65
Cfh	Complement component factor h	NM_009888	12628	0,0004201	1047,38	1599,9	0,65
Fgl1	Fibrinogen-like protein 1	NM_145594	234199	0,0002301	1203,79	1842,82	0,65
Ifit2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	NM_008332	15958	0,0007698	25,69	39,63	0,65
Acsm3	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	NM_016870	20216	7,28E-05	170,69	268,7	0,64
Cyp3a41b	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41B	NM_001105159	100041375	0,0004612	585,58	911,84	0,64
Cyp4a10	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10	NM_010011	13117	0,0001254	652,29	1021,64	0,64
Dpy19l3	Dpy-19-like 3 (C. elegans)	ENSMUST00000051377	233115	0,0002315	57,3	88,93	0,64
Gm9992	Predicted gene 9992	NM_001142539	667055	0,0001052	212,06	332,52	0,64
Nfyb	Nuclear transcription factor-Y beta	NM_010914	18045	0,0002989	101,44	159,38	0,64
Syne1	Synaptic nuclear envelope 1	ENSMUST00000056571	64009	0,0002434	208,48	324,47	0,64
Tcf24		XM_003688767		0,0005665	125,3	195,34	0,64

Arrdc3	Arrestin domain containing 3	NM_001042591	105171	0,0004778	235,15	374,78	0,63
Hyal5	Hyaluronoglucosaminidase 5	ENSMUST00000031689	74468	0,0006077	9,7	15,38	0,63
Lect2	Leukocyte cell-derived chemotaxin 2	NM_010702	16841	0,0001679	762,11	1219,01	0,63
Tgtp2		ENSMUST00000146439		0,0006104	32,45	51,97	0,62
Ces1d	Carboxylesterase 1D	ENSMUST00000034172	104158	0,0003535	115,53	188,54	0,61
Pctp	Phosphatidylcholine transfer protein	ENSMUST00000020864	18559	5,37E-05	318,05	522,27	0,61
Pi4k2b	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	NM_025951	67073	0,0002318	80,95	132,85	0,61
Glul	Glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	NM_008131	14645	7,83E-05	985,07	1630,88	0,6
Gm10639	Predicted gene 10639	ENSMUST00000119823	100042314	0,0004439	15,24	25,56	0,6
Gramd1c	GRAM domain containing 1C	NM_153528	207798	6,64E-05	64,78	108,3	0,6
Olfr1344	Olfactory receptor 1344	ENSMUST00000168341	257882	0,0001607	6,12	10,2	0,6
5830473C10Rik	RIKEN cDNA 5830473C10 gene	NM_001252661	622307	0,0006364	184,25	314,02	0,59
Apcs	Serum amyloid P-component	NM_011318	20219	0,0001253	983,11	1667,26	0,59
Cmah	Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	NM_001111110	12763	7,46E-05	89,93	151,28	0,59
Cyp2a12	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 12	NM_133657	13085	0,0004839	853,4	1437,55	0,59
Cyp3a41a	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41A	NM_017396	53973	7,99E-05	550,61	935,69	0,59
Fam83f	Family with sequence similarity 83, member F	NM_145986	213956	0,0008137	27,9	47,28	0,59
Igk-V28		V00810		0,0009467	103,08	173,7	0,59
Akr1c14	Aldo-keto reductase family 1, member C14	ENSMUST00000118717	105387	0,0001628	105,78	183,25	0,58
Cyp3a44	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44	NM_177380	337924	0,0009259	90,53	155,52	0,58

Enpp2	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	ENSMUST00000171545	18606	3,40E-05	203,23	350,33	0,58
Gm3776	Predicted gene 3776	NM_001243092	100042295	8,80E-05	71,09	121,58	0,58
Bach2	BTB and CNC homology 2	ENSMUST00000108180	12014	0,000148	47,99	84,2	0,57
Colec10	Collectin sub-family member 10	NM_173422	239447	0,0002124	92,91	163,3	0,57
Cyp2e1	Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	ENSMUST00000026552	13106	7,72E-05	1451,34	2547,5	0,57
Slc17a3	Solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	NM_134069	105355	4,14E-05	219,53	386,72	0,57
Vmn1r159	Vomeronasal 1 receptor 159	NM_001166758	670857	0,0001271	138,37	240,66	0,57
Cyp4a31	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 31	NM_201640	666168	0,0004055	385,97	683,83	0,56
F11	Coagulation factor XI	NM_028066	109821	2,91E-05	453,03	812,31	0,56
Ifi44	Interferon-induced protein 44	NM_133871	99899	0,0001448	21,46	38,04	0,56
Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2	NM_145227	246728	0,0006974	32,19	57,91	0,56
Rarres1	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	NM_001164763	109222	0,00058	145,86	261,54	0,56
Zfp125	Zinc finger protein 125	AJ005350	22651	0,0008605	4,58	8,15	0,56
Acss3	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	NM_001142804	380660	0,000125	47,29	86,51	0,55
Cdkn1c	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	NM_001161624	12577	0,0002839	53,79	97,05	0,55
Clec9a	C-type lectin domain family 9, member a	NM_001205363	232414	0,0002708	46,12	83,96	0,55
Fmo2	Flavin containing monooxygenase 2	ENSMUST00000045902	55990	0,0001761	28,94	52,9	0,55
Fzd8	Frizzled homolog 8 (Drosophila)	NM_008058	14370	0,0003285	40,41	73,76	0,55
Ccbl1	Cysteine conjugate-beta lyase 1	NM_172404	70266	2,41E-05	96,37	178,39	0,54

Clec2d	C-type lectin domain family 2, member d	NM_053109	93694	6,90E-06	499,31	925,98	0,54
Ebpl	Emopamil binding protein-like	NM_026598	68177	1,94E-05	240,79	446,96	0,54
Gm16340		XM_003084464		0,0001848	28,92	53,96	0,54
LOC100861693		XR_141399		3,09E-05	615,08	1139,8	0,54
Prok1	Prokineticin 1	NM_001044382	246691	1,26E-05	26,22	48,5	0,54
Slc13a3	Solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	ENSMUST00000029208	114644	9,79E-05	553,94	1023,06	0,54
4930563F08Rik		NR_040704		0,0008144	28,86	54,45	0,53
Agxt	Alanine-glyoxylate aminotransferase	ENSMUST00000027491	11611	0,000363	585,45	1105	0,53
Gm19788		XR_105988		9,86E-05	10,08	19,21	0,52
Ifi27l2a	Interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	NM_029803	76933	4,11E-05	19,59	37,38	0,52
Serpina7	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7	NM_177920	331535	1,00E-05	576,1	1099,83	0,52
Bex2	Brain expressed X-linked 2	NM_009749	12069	0,0001206	153,91	301,8	0,51
Gpr110	G protein-coupled receptor 110	ENSMUST00000047399	77596	0,0002939	74,3	145,84	0,51
Wif1	Wnt inhibitory factor 1	NM_011915	24117	6,25E-05	31,67	62,28	0,51
2010011I20Rik	RIKEN cDNA 2010011I20 gene	NM_025912	67017	0,0002667	141,16	282,45	0,5
Cyp2j5	Cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 5	NM_010007	13109	9,34E-05	237,52	478,61	0,5
Acnat1	Acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 1	NM_001164565	230161	3,90E-06	53,38	108,43	0,49
Tymp	Thymidine phosphorylase	NM_138302	72962	1,78E-05	88,12	180,13	0,49
A630076J17Rik	RIKEN cDNA A630076J17 gene	NM_001256174	319929	6,94E-05	32,19	67,72	0,48
Cyp2b13	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 13	NM_007813	13089	0,00021	139,55	291,71	0,48
Grb10	Growth factor receptor bound protein 10	NM_010345	14783	1,24E-05	334,25	691,63	0,48

Nt5e	5' nucleotidase, ecto	NM_011851	23959	5,62E-05	76,47	159,52	0,48
A2m	Alpha-2-macroglobulin	NM_175628	232345	0,0001357	48,83	103,8	0,47
Gpc3	Glypican 3	NM_016697	14734	9,40E-06	464,08	981,25	0,47
Cml2	Camello-like 2	NM_053096	93673	0,0008069	14,23	30,97	0,46
Gm8883		NR_027658		8,70E-06	191,77	418,48	0,46
Prlr	Prolactin receptor	NM_011169	19116	1,50E-06	123,88	268,06	0,46
Saa4	Serum amyloid A 4	NM_011316	20211	9,00E-07	149,95	329,2	0,46
Slc44a5	Solute carrier family 44, member 5	NM_001081263	242259	6,79E-05	10,82	23,32	0,46
Slc22a7	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	NM_144856	108114	5,09E-05	17,04	39,14	0,44
Slco1b2	Solute carrier organic anion transporter family, member 1b2	NM_020495	28253	1,48E-05	612,03	1393,92	0,44
2810007J24Rik	RIKEN cDNA 2810007J24 gene	NM_175250	76971	2,30E-06	120,41	282,32	0,43
Esr1		NM_007956		7,30E-06	44,51	104,37	0,43
Dio1	Deiodinase, iodothyronine, type I	NM_007860	13370	3,90E-06	45,01	106,66	0,42
Nr1i3	Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	NM_009803	12355	1,52E-05	275,96	653,76	0,42
Ugt3a2	UDP glycosyltransferases 3 family, polypeptide A2	ENSMUST00000072403	223337	0,0003223	44,86	106,25	0,42
Cyp3a16	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16	NM_007820	13114	1,80E-06	158,57	388,34	0,41
Slc22a26		NM_146232		3,49E-05	35,91	86,61	0,41
Tdo2	Tryptophan 2,3-dioxygenase	ENSMUST00000029645	56720	3,80E-06	241,28	604,74	0,4
Oas1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G	NM_011852	23960	7,28E-05	8,14	21,11	0,39
Miox	Myo-inositol oxygenase	ENSMUST00000023282	56727	3,30E-06	38,72	100,97	0,38
Susd4	Sushi domain containing 4	ENSMUST00000085724	96935	0,0002449	31,7	82,42	0,38
Tstd1	Thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)-like domain containing 1	NM_001164525	226654	2,70E-06	598,51	1569	0,38
Sult1c2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	ENSMUST00000023886	69083	1,02E-05	25,2	68,04	0,37

Cyp2g1	Cytochrome P450, family 2, subfamily g, polypeptide 1	NM_013809	13108	1,70E-06	12,12	33,25	0,36
BC089597	CDNA sequence BC089597	NM_145424	216454	1,97E-05	28,65	80,81	0,35
Cyp2a22	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 22	NM_001101467	233005	7,50E-06	169,88	479,56	0,35
Hsd11b1	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	ENSMUST00000016338	15483	1,10E-06	63,79	187,41	0,34
AW549542		NR_045702		1,00E-07	45,1	135,84	0,33
Slc22a1	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	NM_009202	20517	4,00E-07	46,59	141,41	0,33
Acnat2	Acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 2	NM_145368	209186	4,90E-06	30,94	98,88	0,31
Ces1f	Carboxylesterase 1F	NM_144930	234564	0,0005218	15,62	54,81	0,29
Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase	ENSMUST00000003569	21743	1,10E-06	231	806,78	0,29
Serpina3k	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K	NM_011458	20714	1,25E-05	36,12	129,28	0,28
Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1	NM_025557	66425	9,20E-06	98,84	384,34	0,26
Ces1g	Carboxylesterase 1G	ENSMUST00000044602	12623	3,00E-07	42,39	181,1	0,23
Clec2h	C-type lectin domain family 2, member h	NM_053165	94071	0,0003706	19,11	85,32	0,22
Mug-ps1	Murinoglobulin, pseudogene 1	NR_027619	17835	7,60E-06	8,85	42,03	0,21
Hamp2	Hepcidin antimicrobial peptide 2	NM_183257	66438	1,00E-07	7,48	37,17	0,2
Cyp2c50	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 50	NM_001167877	107141	3,13E-05	8,41	44,57	0,19
B3galt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1	ENSMUST00000042456	26877	< 1e-07	23,96	132,88	0,18
Cyp2c69	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 69	NM_001104525	100043108	< 1e-07	96,6	582,22	0,17

Cyp2c54	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 54	NM_206537	404195	< 1e-07	34,96	218,57	0,16
Gm10319	Predicted pseudogene 10319	NR_003624	381806	< 1e-07	6,57	39,86	0,16
Cyp1a2	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	NM_009993	13077	9,90E-06	62,98	412,41	0,15
Ces3a	Carboxylesterase 3A	NM_198672	382053	3,00E-07	246,14	1763,14	0,14
Mug1	Murinoglobulin 1	NM_008645	17836	< 1e-07	14,71	339,51	0,043

Supplementary Table 2: List of 122 non-redundant genes differentially expressed in KO vs WT (LKBKOlivad) mice

* p<.05 ; ** fold-change >1.2

Gene symbol	Gene name	Accession	Parametric p-value *	Geom mean of intensities in KO_LKB1	Geom mean of intensities in WT_LKB1	Fold-change LKB1 KO/WT **
Rsph4a	radial spoke head 4 homolog A (Chlamydomonas)	NM_001162957	0,0010246	215,24	114,25	1,88
Tmem25	transmembrane protein 25	NM_027865	0,0080595	214,2	119,06	1,8
Dnajb9	predicted gene 6568; DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	NM_013760	0,0188509	457,49	257,27	1,78
Esr1	estrogen receptor 1 (alpha)	NM_007956	0,0173303	181,14	105,49	1,72
Cyp4f14	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 14	NM_022434	0,0463215	289,38	173,64	1,67
Nfe2l2	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	NM_010902	0,0132009	565,91	355,1	1,59
Ppp1r10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	NM_001163818	0,0311983	170,58	108,56	1,57
Tsc22d3	TSC22 domain family, member 3	NM_001077364	0,0258257	184,03	117,7	1,56
Dynll1	similar to cytoplasmic dynein light chain 1; predicted gene 11582; dynein light chain LC8-type 1; predicted gene 6788	NM_019682	0,0055759	287,66	185,35	1,55
Agxt	alanine-glyoxylate aminotransferase	NM_016702	0,0455319	583,25	384,5	1,52
Prkd3	protein kinase D3	NM_001171004	0,0355399	399,17	262,09	1,52

Gramd1c	GRAM domain containing 1C	NM_153528	0,0274843	507,38	339,14	1,5
Catsper2	cation channel, sperm associated 2	NM_153075	0,0011373	149,13	100	1,49
Grb7	growth factor receptor bound protein 7	NM_010346	0,0230593	251,44	177,68	1,42
1190005F20Rik	RIKEN cDNA 1190005F20 gene	NM_026876	0,0254138	212,54	150,4	1,41
Sult3a1	predicted gene 4794; sulfotransferase family 3A, member 1	NM_020565	0,0381329	2776,47	1963,08	1,41
Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator pseudogene; CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	NM_009805	0,0261969	308,49	220,27	1,4
Cth	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	NM_145953	0,0426226	1698,92	1212,29	1,4
Nostrin	nitric oxide synthase trafficker	NM_181547	0,0140609	344,61	245,29	1,4
Slc35e2	RIKEN cDNA A530082C11 gene	NM_177186	0,0054831	258,89	185,11	1,4
Adh6-ps1	alcohol dehydrogenase 6 (class V), pseudogene 1	NR_033581	0,0235017	160,77	115,74	1,39
Morc2a	microrchidia 2A	NM_001159288	0,0313342	248,38	178,41	1,39
Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	NM_198095	0,0084645	270,12	196,3	1,38
Tmem147	transmembrane protein 147	NM_027215	0,0365931	338,59	247,39	1,37
Crkl	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	NM_007764	0,0253279	160,35	118,23	1,36

G630090E17Rik	predicted gene, 100041085; similar to Na+ dependent glucose transporter 1	NM_001173500	0,0274964	211,36	155,05	1,36
Rnf125	ring finger protein 125	NM_026301	0,0130849	381,41	279,91	1,36
Slpi	secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_011414	0,0300134	141,57	104,47	1,36
Cks2	similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2); CDC28 protein kinase regulatory subunit 2; predicted gene 15452	NM_025415	0,029633	154,54	114,37	1,35
Dpy19l1	dpy-19-like 1 (C. elegans)	NM_172920	0,0430057	262,24	195,91	1,34
Kdm6a	4lysine (K)-specific demethylase 6A	NM_009483	0,019286	201,06	150,33	1,34
Fggy	FGGY carbohydrate kinase domain containing	NM_029347	0,0386257	325,43	244,46	1,33
Ptpn9	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 9	NM_019651	0,0146835	164,95	124,24	1,33
Safb	scaffold attachment factor B	NM_001163300	0,0459756	194,46	146,39	1,33
Clic4	chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	NM_013885	0,0221766	591,92	448,11	1,32
Lphn2	latrophilin 2	NM_001081298	0,0311407	227,84	173,65	1,31
4921513D23Rik	hypothetical protein LOC100045622; RIKEN cDNA 4921513D23 gene	NM_001081154	0,0217161	398,12	309,57	1,29
Hnrnph1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	NM_021510	0,0046065	628,89	488,04	1,29

Mettl6	methyltransferase like 6	NM_025907	0,0089615	218,04	170,99	1,28
Triap1	TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1	NM_026933	0,0091408	177,08	138,22	1,28
A2ld1	AIG2-like domain 1	NM_145466	0,0193315	204,56	160,52	1,27
Lysmd3	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 3	NM_030257	0,0354258	176,07	138,34	1,27
Srp9	signal recognition particle 9	NM_012058	0,0220656	388,76	306,78	1,27
Cd276	CD276 antigen	DQ832276	0,0401232	138,5	110,28	1,26
Ces3a		NM_198672	0,0474566	1848,58	1468,95	1,26
Ankrd13c	ankyrin repeat domain 13c	NM_001013806	0,0346525	134,32	107,45	1,25
Gpatch8	G patch domain containing 8	NM_001159492	0,0293457	169,51	135,38	1,25
Lclat1	lysocardiolipin acyltransferase 1	NM_001081071	0,0251626	254,46	203,29	1,25
Rcan1	regulator of calcineurin 1	NM_001081549	0,0495534	150,59	120,45	1,25
4933424B01Rik	RIKEN cDNA 4933424B01 gene	NM_138757	0,0300374	158,54	127,64	1,24
6720456H20Rik	RIKEN cDNA 6720456H20 gene	NM_172600	0,0136845	131,16	105,76	1,24
Ccnl1	cyclin L1	NM_019937	0,0409223	239,02	193,62	1,23
Esd	similar to esterase D/formylglutathione hydrolase; esterase D/formylglutathione hydrolase; predicted gene 5456; predicted gene 2904	NM_016903	0,018682	955,99	775,65	1,23
Lrrc28	leucine rich repeat containing 28	NM_175124	0,0407359	143,84	116,94	1,23
Nr2c1	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1	NM_011629	0,0064401	128,18	104,23	1,23

Atrn	attractin	NM_009730	0,0045154	318,28	261,63	1,22
Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated); similar to PTB-associated splicing factor	NM_023603	0,028474	612,78	503,63	1,22
Whsc2	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 (human)	NM_011914	0,0443608	158,48	129,71	1,22
Depdc6	DEP domain containing 6	NM_001037937	0,0327468	206,78	171,18	1,21
Mthfd1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthase	NM_138745	0,0271195	404,75	334,04	1,21
Rmnd1	required for meiotic nuclear division 1 homolog (S. cerevisiae); predicted gene 5512	NM_025343	0,0211955	349,19	288,55	1,21
Mknk1	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 1	NM_021461	0,0223859	133,59	111,19	1,2
Mrps6	mitochondrial ribosomal protein S6	NM_080456	0,0300694	188,65	157,66	1,2
Egfr	epidermal growth factor receptor	NM_207655	0,0249386	1981,67	1665,42	1,19
Chchd6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6	NM_025351	0,0103463	115,7	138,5	0,84

Pigyl	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y-like	NM_001082532	0,0206805	162,51	193,52	0,84
Sat2	spermidine/spermine N1-acetyl transferase 2	NM_026991	0,0381162	101,31	121,33	0,84
Smad2	MAD homolog 2 (Drosophila)	NM_010754	0,0332297	210,52	251,18	0,84
Usp24	ubiquitin specific peptidase 24	NM_183225	0,0339058	107,08	127,7	0,84
Zfp59	zinc finger protein 59; predicted gene 7452	NM_011762	0,0444567	166,01	198,03	0,84
Ank	progressive ankylosis	NM_020332	0,0075982	101,41	121,98	0,83
Golgb1	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1	NM_030035	0,031864	109,04	131,34	0,83
Gprc5c	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C; similar to G protein-coupled receptor, family C, group 5, member C	NM_001110337	0,0346985	110,01	132,33	0,83
Ppp2r2d	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, delta isoform	NM_026391	0,0212897	228,57	276,02	0,83
Smc4	structural maintenance of chromosomes 4	NM_133786	0,0409468	108,94	131,9	0,83
Ywhah	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	NM_011738	0,0073893	148,16	179,5	0,83

Apbb2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2	NM_009686	0,0053129	100,63	122,67	0,82
Sp1	trans-acting transcription factor 1	NM_013672	0,0385214	109,82	134,26	0,82
Ubap1	ubiquitin-associated protein 1	NM_023305	0,0480363	263,13	320,89	0,82
Zc3h12c	zinc finger CCCH type containing 12C	NM_001162921	0,040809	105,42	129,23	0,82
4933407C03Rik	RIKEN cDNA 4933407C03 gene	NM_001163262	0,007522	124,91	153,74	0,81
Ankrd40	ankyrin repeat domain 40	NM_027799	0,0390826	126,53	156,19	0,81
Arhgef11	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11	NM_001003912	0,0098701	102,64	127,31	0,81
Cdh5	cadherin 5	NM_009868	0,0211972	105,94	130,16	0,81
Ptpra	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	NM_008980	0,0002222	109,74	135,83	0,81
Rb1	retinoblastoma 1	NM_009029	0,0354336	106,17	131,37	0,81
Svil	supervillin	NM_153153	0,0029535	100,52	124,47	0,81
Tom1	predicted gene 5884; target of myb1 homolog (chicken)	NM_011622	0,0267565	113,31	139,68	0,81
Enpp5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5	NM_032003	0,0354065	103,67	130,17	0,8
Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)	NM_008278	0,0266	879,38	1103,78	0,8
Plbd2	phospholipase B domain containing 2	NM_023625	0,0112435	132,39	164,57	0,8
Xpo6	exportin 6	NM_028816	0,0324585	217,08	273,03	0,8
1810063B05Rik	RIKEN cDNA 1810063B05 gene	NM_174987	0,0046152	104,6	132,93	0,79

Atxn7l1	ataxin 7-like 1	NM_001033436	0,0450148	144,35	183,82	0,79
Fbxl14	F-box and leucine-rich repeat protein 14	NM_133940	0,0199108	147,57	185,98	0,79
Hmgb3	predicted gene 11805; predicted gene 8850; high mobility group box 3; similar to High mobility group protein 4 (HMG-4) (High mobility group protein 2a) (HMG-2a)	NM_008253	0,0306378	131,52	166,12	0,79
Ldb2	LIM domain binding 2	NM_001077398	0,0105367	114,54	144,42	0,79
Socs2	suppressor of cytokine signaling 2; predicted gene 8000	NM_007706	0,0061172	100	126,53	0,79
Dynlt1a		NM_001166629	0,0146264	284,26	366,53	0,78
Palmd	palmdelphin; similar to palmdelphin	NM_023245	0,031739	709,26	908,26	0,78
0610010K06Rik	predicted gene 5578; RIKEN cDNA 0610010K06 gene	NM_027861	0,0027747	154,3	202,38	0,76
Adap2	ArfGAP with dual PH domains 2	NM_172133	0,0470875	185,55	244,09	0,76
Dynlt1c	predicted gene, ENSMUSG00000056252; dynein light chain Tctex-type 1D; dynein light chain Tctex-type 1; dynein light chain Tctex-type 1E; similar to tctex-1 protein	NM_001166630	0,0175682	395,71	519,53	0,76
Mafb	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	NM_010658	0,0045126	171,29	228,01	0,75
Ces2d-ps		NR_033726	0,0198517	118,68	162,46	0,73

Dtd1	similar to D-tyrosyl-tRNA deacylase 1; D-tyrosyl-tRNA deacylase 1 homolog (S. cerevisiae)	NM_025314	0,0401879	213,35	297,11	0,72
Hivep1	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	NM_007772	0,0040266	174,68	246,14	0,71
Mpp5	membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)	NM_019579	0,0057212	138,92	195,07	0,71
Cabyr	calcium-binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated (fibrousheathin 2)	NM_027687	0,0116071	102,81	146,17	0,7
Myadm	myeloid-associated differentiation marker	NM_001093765	0,0427494	158,86	228,09	0,7
0610008F07Rik	RIKEN cDNA 0610008F07 gene	BC025862	0,0031263	100	148,3	0,67
Gm9909	predicted gene 9909	ENSMUST00000054120	0,0239283	196,83	294,9	0,67
Igsf6	immunoglobulin superfamily, member 6	NM_030691	0,0367715	167,49	248,82	0,67
Cirbp	cold inducible RNA binding protein	NM_007705	0,0224709	105,68	160,94	0,66
Pgap1	post-GPI attachment to proteins 1	NM_001163314	0,0252828	240,56	369,87	0,65
Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	NM_009344	0,0408716	286,17	462,83	0,62
D630039A03Rik	RIKEN cDNA D630039A03 gene	BC095953	0,0349081	117,44	214,55	0,55
Tgtp1	T-cell specific GTPase 2; T-cell specific GTPase	NM_011579	0,023294	113,79	215,72	0,53

Alas1	aminolevulinic acid synthase 1	NM_020559	0,0227644	736,51	1417,04	0,52
Myc	myelocytomatosis oncogene	NM_010849	0,0055355	166,94	402,35	0,41
Onecut1	one cut domain, family member 1	NM_008262	0,0443257	184,98	586,99	0,32
Stk11	serine/threonine kinase 11	NM_011492	2,31E-05	105,18	333,09	0,32

Supplementary Table 3:
List of 5 non-redundant genes differentially expressed in both (LKBKOlivemb) and (LKBKOlivad) KO vs WT mice

Gene symbol	Gene name	Accession	Entrez ID	p-value LKBlivemb KO vs WT *	Fold-change LKBlivemb KO/WT **	p-value LKBlivad KO vs WT *	Fold-change LKBlivad KO/WT **
Agxt	Alanine-glyoxylate aminotransferase	ENSMUST000000	11611	0,000363	0,53	0,0455319	1,52
Ces3a	Carboxylesterase 3A	NM_198672	382053	3,00E-07	0,14	0,0474566	1,26
Esr1		NM_007956		7,30E-06	0,43	0,0173303	1,72
Gramd1c	GRAM domain containing 1C	NM_153528	207798	6,64E-05	0,6	0,0274843	1,5
Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_011414	20568	< 1e-07	7,73	0,0300134	1,36

Supplementary table 4: List of 237 non-redundant genes differentially expressed in KO vs WT (NOTCKKOlivemb) mice

* p<.001 ; ** fold-change >1.5

Gene symbol	Gene name	Accession	Entrez ID	Parametric p-value *	Geom mean of intensities in KO_RBPJ	Geom mean of intensities in WT_RBPJ	Fold-change RBPJ KO/WT **
Hamp	Hepcidin antimicrobial peptide	NM_032541	84506	6,29E-05	743,78	62,83	11,84
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_001044384	21857	8,00E-07	84,94	12,02	7,07
Cyp2c55	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	NM_028089	72082	8,30E-06	91,14	16,23	5,62
Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	NM_009127	20249	6,00E-07	317,01	56,92	5,57
Gp49a	Glycoprotein 49 A	ENSMUST00000102894	14727	0,0002853	78,72	20,1	3,92
Cidec	Cell death-inducing DFFA-like effector c	ENSMUST00000113091	14311	3,70E-06	91,62	24,17	3,79
Saa2	Serum amyloid A 2	NM_011314	20209	2,20E-06	50,8	13,63	3,73
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	NM_011333	20296	8,80E-06	172,34	46,54	3,7
Egr1	Early growth response 1	NM_007913	13653	0,000164	332,23	90,18	3,68
Atp6v0d2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2	ENSMUST00000029900	242341	0,0001567	40,45	11,34	3,57
Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	NM_021274	15945	0,0003826	182,79	52,09	3,51
Chka	Choline kinase alpha	ENSMUST00000128694	12660	1,10E-06	564,62	165,61	3,41
Scd2	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	NM_009128	20250	3,00E-07	445,38	131,22	3,39
Cacna1b	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	ENSMUST00000070864	12287	5,20E-06	98,34	31,45	3,13

Eid3	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3	NM_025499	66341	2,40E-06	144,93	46,38	3,13
AB041803	CDNA sequence AB041803	AB041803	232685	1,74E-05	84,06	27,19	3,09
Lss	Lanosterol synthase	ENSMUST00000048678	16987	2,44E-05	379,16	124,02	3,06
Tigit	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	NM_001146325	100043314	5,10E-06	25,47	8,53	2,99
Jun	Jun oncogene	NM_010591	16476	0,0001122	149,2	51,73	2,88
Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	NM_008255	15357	4,20E-06	694,95	247,8	2,8
Ostb	Organic solute transporter beta	NM_178933	330962	0,0004253	96,67	34,94	2,77
Saa1	Serum amyloid A 1	NM_009117	20208	0,0008189	105,91	38,29	2,77
Gpnmb	Glycoprotein (transmembrane) nmb	NM_053110	93695	0,0001379	67,45	24,99	2,7
Selp	Selectin, platelet	NM_011347	20344	8,90E-06	97,79	36,68	2,67
Fdps	Farnesyl diphosphate synthetase	NM_001253751	110196	1,56E-05	804,63	303,48	2,65
Slc41a2	Solute carrier family 41, member 2	ENSMUST00000039956	338365	2,29E-05	128,22	49,24	2,6
Sc4mol	Sterol-C4-methyl oxidase-like	ENSMUST00000034015	66234	1,48E-05	483,13	186,64	2,59
Sgk2	Serum/glucocorticoid regulated kinase 2	ENSMUST00000018012	27219	6,00E-06	124,75	48,15	2,59
Nr1d1	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	ENSMUST00000064941	217166	5,70E-05	286,52	111,32	2,57

Serpina3f	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F	NM_001168294	238393	3,30E-06	148,29	57,8	2,57
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_010941	18194	1,21E-05	585,1	228,12	2,56
H2-Q5		NR_051981		4,79E-05	56,54	22,3	2,54
Gm19409		AK137355		7,20E-06	151,88	60,59	2,51
Lilrb4	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	NM_013532	14728	2,05E-05	348,85	141,45	2,47
Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	NM_019948	56619	0,0004496	19,02	7,75	2,46
G6pc2	Glucose-6-phosphatase, catalytic, 2	ENSMUST00000005364	14378	0,0008584	54,09	22,05	2,45
Tnfrsf12a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	NM_013749	27279	3,80E-06	114,89	46,98	2,45
Akr1b7	Aldo-keto reductase family 1, member B7	NM_009731	11997	0,0001405	340,95	140,49	2,43
Lpin2	Lipin 2	AK048657	64898	0,0002116	193,48	80,11	2,42
Pdk4	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	NM_013743	27273	0,0001295	589,42	244,56	2,41
Dhrs9	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	ENSMUST00000063690	241452	3,25E-05	69,53	29,09	2,39
Idi1	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase	NM_145360	319554	7,50E-06	387,08	162,05	2,39
Cd14	CD14 antigen	ENSMUST00000061829	12475	4,39E-05	131,79	55,73	2,37

Csf2rb2	Colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	NM_007781	12984	4,63E-05	139,89	59,54	2,35
Lrg1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	NM_029796	76905	0,0005851	752,09	320	2,35
Gdf15	Growth differentiation factor 15	ENSMUST00000110103	23886	0,0004179	79,4	34,04	2,33
Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_011414	20568	3,07E-05	246,04	105,82	2,33
Tlr13	Toll-like receptor 13	NM_205820	279572	0,0004221	42,25	18,12	2,33
Tmem82	Transmembrane protein 82	NM_145987	213989	2,46E-05	214,98	92,1	2,33
2210408F21Rik	RIKEN cDNA 2210408F21 gene	NR_040259	73652	0,0001742	63,65	27,55	2,31
Cyp51	Cytochrome P450, family 51	ENSMUST00000001507	13121	0,0001647	461,55	202,32	2,28
Steap4	STEAP family member 4	NM_054098	117167	2,95E-05	580,78	255,14	2,28
Saa3	Serum amyloid A 3	NM_011315	20210	0,0003124	123,21	54,18	2,27
Atf3	Activating transcription factor 3	NM_007498	11910	4,42E-05	91,93	40,76	2,26
Osmr	Oncostatin M receptor	NM_011019	18414	1,93E-05	53,34	23,6	2,26
Otud1	OTU domain containing 1	NM_027715	71198	4,78E-05	76,85	34,22	2,25
Per1	Period homolog 1 (Drosophila)	NM_001159367	18626	1,60E-05	270,61	120,37	2,25
Cyp27a1	Cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1	NM_024264	104086	2,94E-05	272,31	121,34	2,24
Gm19622		XR_107259		0,0001143	53,12	23,82	2,23
4930483K19Rik		NR_045354		7,42E-05	99,59	44,95	2,22
Sqle	Squalene epoxidase	NM_009270	20775	4,60E-05	469,09	213,63	2,2

Frzb	Frizzled-related protein	ENSMUST00000028389	20378	4,43E-05	24,02	10,98	2,19
Mtmr11	Myotubularin related protein 11	NM_181409	194126	5,15E-05	53,04	24,2	2,19
Rel	Reticuloendotheliosis oncogene	ENSMUST00000102864	19696	4,47E-05	154,94	70,86	2,19
AI507597		NR_033566		0,0008956	99,28	45,87	2,16
Duox2	Dual oxidase 2	ENSMUST00000053734	214593	0,000317	22,36	10,36	2,16
Mir128-1		NR_029543		0,0001999	17,21	7,99	2,15
Zbtb16	Zinc finger and BTB domain containing 16	NM_001033324	235320	4,30E-05	95,71	45,03	2,13
Kctd3	Potassium channel tetramerisation domain containing 3	NM_172650	226823	1,77E-05	169,49	79,81	2,12
Zfp36	Zinc finger protein 36	ENSMUST00000051241	22695	0,0001047	1358,5	643,63	2,11
Txnip	Thioredoxin interacting protein	NM_001009935	56338	4,95E-05	900,23	432	2,08
Pcsk9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	NM_153565	100102	9,92E-05	136,71	66,17	2,07
A330021E22Rik	RIKEN cDNA A330021E22 gene	BC062906	207686	0,0002512	38,42	18,86	2,04
Hsd17b7	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	NM_010476	15490	0,0001073	234,35	115,13	2,04
Socs3	Suppressor of cytokine signaling 3	NM_007707	12702	0,0003426	41,09	20,17	2,04
Mmp15	Matrix metallopeptidase 15	ENSMUST00000034243	17388	0,0002163	99,95	49,34	2,03
BC090627		NR_004843		3,72E-05	73,64	36,63	2,01
Gpr64	G protein-coupled receptor 64	NM_178712	237175	0,0004744	70,11	34,93	2,01
Ppan	Peter pan homolog (Drosophila)	BC059277	235036	0,000163	92,33	45,96	2,01

Clec4d	C-type lectin domain family 4, member d	NM_010819	17474	0,0001213	36,45	18,41	1,98
Ccl6	Chemokine (C-C motif) ligand 6	NM_009139	20305	4,23E-05	61,75	31,34	1,97
D5Ertd579e	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 579, expressed	ENSMUST00000140653	320661	0,0008307	40,76	20,65	1,97
Rdh11	Retinol dehydrogenase 11	ENSMUST00000161204	17252	0,0001479	160,57	81,39	1,97
Pmvk	Phosphomevalonate kinase	NM_026784	68603	0,0002338	284,2	144,68	1,96
Serpina3h	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3H	NR_033450	546546	0,0003311	23,8	12,18	1,95
Cyr61	Cysteine rich protein 61	NM_010516	16007	0,000236	80,09	41,24	1,94
Slc25a34	Solute carrier family 25, member 34	NM_001013780	384071	0,0006418	51,1	26,52	1,93
4933401B06Rik		NR_033580		6,74E-05	8,41	4,37	1,92
Akr1c19	Aldo-keto reductase family 1, member C19	ENSMUST00000118663	432720	0,0003495	23,07	12	1,92
Aldoc	Aldolase C, fructose-bisphosphate	ENSMUST00000017534	11676	0,0008894	117,68	61,37	1,92
Gm19773		XR_107093		0,0002888	47,33	24,65	1,92
Preb	Prolactin regulatory element binding	NM_016703	50907	3,76E-05	289,3	151,16	1,91
Rhod	Ras homolog gene family, member D	NM_007485	11854	0,0001931	178,69	93,64	1,91
S100a4	S100 calcium binding protein A4	NM_011311	20198	0,0008552	125,42	65,83	1,91
Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	NM_020008	56644	0,0002513	80,82	42,43	1,9
Wfdc3	WAP four-disulfide core domain 3	ENSMUST00000103096	71856	0,0003101	48,88	25,76	1,9

2510049J12Rik	RIKEN cDNA 2510049J12 gene	NM_001101431	70291	0,000261	203,41	107,4	1,89
Orm2	Orosomucoid 2	NM_011016	18406	0,0003073	28,94	15,32	1,89
Snord16a		NR_028548		0,000161	87,78	46,35	1,89
1700024P16Rik	RIKEN cDNA 1700024P16 gene	NM_001162980	242594	0,0004115	72,85	38,77	1,88
Gm7334		NR_002700		8,61E-05	74,07	39,33	1,88
Cxadr	Coxsackie virus and adenovirus receptor	ENSMUST00000023572	13052	8,05E-05	274,69	146,63	1,87
Gm19950		XR_142259		0,00052	158,46	84,64	1,87
Tenc1	Tensin like C1 domain-containing phosphatase	NM_153533	209039	0,0007379	167,96	90,25	1,86
Mad2l2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	ENSMUST00000030860	71890	0,000673	211,03	114,82	1,84
Gstt2	Glutathione S-transferase, theta 2	NM_010361	14872	0,0007313	231,2	126,1	1,83
Jdp2	Jun dimerization protein 2	NM_001205053	81703	0,0002618	42,24	23,12	1,83
Abcb11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	ENSMUST00000102709	27413	0,0003009	1245,49	685,78	1,82
H2-Q7	Histocompatibility 2, Q region locus 7	NM_010394	15018	0,0001217	1370,51	754,42	1,82
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	NM_145942	208715	0,0002069	1711,25	938,95	1,82
Mfge8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	NM_008594	17304	0,0007627	254,12	139,8	1,82
Gcnt2	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme	NM_008105	14538	0,000971	158,09	87,51	1,81
Nrg1	Neuregulin 1	NM_178591	211323	0,0003108	39,97	22,14	1,81

Scn1b	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta	NM_011322	20266	0,0005207	87,38	48,3	1,81
Tmem98	Transmembrane protein 98	ENSMUST00000040865	103743	0,000419	67,56	37,51	1,8
Apobec1	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1	NM_031159	11810	0,0002116	200,2	111,75	1,79
4933433P14Rik	RIKEN cDNA 4933433P14 gene	NM_178613	66787	0,0009423	58,44	33,05	1,77
Casp4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_007609	12363	0,0008036	46,15	26,01	1,77
Fasn	Fatty acid synthase	NM_007988	14104	0,0001421	291,76	164,49	1,77
Il1r2	Interleukin 1 receptor, type II	NM_010555	16178	0,0005521	35,29	19,96	1,77
LOC100505155		AK041730		0,000957	69,06	38,95	1,77
Plin2	Perilipin 2	NM_007408	11520	0,0001803	570,71	322,69	1,77
Btg3	B-cell translocation gene 3	NM_009770	12228	0,0007282	113,49	64,62	1,76
Dmxl2	Dmx-like 2	NM_172771	235380	0,0004063	108,69	61,92	1,76
Erbb3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	ENSMUST00000082059	13867	0,0002024	151,73	86,52	1,75
Hilpda		NM_001190461		0,0003331	136,74	77,98	1,75
Gm10933	Predicted gene 10933	AK148176	100169866	0,0004603	61,99	35,69	1,74
Mvp	Major vault protein	NM_080638	78388	0,0005068	117,7	67,9	1,73
Pigr	Polymeric immunoglobulin receptor	NM_011082	18703	0,0006512	61,27	35,47	1,73
Snord4a		NR_030702		0,0005574	115,19	66,68	1,73

B4galt5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	NM_019835	56336	0,0003577	190,31	111,32	1,71
Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3	NM_033601	12051	0,0004255	208,35	121,82	1,71
Slc9a6	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6	NM_172780	236794	0,000736	46,14	27,05	1,71
Aebp1	AE binding protein 1	NM_009636	11568	0,0008041	107,56	63,16	1,7
Anxa5	Annexin A5	NM_009673	11747	0,0003383	590,77	346,57	1,7
Rdh9	Retinol dehydrogenase 9	NM_153133	103142	0,0005239	765,61	449,14	1,7
C730027H18Rik		NR_038040		0,0005445	35,4	20,9	1,69
Ccdc120	Coiled-coil domain containing 120	NM_207202	54648	0,0004078	38,92	23,09	1,69
Gcnt4	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2 (beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase)	NM_001166065	218476	0,0008305	50,8	30,09	1,69
2210403K04Rik		NR_030711		0,0002611	173,01	103,11	1,68
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	ENSMUST00000141916	13360	0,000674	244,24	145,32	1,68
Zfp655	Zinc finger protein 655	NM_001083958	72611	0,0005663	389,18	231,69	1,68
Il6st	Interleukin 6 signal transducer	NM_010560	16195	0,0002732	885,73	530,6	1,67
Klf11	Kruppel-like factor 11	NM_178357	194655	0,0005027	110,7	66,76	1,66

Map4k4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	NM_001252200	26921	0,0005776	194,92	117,07	1,66
1700017B05Rik	RIKEN cDNA 1700017B05 gene	NM_028820	74211	0,000462	135,62	82,01	1,65
Fkbp11	FK506 binding protein 11	NM_024169	66120	0,0009719	354,57	214,41	1,65
Nedd9	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9	NM_001111324	18003	0,0003796	128,81	77,99	1,65
Slc30a1	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	NM_009579	22782	0,0009208	245,65	149,86	1,64
Entpd1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	NM_009848	12495	0,0004216	124,22	76,15	1,63
Ppap2c	Phosphatidic acid phosphatase type 2C	NM_015817	50784	0,0004822	157,36	97,12	1,62
Slc36a4	Solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4	ENSMUST00000061568	234967	0,0008258	51,78	31,87	1,62
Txnrd1	Thioredoxin reductase 1	NM_001042523	50493	0,000603	322,41	199,38	1,62
Clu	Clusterin	NM_013492	12759	0,0007918	1164,1	722,05	1,61
Tiparp	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	NM_178892	99929	0,0008494	77,09	48	1,61
Nags	N-acetylglutamate synthase	NM_178053	217214	0,0004221	167,8	104,59	1,6
Id2	Inhibitor of DNA binding 2	NM_010496	15902	0,0006482	365,43	230,81	1,58

Gsr	Glutathione reductase	NM_010344	14782	0,0009283	234,69	149,32	1,57
Gstm1	Glutathione S-transferase, mu 1	NM_010358	14862	0,0006619	161,74	103,17	1,57
2610019F03Rik	RIKEN cDNA 2610019F03 gene	NM_173744	72148	0,000953	19,02	12,18	1,56
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	NM_010493	15894	0,0008495	92,14	59,48	1,55
Gstp1	Glutathione S-transferase, pi 1	NM_013541	14870	0,0009887	3825,86	2493	1,53
Fam46a	Family with sequence similarity 46, member A	NM_001160378	212943	0,0009704	32,75	52,29	0,63
9830132P13		NR_040552		0,0008222	10,61	17,17	0,62
C8g	Complement component 8, gamma polypeptide	ENSMUST00000040042	69379	0,0007997	532,12	859,65	0,62
Phlda1	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	NM_009344	21664	0,0006359	127,36	206,28	0,62
Atp6v0e2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit E2	NM_133764	76252	0,0003702	23	37,45	0,61
Hagh	Hydroxyacyl glutathione hydrolase	NM_024284	14651	0,0008041	256,01	418,99	0,61
Hsd11b1	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	ENSMUST00000016338	15483	0,0004827	84,14	138,6	0,61
Letmd1	LETM1 domain containing 1	NM_134093	68614	0,0002218	180,03	302,39	0,6
Ly6i		NM_020498		0,0004517	4,04	6,68	0,6
Cmbl	Carboxymethylenebutenolidase-like (Pseudomonas)	NM_181588	69574	0,0003543	119,42	201,59	0,59

Zfp456	Zinc finger protein 456	AK132547	408065	0,0003335	7,09	11,99	0,59
Ifi44	Interferon-induced protein 44	NM_133871	99899	0,0002289	28,66	50,38	0,57
Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1	NM_025557	66425	0,000199	148,8	259,9	0,57
Plcxd2	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 2	NM_001134480	433022	0,0006432	63,65	112,33	0,57
Fzd8	Frizzled homolog 8 (Drosophila)	NM_008058	14370	0,0003894	35,54	63,17	0,56
Gm16551		NR_045284		0,0004297	11,29	20,17	0,56
9030622O22Rik		AK018565		0,0007664	65,21	117,68	0,55
Ugt2b1	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B1	NM_152811	71773	0,0006585	321,76	585,16	0,55
Ugt3a2	UDP glycosyltransferases 3 family, polypeptide A2	ENSMUST00000072403	223337	0,0001556	82,87	150,88	0,55
Cdcp1	CUB domain containing protein 1	ENSMUST00000039229	109332	0,0002775	21,03	38,64	0,54
Fam154b	Family with sequence similarity 154, member B	NM_177894	330577	0,0008985	9,33	17,16	0,54
Gm16291		NR_045788		0,0002897	13,17	24,53	0,54
Rarres1	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	NM_001164763	109222	0,0005593	49,24	91,93	0,54
Slc13a3	Solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	ENSMUST00000029208	114644	0,0004982	511,78	944,68	0,54

Olfr1358	Olfactory receptor 1358	XM_981298	258224	0,00051	9,5	17,83	0,53
Pnp2	Purine-nucleoside phosphorylase 2	ENSMUST00000095925	667034	0,0007318	6,55	12,46	0,53
Olfr191	Olfactory receptor 191	NM_001011807	258035	0,0002215	25,41	49,02	0,52
BC031353	CDNA sequence BC031353	NM_001113283	235493	0,000201	86,68	169,23	0,51
Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase	ENSMUST00000003569	21743	0,0005713	211,87	416,09	0,51
Slc22a29		ENSMUST00000113298		0,0001545	11,21	22,07	0,51
Sult2a2	Sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 2	NM_009286	100043194	9,04E-05	116,82	229,11	0,51
Tcf24		XM_003688767		0,0001461	138,91	272,37	0,51
Rag1	Recombination activating gene 1	NM_009019	19373	0,0001054	16,04	32,09	0,5
Slc22a27		NM_134256		0,0003338	51,88	102,89	0,5
Miox	Myo-inositol oxygenase	ENSMUST00000023282	56727	7,94E-05	37,83	77,45	0,49
Serpina3k	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K	NM_011458	20714	0,0001132	22,73	48,2	0,47
Upp2	Uridine phosphorylase 2	NM_029692	76654	0,0002389	158,65	334,57	0,47
Il7r	Interleukin 7 receptor	NM_008372	16197	0,0003163	11,4	24,8	0,46
Dio1	Deiodinase, iodothyronine, type I	NM_007860	13370	0,0004279	78,8	176,13	0,45
Ifi27l2a	Interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	NM_029803	76933	0,0003395	21,93	48,21	0,45
2810007J24Rik	RIKEN cDNA 2810007J24 gene	NM_175250	76971	0,0003734	63,45	144,9	0,44

Akr1c18	Aldo-keto reductase family 1, member C18	NM_134066	105349	7,77E-05	92,25	207,93	0,44
Cyp2a22	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 22	NM_001101467	233005	0,000259	257,28	588,86	0,44
Cyp2c69	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 69	NM_001104525	100043108	0,0001161	141,1	323,84	0,44
Sds	Serine dehydratase	NM_145565	231691	0,0002843	38,66	88,79	0,44
LOC100861992		XR_140601		0,0002261	119,89	279,06	0,43
Olfr441	Olfactory receptor 441	ENSMUST00000095954	258649	0,0002473	3,6	8,45	0,43
Keg1	Kidney expressed gene 1	NM_029550	64697	0,0001707	92,06	220,32	0,42
Ppp1r3c	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	ENSMUST00000087321	53412	0,0001605	89,92	213,2	0,42
Slc22a7	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	NM_144856	108114	0,0001096	54,64	129,55	0,42
Cd209g	CD209g antigen	NM_027343	70192	4,95E-05	11,58	28,17	0,41
Cyp7a1	Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	NM_007824	13122	6,87E-05	159,32	387,65	0,41
Ppp1r10		ENSMUST00000087211		1,03E-05	58,44	143,92	0,41
Acss3	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	NM_001142804	380660	2,74E-05	29,15	72,52	0,4
Cyp3a44	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44	NM_177380	337924	0,0004701	102,54	258,08	0,4
Igfals	Insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit	ENSMUST00000168131	16005	0,0002209	118,4	296,54	0,4

Hao2	Hydroxyacid oxidase 2	NM_019545	56185	8,60E-06	187,66	486,17	0,39
Slc34a2	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	NM_011402	20531	7,30E-06	21,62	57,71	0,37
Igll1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	NM_001190325	16136	4,20E-06	17,55	48,58	0,36
Mmd2	Monocyte to macrophage differentiation-associated 2	ENSMUST00000037048	75104	0,0001114	92,5	254,28	0,36
Raet1e	Retinoic acid early transcript 1E	NM_198193	379043	0,0002726	23,93	66,02	0,36
Prok1	Prokineticin 1	NM_001044382	246691	9,75E-05	13,91	40,33	0,34
9030619P08Rik	RIKEN cDNA 9030619P08 gene	NM_001039720	105892	0,0002704	100,86	314,94	0,32
Clec2d	C-type lectin domain family 2, member d	NM_053109	93694	1,30E-06	217,85	675,54	0,32
Mug1	Murinoglobulin 1	NM_008645	17836	1,19E-05	114,99	358,8	0,32
Cml2	Camello-like 2	NM_053096	93673	0,0008911	29,2	93,73	0,31
Tdo2	Tryptophan 2,3-dioxygenase	ENSMUST00000029645	56720	8,30E-06	113,04	364,65	0,31
Cd209f	CD209f antigen	ENSMUST00000145007	69142	3,68E-05	28,61	93,99	0,3
B3galt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1	ENSMUST00000042456	26877	2,60E-06	62,2	247,75	0,25
Spp1	Secreted phosphoprotein 1	NM_001204201	20750	4,80E-06	45,53	179,19	0,25
Sult1c2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	ENSMUST00000023886	69083	5,00E-07	36,13	146,22	0,25
A630076J17Rik	RIKEN cDNA A630076J17 gene	NM_001256174	319929	5,60E-06	12,35	51,06	0,24

Ces1f	Carboxylesterase 1F	NM_144930	234564	7,65E-05	17,78	74,51	0,24
Sult2a6	Sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 6	NM_001081325	629219	9,81E-05	8	36,71	0,22
Ces3a	Carboxylesterase 3A	NM_198672	382053	1,75E-05	103,15	1336,21	0,077

Supplementary table 5:

List of 54 non-redundant genes differentially expressed in both (LKBKOlivemb) and (NOTCHKOlivemb) KO vs WT mice

* p<.001 ; ** fold-change >1.5

Gene symbol	Gene name	Accession	Entrez ID	p-value LKB1 KO vs WT *	Fold-change LKB1 KO/WT **	p-value RBPJ KO vs WT *	Fold-change RBPJ KO/WT **
Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_001044384	21857	2,79E-05	3,03	8,00E-07	7,07
Cyp2c55	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55	NM_028089	72082	< 1e-07	10	8,30E-06	5,62
Scd1	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	NM_009127	20249	4,50E-06	4,25	6,00E-07	5,57
Cidec	Cell death-inducing DFFA-like effector c	ENSMUST00000113	14311	0,0007608	1,7	3,70E-06	3,79
Scd2	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	NM_009128	20250	1,02E-05	2,09	3,00E-07	3,39
Cacna1b	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	ENSMUST00000070	12287	9,70E-06	2,44	5,20E-06	3,13
Jun	Jun oncogene	NM_010591	16476	0,0001015	2,39	0,0001122	2,88
Fdps	Farnesyl diphosphate synthetase	NM_001253751	110196	0,0009014	1,65	1,56E-05	2,65
Sgk2	Serum/glucocorticoid regulated kinase 2	ENSMUST00000018	27219	0,0001271	1,73	6,00E-06	2,59
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	NM_010941	18194	0,000531	1,58	1,21E-05	2,56
Tnfrsf12a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	NM_013749	27279	1,00E-07	3,44	3,80E-06	2,45
Akr1b7	Aldo-keto reductase family 1, member B7	NM_009731	11997	1,50E-06	2,12	0,0001405	2,43
Slpi	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_011414	20568	< 1e-07	7,73	3,07E-05	2,33
Tmem82	Transmembrane protein 82	NM_145987	213989	4,07E-05	1,85	2,46E-05	2,33
Otud1	OTU domain containing 1	NM_027715	71198	0,0004744	1,61	4,78E-05	2,25
BC090627		NR_004843		0,000247	1,75	3,72E-05	2,01

2510049J12Rik	RIKEN cDNA 2510049J12 gene	NM_001101431	70291	2,85E-05	1,91	0,000261	1,89
1700024P16Rik	RIKEN cDNA 1700024P16 gene	NM_001162980	242594	0,0005802	1,72	0,0004115	1,88
Cxadr	Coxsackie virus and adenovirus receptor	ENSMUST00000023	13052	5,68E-05	1,67	8,05E-05	1,87
Tmem98	Transmembrane protein 98	ENSMUST00000040	103743	0,0001015	1,69	0,000419	1,8
B4galt5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	NM_019835	56336	5,62E-05	1,87	0,0003577	1,71
C730027H18Rik		NR_038040		4,71E-05	1,91	0,0005445	1,69
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	ENSMUST00000141	13360	3,23E-05	1,72	0,000674	1,68
Nedd9	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9	NM_001111324	18003	0,0004137	1,55	0,0003796	1,65
Gstp1	Glutathione S-transferase, pi 1	NM_013541	14870	0,0002174	1,57	0,0009887	1,53
Hsd11b1	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	ENSMUST00000016	15483	1,10E-06	0,34	0,0004827	0,61
Ifi44	Interferon-induced protein 44	NM_133871	99899	0,0001448	0,56	0,0002289	0,57
Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1	NM_025557	66425	9,20E-06	0,26	0,000199	0,57
Fzd8	Frizzled homolog 8 (Drosophila)	NM_008058	14370	0,0003285	0,55	0,0003894	0,56
Ugt3a2	UDP glycosyltransferases 3 family, polypeptide A2	ENSMUST00000072	223337	0,0003223	0,42	0,0001556	0,55
Rarres1	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	NM_001164763	109222	0,00058	0,56	0,0005593	0,54
Slc13a3	Solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	ENSMUST00000029	114644	9,79E-05	0,54	0,0004982	0,54
Tcf24		XM_003688767		0,0005665	0,64	0,0001461	0,51
Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase	ENSMUST00000003	21743	1,10E-06	0,29	0,0005713	0,51
Miox	Myo-inositol oxygenase	ENSMUST00000023	56727	3,30E-06	0,38	7,94E-05	0,49
Serpina3k	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K	NM_011458	20714	1,25E-05	0,28	0,0001132	0,47

Ifi27l2a	Interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	NM_029803	76933	4,11E-05	0,52	0,0003395	0,45
Dio1	Deiodinase, iodothyronine, type I	NM_007860	13370	3,90E-06	0,42	0,0004279	0,45
2810007J24Rik	RIKEN cDNA 2810007J24 gene	NM_175250	76971	2,30E-06	0,43	0,0003734	0,44
Cyp2a22	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 22	NM_001101467	233005	7,50E-06	0,35	0,000259	0,44
Cyp2c69	Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 69	NM_001104525	100043108	< 1e-07	0,17	0,0001161	0,44
Slc22a7	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	NM_144856	108114	5,09E-05	0,44	0,0001096	0,42
Cyp3a44	Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44	NM_177380	337924	0,0009259	0,58	0,0004701	0,4
Acss3	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	NM_001142804	380660	0,000125	0,55	2,74E-05	0,4
Prok1	Prokineticin 1	NM_001044382	246691	1,26E-05	0,54	9,75E-05	0,34
Clec2d	C-type lectin domain family 2, member d	NM_053109	93694	6,90E-06	0,54	1,30E-06	0,32
Mug1	Murinoglobulin 1	NM_008645	17836	< 1e-07	0,043	1,19E-05	0,32
Cml2	Camello-like 2	NM_053096	93673	0,0008069	0,46	0,0008911	0,31
Tdo2	Tryptophan 2,3-dioxygenase	ENSMUST00000029	56720	3,80E-06	0,4	8,30E-06	0,31
Sult1c2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2	ENSMUST00000023	69083	1,02E-05	0,37	5,00E-07	0,25
B3galt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 1	ENSMUST00000042	26877	< 1e-07	0,18	2,60E-06	0,25
A630076J17Rik	RIKEN cDNA A630076J17 gene	NM_001256174	319929	6,94E-05	0,48	5,60E-06	0,24
Ces1f	Carboxylesterase 1F	NM_144930	234564	0,0005218	0,29	7,65E-05	0,24
Ces3a	Carboxylesterase 3A	NM_198672	382053	3,00E-07	0,14	1,75E-05	0,077

1.3 Discussion

Nos différents résultats ont permis d'asseoir l'existence d'un réel dialogue entre LKB1 et β-caténine dans le foie. À l'image de β-caténine, LKB1 est apparu comme jouant des rôles différents en fonction du stade de développement [34, 39, 169]. Vis-à-vis de β-caténine, LKB1 exercerait plutôt un rôle de morphogène au cours du développement, nécessaire pour la mise en place du zonage lobulaire par β-caténine et pour la tubulogenèse biliaire. En revanche, dans le foie adulte, LKB1 agirait plutôt comme senseur énergétique, permettant de coupler une partie du programme transcriptionnel de β-caténine au statut nutritionnel. Dans ces deux situations, LKB1 est apparu comme nécessaire pour l'activation complète du programme transcriptionnel de β-caténine dans le foie. De plus, dans un contexte tumoral, l'activation oncogénique de β-caténine semble promouvoir l'expression protéique de LKB1 qui, en retour, est apparue comme nécessaire à la survie des hépatocytes (sur-)activés pour β-caténine, réalisant un véritable dialogue coopératif entre ces deux acteurs.

Concernant le dialogue LKB1/β-caténine, la littérature est cependant assez pauvre. D'un point de vue mécanistique, certains travaux placent LKB1 en amont de β-caténine. Chez le xénope, XEEK1, l'homologue de LKB1 active la voie Wnt/β-caténine en phosphorylant et inactivant GSK3β [380, 381], ce dialogue étant important dans le développement embryonnaire, notamment pour l'axe cranio-caudal. Un même type de contrôle a été observé dans un modèle murin de carcinomes basocellulaires induits par les rayons UV [382]. Pour d'autres cependant, LKB1 inhiberait la voie Wnt/β-caténine *via* l'activation de *Mark3* (PAR1A) qui n'interagirait plus avec Dvl [383], *via* une interaction directe avec APC [384] ou *via* l'activation de GSK3β [359, 385, 386]. Dans le polype de Peutz-Jeghers, la perte (le plus souvent biallélique) de LKB1 s'accompagne parfois de mutations activatrices de *CTNNB1* dans les rares cas où une composante adénomateuse existe [230, 245, 246].

À l'inverse, d'autres travaux placent β-caténine en amont de LKB1, le contrôlant négativement. Dans des lignées carcinomateuses épidermoïdes ORL, l'invalidation de β-caténine conduit à une augmentation de l'expression de LKB1 et de l'apoptose [387].

Au total, les données de la littérature sont quelque peu contradictoires, plaçant à la fois LKB1 en amont et en aval de β-caténine et avec un dialogue soit activateur soit répresseur. Cette hétérogénéité des données tend à montrer qu'un dialogue LKB1/β-caténine existe bel et bien dans de nombreuses situations tumorales mais que les tenants et aboutissants varient en fonction du contexte.

Notre modèle apparaît comme original vis-à-vis des données de la littérature, plaçant LKB1 sous le contrôle positif de β-caténine et comme acteur essentiel pour l'activation complète du programme β-caténine.

Aucune étude n'a cependant préalablement étudié un tel dialogue LKB1/β-caténine dans le foie normal ou tumoral. À notre connaissance, seuls H. Miyoshi et coll. ont abordé ce sujet mais selon un angle complètement différent du nôtre. Ils ont étudié le modèle murin Lkb1$^{+/-}$ qui développe spontanément des nodules hépatocytaires dysplasiques au bout de 7 mois de vie et des CHC au bout de 10 mois de vie [355]. Une activation de β-caténine [10] a été réalisée dans le foie de ces souris entre 11 et 14 mois de vie, c'est-à-dire après l'apparition potentielle des lésions (pré-)cancéreuses hépatiques. Les auteurs ont observé que deux mois après l'activation de β-caténine, le nombre de CHC était augmenté par rapport aux souris Lkb1$^{+/-}$. Ces CHC présentaient une LOH du locus *Lkb1* et une certaine activation d'un programme transcriptionnel de type β-caténine ; la glutamine synthétase (Glul) n'était cependant pas exprimée. Leurs résultats indiquent que dans un contexte d'haploinsuffisance *Lkb1*, l'activation de β-caténine favorise l'apparition de CHC [185]. Ces CHC semblent cependant être assez différents des CHC humains mutés *CTNNB1*, notamment en ce sens qu'ils n'exprimaient pas Glul, marqueur sensible des CHC mutés *CTNNB1* [2, 30, 173]. Malheureusement, l'aspect microscopique des tumeurs n'était que peu détaillé dans l'article et leur modèle semble être assez éloigné de la réalité clinique. En effet, les patients souffrant d'un syndrome de Peutz-Jeghers développent certes de nombreux cancers de la sphère digestive mais très rarement des CHC. En accord, les mutations de *LKB1* sont rarissimes dans les CHC sporadiques [371].

Cependant, leurs résultats ont permis de confirmer une de nos observations : en l'absence de LKB1, β-caténine est incapable d'induire l'entièreté de son programme transcriptionnel. En effet, leurs tumeurs β-caténine+/Lkb1− présentaient une induction d'un programme transcriptionnel β-caténine, mais qui était incomplet, sans expression de Glul.

Pour aller plus loin, même si ce n'est qu'une hypothèse, l'activation de β-caténine dans les CHC induirait un programme métabolique impliquant LKB1 et requérant la synthèse de glutamine comme substrat énergétique, anaplérotique du cycle de Krebs. En revanche, dans un contexte de déficience *LKB1*, même si plus théorique que réel, les CHC mutés *CTNNB1* reprogrammeraient leur métabolisme en un circuit indépendant de la glutamine. Cette hypothèse trouvera une résonance dans le chapitre suivant puisque l'invalidation de LKB1 dans le foie induit une reprogrammation métabolique de l'hépatocyte, laquelle semble impliquer l'utilisation de voies alternatives pour le métabolisme des acides aminés.

Nous avons aussi observé dans le modèle LKBKO^{livad} que Lkb1 était surtout nécessaire à l'activation complète du programme transcriptionnel de β-caténine surtout à l'état nourri. Ceci permettrait de lier les fonctions de LKB1 sur β-

10. Modèle Lkb1$^{+/-}$;*Ctnnb1*$^{lox(ex3)/wt}$ + injections d'un adénovirus codant la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur CMV

caténine au statut nutritionnel. Nous allons voir dans le chapitre suivant que les fonctions métaboliques de LKB1 varient également en fonction de l'état nutritionnel.

Enfin, nous avons établi un nouveau lien entre *Lkb1* et la voie Notch dans le foie embryonnaire, notamment important pour la tubulogenèse biliaire.À notre connaissance, une seule étude a établi un potentiel lien entre ces deux acteurs. Dans un modèle d'invalidation totale de *Lkb1* dans l'intestin murin, la perte de Lkb1 induit une altération de la différenciation des cellules de PANETH et caliciformes, associée à une modulation de la voie Notch [388].

Comme pour le lien LKB1/β-caténine, nous n'avons malheureusement pas encore identifié les intermédiaires moléculaires entre LKB1 et la voie Notch.

Dans un contexte tumoral hépatique, nous avons précédemment vu que, selon les études, la voie Notch apparaissait soit comme oncogénique soit comme suppressive de tumeurs (voir 2.3.3 page 65 et suivantes). Dans les situations où la voie Notch était considérée comme oncogénique, les tumeurs observées avaient généralement une double différenciation hépatocytaire et cholangiocytaire (tumeurs de type « progéniteur ») ou étaient des cholangiocarcinomes. Dans notre modèle d'invalidation hépatospécifique de *Lkb1* dans le foie embryonnaire, Lkb1 semblait être nécessaire à l'activation de la voie Notch. Cette observation irait donc à l'encontre du phénotype de type hépatocytaire bien différencié qui caractérise les CHC mutés *CTNNB1*. Cependant, comme LKB1 et β-caténine ont des rôles très différents en fonction du stade de développement, cette apparente contradiction suggèrerait que l'interaction réciproque entre Notch, LKB1 et β-caténine serait également complètement fonction du stade développemental (dans un contexte physiologique) et de la nature de la cellule initiatrice de tumeurs (progénitrice, hépatocytaire ou cholangiocytaire) dans un contexte tumoral.

Chapitre 2

Rôles métaboliques de LKB1 dans le foie.

2.1 Introduction

Dans ce second volet, nous avons cherché à identifier les rôles métaboliques de LKB1 dans le foie. En effet, pour pouvoir s'intégrer dans notre hypothèse de départ de l'induction de LKB1 dans les CHC mutés *CTNNB1* pour leur conférer leurs caractéristiques phénotypiques propres, LKB1 devrait constituer un frein à l'établissement d'une stéatose, soit en inhibant la lipogenèse soit en induisant une β-oxydation accrue.

Si les rôles métaboliques de LKB1 et surtout de l'AMPK commencent à être bien définis d'une façon générale, peu de données sont disponibles sur leurs rôles spécifiques dans le foie. Une étude d'invalidation hépatospécifique de *Lkb1* dans un modèle murin a été publiée en 2005. Cette étude utilisait un modèle $Lkb1^{lox/lox}$ dans lequel l'invalidation de *Lkb1* était induite dans le foie adulte par une injection intraveineuse d'un adénovirus codant la recombinase Cre. Les auteurs ont observé la présence d'une hyperglycémie avec augmentation de la lipogenèse et de la néoglucogenèse hépatiques. Ce phénotype était expliqué par une déphosphorylation de CRTC2 (TORC2), co-activateur transcriptionnel de CREB1, le rendant actif et induisant l'expression d'un programme de néoglucogenèse médié par PPARGC1A (PGC1α) et [128].

Nous avons initialement essayé de reproduire ces résultats en utilisant le même modèle. Cependant, entre nos mains, nous avons observé une apoptose des hépatocytes infectés par l'adénovirus-Cre, suivie d'une repopulation du parenchyme hépatique par des hépatocytes non recombinés pour *Lkb1*, empêchant toute analyse fiable.

2.2 Résultats

2.2.1 Lkb1 joue des rôles différents dans le foie embryonnaire et le foie adulte.

Pour contourner ce problème, nous avons développé les deux modèles d'invalidation hépatospécifique de *Lkb1*, LKBKO^{livad} et LKBKO^{livemb}, déjà présentés dans le chapitre précédent, et dans lesquels la recombinase Cre a été « apportée » par transgenèse additive. Pour rappel, LKBKO^{livemb} permet l'invalidation de *Lkb1* dans le foie embryonnaire vers E10.5 (*AlFp-Cre*). Le modèle LKBKO^{livad} permet l'invalidation de *Lkb1* dans l'hépatocyte adulte, après injections de tamoxifène (1.5 mg/j, 3 j) (*Ttr-CreER*^{T2}) (Figure 2.2 page 221). Ces souris ont été élevées, sauf mention contraire, sous régime standard (A03, Safe Diets©). Par la suite, le terme « *KO* » sera utilisé pour mentionner les souris homozygotes pour la construction lox sur *Lkb1* et ayant le transgène *Cre*. Le terme « *WT* » ou « contrôles » sera utilisé pour mentionner les souris ayant tout autre génotype. Seules des souris mâles ont été analysées (sauf pour l'établissement des courbes pondérales sous différents régimes dans le modèle LKBKO^{livemb}).

Comme déjà mentionné dans le 1er chapitre des « Résultats », le phénotype était profondément différent entre les deux modèles. Les animaux LKBKO^{livemb} (figure 2.3 page 222) naissaient de façon mendélienne et sans phénotype apparent mais présentaient un arrêt de leur croissance postnatale débutant vers $J12$ et aboutissant à la mort entre $J25$ et $J30$ dans un contexte de cachexie avec sarcopénie. Les animaux étaient initialement normoglycémiques mais une hypoglycémie apparaissaient à $J22$ chez les animaux KO.

À l'inverse, les animaux LKBKO^{livad} (figure 2.4 page 223) ne présentaient pas de phénotype global apparent si ce n'est une hyperglycémie modérée à jeun. Il n'existait ni cytolyse ni cholestase biologiques significatives. Les animaux mourraient pour la plupart au bout de quelques semaines après injection de tamoxifène. Cependant, la courbe de survie différait en fonction de l'âge des animaux au moment des injections de tamoxifène, les souris plus âgées ayant une survie prolongée par rapport aux souris plus jeunes.

2.2.2 Lkb1 dans le foie contrôle l'homéostasie énergétique globale.

Une hypothèse pour expliquer cette différence serait que les souris plus âgées ont des réserves énergétiques plus importantes que les souris plus jeunes. Comme LKB1 a été montré comme ayant un rôle majeur dans le rationnement des réserves énergétiques chez le poisson zèbre [307] et chez *Caenorhabditis elegans* [306], nous avons alors analysé l'évolution de la composition corporelle par IRM quantitative

chez les animaux LKBKO^{livad} (figure 2.5 page 224). De façon surprenante, ces animaux présentaient une accumulation progressive de leur masse grasse et une diminution relative de leur masse maigre sans que leur poids total ne soit différent de celui des souris contrôles.

Pour en savoir un peu plus, nous avons soumis ces animaux à une étude de calorimétrie dans des cages métaboliques (collaboration équipe de S. Luquet, BFA EAC 4413, Université Paris Diderot). Les animaux LKBKO^{livad} présentaient une augmentation modérée de leur prise alimentaire associée à une diminution de leur activité locomotrice ambulatoire (figure 2.6 page 225). Les données de calorimétrie indirecte (figure 2.7 page 226) indiquaient que la dépense énergétique était comparable entre souris KO et contrôles et que la balance énergétique (prise alimentaire − dépense énergétique) était augmentée chez les animaux KO. Surtout, l'analyse des flux respiratoires $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ indiquait une préférence significative pour l'utilisation des glucides et non des lipides comme substrat énergétique global. Ce ratio $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ était plus particulièrement augmenté chez les souris KO lors de la fin du jeûne et au début de la phase de ré-alimentation au cours d'un cycle nycthéméral normal.

L'ensemble de ces données expliquerait l'augmentation de la masse grasse chez ces animaux et indiquerait un rôle de LKB1 hépatique dans le contrôle du métabolisme énergétique global (corps entier) et dans le choix des substrats énergétiques.

2.2.3 Lkb1 inhibe la signalisation AKT et la néoglucogenèse dans le foie.

Comme mentionné, les animaux LKBKO^{livad} présentaient une hyperglycémie modérée à jeun. Le test de tolérance au glucose a montré des glycémies capillaires plus élevées chez les animaux KO que chez les animaux contrôles (figure 2.8 page 227). Pour expliquer cette hyperglycémie, nous avons réalisé un test de tolérance au pyruvate qui indiquait une néoglucogenèse accrue chez les animaux KO (figure 2.8 page 227). Ces résultats sont en accord avec les données publiées [128].

Pour poursuivre l'analyse du métabolisme glucidique hépatique, nous avons analysé le contenu hépatocytaire en glycogène dans le modèle LKBKO^{livad}. Les animaux KO présentaient une augmentation du contenu en glycogène des hépatocytes (figure 2.9 page 228).

Pour expliquer cette accumulation de glycogène, nous nous sommes intéressés à la signalisation insuline. Dans le modèle LKBKO^{livad}, alors que la signalisation AMPK ne paraissait que peu altérée (figure 2.10 page 229), nous avons observé une augmentation de la phosphorylation d'AKT que ce soit à jeun ou à l'état nourri (figure 2.11 page 230). En aval, les phosphorylations de Gsk3β et de Foxo1 étaient également plus importantes chez les souris KO. Cependant, malgré l'hyperglycémie

des animaux, les taux d'insuline plasmatiques n'étaient pas augmentés, indiquant que cette activation d'AKT se produisait de façon *cell autonomous* (figure 2.12 page 231.

Nous avons testé plusieurs pistes pour déterminer les liens moléculaires entre LKB1 et la signalisation AKT. Cependant, l'expression protéique de phosphatases capables de déphosphoryler AKT comme Pten, la protéine phosphatase 2A, Phlpp1 et Phlpp2, n'était pas modifiée. De même, l'état d'activation de mTORC2, appréhendé par la phosphorylation de ses cibles (Prkca (Pkcα), Ndrg1 et Akt (T450)) ne variait pas entre souris *KO* et contrôles (figure 2.11 page 230).

L'existence d'une néoglucogenèse accrue en présence d'une signalisation AKT activée est paradoxale. Nous avons vérifié sur le plan transcriptionnel si les enzymes limitantes de la néoglucogenèse étaient induites chez les animaux *KO*. Alors que l'expression de la glucose 6-phosphatase (G6pc) était augmentée à jeun, celle de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Pepck) ne variait pas (figure 2.13 page 232). Il ne semblait pas non plus exister d'augmentation de la néoglucogenèse dans le rein (figure 2.14 page 233). FOXO1 est le principal régulateur transcriptionnel de la néoglucogenèse. Il était activé dans le foie des souris *KO* comme en témoignait l'induction transcriptionnelle de ses gènes cibles spécifiques (Igfbp1, Agxt1l2, Pgc1α et Mmd2)(figure 2.13 page 232). La phosphorylation de FOXO1 par AKT conduit à sa séquestration cytoplasmique. Cependant, l'acétylation de FOXO1 est aussi capable de le séquestrer dans le cytoplasme et sa déacétylation par des histones déacétylases (HDAC) de classe IIa lui permet d'être actif dans le noyau [389]. Des études récentes ont montré que l'axe LKB1/AMPK est capable d'inactiver par phosphorylation les histones déacétylases (HDAC) de classe IIa [296].

Même si ceci reste encore à montrer dans notre modèle, l'activation de la néoglucogenèse ne serait donc pas antinomique avec l'activation d'AKT, car l'invalidation de Lkb1 pourrait s'accompagner d'une activation des HDAC entrainant la déacétylation et l'activation de Foxo1 pour induire un programme de néoglucogenèse.

2.2.4 L'invalidation hépatospécifique de *Lkb1* induit une dépendance énergétique aux acides aminés.

Parmi les rares gènes différentiellement exprimés entre *KO* et contrôles qui étaient communs entre les modèles LKBKO^{livad} et LKBKO^{livemb} figurait *Agxt*. Ce gène code une aminotransférase impliquée dans le métabolisme des acides aminés, notamment de la sérine qui peut être catalysée en un substrat glucoformateur selon une voie *by-passant* PCK1 (PEPCK) (voir pages 36 et suivantes). L'expression transcriptionnelle et protéique d'*Agxt* était augmentée chez les animaux *KO* à jeun et à l'état nourri (figures 2.13 page 232 et 2.15 page 234-E), suggérant qu'une

néoglucogenèse importante à partir d'acides aminés pouvait avoir lieu.

L'urémie, témoin du catabolisme des acides aminés, était augmentée chez les animaux KO (figure 2.15 page 234-A). Nous avons réalisé plusieurs tests de tolérance à différents acides aminés. Le test de tolérance à la L-alanine a montré une néoglucogenèse accrue chez les animaux KO (figure 2.15 page 234-B), de même que le test à la L-glutamine mais avec des glycémies inférieures (figure 2.15 page 234-C). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la L-alanine soit un acide aminé plutôt glucoformateur dans le foie alors que la L-glutamine le serait plutôt dans le rein [390]. De façon plus intéressante, la serine, substrat d'Agxt, était également capable d'induire une néoglucogenèse accrue chez les animaux KO (figure 2.15 page 234-D). Ainsi, l'invalidation hépatique de *Lkb1* conduirait à une néoglucogenèse accrue, préférentiellement à partir d'acides aminés, *via* un circuit impliquant probablement Agxt. Ceci expliquerait la mort dans un contexte de cachexie avec sarcopénie des animaux LKBKO^{livemb} et la diminution de la masse maigre chez les souris LKBKO^{livad}.

Pour conforter cette hypothèse, nous avons tenté un sauvetage phénotypique des souris dans le modèle LKBKO^{livemb} avec différents régimes alimentaires. Sous régime standard, les animaux KO présentent un « décrochage » de leur courbe pondérale vers $J12$, ce qui correspond à la période de la transition allaitement - sevrage. Cette période se caractérise par la complète modification du métabolisme glucidolipidique global et hépatique. L'allaitement pourvoit un apport alimentaire à peu près continu et très riche en lipides alors que le sevrage s'accompagne d'un fractionnement de la prise alimentaire dont le contenu en lipides diminue fortement (figure 2.1) [391].

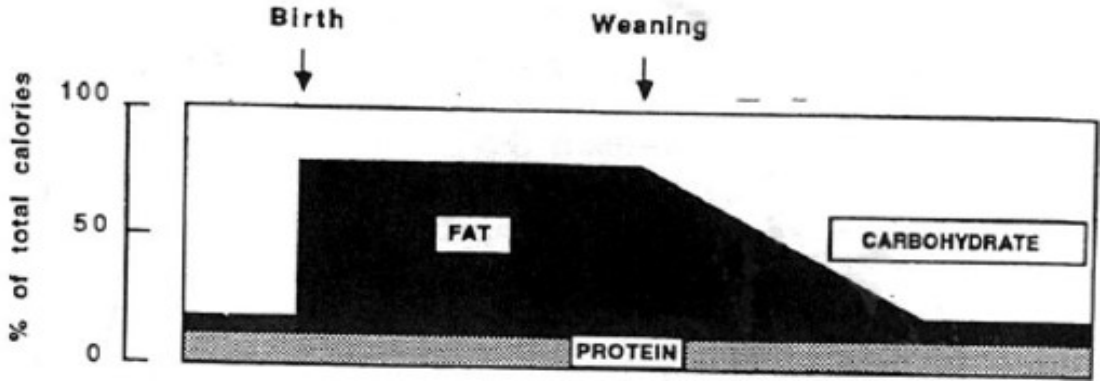


FIGURE 2.1 – Modifications de la composition alimentaire lors de la transition allaitement - sevrage. Issu de [391].

Dans notre modèle LKBKO^{livemb}, deux types différents de régimes riches en lipides n'ont pas permis d'obtenir d'amélioration majeure de la survie et de la prise

pondérale des animaux KO (figure 2.16 page 235) [1]. En revanche, un régime enrichi en protides permettait une reprise pondérale avec une survie doublée (figure 2.16 page 235).

2.2.5 Rôles de Lkb1 dans le métabolisme lipidique hépatique.

Concernant le métabolisme lipidique hépatique, les animaux LKBKO^{livad} KO présentaient à jeun des taux sériques en triglycérides comparables aux animaux contrôles. En revanche, le cholestérol total et le β-hydroxybutyrate (témoin sérique de la cétogenèse) étaient diminués (figure 2.17 page 236). Le contenu hépatocytaire en triglycérides était augmenté chez les animaux KO à jeun mais pas à l'état nourri.

Sur le plan transcriptionnel, l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse était augmentée chez les souris KO à jeun, mais pas à l'état nourri. En revanche, l'expression des gènes impliqués dans l'estérification des acides gras ne variait pas à jeun et était diminuée chez les KO à l'état nourri (figure 2.18 page 237).

Concernant les gènes impliqués dans la β-oxydation des acides gras et dans la cétogenèse, les résultats ont été plus nuancés (figure 2.19 page 238) ; cependant il existait une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la cétogenèse à jeun et à l'état nourri.

1. Dans l'hypothèse d'une moindre absorption intestinale des lipides chez les animaux KO en raison de leur cholestase obstructive, nous avons également testé un régime riche en lipides additionné de 1% d'acide ursodéoxycholique. Malheureusement, ce régime s'accompagnait d'une diminution de la prise alimentaire avec perte de poids que ce soit chez les animaux KO ou contrôles.

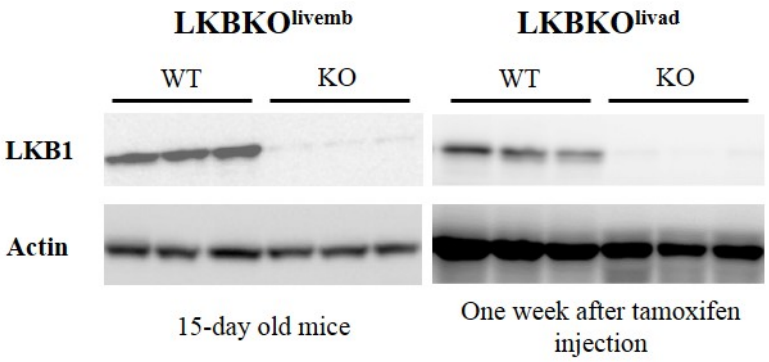


FIGURE 2.2 – Deux modèles murins de délétion hépatique de *Lkb1*, LKBKO^{livad} et LKBKO^{livemb}. Démonstration par *western blot* sur lysats hépatiques de l'invalidation de Lkb1 dans le foie de ces deux modèles.Les animaux *KO* et contrôles ont tous reçus des injections de tamoxifène (1,5 mg/j, 3j) dans le modèle LKBKO^{livad}.

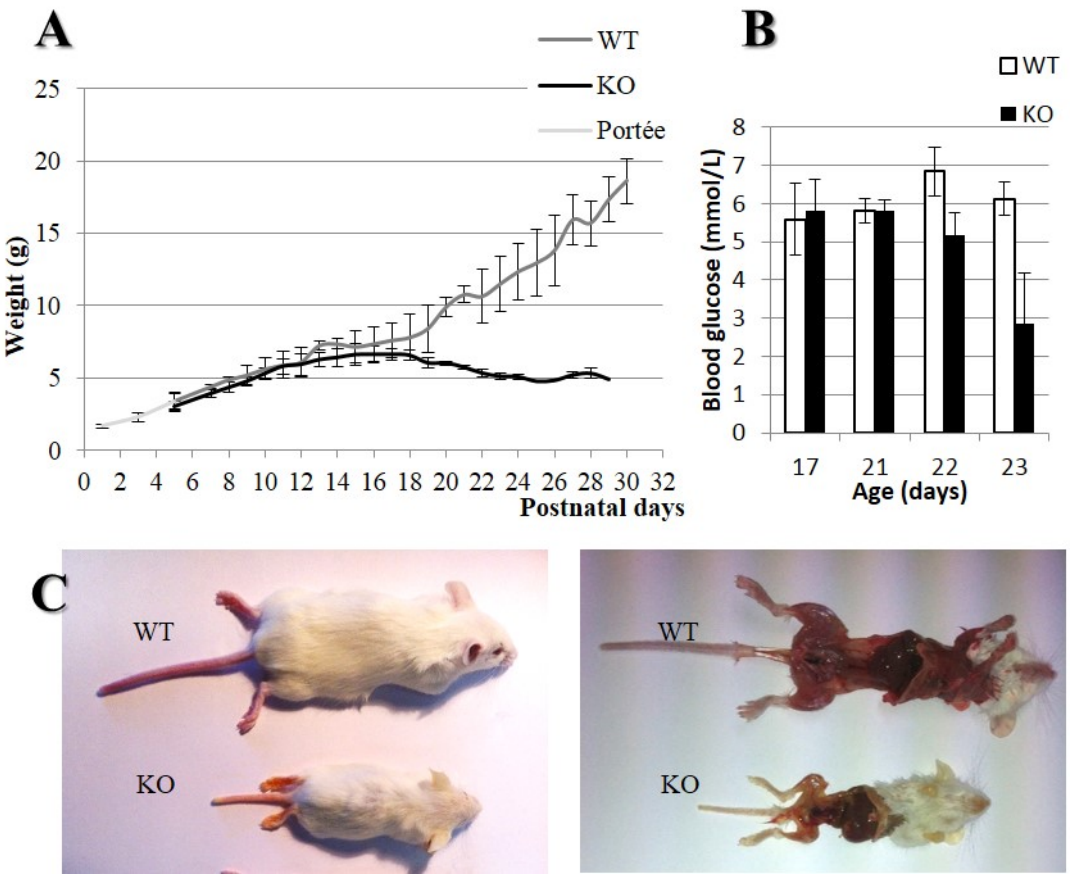


FIGURE 2.3 – Phénotype global des animaux LKBKO^{livemb}. **A** : Courbe pondérale des animaux de la naissance à $J30$. Les souris KO mourraient invariablement entre $J25$ et $J30$. n=15 WT et 8 KO. Barres d'erreur : écarts-types. **B** : Glycémie capillaire aux jours indiqués. n=5 WT et 6 KO. Barres d'erreur : écarts-types. **C** : Aspect macroscopique des animaux à $J28$. Notez la réduction de la trophicité musculaire, notamment des membres inférieurs, chez les animaux KO.

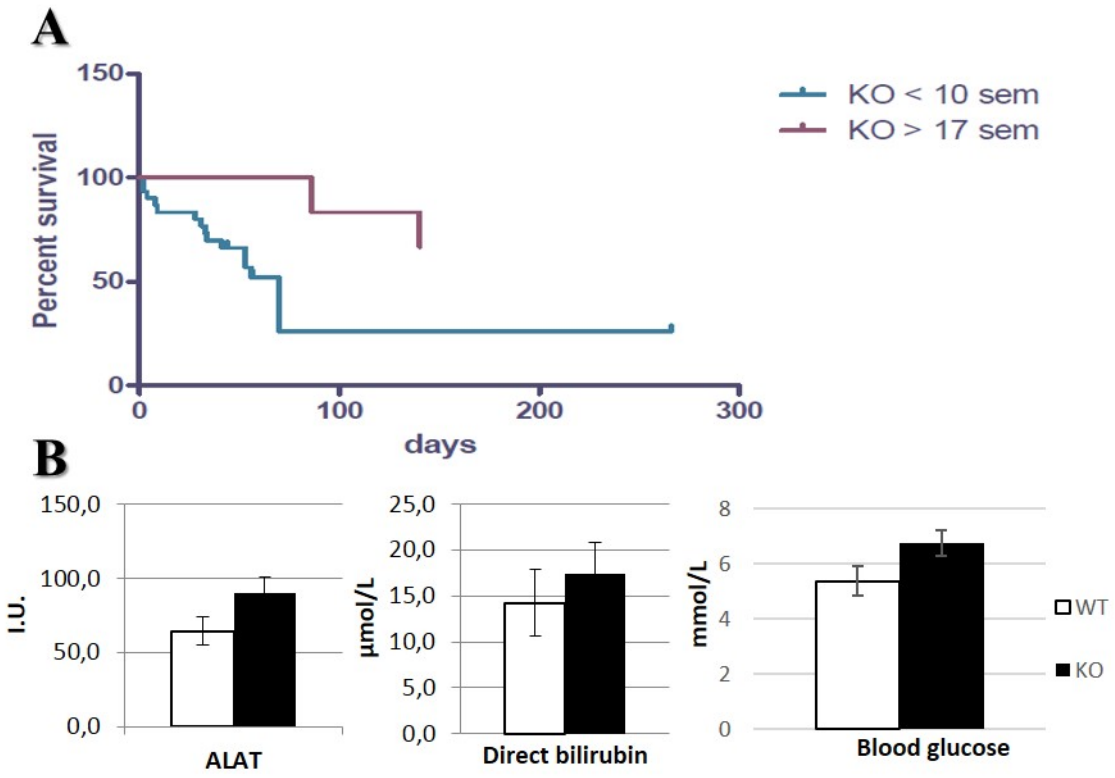


FIGURE 2.4 – Phénotype global des animaux LKBKO^{livad}. **A** : Courbe de survie des animaux *KO* selon KAPLAN-MEIER en fonction de l'âge des souris lors des injections de tamoxifène. p<0.05. **B** : Dosages sériques en ALAT, bilirubine directe (=conjuguée) et en glucose, 15 jours après injections de tamoxifène et après 16h de jeûne. n=6 WT et 12 KO. Barres d'erreur : SEM.

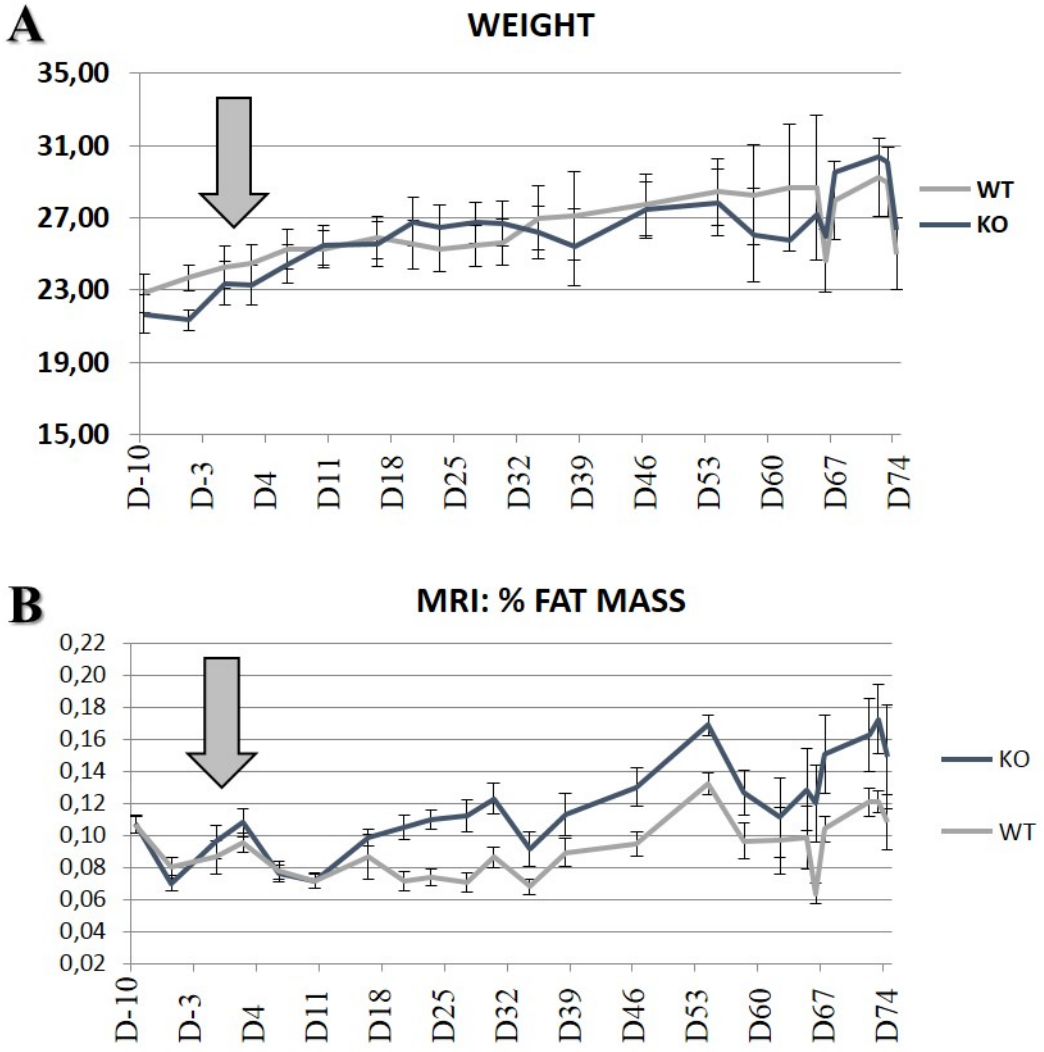


FIGURE 2.5 – Évolution de la composition corporelle des animaux LKBKO^{livad}.
A : Évolution pondérale. La flèche indique le moment de l'injection de tamoxifène. n=7 WT et 7 KO. Barres d'erreur : SEM. **B** : Analyse par IRM de la masse grasse des animaux. La flèche indique le moment de l'injection de tamoxifène. n=7 WT et 7 KO. Barres d'erreur : SEM. Méthodes : [392].

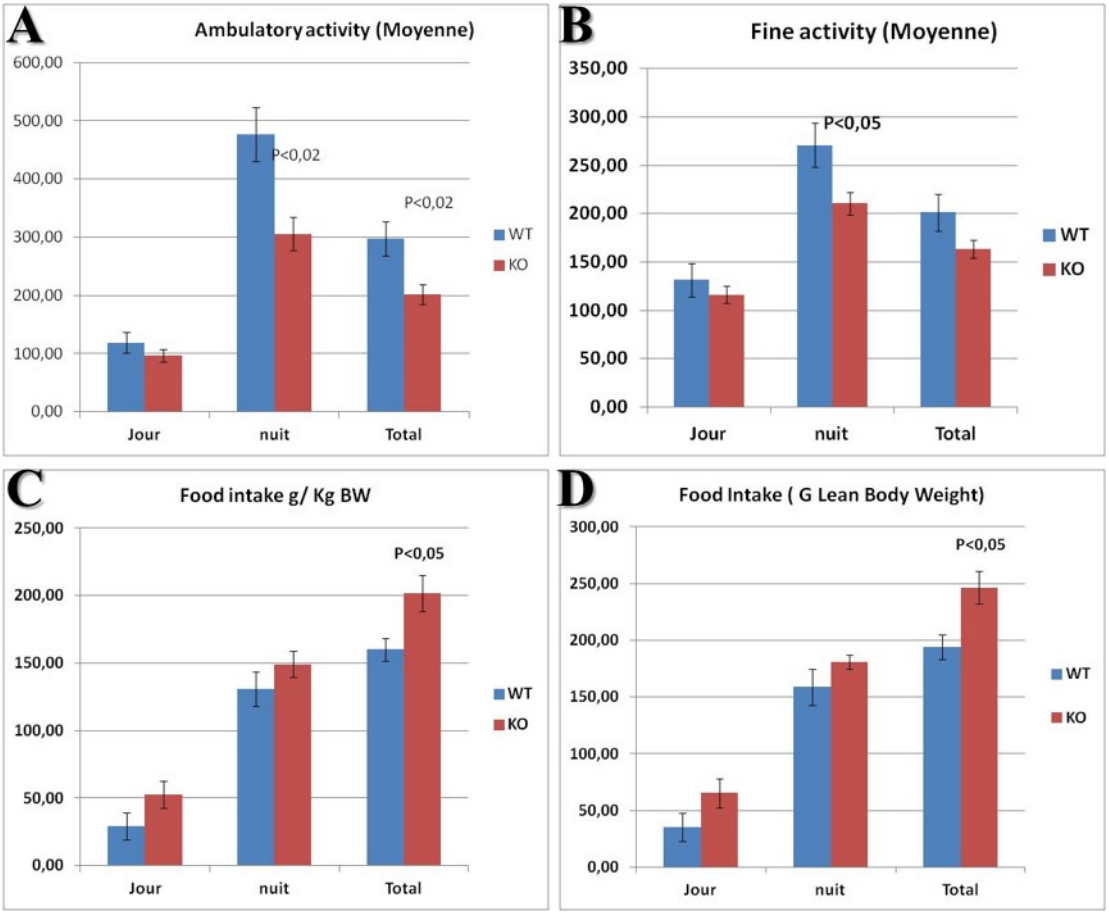


FIGURE 2.6 – Activité locomotrice et comportement alimentaire des souris LKBKO^{livad} 15 jours après injections de tamoxifène. **A** : activité ambulatoire. **B** : activité fine. **C** : prise alimentaire rapportée au poids total. **D** : prise alimentaire rapportée à la masse maigre. n=7 WT et 7 KO. Barres d'erreur : SEM. Méthodes : [392].

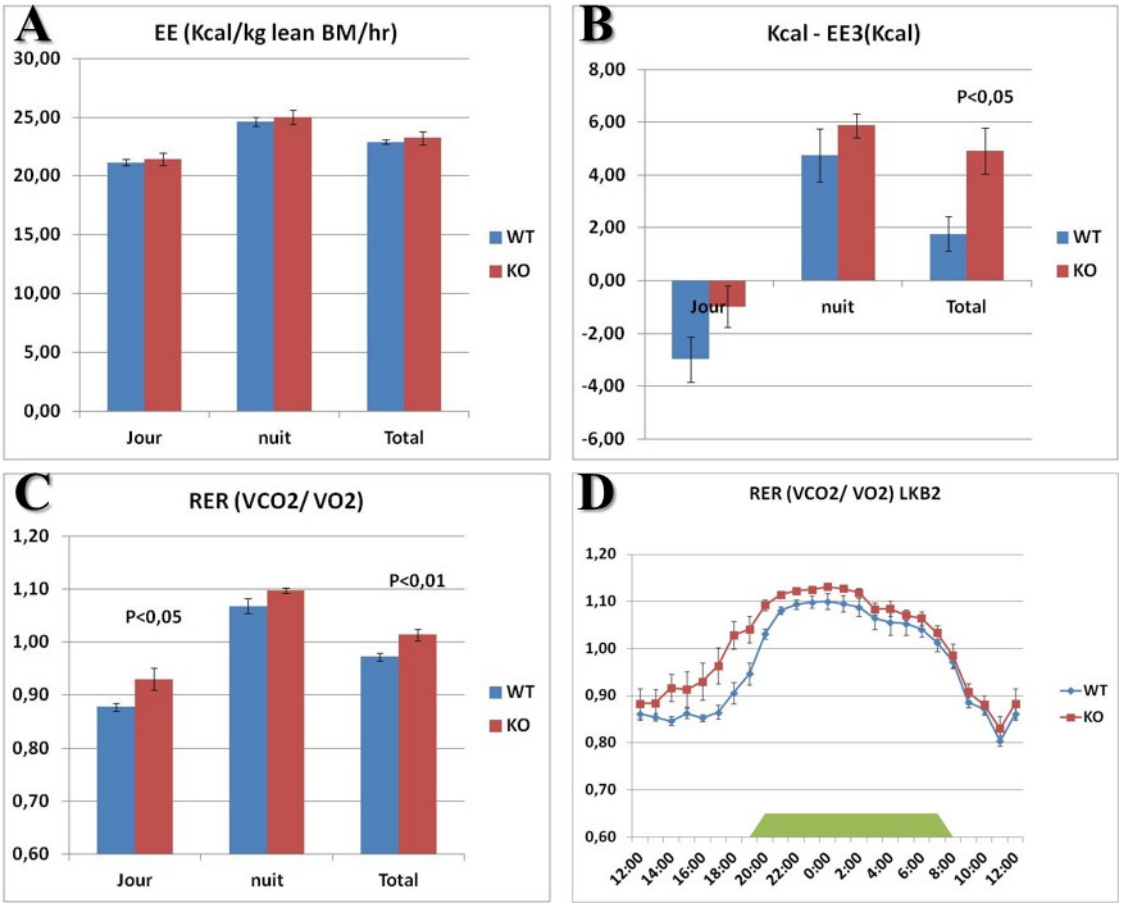


FIGURE 2.7 – Données de calorimétrie indirecte chez les animaux LKBKO^{livad} 15 jours après injections de tamoxifène. **A** : Dépense énergétique. **B** : Balance énergétique. **C** : Ratio d'échanges respiratoires $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$. **D** : Ratio d'échanges respiratoires $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ au cours d'un nycthémère type. n=7 WT et 7 KO. Barres d'erreur : SEM. Méthodes : [392].

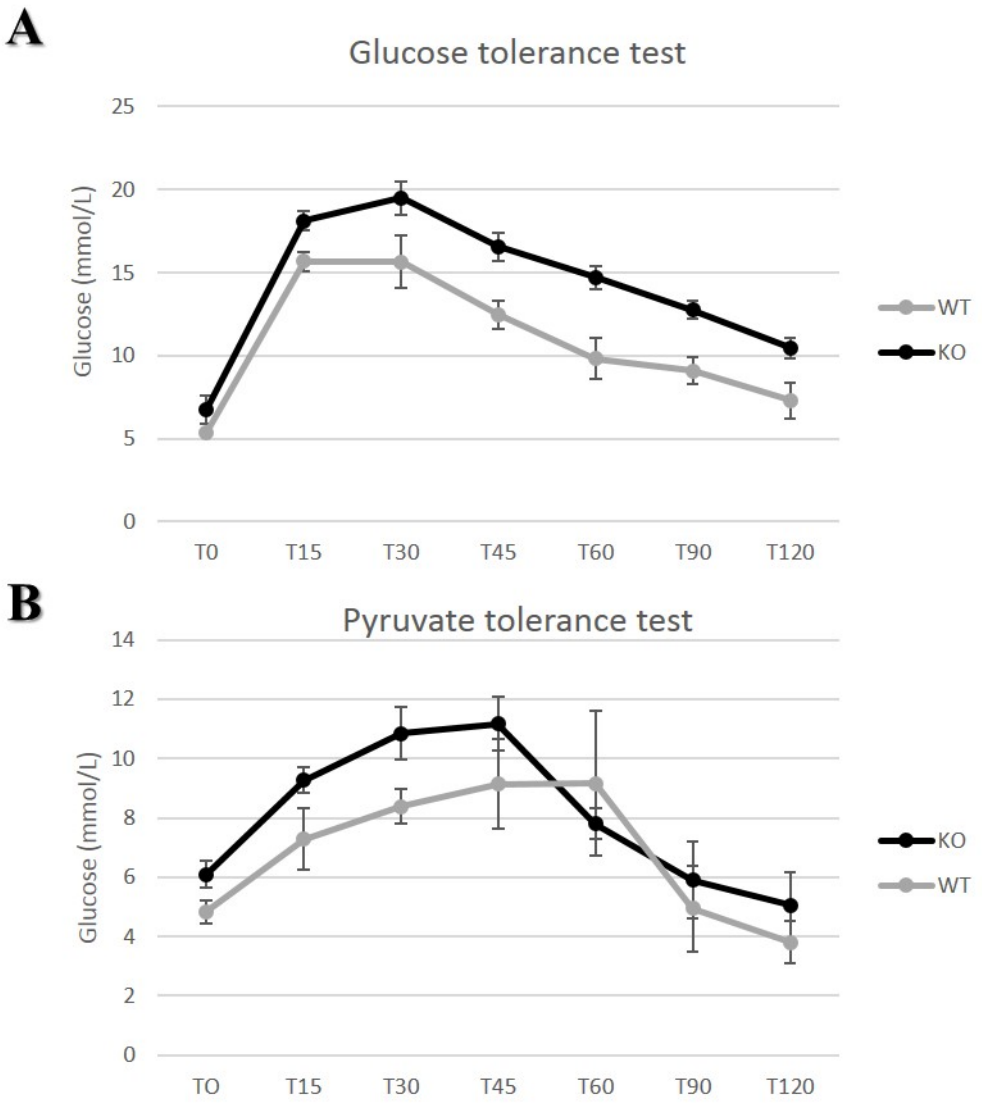


FIGURE 2.8 – Tests de tolérance au glucose (**A**) et au pyruvate (**B**) chez les animaux LKBKO^{livad}. Tests réalisés 15 jours après injections de tamoxifène chez des animaux à jeun pendant 16h. Mesure de la glycémie capillaire aux temps indiqués après injection intrapéritonéale de 2 g/kg de dextrose ou de pyruvate de sodium. n=6 WT et 12 KO pour le test de tolérance au glucose. n=4 WT et 5 KO pour le test de tolérance au pyruvate. Barres d'erreur : SEM.

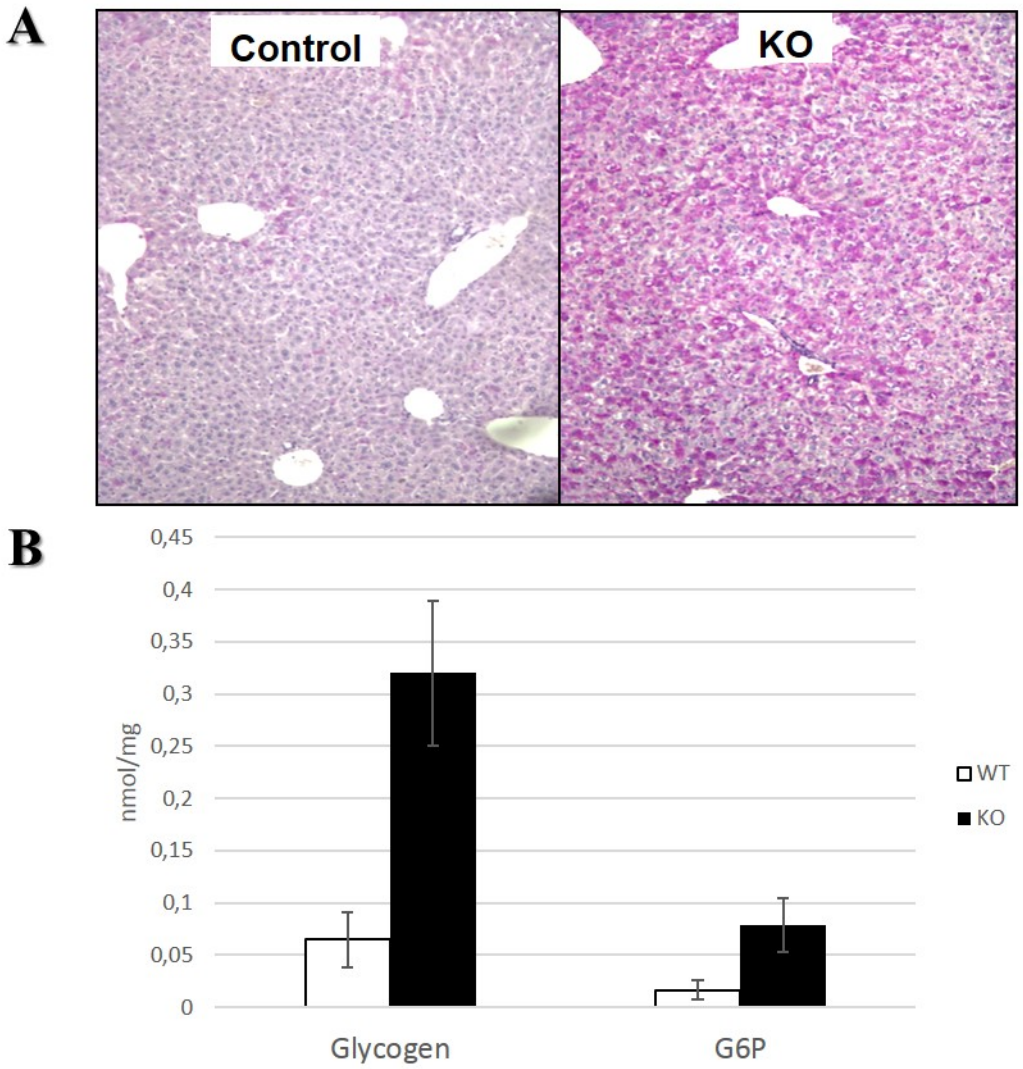


FIGURE 2.9 – Contenu hépatique en glycogène dans le modèle LKBKO^{livad}. Analyse 15 jours après injections de tamoxifène chez des animaux à jeun pendant 16h. **A** : Coloration de SCHIFF après traitement par l'acide périodique (PAS). **B** : Dosage du contenu hépatique en glycogène et glucose 6-phosphate. Méthode : [393]. n=5 par groupe. Barres d'erreur : SEM.

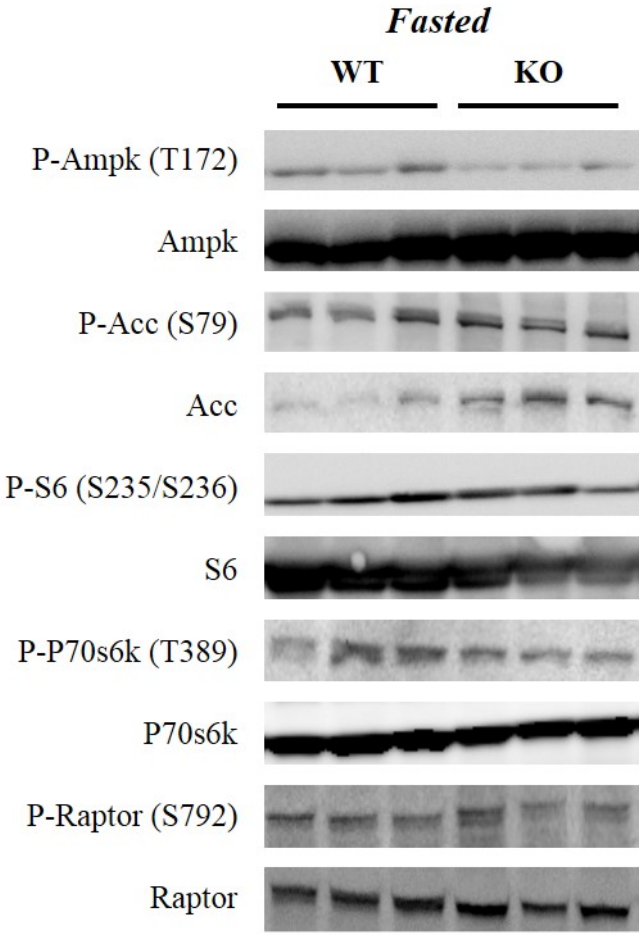


FIGURE 2.10 – Signalisation AMPK dans le modèle LKBKO^{livad}. Analyse par *Western blot* 15 jours après injection de tamoxifène et après 16h de jeûne.

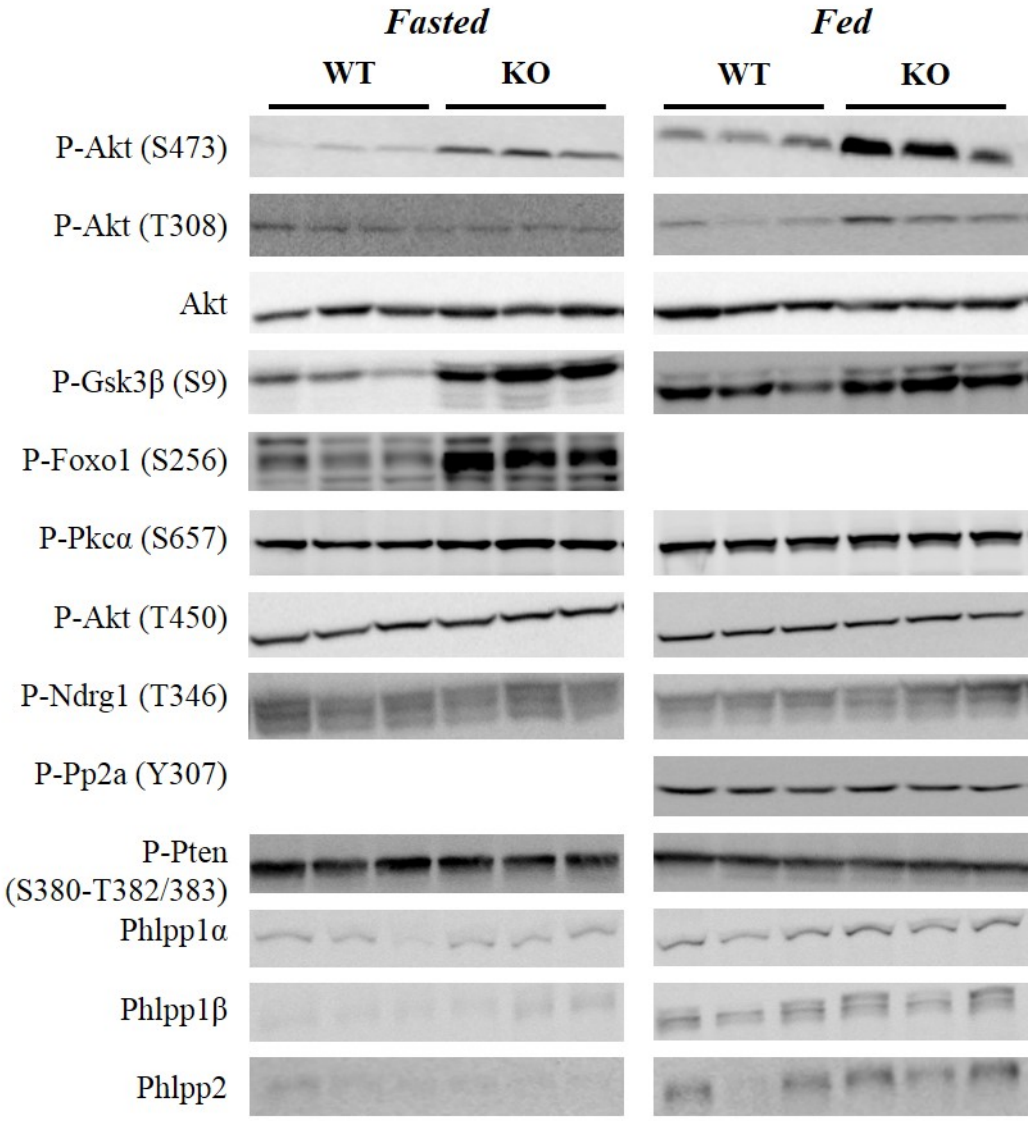


FIGURE 2.11 – Signalisation AKT dans le modèle LKBKO^{livad}. Analyse par *Western blot* 15 jours après injection de tamoxifène et après 16h de jeûne (**à gauche**) ou à l'état nourri (3h après l'extinction de la lumière au cours d'un cycle nycthéméral contrôlé 12h-12h)(**à droite**).

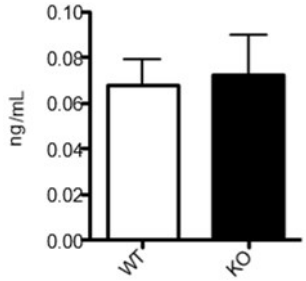


FIGURE 2.12 – Insulinémie dans le modèle LKBKO^{livad}. Dosages plasmatiques 15j après injections de tamoxifène chez des animaux à jeun pendant 16h. n=6 WT et 12 KO. Barres d'erreur : SEM. Méthodes : [393].

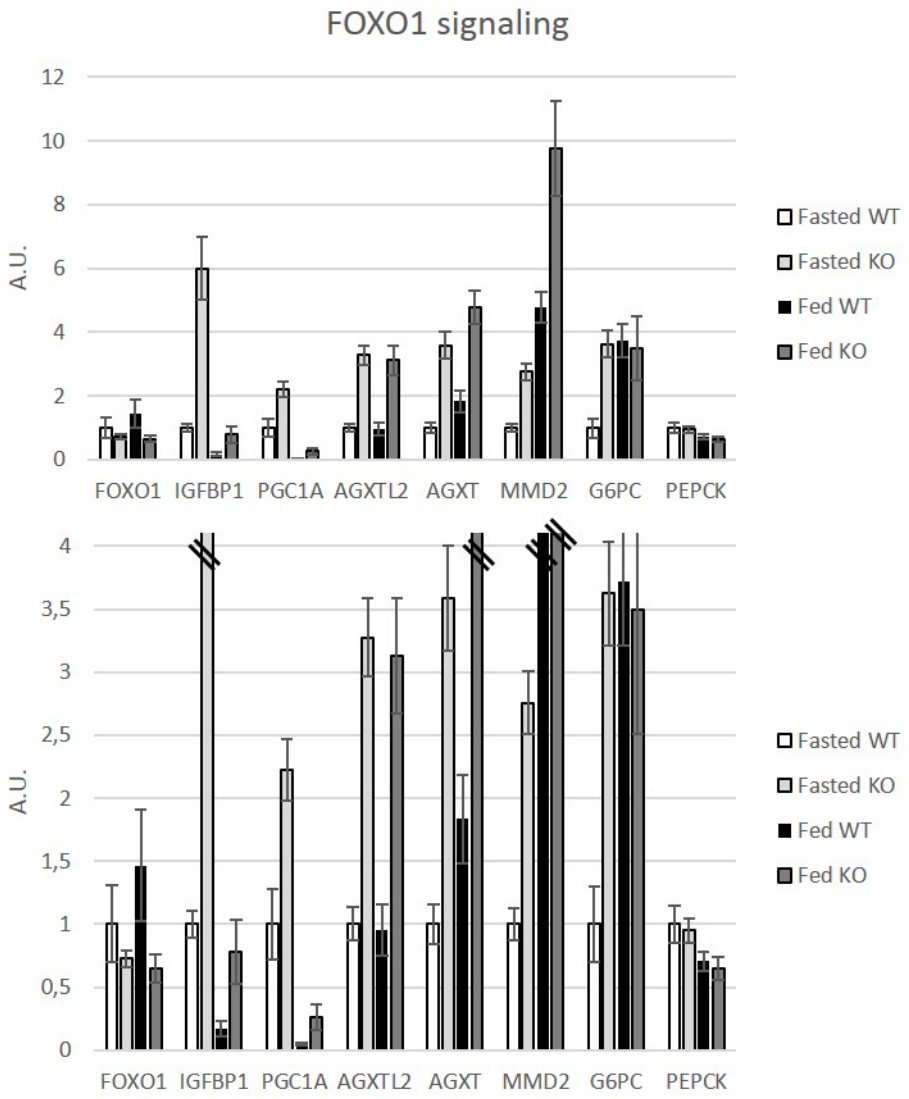


FIGURE 2.13 – Expression des gènes cibles de Foxo1 dans le modèle LKBKO^{livad}.
RT-PCR quantitative sur tissu hépatique de souris sacrifiées 15 jours après injection de tamoxifène et après un jeûne de 16h (**Fasted**) ou à l'état nourri (3h après l'extinction de la lumière au cours d'un cycle nycthéméral contrôlé 12h-12h) (**Fed**). Fasted : n=6 WT et 12 KO. Fed : n=4 WT et 6 KO. Barres d'erreur : SEM.

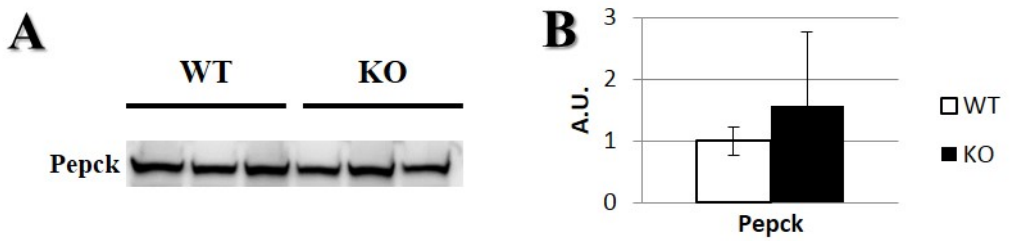


FIGURE 2.14 – Expression rénale de Pepck dans le modèle LKBKO^{livad}. *Western blot* (**A**) et RT-PCR quantitative (**B**) sur tissu rénal de souris sacrifiées 15 jours après injection de tamoxifène et après un jeûne de 16h. n=5 WT et 10 KO. Barres d'erreur : écarts-types.

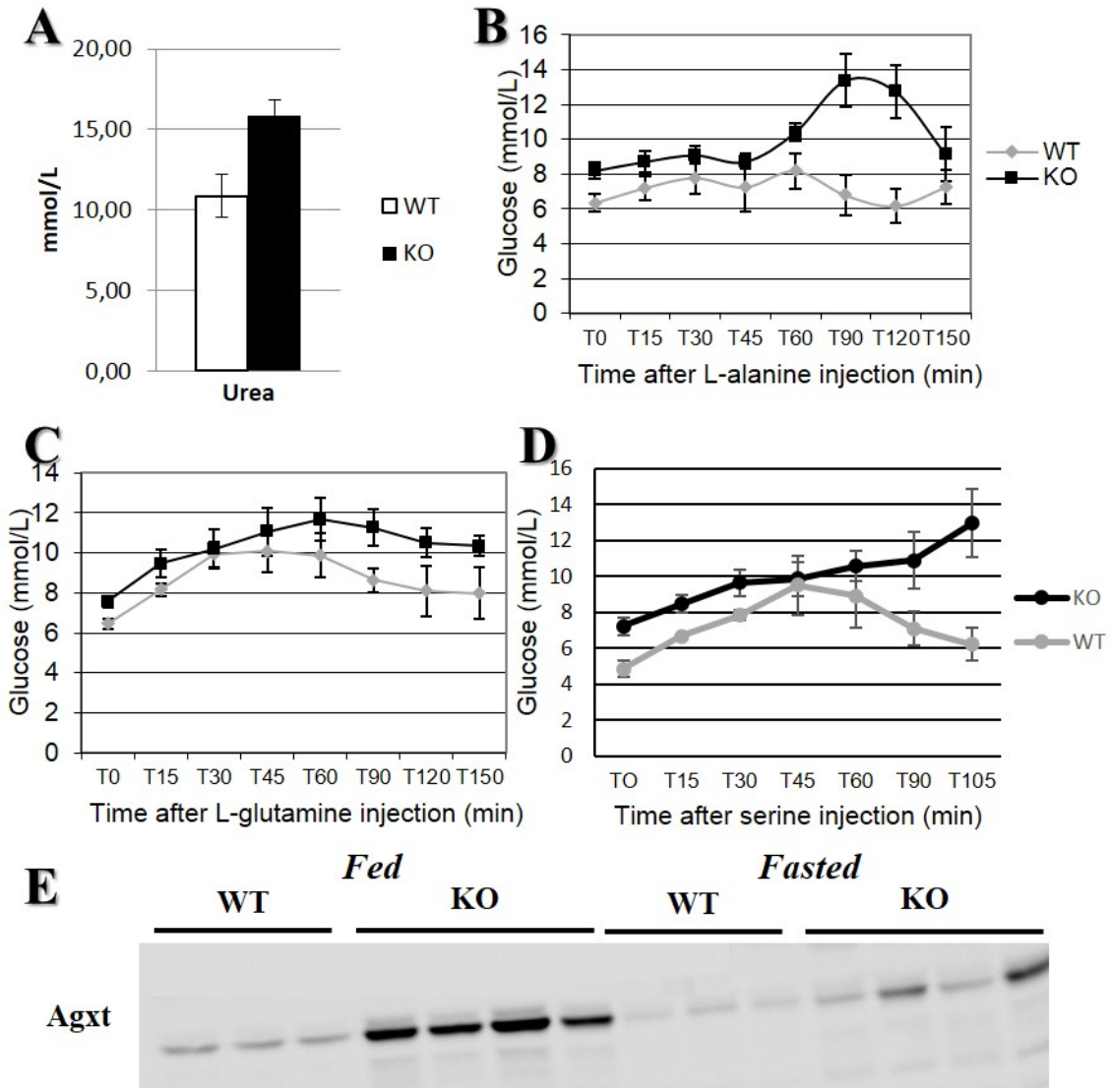


FIGURE 2.15 – Néoglucogenèse à partir d'acides aminés chez les animaux LKBKO^{livad}. Résultats obtenus 15 jours après injections de tamoxifène. **A** : Urémie à l'état nourri. n=4 WT et 6 KO. **B-D** : Tests de tolérance à la L-alanine (B), à la L-glutamine (C) et à la serine (D). Mesure de la glycémie capillaire aux temps indiqués après injections intrapéritonéales de 2 g/kg de L-alanine, L-glutamine et de serine après un jeûne de 16h. n=4 WT et 5 KO pour chacun de ces tests. Barres d'erreur : SEM. **E** : Expression hépatique d'Agxt par *Western blot* à jeun et à l'état nourri.

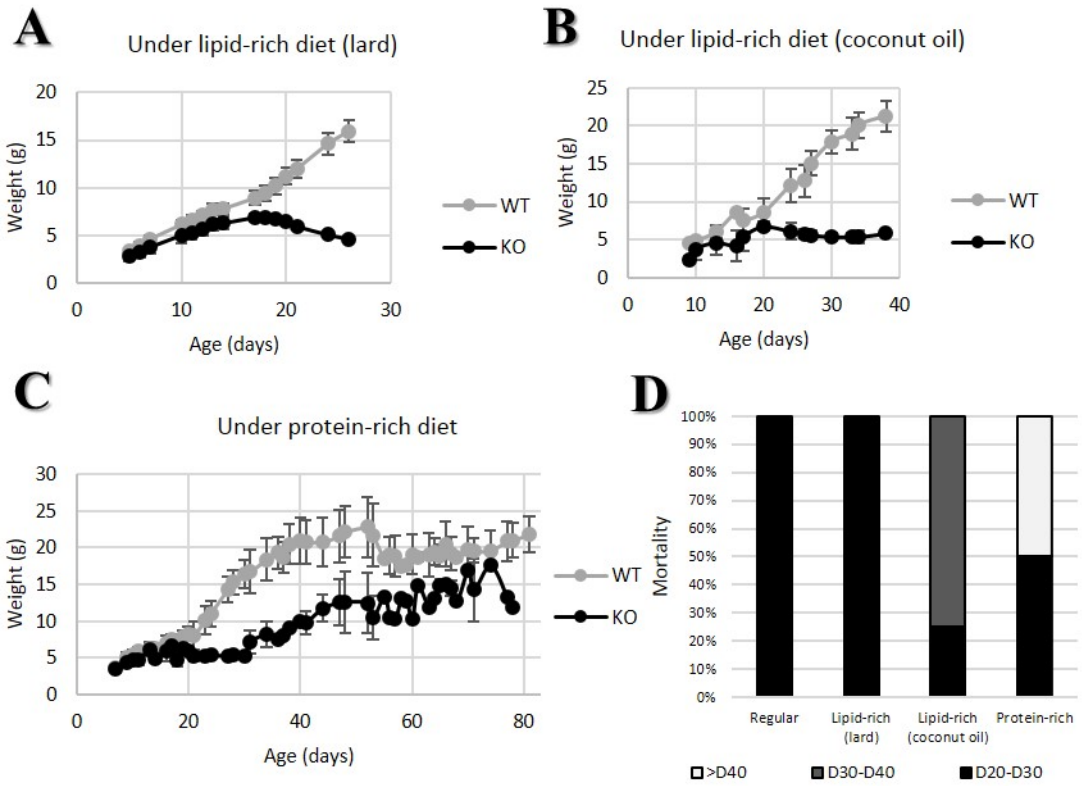


FIGURE 2.16 – Prise pondérale et survie dans le modèle LKBKO^{livemb} sous différents régimes alimentaires. **A** : Courbe pondérale sous régime riche en lipides (Régime constitué de 60%$kCal$ de lipides sous la forme de saindoux, apport glucidique constitué d'amidon.). Les lipides de ce régime sont essentiellement des acides gras saturés ou mono-insaturés à chaînes longues. n=7 WT et 3 KO. **B** : Courbe pondérale sous régime riche en lipides (Régime constitué de 60%$kCal$ de lipides sous la forme d'huile de noix de coco, ssniff© Ref. 15116.). Les lipides de ce régime sont essentiellement des acides gras saturés à chaînes moyennes. n=13WT et 4 KO. **C** : Courbe pondérale sous régime riche en protides (Régime constitué de 60%$kCal$ de protides, ssniff© Ref. 15209.). n=19 WT et 8 KO. **D** : Âge au décès sous ces différents régimes. Barres d'erreur : écarts-types.

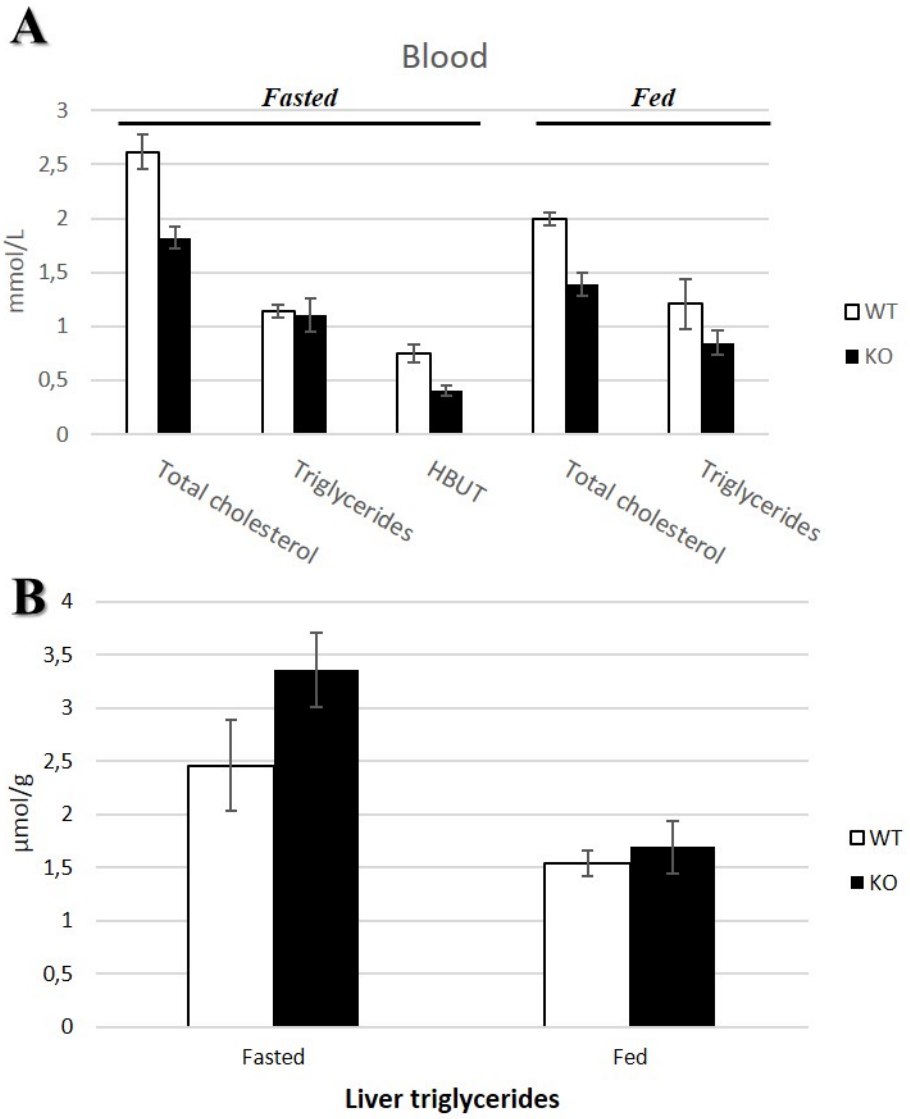


FIGURE 2.17 – Dosages en triglycérides sériques et hépatiques, en cholestérol total sérique et en β-hydroxbutyrate sérique dans le modèle LKBKO^{livad}. Paramètres mesurés 15 jours après injections de tamoxifène et après 16h de jeûne (**fasted**) ou à l'état nourri (3h après l'extinction de la lumière au cours d'un cycle nycthéméral contrôlé 12h-12h)(**fed**). **A** : Dosages sériques en triglycérides, cholestérol total et β-hydroxybutyrate (HBUT). n=6 WT et 12 KO à jeun et n=4 WT et 6 KO à l'état nourri. **B** : Contenu hépatique en triglycérides après chromatographie. n=5 WT et 9 KO à jeun et n=4 WT et 4 KO à l'état nourri. Méthodes : [394]. Barres d'erreur : SEM.

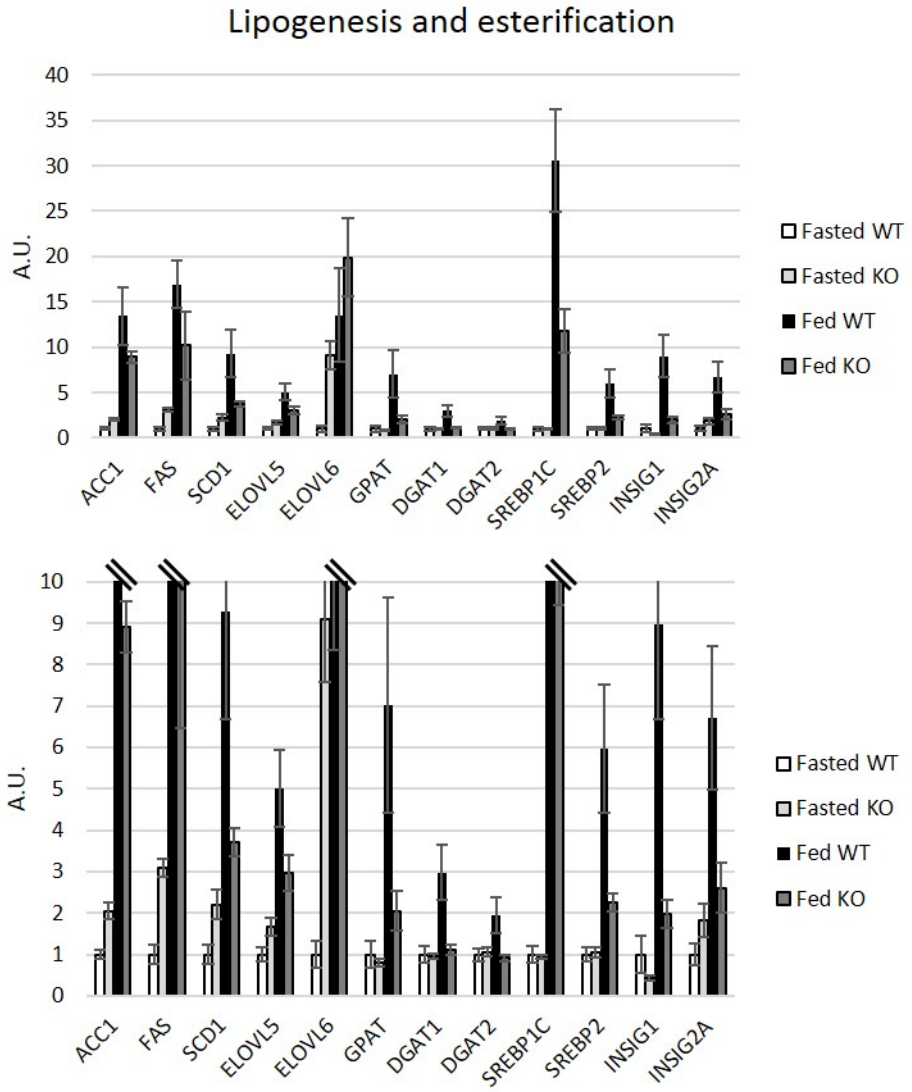


FIGURE 2.18 – Expression des gènes impliqués dans la lipogenèse et l'estérification dans le modèle LKBKO^{livad}. RT-PCR quantitative sur tissu hépatique de souris sacrifiées 15 jours après injection de tamoxifène et après un jeûne de 16h (**Fasted**) ou à l'état nourri (3h après l'extinction de la lumière au cours d'un cycle nycthéméral contrôlé 12h-12h) (**Fed**). Fasted : n=6 WT et 12 KO. Fed : n=4 WT et 6 KO. Barres d'erreur : SEM.

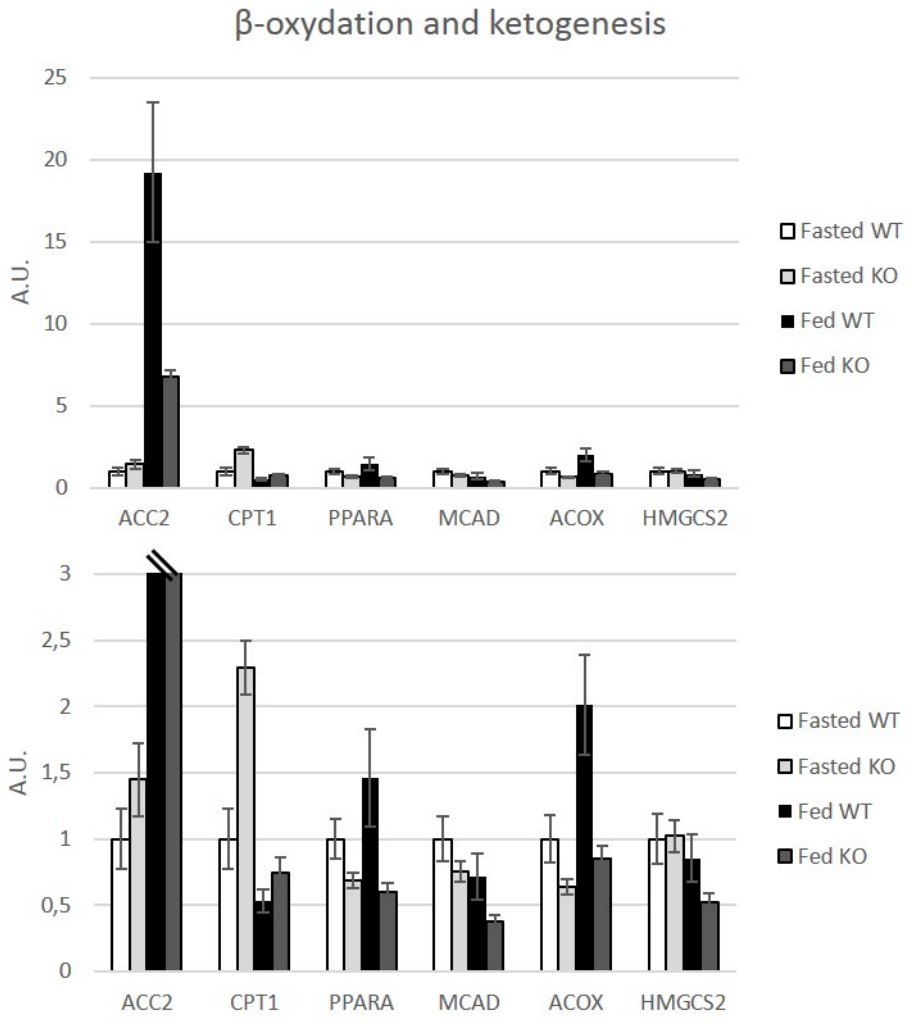


FIGURE 2.19 – Expression des gènes impliqués dans la β-oxydation des acides gras et la cétogenèse dans le modèle LKBKO^{livad}. RT-PCR quantitative sur tissu hépatique de souris sacrifiées 15 jours après injection de tamoxifène et après un jeûne de 16h (**Fasted**) ou à l'état nourri (3h après l'extinction de la lumière au cours d'un cycle nycthéméral contrôlé 12h-12h) (**Fed**). Fasted : n=6 WT et 12 KO. Fed : n=4 WT et 6 KO. Barres d'erreur : SEM.

2.3 Discussion.

Nos résultats permettent d'établir le rôle métabolique de LKB1 dans le foie avec des fonctions inhibitrices sur la glycogénogenèse (*via* l'axe AKT/GSK3β), sur la néoglucogenèse (probablement *via* HDAC/FOXO) et sur la lipogenèse. De façon surprenante, ces aspects ne semblaient pas passer par l'inactivation de l'Ampk, car l'état de phosphorylation de ses cibles n'était pas ou peu modifié chez les animaux KO. Ceci est en accord avec le phénotype métabolique modeste observé après invalidation de l'activité Ampk dans le foie murin [302, 303].

Nos résultats indiquent aussi que LKB1 au niveau du foie pourrait contrôler la masse musculaire de l'organisme en inhibant la néoglucogenèse à partir d'acides aminés. Le lien moléculaire entre le parenchyme hépatique et le tissu musculaire n'est pas encore identifié dans notre étude. Cependant, dans nos analyses transcriptomiques (modèles LKBKO^{livad} et LKBKO^{livemb}), *Fst* est apparu comme un candidat intéressant. Ce gène code la follistatine, un membre de la super-famille du TGFβ, et qui est considérée comme une hépatokine capable d'inhiber la myostatine au niveau musculaire [395, 396].

LKB1 est aussi apparu comme crucial au cours de deux grands types de transition énergétique :

— la transition allaitement sevrage, dans lequel LKB1 hépatique est requis pour la poursuite de la croissance corporelle.

— la transition jeûne/renutrition dans le foie adulte. En effet, les expériences de cages métaboliques, les souris *KO* présentaient une augmentation du ratio d'échanges respiratoires $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$ (RER) qui était essentiellement significative à la fin du jeûne physiologique et au début de la ré-alimentation. Nos différentes données ont également montré un rôle différentiel de Lkb1 dans le métabolisme lipidique entre les animaux à jeun et nourris.

Pour vérifier cette notion, nous avons étudié l'expression de Lkb1 dans le foie de souris normales au cours d'un cycle alimentaire physiologique, d'un jeûne prolongé, et au cours d'une renutrition glucosée. De façon intéressante, l'expression protéique de Lkb1 augmentait à la fin du jeûne et au début de la renutrition. Cependant, aucune corrélation directe ne pouvait être faite entre son expression protéique et son expression transcriptionnelle. Concernant notre candidat Agxt, son expression transcriptionnelle n'était pas stable au cours du cycle nycthéméral ; elle n'était pas non plus superposable à celle de la Pepck. De façon intéressante, son expression transcriptionnelle était la plus importante à la fin de la période de la prise alimentaire et au début du jeûne physiologique, moments lors desquels l'expression protéique de Lkb1 était la plus basse (Figure 2.20 page suivante). Cette observation reste à creuser et s'intègrerait dans une régulation fine du métabolisme lors d'étapes nutritionnelles cruciales.

Une autre question qui n'est pas résolue est celle de la localisation de LKB1

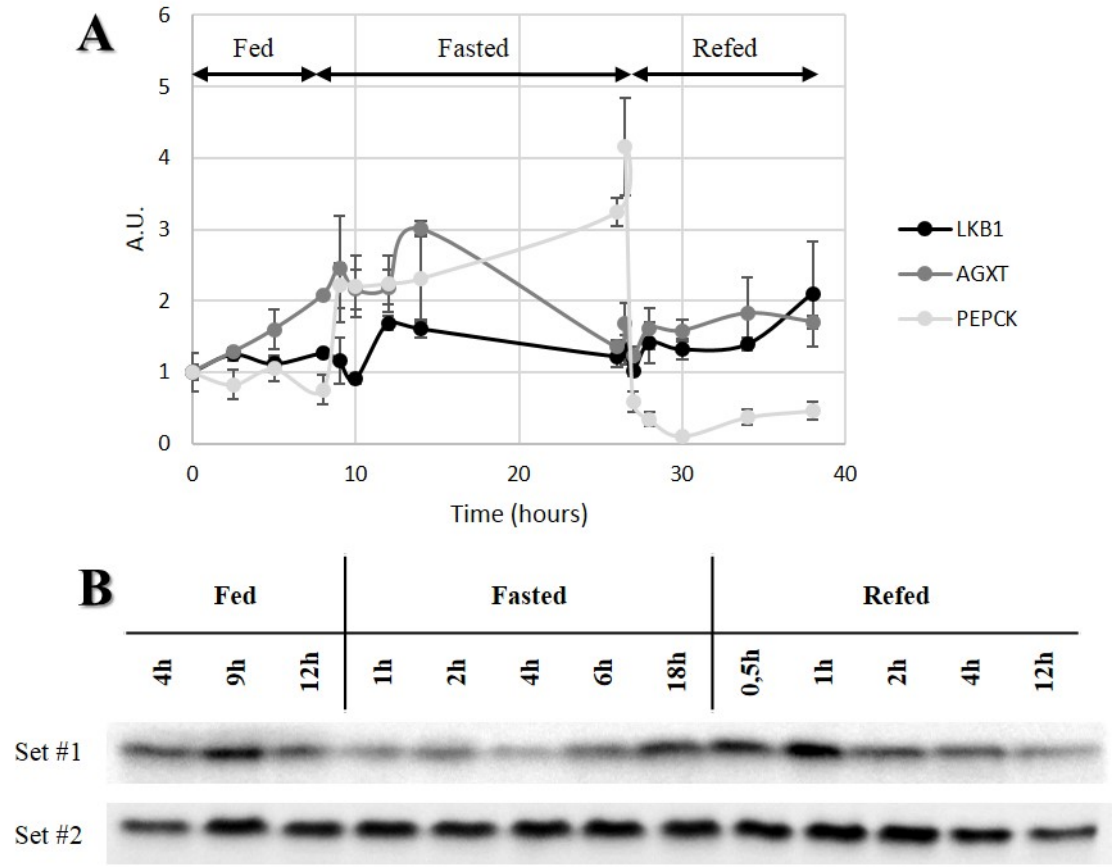


FIGURE 2.20 – Expression transcriptionnelle et protéique de Lkb1 en fonction de l'état nutritionnel. Des souris mâles C57/Black6J ont été sacrifiées à différents temps d'un cycle alimentaire physiologique (cycle nycthéméral contrôlé 12h-12h), au cours d'un jeûne prolongé et au cours d'une phase de ré-alimentation (régime standard + eau glucosée 20%). **A** : Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression transcriptionnelle de *Lkb1*, *Agxt* et *Pck1* (*Pepck*). n=5 par groupe. Barres d'erreur : SEM. **B** : Analyse par *Western blot* de l'expression protéique de Lkb1. Deux séries sont présentées.

au sein du lobule hépatique. Les outils immunohistochimiques disponibles actuellement ne sont malheureusement pas convaincants. Une localisation non diffuse de LKB1 dans le lobule avec une restriction périportale ou péricentrolobulaire serait une observation intéressante. L'intégrant à la notion du zonage métabolique lobulaire et au contrôle négatif de la signalisation AKT par LKB1, le zonage lobulaire de LKB1 pourrait apporter des clés pour la compréhension de l'organisation du métabolisme au sein du lobule et pourquoi pas pour expliquer le paradoxe de l'insulinorésistance hépatique. En ce sens, le marquage histochimique *in situ* de l'activité des complexes II (succinate deshydrogénase) et IV (cytochrome-c oxydase) de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le foie des animaux LKBKO^{livad} montrait

un « rezonage » de ces deux activités métaboliques, avec, pour les souris KO, le passage d'un marquage périportal de la l'activité succinate deshydrogénase à un marquage plus diffus dans le lobule, et le passage d'un marquage plutôt diffus de l'activité cytochrome-c oxydase à un marquage restreint au territoire périportal (figure 2.21).

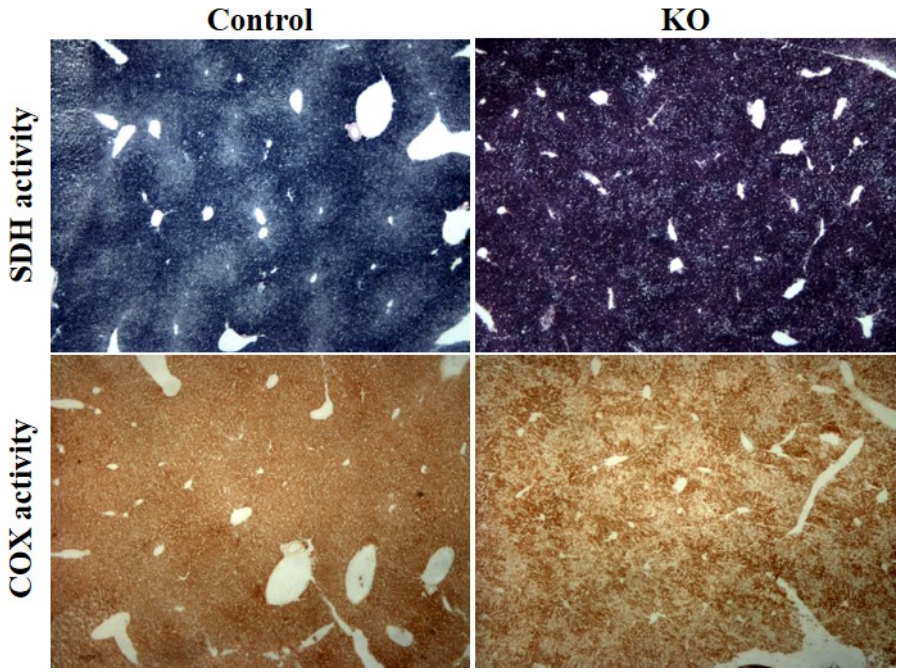


FIGURE 2.21 – Activité *in situ* des complexes II (succinate deshydrogénase) et IV (cytochrome-c oxydase) de la chaîne respiratoire dans le foie des animaux LKBKO^{livad}. Les animaux ont été sacrifiés 15 jours après injections de tamoxifène après un jeûne de 16h. Méthodes : [397].

Chapitre 3

Identification d'une nouvelle isoforme de LKB1 aux rôles singuliers.

3.1 Introduction

Dans la première partie des résultats, a été présentée une expérience utilisant des ARN interférants dirigés contre *CTNNB1* dans la lignée hépatomateuse humaine HuH6. L'analyse par *western blot* de l'expression protéique de LKB1 (clone d'anticorps *Ley37D/G6*) dans ce modèle a montré que l'invalidation de β-caténine s'accompagnait d'une diminution de l'expression de l'isoforme conventionnelle de LKB1, appelée FL-LKB1 et migrant vers 52 kDa. Une bande supplémentaire, migrant vers 42 kDa a été cependant détectée ; cette bande voyait son intensité augmenter avec l'invalidation de β-caténine (figure 3.1 page suivante).

Cette troisième partie du travail a visé à définir si cette bande supplémentaire correspondait à une isoforme protéique de LKB1 et a en définir l'activité biologique potentielle selon les trois grandes fonctions classiques de LKB1 : métabolisme, polarité et croissance/prolifération.

Nous avons tout d'abord montré que cette bande migrant vers 42 kDa correspondait effectivement à une isoforme protéique de LKB1 en utilisant diverses approches d'invalidation du gène *LKB1* qui ont montré la disparition de cette bande en même temps que celle de FL-LKB1.

L'expression tissulaire de la nouvelle isoforme était très particulière, restreinte à certains tissus fortement oxydatifs comme le muscle strié squelettique et le myocarde. Elle n'était pas exprimée dans le foie adulte.

In silico, nous avons pu déterminer que cette isoforme résultait en une protéine LKB1 délétée de ses exons I et II, qui codent le domaine N-terminal de la protéine

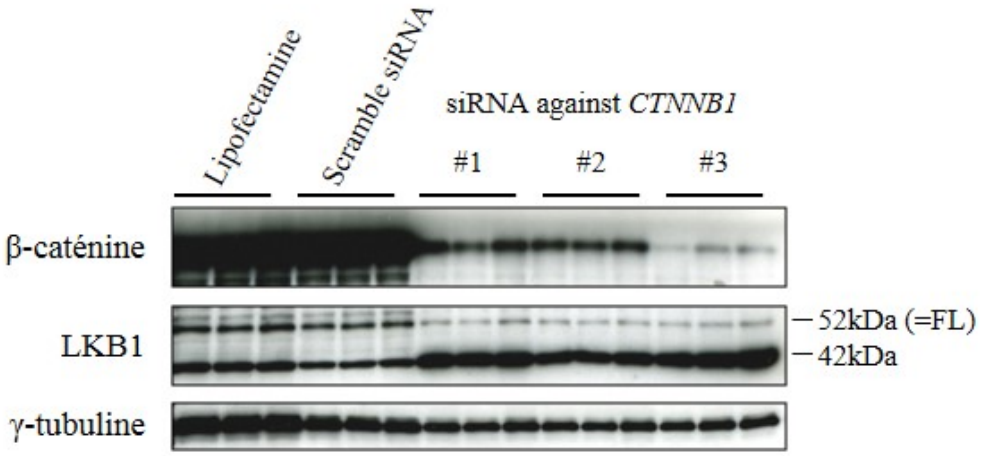


FIGURE 3.1 – Découverte d'une nouvelle isoforme de LKB1. Des cellules hépatomateuses humaines HuH6 (qui présentent une mutation activatrice de *CTNNB1*) ont été traitées avec des ARN interférants dirigés contre *CTNNB1*. *Western blot* montrant la diminution de l'isoforme conventionnelle (FL, 52 kDa) de LKB1 et l'augmentation de l'expression d'une bande plus courte migrant vers 42 kDa (clone Ley37D/G6).

et une partie de son domaine kinase ; cette isoforme a été nommée ΔN-LKB1. Nous avons aussi montré que ΔN-LKB1 résulterait préférentiellement d'une initiation alternative de la traduction à partir d'un codon *AUG* situé au début de l'exon III.

Après l'avoir clonée dans un plasmide d'expression pcDNA3, nous avons montré que l'isoforme ΔN-LKB1 était bien reconnue par des anticorps dirigés contre la partie C-terminale de la protéine et non par ceux dirigés contre la partie N-terminale. De plus, par immunoprécipitation, cette isoforme n'interagissait pas avec les partenaires STRAD et CAB39 (Mo25). Délétée de ses séquences *NLS* situées dans le domaine N-terminal de FL-LKB1, ΔN-LKB1 était constitutivement localisée dans le cytoplasme. Également délétée d'une partie de son domaine kinase, nous avons observé que ΔN-LKB1 était catalytiquement inactive.

Concernant sa caractérisation fonctionnelle, ΔN-LKB1 a montré, de façon surprenante, un rôle de dominant positif sur la phosphorylation (Thr172) et l'activation de l'AMPK par FL-LKB1. Ce rôle résulterait d'une très grande affinité de ΔN-LKB1 pour la sous-unité α de l'AMPK, notamment pour son domaine autoinhibiteur (AID). Conceptuellement, la fixation de ΔN-LKB1 sur le domaine AID de la sous-unité α de l'AMPK résulterait en un changement de conformation de cette dernière, rendant le résidu Thr172 plus accessible à une phosphorylation par FL-LKB1. Nous avons voulu confirmer *in vivo* cette observation originale. Quand exprimée dans le foie murin [1], tissu qui ne l'exprime pas, ΔN-LKB1 induisait une

1. injection d'un adénovirus codant ΔN-LKB1

augmentation de l'activation de l'AMPK qui résultait en une oxydation de l'oléate accrue et en une diminution du contenu hépatocytaire en triglycérides.

Concernant son rôle sur la polarisation épithéliale, nous avons utilisé le modèle cellulaire de Baas et coll. dans lequel l'expression de STRAD est inductible par la doxycycline dans la lignée adénocarcinomateuse colique humaine LS174T [315]. Quand elles sont transfectées avec un plasmide codant FL-LKB1, ces cellules passent, de façon *cell autonomous*, d'un état non polarisé à un état de complète polarisation apicobasale avec formation d'une bordure en brosse. Dans ce modèle, ΔN-LKB1 n'induisait aucune polarisation des cellules et, quand coexprimée avec FL-LKB1, ΔN-LKB1 exerçait une fonction de dominant négatif sur la fonction « polarisante » de FL-LKB1.

Enfin, concernant les fonctions inhibitrices de LKB1 sur la croissance et la prolifération cellulaire, nous avons montré que ΔN-LKB1 seule (*i.e.* en l'absence de FL-LKB1) augmentait le nombre de colonies formées dans des tests de clonogénicité sur plaque et en *soft agar*. Pour confirmer ce rôle inattendu d'inducteur *per se* de ΔN-LKB1, nous avons tiré parti de la lignée carcinomateuse pulmonaire humaine NCI-H460 qui exprime ΔN-LKB1 sans expression de FL-LKB1 (mutation homozygote Q37X de *LKB1*). L'invalidation de ΔN-LKB1 dans cette lignée s'accompagnait d'une diminution de la prolifération cellulaire en culture cellulaire et d'une croissance tumorale très diminuée quand ces cellules étaient xénogreffées chez la souris *nude*.

3.2 Résultats

Ces résultats sont présentés de façon détaillé dans l'article suivant, publié dans *Oncogene* [394].

3.3 Discussion

Cette nouvelle isoforme de LKB1 exerce ainsi des rôles originaux vis-à-vis de l'isoforme conventionnelle FL-LKB1. D'une manière plus générale, elle semble néanmoins avoir un rôle important dans la physiologie de certains tissus à fort potentiel oxydatif comme le myocarde et le muscle strié squelettique. Comme fortement exprimée dans ces deux tissus et comme augmentant l'activité de FL-LKB1 sur l'activation de l'AMPK indépendamment du stress énergétique, ΔN-LKB1, en fonction de son niveau d'expression, pourrait agir comme déterminant du destin glycolytique ou oxydatif des différents types de fibres musculaires. Les données que nous avons obtenues sur différents types de muscles murins nous indiquent cependant que ce soit plutôt le rapport ΔN-LKB1/FL-LKB1 qui serait déterminant

dans ce contexte. Pour aller plus loin, les rôles de dominant négatif de ΔN-LKB1 sur la polarisation apicobasale induite par FL-LKB1 pourrait aussi déterminer l'aspect cytologique particulier des cellules musculaires striées squelettiques qui présentent plusieurs noyaux situés à la périphérie de la cellule [2].

Conceptuellement, ΔN-LKB1 pourrait exercer des fonctions oncogéniques à trois niveaux différents :

- Agissant comme dominant négatif sur la polarité épithéliale, elle pourrait permettre le passage d'un carcinome *in situ* à un carcinome infiltrant, mécanisme impliquant une étape de transition épithélio-mésenchymateuse avec perte de la polarité épithéliale.
- Agissant comme dominant positif sur l'activation de l'AMPK par FL-LKB1, ΔN-LKB1 pourrait favoriser l'adaptation métabolique et la survie de la cellule tumorale face au stress énergétique. Ce type de situation se rencontrerait notamment lors de l'initiation tumorale alors que la néovascularisation du stroma tumoral, pourvoyeuse de substrats énergétiques n'est pas encore mise en place. La présence de ΔN-LKB1 constituerait cependant un frein dans les étapes ultérieures de la progression tumorale car empêchant l'anabolisme selon l'effet Warburg.
- ΔN-LKB1 a aussi montré des effets pro-prolifératifs même quand exprimée en l'absence de FL-LKB1. Ce rôle participerait également à l'expansion tumorale.

De façon intéressante, ces trois propriétés de ΔN-LKB1 semblent refléter les différentes étapes de l'initiation et de la progression tumorale [241, 345]. Cependant, les différents rôles de ΔN-LKB1, soit comme dominant positif sur la régulation métabolique médiée par AMPK, soit comme dominant négatif sur la polarité, impliquent la présence de FL-LKB1 pour être effectifs. Les rôles de ΔN-LKB1 sur la prolifération et la croissance cellulaires semblent néanmoins être intrinsèques à cette isoforme, s'exerçant en l'absence de FL-LKB1. Ainsi, le ratio ΔN-LKB1/FL-LKB1 constituerait la meilleure approche pour appréhender les rôles de ΔN-LKB1 dans l'oncogenèse.

Un excellent modèle d'étude serait les adénocarcinomes pulmonaires dans lesquels les mutations de *LKB1* sont assez fréquentes et dont nombre sont prédites comme potentiellement à l'origine de ΔN-LKB1 [337, 347–351]. Ceci serait à mettre en perspective avec la présence ou non de FL-LKB1 et avec le stade et le grade tumoral.

Cependant, « pour revenir à nos moutons » [398], ΔN-LKB1 n'est pas exprimée dans le foie adulte ni dans les CHC (voir la première partie des résultats). Faut-il pour autant complètement oublier ΔN-LKB1 dans le contexte du foie ? Nous n'en sommes pas totalement convaincus car des *western blots* analysant l'expression

2. un type de polarité donc bien différent de la polarité épithéliale simple.

de Lkb1 dans le foie embryonnaire à e17.5 ont montré la présence de ΔN-LKB1 (ainsi que d'autres potentielles isoformes de taille moindre)(figure 3.2). ΔN-LKB1 aurait donc éventuellement un rôle au cours de l'organogenèse hépatique et aussi, pourquoi pas, dans l'oncogenèse des hépatoblastomes .

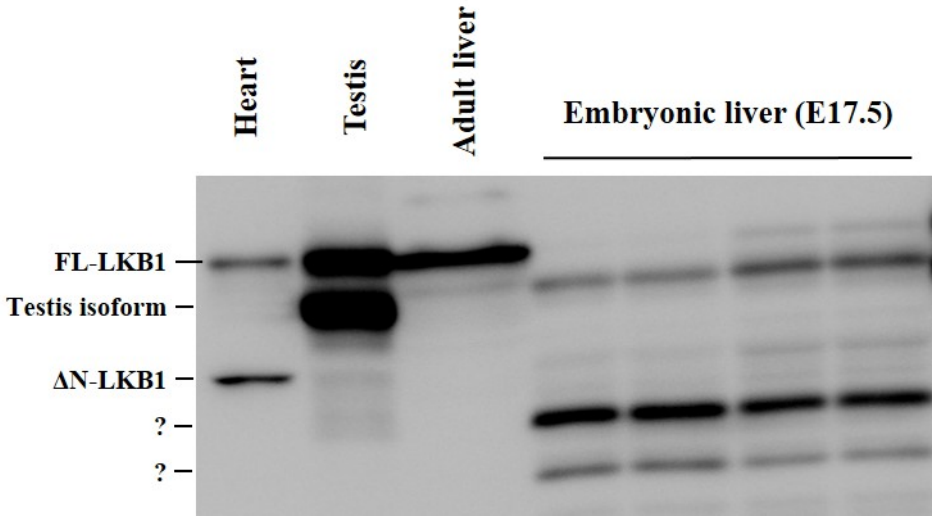


FIGURE 3.2 – D'autres nouvelles isoformes de LKB1 ? *Western blot* utilisant un anticorps anti-LKB1 (clone Ley37D/G6) sur lysats de foie murin embryonnaire (E17.5). Des lysats de foie adulte, de cœur et de testicule murins ont été comigrés comme témoins de taille des isoformes conventionnelle (FL), testiculaire et ΔN de LKB1.

Troisième partie

Conclusion

L'ensemble de nos données indique l'existence d'un réel dialogue coopératif entre LKB1 et β-caténine dans le foie normal et tumoral. Dans les CHC mutés *CTNNB1*, nous avons en effet montré que les mutations oncogéniques de *CTNNB1* s'accompagnaient d'une expression accrue de LKB1 qui en retour était nécessaire à l'expression complète du programme transcriptionnel de β-caténine et à la survie des hépatocytes tumoraux et des hépatoblastes présentant une activation constitutive du signal β-caténine.

Nous avons aussi participé à la compréhension des rôles métaboliques joués par LKB1 dans le foie adulte. Nous avons confirmé que l'invalidation hépatique de *LKB1* induisait une néoglucogenèse et une lipogenèse accrue [128, 303]. Cependant, de façon nouvelle, nous avons pu déterminer que cette néoglucogenèse semblait être préférentiellement alimentée par des acides aminés glucoformateurs et qu'elle se produisait malgré l'activation aberrante de la signalisation AKT. Si la phosphorylation de l'AMPK était diminuée, celle de ses cibles ne l'était pas, indiquant que les voies moléculaires impliquées étaient probablement autres [302, 303]. Même si nous ne l'avons pas encore montré, LKB1 pourrait notamment contrôler l'activité de FOXO en régulant son état d'acétylation par les histones déacétylases [296]. Enfin, une donnée inattendue a été celle de la modification de la composition corporelle et du métabolisme énergétique global suite à l'invalidation *hépatospécifique* de LKB1. Une hépatokine, peut-être la follistatine [395, 396], pourrait être impliquée dans ce dialogue entre le foie et les organes périphériques, orchestrant, à l'échelle de l'organisme entier, le métabolisme énergétique global, le choix des substrats énergétiques et l'utilisation raisonnée des réserves énergétiques de l'organisme.

Bien sûr, ces données dépassent le cadre du CHC mais ont permis de montrer que les rôles de LKB1 ne sont pas forcément tous joués de façon *cell autonomous* et pourraient impliquer un dialogue intercellulaire si ce n'est interorgane. En ce sens, le dialogue TGBβ médié par LKB1 entre les cellules du chorion et les cellules épithéliales pour induire la formation de polypes de Peutz-Jeghers [237] ont valu à LKB1 d'être qualifié de gène suppresseur de tumeur de type *landscaper* [354].

Selon notre perception et nos résultats, LKB1 dans le carcinome hépatocellulaire ne se comporterait pas comme un gène suppresseur de tumeur ; au contraire, il serait nécessaire pour que la β-caténine puisse exercer ses fonctions oncogéniques. Cependant, nous avons observé que, dans le foie, les fonctions de LKB1 et la nature de son dialogue avec β-caténine dépendaient de deux facteurs primordiaux que sont :

— le contexte nutritionnel et

— le stade de développement (hépatoblaste *versus* hépatocyte mature).

Concernant ce premier point, cette donnée est tout particulièrement intéres-

sante car elle suggère que LKB1 dans les CHC mutés *CTNNB1* pourrait moduler le programme transcriptionnel oncogénique de β-caténine pour le coupler aux conditions métaboliques locales, notamment à la biodisponibilité des substrats énergétiques et bioformateurs. Nous avons vu dans la section 3.3.5 page 111 que, dans certaines situations, LKB1 pouvait se comporter comme un véritable oncogène en favorisant la survie des cellules tumorales en conditions de stress énergétique [362, 363]. De plus, les données récentes liant LKB1, l'AMPK et l'Axine au complexe Ragulator du lysosome (voir section 3.2.5 page 95) [281, 282] indiquent que LKB1 est directement impliqué dans l'orchestration du *switch* entre catabolisme et anabolisme en fonction des ressources énergétiques cellulaires, notamment en acides aminés. Ainsi, LKB1 pourrait freiner un certain programme transcriptionnel de β-caténine en conditions énergétiques défavorables, favorisant la survie des cellules hépatocarcinomateuses ; à l'inverse, il pourrait aussi l'activer en conditions énergétiques favorables, favorisant anabolisme et croissance tumorale.

Les liens entre métabolisme et cancer [345] sont de plus en plus étudiés dans la littérature ; cependant l'angle d'approche est généralement celui de la modification par la cellule tumorale de la machinerie énergétique intracellulaire pour favoriser l'effet Warburg [364]. Le rôle de LKB1 dans la cellule cancéreuse serait plutôt inverse, en permettant d'adapter l'activité des oncogènes au contexte nutritionnel. En ce sens, il est connu depuis longtemps que les conditions nutritionnelles, notamment la restriction calorique, sont capables de moduler l'expression de certains oncogènes [399].

Concernant le second point, dans nos modèles murins, Lkb1 est en effet apparu comme jouant des rôles différentiels dans l'hépatoblaste et l'hépatocyte mature, en particulier en ce qui concerne le contrôle de la signalisation β-caténine. La transposition de cette donnée au cancer du foie invite à analyser deux situations particulières : celle du CHC, présumé dériver de l'hépatocyte mature [3] et celle de l'hépatoblastome, présumé dériver de l'hépatoblaste. L'implication de la voie Wnt/β-caténine est fréquente mais très différente dans ces deux cas, notamment en ce qui concerne l'expression de deux gènes cibles : *GLUL* [4] et *MYC* [5]. Dans le CHC, les mutations activatrices de *CTNNB1* sont à l'origine d'un programme transcriptionnel hépatique de β-caténine quasi complet [30, 39], de type hépatocyte mature [6], et d'un aspect morphologique bien différencié [2]. Au contraire, dans l'hépatoblastome, les mutations gain-de-fonction de *CTNNB1* sont très fréquentes mais sont à l'origine de deux groupes distincts de tumeurs : l'un de bon pronostic, avec expression membranaire de β-caténine et cytoplasmique de GLUL, l'autre

3. tout du moins pour les CHC bien différenciés sans signature de type « progéniteur ».

4. glutamine synthase, gène cible canonique de β-caténine dans l'hépatocyte mature

5. gène dont la régulation est complexe, mais qui n'est pas considéré comme un gène cible de β-caténine dans le foie normal contrairement à d'autres tissus.

6. notamment avec expression de *GLUL* (glutamine synthase) et sans expression de *MYC*

de moins pronostic avec expression nucléaire de β-caténine, induction de *MYC* et sans expression de GLUL [174]. Si le premier groupe était vu comme dérivant d'hépatoblastes avancés dans leur maturation en hépatocyte, le second l'était comme dérivant d'hépatoblastes beaucoup moins avancés dans leur différenciation [174]. Les CHC peu différenciés avec signature de type « progéniteur » et les tumeurs hybrides hépatocholangiocarcinomateuses, peuvent présenter une signature Wnt avec expression de *MYC*, sans mutation de *CTNNB1* ni d'expression de GLUL [117, 156, 179, 180]. Ils peuvent donc conceptuellement être rapprochés du groupe des hépatoblastomes de mauvais pronostic et dériveraient de cellules progénitrices hépatiques ou d'un hépatocyte reprogrammé en cellule progénitrice. Comme nous avons observé dans nos modèles murins que Lkb1 contrôlait positivement l'expression de Glul par β-caténine dans l'hépatoblaste et non dans l'hépatocyte mature, il serait intéressant de pouvoir observer des rôles différentiels de LKB1 dans ces différentes catégories de tumeurs. Il serait également intéressant de constater que l'expression de LKB1 soit conservée ou induite dans les hépatoblastomes de type progéniteur tardif et perdue dans les hépatoblastomes de type progéniteur précoce et dans les carcinomes hépatocellulaires de type progéniteur. Dans le même sens, l'analyse du niveau d'expression transcriptionnelle et protéique de *Myc* dans nos différents modèles murins permettrait de savoir comment LKB1 contrôle (ou pas) l'expression hépatique de MYC en fonction du stade de développement.

Par ailleurs, il est tout à fait probable que d'autres voies moléculaires soient également impliquées. Nous avons par exemple discerné un potentiel dialogue entre Lkb1 et la voie Notch dans le foie embryonnaire, avec un programme transcriptionnel apparenté dans l'hépatocyte et un phénotype similaire sur la tubulogenèse biliaire. Là encore, le stade développemental joue un rôle majeur. En effet, comme nous l'avons vu dans la section 2.3.3 page 65, Notch est apparu comme jouant un rôle suppresseur de tumeurs dans le CHC et, *a contrario*, un rôle oncogénique dans les CHC de type progéniteur et dans les tumeurs hybrides hépatocholangiocarcinomateuses. De plus, Notch joue des rôles importants dans le foie adulte pour la régulation du métabolisme glucidolipidique, favorisant la néoglucogenèse et la lipogenèse [145, 146]. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de l'interaction entre la voie Notch d'une part et LKB1 et la voie Wnt/β-caténine d'autre part dans nos différents modèles murins et de l'aborder dans différentes catégories de CHC. Les rôles métaboliques de la voie Notch et son rôle de suppresseur de tumeurs dans le CHC bien différencié seraient en effet compatibles avec le phénotype et le comportement clinique des CHC mutés *CTNNB1*.

Enfin, une dernière voie semble tout particulièrement intéressante car située au carrefour de ces différentes problématiques (voir section 2.3.3 page 66). Il s'agit de la voie Hippo/YAP. D'une part, l'activation de YAP est oncogénique dans le foie embryonnaire, induisant la formation de cholangiocarcinomes et des tumeurs

hybrides hépatocholangiocarcinomateuses. De plus, YAP promeut, dans le foie adulte, une sortie de quiescence de l'hépatocyte et sa reprogrammation vers un phénotype progéniteur, mécanisme impliquant la voie Notch [158]. Fréquemment activé dans les CHC peu différenciés et de type progéniteur, YAP serait donc à l'origine d'un mode d'hépatocarcinogenèse dans le foie adulte passant par une dédifférenciation de l'hépatocyte mature en une cellule progénitrice. De plus, il existe un dialogue réciproque entre les voie Hippo et Wnt/β-caténine, notamment dans le foie [158, 168]. Enfin, YAP dialogue également avec la voie métabolique AKT/mTOR, avec des interactions réciproquement activatrices. Une étude récente montre de plus que le stress énergétique, *via* l'AMPK, induit une inactivation de YAP et de ses propriétés transformantes [400]. Ainsi, selon notre modèle d'étude, LKB1 pourrait intervenir dans la régulation de YAP, pour inhiber ses activités de dédifférenciation hépatocytaire dans les CHC mutés CTNNB1. Nous initions actuellement l'étude de cette hypothèse sur nos différents modèles murins.

Bibliographie

1. Audard V. Le carcinome hépatocellulaire muté pour le gène de la ß-caténine : une unité morphologique à part. Thèse de doct. Université Paris Sud, 2010.
2. Audard V, Grimber G, Elie C et al. Cholestasis is a marker for hepatocellular carcinomas displaying beta-catenin mutations. J. Pathol. 2007 ;212 :345–352.
3. MacSween R, Burt A, Portmann B.C. ans Ishak K, Scheuer P et Anthony P. Pathology of the liver. 4e éd. Londres : Churchill Livingstone et Harcourt Publishers, 2002. 982 p.
4. Martin E et Feldmann G. Histopathologie du foie et des voies biliaires. Paris : Masson, 1982. 358 p.
5. Kiernan F. The anatomy and physiology of the liver. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 1833 ;123 :711–770.
6. Rappaport AM. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. Beitr Pathol 1976 ;157 :215–243.
7. Lamers WH, Hilberts A, Furt E et al. Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. Hepatology 1989 ;10 :72–76.
8. Matsumoto T et Kawakami M. The unit-concept of hepatic parenchyma–a re-examination based on angioarchitectural studies. Acta Pathol. Jpn. 1982 ;32 Suppl 2 :285–314.
9. Sasse D, Katz N et Jungermann K. Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes. FEBS Lett. 1975 ;57 :83–88.
10. Sasse D. Dynamics of liver glycogen: the topochemistry of glycogen synthesis, glycogen content and glycogenolysis under the experimental conditions of glycogen accumulation and depletion. Histochemistry 1975 ;45 :237–254.
11. Torre C, Perret C et Colnot S. Molecular determinants of liver zonation. Prog Mol Biol Transl Sci 2010 ;97 :127–150.
12. Colnot S et Perret C. Liver zonation. In : *Molecular pathology of liver diseases*. Sous la dir. de Monga SPS. Springer science, 2011 :7–16.

13. Jungermann K et Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu. Rev. Nutr. 1996 ;16 :179–203.

14. Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH et Groen AK. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. Biochimie 2014 ;96 :121–129.

15. Kaestner KH. In the zone: how a hepatocyte knows where it is. Gastroenterology 2009 ;137 :425–427.

16. Haussinger D, Lamers WH et Moorman AF. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. Enzyme 1992 ;46 :72–93.

17. Lindros KO. Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver. Gen. Pharmacol. 1997 ;28 :191–196.

18. Wang J, Olin M, Rozell B et al. Differential hepatocellular zonation pattern of cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a1) and sterol 12alpha-hydroxylase (Cyp8b1) in the mouse. Histochem. Cell Biol. 2007 ;127 :253–261.

19. Brosnan ME et Brosnan JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. Am. J. Clin. Nutr. 2009 ;90 :857S–861S.

20. Katz N, Teutsch HF, Jungermann K et Sasse D. Perinatal development of the metabolic zonation of hamster liver parenchyma. FEBS Lett. 1976 ;69 :23–26.

21. Zajicek G, Oren R et Weinreb M. The streaming liver. Liver 1985 ;5 :293–300.

22. Malato Y, Naqvi S, Schurmann N et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. J. Clin. Invest. 2011 ;121 :4850–4860.

23. Michalopoulos GK. Phenotypic fidelity (or not?) of epithelial cells in the liver. Hepatology 2012 ;55 :2024–2027.

24. Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. Nat. Genet. 2011 ;43 :34–41.

25. Bralet MP, Branchereau S, Brechot C et Ferry N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. Am. J. Pathol. 1994 ;144 :896–905.

26. Jungermann K et Thurman RG. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. Enzyme 1992 ;46 :33–58.

27. Quistorff B, Katz N et Witters LA. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of fatty acids: discrepancies on zonation of acetyl-CoA carboxylase. Enzyme 1992 ;46 :59–71.

28. Gebhardt R et Mecke D. Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. EMBO J. 1983 ;2 :567–570.

29. Braeuning A, Ittrich C, Kohle C et al. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. FEBS J. 2006 ;273 :5051–5061.

30. Cadoret A, Ovejero C, Terris B et al. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. Oncogene 2002 ;21 :8293–8301.

31. Fagotto F. Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of beta-catenin. EMBO Rep. 2013 ;14 :422–433.

32. Kim W, Kim M et Jho EH. Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. Biochem. J. 2013 ;450 :9–21.

33. Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X et al. The way Wnt works: components and mechanism. Growth Factors 2013 ;31 :1–31.

34. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell 2006 ;127 :469–480.

35. Ring A, Kim YM et Kahn M. Wnt/Catenin Signaling in Adult Stem Cell Physiology and Disease. Stem Cell Rev 2014.

36. Serio RN. Wnt of the Two Horizons: Putting Stem Cell Self-Renewal and Cell Fate Determination into Context. Stem Cells Dev. 2014.

37. Van Camp JK, Beckers S, Zegers D et Van Hul W. Wnt signaling and the control of human stem cell fate. Stem Cell Rev 2014 ;10 :207–229.

38. Dahmani R, Just PA et Perret C. The Wnt/beta-catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2011 ;35 :709–713.

39. Cavard C, Colnot S, Audard V et al. Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. Future Oncol 2008 ;4 :647–660.

40. Zeng G, Awan F, Otruba W et al. Wnt'er in liver: expression of Wnt and frizzled genes in mouse. Hepatology 2007 ;45 :195–204.

41. Benhamouche S, Decaens T, Godard C et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. Dev. Cell 2006 ;10 :759–770.

42. Moriyama A, Kii I, Sunabori T et al. GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. Genesis 2007 ;45 :90–100.

43. Sekine S, Lan BY, Bedolli M, Feng S et Hebrok M. Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. Hepatology 2006 ;43 :817–825.

44. Braeuning A, Ittrich C, Kohle C, Buchmann A et Schwarz M. Zonal gene expression in mouse liver resembles expression patterns of Ha-ras and beta-catenin mutated hepatomas. Drug Metab. Dispos. 2007 ;35 :503–507.

45. Braeuning A, Menzel M, Kleinschnitz EM et al. Serum components and activated Ha-ras antagonize expression of perivenous marker genes stimulated by beta-catenin signaling in mouse hepatocytes. FEBS J. 2007 ;274 :4766–4777.

46. Stanulovic VS, Kyrmizi I, Kruithof-de Julio M et al. Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. Hepatology 2007 ;45 :433–444.

47. Colletti M, Cicchini C, Conigliaro A et al. Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. Gastroenterology 2009 ;137 :660–672.

48. Gougelet A, Torre C, Veber P et al. T-cell factor 4 and beta-catenin chromatin occupancies pattern zonal liver metabolism in mice. Hepatology 2014 ;59 :2344–2357.

49. Si-Tayeb K, Lemaigre FP et Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. Dev. Cell 2010 ;18 :175–189.

50. Antoniou A, Raynaud P, Cordi S et al. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. Gastroenterology 2009 ;136 :2325–2333.

51. Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N et al. Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. Genes Dev. 2005 ;19 :1849–1854.

52. Hartley JL, Gissen P et Kelly DA. Alagille syndrome and other hereditary causes of cholestasis. Clin Liver Dis 2013 ;17 :279–300.

53. Hori K, Sen A et Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. J. Cell. Sci. 2013 ;126 :2135–2140.

54. Lemaigre FP. Notch signaling in bile duct development: new insights raise new questions. Hepatology 2008 ;48 :358–360.

55. Zong Y, Panikkar A, Xu J et al. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. Development 2009 ;136 :1727–1739.

56. Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K et Chiba T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. Gastroenterology 2004 ;127 :1775–1786.

57. Hofmann JJ, Zovein AC, Koh H, Radtke F, Weinmaster G et Iruela-Arispe ML. Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development: insights into Alagille syndrome. Development 2010 ;137 :4061–4072.

58. Decaens T, Godard C, Reynies A de et al. Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. Hepatology 2008 ;47 :247–258.

59. Monga SP, Monga HK, Tan X, Mule K, Pediaditakis P et Michalopoulos GK. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. Gastroenterology 2003 ;124 :202–216.

60. Hussain SZ, Sneddon T, Tan X, Micsenyi A, Michalopoulos GK et Monga SP. Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. Exp. Cell Res. 2004 ;292 :157–169.

61. Tan X, Yuan Y, Zeng G et al. Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. Hepatology 2008 ;47 :1667–1679.

62. Raynaud P, Tate J, Callens C et al. A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis. Hepatology 2011 ;53 :1959–1966.

63. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW et Weil A. Biochimie de Harper. Trad. par Domenjoud L. 5e éd. Bruxelles : De Boeck Supérieur, 2013. 864 p.

64. Salway JG et Granner DK. Metabolism at a glance. 3e éd. Oxford : Blackwell Publishing Ltd, 2004. 128 p.

65. Cura AJ et Carruthers A. Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis. Compr Physiol 2012 ;2 :863–914.

66. Ichiyama A. Studies on a unique organelle localization of a liver enzyme, serine:pyruvate (or alanine:glyoxylate) aminotransferase. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci. 2011 ;87 :274–286.

67. Amelio I, Cutruzzola F, Antonov A, Agostini M et Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. Trends Biochem. Sci. 2014 ;39 :191–198.

68. Burnol AF, Morzyglod L et Popineau L. [Cross-talk between insulin signaling and cell proliferation pathways]. Ann. Endocrinol. (Paris) 2013 ;74 :74–78.

69. Manning BD et Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell 2007 ;129 :1261–1274.

70. Taniguchi CM, Emanuelli B et Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006 ;7 :85–96.

71. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. J. Clin. Invest. 2003 ;112 :197–208.

72. Scheid MP, Marignani PA et Woodgett JR. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. Mol. Cell. Biol. 2002 ;22 :6247–6260.

73. Ugi S, Imamura T, Maegawa H et al. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. Mol. Cell. Biol. 2004 ;24 :8778–8789.

74. Brognard J, Sierecki E, Gao T et Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. Mol. Cell 2007 ;25 :917–931.

75. Postic C, Dentin R, Denechaud PD et Girard J. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. Annu. Rev. Nutr. 2007 ;27 :179–192.

76. Dentin R, Tomas-Cobos L, Foufelle F et al. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. J. Hepatol. 2012 ;56 :199–209.

77. Altarejos JY et Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2011 ;12 :141–151.

78. Tikhanovich I, Cox J et Weinman SA. Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. J. Gastroenterol. Hepatol. 2013 ;28 Suppl 1 :125–131.

79. Cheng Z et White MF. Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models. Antioxid. Redox Signal. 2011 ;14 :649–661.

80. Daitoku H, Sakamaki J et Fukamizu A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. Biochim. Biophys. Acta 2011 ;1813 :1954–1960.

81. Chen KS et Katz J. Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. Biochem. J. 1988 ;255 :99–104.

82. Wolfle D, Schmidt H et Jungermann K. Short-term modulation of glycogen metabolism, glycolysis and gluconeogenesis by physiological oxygen concentrations in hepatocyte cultures. Eur. J. Biochem. 1983 ;135 :405–412.

83. Jungermann K. Dynamics of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptive alterations during regeneration after partial hepatectomy, starvation and diabetes. Acta Histochem. Suppl. 1986 ;32 :89–98.

84. Jones CG et Titheradge MA. Measurement of metabolic fluxes through pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate dehydrogenase, and pyruvate carboxylate in hepatocytes of different acinar origin. Arch. Biochem. Biophys. 1996 ;326 :202–206.

85. Guzman M et Castro J. Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. Biochem. J. 1989 ;264 :107–113.

86. Guzman M, Bijleveld C et Geelen MJ. Flexibility of zonation of fatty acid oxidation in rat liver. Biochem. J. 1995 ;311 (Pt 3) :853–860.

87. Katz NR, Fischer W et Giffhorn S. Distribution of enzymes of fatty acid and ketone body metabolism in periportal and perivenous rat-liver tissue. Eur. J. Biochem. 1983 ;135 :103–107.

88. Bass NM, Barker ME, Manning JA, Jones AL et Ockner RK. Acinar heterogeneity of fatty acid binding protein expression in the livers of male, female and clofibrate-treated rats. Hepatology 1989 ;9 :12–21.

89. Suzuki T et Ono T. Immunohistochemical studies on the distribution and frequency of fatty-acid-binding protein positive cells in human fetal, newborn and adult liver tissues. J. Pathol. 1987 ;153 :385–394.

90. Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. Mod. Pathol. 2007 ;20 Suppl 1 :S40–48.

91. Chalasani N, Wilson L, Kleiner DE et al. Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. 2008 ;48 :829–834.

92. Almeda-Valdes P, Cuevas-Ramos D et Aguilar-Salinas CA. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. Ann Hepatol 2009 ;8 Suppl 1 :18–24.

93. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D et Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. Am. J. Clin. Nutr. 2003 ;77 :43–50.

94. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. Mol. Cell 2000 ;6 :87–97.

95. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Galadari A et Thayyullathil F. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. Lipids Health Dis 2013 ;12 :98.

96. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH et Theise ND, éds. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon : IARC Press, 2010. 417 p.

97. Forner A, Llovet JM et Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet 2012 ;379 :1245–1255.

98. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med. 2011 ;365 :1118–1127.

99. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. 2013. url : `http://globocan.iarc.fr`.

100. Tarocchi M, Polvani S, Marroncini G et Galli A. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. World J. Gastroenterol. 2014 ;20 :11630–11640.

101. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. Hepatology 2009 ;49 :851–859.

102. Bressac B, Kew M, Wands J et Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature 1991 ;350 :429–431.

103. Kuper H, Ye W, Broome U et al. The risk of liver and bile duct cancer in patients with chronic viral hepatitis, alcoholism, or cirrhosis. Hepatology 2001 ;34 :714–718.

104. Hytiroglou P, Snover DC, Alves V et al. Beyond "cirrhosis": a proposal from the International Liver Pathology Study Group. Am. J. Clin. Pathol. 2012 ;137 :5–9.

105. Park YN. Update on precursor and early lesions of hepatocellular carcinomas. Arch. Pathol. Lab. Med. 2011 ;135 :704–715.

106. Bralet MP, Regimbeau JM, Pineau P et al. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. Hepatology 2000 ;32 :200–204.

107. Karagozian R, Derdak Z et Baffy G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. Metab. Clin. Exp. 2014 ;63 :607–617.

108. Kew MC. The role of cirrhosis in the etiology of hepatocellular carcinoma. J Gastrointest Cancer 2014 ;45 :12–21.

109. Bishayee A. The role of inflammation and liver cancer. Adv. Exp. Med. Biol. 2014 ;816 :401–435.

110. Nault JC, Bioulac-Sage P et Zucman-Rossi J. Hepatocellular benign tumors-from molecular classification to personalized clinical care. Gastroenterology 2013 ;144 :888–902.

111. Farges O, Ferreira N, Dokmak S, Belghiti J, Bedossa P et Paradis V. Changing trends in malignant transformation of hepatocellular adenoma. Gut 2011 ;60 :85–89.

112. Diouf I, Charles MA, Ducimetiere P, Basdevant A, Eschwege E et Heude B. Evolution of obesity prevalence in France: an age-period-cohort analysis. Epidemiology 2010 ;21 :360–365.

113. Colin P. Tumeurs primitives malignes mixtes hépatiques : étude anatomopathologique. Thèse de doct. Université Paris Diderot, 2013.

114. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. Gastroenterology 2001 ;120 :1763–1773.

115. Nault JC et Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular carcinoma: the next generation. J. Hepatol. 2014 ;60 :224–226.

116. Boyault S, Rickman DS, Reynies A de et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. Hepatology 2007 ;45 :42–52.

117. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2009 ;69 :7385–7392.

118. Alayev A et Holz MK. mTOR signaling for biological control and cancer. J. Cell. Physiol. 2013 ;228 :1658–1664.

119. Sieghart W, Fuereder T, Schmid K et al. Mammalian target of rapamycin pathway activity in hepatocellular carcinomas of patients undergoing liver transplantation. Transplantation 2007 ;83 :425–432.

120. Villanueva A, Chiang DY, Newell P et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2008 ;135 :1972–1983.

121. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G et Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. Clin. Cancer Res. 2004 ;10 :8421–8425.

122. Zhou L, Huang Y, Li J et Wang Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. Med. Oncol. 2010 ;27 :255–261.

123. Daveau M, Scotte M, Francois A et al. Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. Mol. Carcinog. 2003 ;36 :130–141.

124. Sakata H, Takayama H, Sharp R, Rubin JS, Merlino G et LaRochelle WJ. Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. Cell Growth Differ. 1996 ;7 :1513–1523.

125. Janku F, Kaseb AO, Tsimberidou AM, Wolff RA et Kurzrock R. Identification of novel therapeutic targets in the PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma using targeted next generation sequencing. Oncotarget 2014 ;5 :3012–3022.

126. Menon S, Yecies JL, Zhang HH et al. Chronic activation of mTOR complex 1 is sufficient to cause hepatocellular carcinoma in mice. Sci Signal 2012 ;5 :ra24.

127. Pernicova I et Korbonits M. Metformin–mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol 2014 ;10 :143–156.

128. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science 2005 ;310 :1642–1646.

129. Chen HP, Shieh JJ, Chang CC et al. Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies. Gut 2013 ;62 :606–615.

130. Donadon V, Balbi M, Mas MD, Casarin P et Zanette G. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. Liver Int. 2010 ;30 :750–758.

131. Badrick E et Renehan AG. Diabetes and cancer: 5 years into the recent controversy. Eur. J. Cancer 2014 ;50 :2119–2125.

132. Bhat M, Sonenberg N et Gores GJ. The mTOR pathway in hepatic malignancies. Hepatology 2013 ;58 :810–818.

133. Facciorusso A. The influence of diabetes in the pathogenesis and the clinical course of hepatocellular carcinoma: recent findings and new perspectives. Curr Diabetes Rev 2013 ;9 :382–386.

134. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K et Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N. Engl. J. Med. 2003 ;348 :1625–1638.

135. Samanic C, Chow WH, Gridley G, Jarvholm B et Fraumeni JF. Relation of body mass index to cancer risk in 362,552 Swedish men. Cancer Causes Control 2006 ;17 :901–909.

136. Sanyal A, Poklepovic A, Moyneur E et Barghout V. Population-based risk factors and resource utilization for HCC: US perspective. Curr Med Res Opin 2010 ;26 :2183–2191.

137. Yeh MM et Brunt EM. Pathological Features of Fatty Liver Disease. Gastroenterology 2014.

138. Duan XY, Zhang L, Fan JG et Qiao L. NAFLD leads to liver cancer: do we have sufficient evidence? Cancer Lett. 2014 ;345 :230–234.

139. Paradis V, Albuquerque M, Mebarki M et al. Cullin7: a new gene involved in liver carcinogenesis related to metabolic syndrome. Gut 2013 ;62 :911–919.

140. Ferreira DM, Simao AL, Rodrigues CM et Castro RE. Revisiting the metabolic syndrome and paving the way for microRNAs in non-alcoholic fatty liver disease. FEBS J. 2014 ;281 :2503–2524.

141. Brown MS et Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. Cell Metab. 2008 ;7 :95–96.

142. Khandekar MJ, Cohen P et Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. Nat. Rev. Cancer 2011 ;11 :886–895.

143. Livingstone C. IGF2 and cancer. Endocr. Relat. Cancer 2013 ;20 :R321–339.

144. Tovar V, Alsinet C, Villanueva A et al. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. J. Hepatol. 2010 ;52 :550–559.

145. Pajvani UB, Shawber CJ, Samuel VT et al. Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. Nat. Med. 2011 ;17 :961–967.

146. Pajvani UB, Qiang L, Kangsamaksin T, Kitajewski J, Ginsberg HN et Accili D. Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability. Nat. Med. 2013 ;19 :1054–1060.

147. Wang C, Qi R, Li N et al. Notch1 signaling sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Akt/Hdm2-mediated p53 degradation and up-regulating p53-dependent DR5 expression. J. Biol. Chem. 2009 ;284 :16183–16190.

148. Qi R, An H, Yu Y et al. Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis. Cancer Res. 2003 ;63 :8323–8329.

149. Viatour P, Ehmer U, Saddic LA et al. Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. J. Exp. Med. 2011 ;208 :1963–1976.

150. Villanueva A, Alsinet C, Yanger K et al. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. Gastroenterology 2012 ;143 :1660–1669.

151. Geisler F et Strazzabosco M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. Hepatology 2014.

152. Strazzabosco M et Fabris L. Notch signaling in hepatocellular carcinoma: guilty in association! Gastroenterology 2012 ;143 :1430–1434.

153. Lee JS, Heo J, Libbrecht L et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. Nat. Med. 2006 ;12 :410–416.

154. Oishi N, Yamashita T et Kaneko S. Molecular biology of liver cancer stem cells. Liver Cancer 2014 ;3 :71–84.

155. Lien WH et Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/beta-catenin signaling. Genes Dev. 2014 ;28 :1517–1532.

156. Coulouarn C, Cavard C, Rubbia-Brandt L et al. Combined hepatocellular-cholangiocarcinomas exhibit progenitor features and activation of Wnt and TGFbeta signaling pathways. Carcinogenesis 2012 ;33 :1791–1796.

157. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. Development 2014 ;141 :1614–1626.

158. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. Cell 2014 ;157 :1324–1338.

159. Tschaharganeh DF, Chen X, Latzko P et al. Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2013 ;144 :1530–1542.

160. Zhang N, Bai H, David KK et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. Dev. Cell 2010 ;19 :27–38.

161. Zhou D, Conrad C, Xia F et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. Cancer Cell 2009 ;16 :425–438.

162. Lu L, Li Y, Kim SM et al. Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010 ;107 :1437–1442.

163. Han SX, Bai E, Jin GH et al. Expression and clinical significance of YAP, TAZ, and AREG in hepatocellular carcinoma. J Immunol Res 2014 ;2014 :261365.

164. Zheng T, Wang J, Jiang H et Liu L. Hippo signaling in oval cells and hepatocarcinogenesis. Cancer Lett. 2011 ;302 :91–99.

165. Strassburger K, Tiebe M, Pinna F, Breuhahn K et Teleman AA. Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. Dev. Biol. 2012 ;367 :187–196.

166. Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russell RC et al. YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)Kâ“TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. Nat. Cell Biol. 2012 ;14 :1322–1329.

167. Kim M et Jho EH. Cross-talk Between Wnt/beta-catenin and Hippo signaling pathways: a brief review. BMB Rep 2014.

168. Tao J, Calvisi DF, Ranganathan S et al. Activation of beta-Catenin and Yap1 in Human Hepatoblastoma and Induction of Hepatocarcinogenesis in Mice. Gastroenterology 2014 ;147 :690–701.

169. Clevers H et Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. Cell 2012 ;149 :1192–1205.

170. Hoppler S et Kavanagh CL. Wnt signalling: variety at the core. J. Cell. Sci. 2007 ;120 :385–393.

171. Monga SP. Role and regulation of beta-catenin signaling during physiological liver growth. Gene Expr. 2014 ;16 :51–62.

172. Nejak-Bowen KN et Monga SP. Wnt drives stem cell-mediated repair response after hepatic injury. Hepatology 2013 ;58 :1847–1850.

173. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. Oncogene 2007 ;26 :774–780.

174. Cairo S, Armengol C, De Reynies A et al. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. Cancer Cell 2008 ;14 :471–484.

175. La Coste A de, Romagnolo B, Billuart P et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998 ;95 :8847–8851.

176. Parveen N, Hussain MU, Pandith AA et Mudassar S. Diversity of axin in signaling pathways and its relation to colorectal cancer. Med. Oncol. 2011 ;28 Suppl 1 :S259–267.

177. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 1992 ;359 :235–237.

178. Su LK, Abdalla EK, Law CH, Kohlmann W, Rashid A et Vauthey JN. Biallelic inactivation of the APC gene is associated with hepatocellular carcinoma in familial adenomatous polyposis coli. Cancer 2001 ;92 :332–339.

179. Yamashita T, Budhu A, Forgues M et Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2007 ;67 :10831–10839.

180. Yamashita T, Forgues M, Wang W et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 2008 ;68 :1451–1461.

181. Lachenmayer A, Alsinet C, Savic R et al. Wnt-pathway activation in two molecular classes of hepatocellular carcinoma and experimental modulation by sorafenib. Clin. Cancer Res. 2012 ;18 :4997–5007.

182. Devereux TR, Anna CH, Foley JF, White CM, Sills RC et Barrett JC. Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis. Oncogene 1999 ;18 :4726–4733.

183. Harada N, Miyoshi H, Murai N et al. Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of beta-catenin. Cancer Res. 2002 ;62 :1971–1977.

184. Harada N, Oshima H, Katoh M, Tamai Y, Oshima M et Taketo MM. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. Cancer Res. 2004 ;64 :48–54.

185. Miyoshi H, Deguchi A, Nakau M et al. Hepatocellular carcinoma development induced by conditional beta-catenin activation in Lkb1+/- mice. Cancer Sci. 2009 ;100 :2046–2053.

186. Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004 ;101 :17216–17221.

187. Feng GJ, Cotta W, Wei XQ et al. Conditional disruption of Axin1 leads to development of liver tumors in mice. Gastroenterology 2012 ;143 :1650–1659.

188. Legoix P, Bluteau O, Bayer J et al. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. Oncogene 1999 ;18 :4044–4046.

189. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL et Peng SY. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. Am. J. Pathol. 2000 ;157 :763–770.

190. Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES et Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. Am. J. Pathol. 1999 ;155 :703–710.

191. Tannapfel A et Wittekind C. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. Virchows Arch. 2002 ;440 :345–352.

192. Cieply B, Zeng G, Proverbs-Singh T, Geller DA et Monga SP. Unique phenotype of hepatocellular cancers with exon-3 mutations in beta-catenin gene. Hepatology 2009 ;49 :821–831.

193. Dal Bello B, Rosa L, Campanini N et al. Glutamine synthetase immunostaining correlates with pathologic features of hepatocellular carcinoma and better survival after radiofrequency thermal ablation. Clin. Cancer Res. 2010 ;16 :2157–2166.

194. Monga SP. Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2011 ;43 :1021–1029.

195. Saxena R, Gianniny L, Burtt NP et al. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. Diabetes 2006 ;55 :2890–2895.

196. Mani A, Radhakrishnan J, Wang H et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. Science 2007 ;315 :1278–1282.

197. Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A et al. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. Am. J. Hum. Genet. 2004 ;75 :832–843.

198. Boj SF, Es JH van, Huch M et al. Diabetes risk gene and Wnt effector Tcf7l2/TCF4 controls hepatic response to perinatal and adult metabolic demand. Cell 2012 ;151 :1595–1607.

199. Liu H, Fergusson MM, Wu JJ et al. Wnt signaling regulates hepatic metabolism. Sci Signal 2011 ;4 :ra6.

200. Essers MA, Vries-Smits LM de, Barker N, Polderman PE, Burgering BM et Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. Science 2005 ;308 :1181–1184.

201. Chocarro-Calvo A, Garcia-Martinez JM, Ardila-Gonzalez S, De la Vieja A et Garcia-Jimenez C. Glucose-induced beta-catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. Mol. Cell 2013 ;49 :474–486.

202. Behari J, Yeh TH, Krauland L et al. Liver-specific beta-catenin knockout mice exhibit defective bile acid and cholesterol homeostasis and increased susceptibility to diet-induced steatohepatitis. Am. J. Pathol. 2010 ;176 :744–753.

203. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A et Dunach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem. 1999 ;274 :36734–36740.

204. Yeh TH, Krauland L, Singh V et al. Liver-specific beta-catenin knockout mice have bile canalicular abnormalities, bile secretory defect, and intrahepatic cholestasis. Hepatology 2010 ;52 :1410–1419.

205. Peutz J. Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentation of skin and mucous membrane. Nederl. Maandschr. Geneesk. 1921 ;10 :134–146.

206. London AS of. Lancet 1895 ;146 :1168–1169.

207. JEGHERS H, McKUSICK VA et KATZ KH. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. N. Engl. J. Med. 1949 ;241 :1031–1036.

208. Hemminki A, Tomlinson I, Markie D et al. Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. Nat. Genet. 1997 ;15 :87–90.

209. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. Nature 1998 ;391 :184–187.

210. Jenne DE, Reimann H, Nezu J et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. Nat. Genet. 1998 ;18 :38–43.

211. Su JY, Erikson E et Maller JL. Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein kinase expressed in early Xenopus embryos. J. Biol. Chem. 1996 ;271 :14430–14437.

212. Watts JL, Morton DG, Bestman J et Kemphues KJ. The C. elegans par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. Development 2000 ;127 :1467–1475.

213. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. J. Biol. 2003 ;2 :28.

214. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Curr. Biol. 2003 ;13 :2004–2008.

215. Smith DP, Spicer J, Smith A, Swift S et Ashworth A. The mouse Peutz-Jeghers syndrome gene Lkb1 encodes a nuclear protein kinase. Hum. Mol. Genet. 1999 ;8 :1479–1485.

216. Alessi DR, Sakamoto K et Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. Annu. Rev. Biochem. 2006 ;75 :137–163.

217. Boudeau J, Sapkota G et Alessi DR. LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. FEBS Lett. 2003 ;546 :159–165.

218. Towler MC, Fogarty S, Hawley SA et al. A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. Biochem. J. 2008 ;416 :1–14.

219. Denison FC, Hiscock NJ, Carling D et Woods A. Characterization of an alternative splice variant of LKB1. J. Biol. Chem. 2009 ;284 :67–76.

220. Churchman M, Dowling B et Tomlinson IP. Identification of a novel mRNA species of the LKB1/STK11 Peutz-Jeghers serine/threonine kinase. DNA Seq. 1999 ;10 :255–261.

221. Abed AA, Gunther K, Kraus C, Hohenberger W et Ballhausen WG. Mutation screening at the RNA level of the STK11/LKB1 gene in Peutz-Jeghers syndrome reveals complex splicing abnormalities and a novel mRNA isoform (STK11 c.597(insertion mark)598insIVS4). Hum. Mutat. 2001 ;18 :397–410.

222. Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. Gut 2010 ;59 :975–986.

223. Hearle N, Schumacher V, Menko FH et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. Clin. Cancer Res. 2006 ;12 :3209–3215.

224. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. Gastroenterology 2000 ;119 :1447–1453.

225. Amos CI, Keitheri-Cheteri MB, Sabripour M et al. Genotype-phenotype correlations in Peutz-Jeghers syndrome. J. Med. Genet. 2004 ;41 :327–333.

226. Schumacher V, Vogel T, Leube B et al. STK11 genotyping and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. J. Med. Genet. 2005 ;42 :428–435.

227. Mehenni H, Resta N, Guanti G et al. Molecular and clinical characteristics in 46 families affected with Peutz-Jeghers syndrome. Dig. Dis. Sci. 2007 ;52 :1924–1933.

228. Jansen M, Langeveld D, De Leng WW, Milne AN, Giardiello FM et Offerhaus GJ. LKB1 as the ghostwriter of crypt history. Fam. Cancer 2011 ;10 :437–446.

229. Tse JY, Wu S, Shinagare SA et al. Peutz-Jeghers syndrome: a critical look at colonic Peutz-Jeghers polyps. Mod. Pathol. 2013 ;26 :1235–1240.

230. Korsse SE, Biermann K, Offerhaus GJ et al. Identification of molecular alterations in gastrointestinal carcinomas and dysplastic hamartomas in Peutz-Jeghers syndrome. Carcinogenesis 2013 ;34 :1611–1619.

231. Jishage K, Nezu J, Kawase Y et al. Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002 ;99 :8903–8908.

232. Miyoshi H, Nakau M, Ishikawa TO, Seldin MF, Oshima M et Taketo MM. Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. Cancer Res. 2002 ;62 :2261–2266.

233. Ylikorkala A, Rossi DJ, Korsisaari N et al. Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. Science 2001 ;293 :1323–1326.

234. Bardeesy N, Sinha M, Hezel AF et al. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. Nature 2002 ;419 :162–167.

235. Rossi DJ, Ylikorkala A, Korsisaari N et al. Induction of cyclooxygenase-2 in a mouse model of Peutz-Jeghers polyposis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002 ;99 :12327–12332.

236. Shibata H, Toyama K, Shioya H et al. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. Science 1997 ;278 :120–123.

237. Katajisto P, Vaahtomeri K, Ekman N et al. LKB1 signaling in mesenchymal cells required for suppression of gastrointestinal polyposis. Nat. Genet. 2008 ;40 :455–459.

238. Shackelford DB, Vasquez DS, Corbeil J et al. mTOR and HIF-1alpha-mediated tumor metabolism in an LKB1 mouse model of Peutz-Jeghers syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009 ;106 :11137–11142.

239. Bhowmick NA, Neilson EG et Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Nature 2004 ;432 :332–337.

240. Shorning BY et Clarke AR. LKB1 loss of function studied in vivo. FEBS Lett. 2011 ;585 :958–966.

241. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N. Engl. J. Med. 1988 ;319 :525–532.

242. Jansen M, Leng WW de, Baas AF et al. Mucosal prolapse in the pathogenesis of Peutz-Jeghers polyposis. Gut 2006 ;55 :1–5.

243. Shepherd NA, Bussey HJ et Jass JR. Epithelial misplacement in Peutz-Jeghers polyps. A diagnostic pitfall. Am. J. Surg. Pathol. 1987 ;11 :743–749.

244. Linos DA, Dozois RR, Dahlin DC et Bartholomew LG. Does Peutz-Jeghers syndrome predispose to gastrointestinal malignancy? A later look. Arch Surg 1981 ;116 :1182–1184.

245. Gruber SB, Entius MM, Petersen GM et al. Pathogenesis of adenocarcinoma in Peutz-Jeghers syndrome. Cancer Res. 1998 ;58 :5267–5270.

246. Miyaki M, Iijima T, Hosono K et al. Somatic mutations of LKB1 and beta-catenin genes in gastrointestinal polyps from patients with Peutz-Jeghers syndrome. Cancer Res. 2000 ;60 :6311–6313.

247. Herrmann JL, Byekova Y, Elmets CA et Athar M. Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of epithelial cancers. Cancer Lett. 2011 ;306 :1–9.

248. Barker N, Es JH van, Kuipers J et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature 2007 ;449 :1003–1007.

249. Snippert HJ, Flier LG van der, Sato T et al. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. Cell 2010 ;143 :134–144.

250. Udd L, Katajisto P, Kyyronen M, Ristimaki AP et Makela TP. Impaired gastric gland differentiation in Peutz-Jeghers syndrome. Am. J. Pathol. 2010 ;176 :2467–2476.

251. Brown KA, McInnes KJ, Takagi K et al. LKB1 expression is inhibited by estradiol-17beta in MCF-7 cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2011 ;127 :439–443.

252. Linher-Melville K, Zantinge S et Singh G. Liver kinase B1 expression (LKB1) is repressed by estrogen receptor alpha (ERÎ) in MCF-7 human breast cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012 ;417 :1063–1068.

253. McInnes KJ, Brown KA, Hunger NI et Simpson ER. Regulation of LKB1 expression by sex hormones in adipocytes. Int J Obes (Lond) 2012 ;36 :982–985.

254. Qanungo S, Haldar S et Basu A. Restoration of silenced Peutz-Jeghers syndrome gene, LKB1, induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells. Neoplasia 2003 ;5 :367–374.

255. Esteller M, Avizienyte E, Corn PG et al. Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. Oncogene 2000 ;19 :164–168.

256. Trojan J, Brieger A, Raedle J, Esteller M et Zeuzem S. 5'-CpG island methylation of the LKB1/STK11 promoter and allelic loss at chromosome 19p13.3 in sporadic colorectal cancer. Gut 2000 ;47 :272–276.

257. Sapkota GP, Boudeau J, Deak M, Kieloch A, Morrice N et Alessi DR. 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. Biochem. J. 2002 ;362 :481–490.

258. Sapkota GP, Kieloch A, Lizcano JM et al. 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. J. Biol. Chem. 2001 ;276 :19469–19482.

259. Kimball SR, Siegfried BA et Jefferson LS. Glucagon represses signaling through the mammalian target of rapamycin in rat liver by activating AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 2004 ;279 :54103–54109.

260. Collins SP, Reoma JL, Gamm DM et Uhler MD. LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. Biochem. J. 2000 ;345 Pt 3 :673–680.

261. Houde VP, Ritorto MS, Gourlay R et al. Investigation of LKB1 Ser431 phosphorylation and Cys433 farnesylation using mouse knockin analysis reveals an unexpected role of prenylation in regulating AMPK activity. Biochem. J. 2014 ;458 :41–56.

262. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N et Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. J. Biol. Chem. 2008 ;283 :27628–27635.

263. Zu Y, Liu L, Lee MY et al. SIRT1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary porcine aortic endothelial cells. Circ. Res. 2010 ;106 :1384–1393.

264. Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 2008 ;283 :20015–20026.

265. Nezu J, Oku A et Shimane M. Loss of cytoplasmic retention ability of mutant LKB1 found in Peutz-Jeghers syndrome patients. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999 ;261 :750–755.

266. Boudeau J, Baas AF, Deak M et al. MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. EMBO J. 2003 ;22 :5102–5114.

267. Sebbagh M, Olschwang S, Santoni MJ et Borg JP. The LKB1 complex-AMPK pathway: the tree that hides the forest. Fam. Cancer 2011 ;10 :415–424.

268. Milburn CC, Boudeau J, Deak M, Alessi DR et Aalten DM van. Crystal structure of MO25 alpha in complex with the C terminus of the pseudo kinase STE20-related adaptor. Nat. Struct. Mol. Biol. 2004 ;11 :193–200.

269. Boudeau J, Scott JW, Resta N et al. Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. J. Cell. Sci. 2004 ;117 :6365–6375.

270. Zeqiraj E, Filippi BM, Deak M, Alessi DR et Aalten DM van. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. Science 2009 ;326 :1707–1711.

271. Gan RY et Li HB. Recent Progress on Liver Kinase B1 (LKB1): Expression, Regulation, Downstream Signaling and Cancer Suppressive Function. Int J Mol Sci 2014 ;15 :16698–16718.

272. Gaude H, Aznar N, Delay A et al. Molecular chaperone complexes with antagonizing activities regulate stability and activity of the tumor suppressor LKB1. Oncogene 2012 ;31 :1582–1591.

273. Nony P, Gaude H, Rossel M, Fournier L, Rouault JP et Billaud M. Stability of the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1 requires its binding to the molecular chaperones Hsp90/Cdc37. Oncogene 2003 ;22 :9165–9175.

274. Boudeau J, Deak M, Lawlor MA, Morrice NA et Alessi DR. Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. Biochem. J. 2003 ;370 :849–857.

275. Viollet B et Andreelli F. AMP-activated protein kinase and metabolic control. Handb Exp Pharmacol 2011 :303–330.

276. Steinberg GR et Kemp BE. AMPK in Health and Disease. Physiol. Rev. 2009 ;89 :1025–1078.

277. Hardie DG, Ross FA et Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012 ;13 :251–262.

278. Hardie DG. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. Curr. Opin. Cell Biol. 2014 ;33C :1–7.

279. Sakamoto K, Goransson O, Hardie DG et Alessi DR. Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2004 ;287 :E310–317.

280. Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA et Hardie DG. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. Cell Metab. 2013 ;18 :556–566.

281. Zhang YL, Guo H, Zhang CS et al. AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. Cell Metab. 2013 ;18 :546–555.

282. Zhang CS, Jiang B, Li M et al. The Lysosomal v-ATPase-Ragulator Complex Is a Common Activator for AMPK and mTORC1, Acting as a Switch between Catabolism and Anabolism. Cell Metab. 2014 ;20 :526–540.

283. Lizcano JM, Goransson O, Toth R et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. EMBO J. 2004 ;23 :833–843.

284. Jaleel M, McBride A, Lizcano JM et al. Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. FEBS Lett. 2005 ;579 :1417–1423.

285. Canto C et Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. Cell. Mol. Life Sci. 2010 ;67 :3407–3423.

286. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH et al. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. Curr. Biol. 2000 ;10 :1247–1255.

287. Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L et Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. J. Biol. Chem. 2002 ;277 :30778–30783.

288. Carling D et Hardie DG. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. Biochim. Biophys. Acta 1989 ;1012 :81–86.

289. Habets DD, Coumans WA, El Hasnaoui M et al. Crucial role for LKB1 to AMPKalpha2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. Biochim. Biophys. Acta 2009 ;1791 :212–219.

290. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG et Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. Am. J. Physiol. 1997 ;273 :E1107–1112.

291. Davies SP, Carling D, Munday MR et Hardie DG. 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. Eur. J. Biochem. 1992 ;203 :615–623.

292. Muoio DM, Seefeld K, Witters LA et Coleman RA. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. Biochem. J. 1999 ;338 (Pt 3) :783–791.

293. Clarke PR et Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. EMBO J. 1990 ;9 :2439–2446.

294. Li Y, Xu S, Mihaylova MM et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. Cell Metab. 2011 ;13 :376–388.

295. Screaton RA, Conkright MD, Katoh Y et al. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. Cell 2004 ;119 :61–74.

296. Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K et al. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. Cell 2011 ;145 :607–621.

297. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. Nature 2009 ;458 :1056–1060.

298. Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ et Clevers H. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. Physiol. Rev. 2009 ;89 :777–798.

299. Viollet B, Athea Y, Mounier R et al. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. Front Biosci (Landmark Ed) 2009 ;14 :19–44.

300. Koh HJ, Arnolds DE, Fujii N et al. Skeletal muscle-selective knockout of LKB1 increases insulin sensitivity, improves glucose homeostasis, and decreases TRB3. Mol. Cell. Biol. 2006 ;26 :8217–8227.

301. Fu A et Screaton RA. Using kinomics to delineate signaling pathways: control of CRTC2/TORC2 by the AMPK family. Cell Cycle 2008 ;7 :3823–3828.

302. Foretz M, Hebrard S, Leclerc J et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. J. Clin. Invest. 2010 ;120 :2355–2369.

303. Patel K, Foretz M, Marion A et al. The LKB1-salt-inducible kinase pathway functions as a key gluconeogenic suppressor in the liver. Nat Commun 2014 ;5 :4535.

304. Granot Z, Swisa A, Magenheim J et al. LKB1 regulates pancreatic beta cell size, polarity, and function. Cell Metab. 2009 ;10 :296–308.

305. Fu A, Ng AC, Depatie C et al. Loss of Lkb1 in adult beta cells increases beta cell mass and enhances glucose tolerance in mice. Cell Metab. 2009 ;10 :285–295.

306. Narbonne P et Roy R. Caenorhabditis elegans dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. Nature 2009 ;457 :210–214.

307. Velden YU van der, Wang L, Zevenhoven J et al. The serine-threonine kinase LKB1 is essential for survival under energetic stress in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011 ;108 :4358–4363.

308. Bastie CC, Zong H, Xu J et al. Integrative metabolic regulation of peripheral tissue fatty acid oxidation by the SRC kinase family member Fyn. Cell Metab. 2007 ;5 :371–381.

309. Yamada E, Pessin JE, Kurland IJ, Schwartz GJ et Bastie CC. Fyn-dependent regulation of energy expenditure and body weight is mediated by tyrosine phosphorylation of LKB1. Cell Metab. 2010 ;11 :113–124.

310. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes Dev. 2011 ;25 :1895–1908.

311. Narkar VA, Downes M, Yu RT et al. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. Cell 2008 ;134 :405–415.

312. Morton DG, Roos JM et Kemphues KJ. par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in Caenorhabditis elegans embryogenesis. Genetics 1992 ;130 :771–790.

313. Martin SG et St Johnston D. A role for Drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. Nature 2003 ;421 :379–384.

314. Amin N, Khan A, St Johnston D et al. LKB1 regulates polarity remodeling and adherens junction formation in the Drosophila eye. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009 ;106 :8941–8946.

315. Baas AF, Kuipers J, Wel NN van der et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. Cell 2004 ;116 :457–466.

316. Shelly M, Cancedda L, Heilshorn S, Sumbre G et Poo MM. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. Cell 2007 ;129 :565–577.

317. Barnes AP, Lilley BN, Pan YA et al. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. Cell 2007 ;129 :549–563.

318. Hezel AF, Gurumurthy S, Granot Z et al. Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms. Mol. Cell. Biol. 2008 ;28 :2414–2425.

319. Kojima Y, Miyoshi H, Clevers HC, Oshima M, Aoki M et Taketo MM. Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase signaling. J. Biol. Chem. 2007 ;282 :23532–23540.

320. Mirouse V, Swick LL, Kazgan N, St Johnston D et Brenman JE. LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress. J. Cell Biol. 2007 ;177 :387–392.

321. Lee JH, Koh H, Kim M et al. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. Nature 2007 ;447 :1017–1020.

322. Mirouse V et Billaud M. The LKB1/AMPK polarity pathway. FEBS Lett. 2011 ;585 :981–985.

323. Shackelford DB et Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. Nat. Rev. Cancer 2009 ;9 :563–575.

324. Zhang L, Li J, Young LH et Caplan MJ. AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006 ;103 :17272–17277.

325. Zheng B et Cantley LC. Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007 ;104 :819–822.

326. Treyer A et Musch A. Hepatocyte polarity. Compr Physiol 2013 ;3 :243–287.

327. Woods A, Heslegrave AJ, Muckett PJ et al. LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice. Biochem. J. 2011 ;434 :49–60.

328. Partanen JI, Nieminen AI, Makela TP et Klefstrom J. Suppression of oncogenic properties of c-Myc by LKB1-controlled epithelial organization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007 ;104 :14694–14699.

329. Nolan ME, Aranda V, Lee S et al. The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. Cancer Res. 2008 ;68 :8201–8209.

330. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol. Cell 2006 ;22 :159–168.

331. Haissaguerre M, Saucisse N et Cota D. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. Mol. Cell. Endocrinol. 2014.

332. Huang K et Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. Semin. Cell Dev. Biol. 2014.

333. Ikeda Y, Sato K, Pimentel DR et al. Cardiac-specific deletion of LKB1 leads to hypertrophy and dysfunction. J. Biol. Chem. 2009 ;284 :35839–35849.

334. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD et al. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. Cancer Cell 2004 ;6 :91–99.

335. Kuwada SK et Burt R. A rationale for mTOR inhibitors as chemoprevention agents in Peutz-Jeghers syndrome. Fam. Cancer 2011 ;10 :469–472.

336. Carretero J, Medina PP, Blanco R et al. Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer. Oncogene 2007 ;26 :1616–1625.

337. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. Nature 2007 ;448 :807–810.

338. Karuman P, Gozani O, Odze RD et al. The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. Mol. Cell 2001 ;7 :1307–1319.

339. Tiainen M, Vaahtomeri K, Ylikorkala A et Makela TP. Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). Hum. Mol. Genet. 2002 ;11 :1497–1504.

340. Morton JP, Jamieson NB, Karim SA et al. LKB1 haploinsufficiency cooperates with Kras to promote pancreatic cancer through suppression of p21-dependent growth arrest. Gastroenterology 2010 ;139 :586–597.

341. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Lopez-Bonet E et Menendez JA. AMPK: Evidence for an energy-sensing cytokinetic tumor suppressor. Cell Cycle 2009 ;8 :3679–3683.

342. Wei C, Bhattaram VK, Igwe JC, Fleming E et Tirnauer JS. The LKB1 tumor suppressor controls spindle orientation and localization of activated AMPK in mitotic epithelial cells. PLoS ONE 2012 ;7 :e41118.

343. Matsumura F, Yamakita Y et Yamashiro S. Myosin light chain kinases and phosphatase in mitosis and cytokinesis. Arch. Biochem. Biophys. 2011 ;510 :76–82.

344. Bettencourt-Dias M, Giet R, Sinka R et al. Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. Nature 2004 ;432 :980–987.

345. Hanahan D et Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011 ;144 :646–674.

346. Partanen JI, Tervonen TA et Klefstrom J. Breaking the epithelial polarity barrier in cancer: the strange case of LKB1/PAR-4. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 2013 ;368 :20130111.

347. Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M et al. Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. Cancer Res. 2002 ;62 :3659–3662.

348. Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K et al. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. Oncogene 2007 ;26 :5911–5918.

349. Gao B, Sun Y, Zhang J et al. Spectrum of LKB1, EGFR, and KRAS mutations in chinese lung adenocarcinomas. J Thorac Oncol 2010 ;5 :1130–1135.

350. Sanchez-Cespedes M. The role of LKB1 in lung cancer. Fam. Cancer 2011 ;10 :447–453.

351. Shah U, Sharpless NE et Hayes DN. LKB1 and lung cancer: more than the usual suspects. Cancer Res. 2008 ;68 :3562–3565.

352. Su GH, Hruban RH, Bansal RK et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. Am. J. Pathol. 1999 ;154 :1835–1840.

353. Wingo SN, Gallardo TD, Akbay EA et al. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. PLoS ONE 2009 ;4 :e5137.

354. Ollila S et Makela TP. The tumor suppressor kinase LKB1: lessons from mouse models. J Mol Cell Biol 2011 ;3 :330–340.

355. Nakau M, Miyoshi H, Seldin MF, Imamura M, Oshima M et Taketo MM. Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice. Cancer Res. 2002 ;62 :4549–4553.

356. Contreras CM, Gurumurthy S, Haynie JM et al. Loss of Lkb1 provokes highly invasive endometrial adenocarcinomas. Cancer Res. 2008 ;68 :759–766.

357. Robinson J, Nye E, Stamp G et Silver A. Osteogenic tumours in Lkb1-deficient mice. Exp. Mol. Pathol. 2008 ;85 :223–226.

358. McCarthy A, Lord CJ, Savage K et al. Conditional deletion of the Lkb1 gene in the mouse mammary gland induces tumour formation. J. Pathol. 2009 ;219 :306–316.

359. Pearson HB, McCarthy A, Collins CM, Ashworth A et Clarke AR. Lkb1 deficiency causes prostate neoplasia in the mouse. Cancer Res. 2008 ;68 :2223–2232.

360. Takeda H, Miyoshi H, Kojima Y, Oshima M et Taketo MM. Accelerated onsets of gastric hamartomas and hepatic adenomas/carcinomas in Lkb1+/-p53-/- compound mutant mice. Oncogene 2006 ;25 :1816–1820.

361. Berger AH, Knudson AG et Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. Nature 2011 ;476 :163–169.

362. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004 ;101 :3329–3335.

363. Jeon SM, Chandel NS et Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. Nature 2012 ;485 :661–665.

364. Bensinger SJ et Christofk HR. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. Semin. Cell Dev. Biol. 2012 ;23 :352–361.

365. Faubert B, Vincent EE, Poffenberger MC et Jones RG. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. Cancer Lett. 2014.

366. Faubert B, Vincent EE, Griss T et al. Loss of the tumor suppressor LKB1 promotes metabolic reprogramming of cancer cells via HIF-1Î. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014 ;111 :2554–2559.

367. Dupuy F, Griss T, Blagih J et al. LKB1 is a central regulator of tumor initiation and pro-growth metabolism in ErbB2-mediated breast cancer. Cancer Metab 2013 ;1 :18.

368. Shackelford DB, Abt E, Gerken L et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. Cancer Cell 2013 ;23 :143–158.

369. Boehlke C, Kotsis F, Patel V et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. Nat. Cell Biol. 2010 ;12 :1115–1122.

370. Jacob LS, Wu X, Dodge ME et al. Genome-wide RNAi screen reveals disease-associated genes that are common to Hedgehog and Wnt signaling. Sci Signal 2011 ;4 :ra4.

371. Kim CJ, Cho YG, Park JY et al. Genetic analysis of the LKB1/STK11 gene in hepatocellular carcinomas. Eur. J. Cancer 2004 ;40 :136–141.

372. Yu J, Zhang HY, Ma ZZ, Lu W, Wang YF et Zhu JD. Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis. Cell Res. 2003 ;13 :319–333.

373. Huang YH, Chen ZK, Huang KT et al. Decreased expression of LKB1 correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients undergoing hepatectomy. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013 ;14 :1985–1988.

374. Kellendonk C, Opherk C, Anlag K, Schutz G et Tronche F. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. Genesis 2000 ;26 :151–153.

375. Tannour-Louet M, Porteu A, Vaulont S, Kahn A et Vasseur-Cognet M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. Hepatology 2002 ;35 :1072–1081.

376. Coffinier C, Gresh L, Fiette L et al. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. Development 2002 ;129 :1829–1838.

377. Clotman F, Lannoy VJ, Reber M et al. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. Development 2002 ;129 :1819–1828.

378. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T et al. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. EMBO J. 1999 ;18 :5931–5942.

379. Cartier N, Miquerol L, Tulliez M et al. Diet-dependent carcinogenesis of pancreatic islets and liver in transgenic mice expressing oncogenes under the control of the L-type pyruvate kinase gene promoter. Oncogene 1992 ;7 :1413–1422.

380. Ossipova O, Bardeesy N, DePinho RA et Green JB. LKB1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development. Nat. Cell Biol. 2003 ;5 :889–894.

381. Green JB. Lkb1 and GSK3-beta: kinases at the center and poles of the action. Cell Cycle 2004 ;3 :12–14.

382. Byekova YA, Herrmann JL, Xu J, Elmets CA et Athar M. Liver kinase B1 (LKB1) in the pathogenesis of UVB-induced murine basal cell carcinoma. Arch. Biochem. Biophys. 2011 ;508 :204–211.

383. Spicer J, Rayter S, Young N, Elliott R, Ashworth A et Smith D. Regulation of the Wnt signalling component PAR1A by the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. Oncogene 2003 ;22 :4752–4756.

384. Jian SF, Hsiao CC, Chen SY et al. Utilization of liquid chromatography mass spectrometry analyses to identify LKB1-APC interaction in modulating Wnt/beta-catenin pathway of lung cancer cells. Mol. Cancer Res. 2014 ;12 :622–635.

385. Liu K, Luo Y, Tian H, Yu KZ, He JX et Shen WY. The tumor suppressor LKB1 antagonizes WNT signaling pathway through modulating GSK3beta activity in cell growth of esophageal carcinoma. Tumour Biol. 2014 ;35 :995–1002.

386. Yan D, Avtanski D, Saxena NK et Sharma D. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires beta-catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways. J. Biol. Chem. 2012 ;287 :8598–8612.

387. Chang HW, Lee YS, Nam HY et al. Knockdown of beta-catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Cell. Signal. 2013 ;25 :839–847.

388. Shorning BY, Zabkiewicz J, McCarthy A et al. Lkb1 deficiency alters goblet and paneth cell differentiation in the small intestine. PLoS ONE 2009 ;4 :e4264.

389. Banks AS, Kim-Muller JY, Mastracci TL et al. Dissociation of the glucose and lipid regulatory functions of FoxO1 by targeted knockin of acetylation-defective alleles in mice. Cell Metab. 2011 ;14 :587–597.

390. Mutel E, Gautier-Stein A, Abdul-Wahed A et al. Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. Diabetes 2011 ;60 :3121–3131.

391. Girard J, Ferre P, Pegorier JP et Duee PH. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. Physiol. Rev. 1992 ;72 :507–562.

392. Picard A, Rouch C, Kassis N et al. Hippocampal lipoprotein lipase regulates energy balance in rodents. Mol Metab 2014 ;3 :167–176.

393. Dentin R, Benhamed F, Hainault I et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. Diabetes 2006 ;55 :2159–2170.

394. Dahmani R, Just PA, Delay A et al. A novel LKB1 isoform enhances AMPK metabolic activity and displays oncogenic properties. Oncogene 2014.

395. Hansen J, Brandt C, Nielsen AR et al. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. Endocrinology 2011 ;152 :164–171.

396. Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK et Mendell JR. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. Muscle Nerve 2009 ;39 :283–296.

397. Tanji K et Bonilla E. Optical imaging techniques (histochemical, immunohistochemical, and in situ hybridization staining methods) to visualize mitochondria. Methods Cell Biol. 2007 ;80 :135–154.

398. Anonyme. La farce de Maître Pathelin. 1456.

399. Hass BS, Hart RW, Lu MH et Lyn-Cook BD. Effects of caloric restriction in animals on cellular function, oncogene expression, and {DNA} methylation in vitro. Mutation Research/DNAging 1993 ;295 :281–289.

400. DeRan M, Yang J, Shen CH et al. Energy Stress Regulates Hippo-YAP Signaling Involving AMPK-Mediated Regulation of Angiomotin-like 1 Protein. Cell Reports 2014 ;9 :495–503.

RÉSUMÉ

Les carcinomes hépatocellulaires (CHC) mutés *CTNNB1* ont des caractéristiques phénotypiques propres en termes de polarité et de métabolisme (absence de stéatose). Nous avons émis l'hypothèse que ce phénotype pouvait être secondaire à l'activation du gène suppresseur de tumeurs *LKB1* qui code une Ser/Thr kinase multitâches.

Nous avons tout d'abord montré qu'il existait effectivement un dialogue complexe entre les voies Wnt/β-caténine et LKB1 dans le foie. Les mutations de *CTNNB1* sont en effet capables d'induire l'expression protéique de LKB1 dans des lignées hépatomateuses humaines, et les CHC mutés *CTNNB1* présentent une expression protéique accrue de LKB1 et une signature transcriptionnelle d'activation de LKB1. De plus, dans deux modèles murins d'invalidation hépatospécifique de *Lkb1*, LKB1 est apparu comme requis pour l'activation complète du programme transcriptionnel de β-caténine mais de façon dépendante du stade de développement et du contexte nutritionnel. Enfin, la signalisation LKB1 est apparue comme nécessaire à la survie des hépatocytes activés pour β-caténine dans deux modèles murins différents.

Nous avons aussi caractérisé les rôles métaboliques de LKB1 dans le foie. L'invalidation hépatospécifique de *Lkb1* induisait une augmentation progressive de la masse grasse corporelle avec utilisation préférentielle des glucides comme substrat énergétique. Il existait une activation de la néoglucogenèse hépatique avec hyperglycémie et une lipogenèse accrue avec accumulation hépatocytaire de lipides. Enfin, nous avons mis en évidence une activation paradoxale de la signalisation AKT dans les hépatocytes, même à jeun, et une dépendance énergétique aux acides aminés.

Enfin, nous avons identifié une nouvelle isoforme protéique de LKB1 délétée de son domaine N-terminal et d'une partie de son domaine kinase. D'expression tissulaire préférentiellement musculaire et myocardique, cette isoforme catalytiquement inactive se comportait comme dominant positif sur l'activation de l'AMPK par la forme conventionnelle mais comme dominant négatif dans l'activité polarisation induite par LKB1. Enfin, elle était capable d'induire, en l'absence de la forme conventionnelle, la prolifération cellulaire et la tumorigenèse chez la souris *nude*. Elle pourrait exercer des rôles métaboliques particuliers dans les tissus fortement oxydatifs et des rôles oncogéniques dans certains contextes.

ABSTRACT

CTNNB1-mutated hepatocellular carcinomas (HCC) share a specific polarity and metabolic phenotype without steatosis. We hypothesized that such phenotype could imply the tumor suppressor gene *LKB1* that encodes for a multi-task Ser/Thr kinase.

We first demonstrated that a complex crosstalk indeed exists in the liver between LKB1 and the Wnt/β-catenin pathway. LKB1 proteic expression was controlled by mutant β-catenin in hepatomatous cell line and *CTNNB1*-mutated HCCs had an enhanced LKB1 proteic expression as well a transcriptomic signature of LKB1 activation. In two mouse model of liver-specific invalidation of *Lkb1*, we showed that LKB1 was required for full activation of the β-catenin transcriptomic program, but it depended on the developmental stage and nutritional context. At least, LKB1 appeared to be required for the survival of β-catenin activated liver cells in two other mouse models.

Then, we wanted to caracterize the metabolic roles of LKB1 in the liver. Liver-specific invalidation of *Lkb1* progressively raised the body fat mass and we observed that carbohydrates were preferred as whole-body energetic fuel. In the liver, gluconeogenesis and lipogenesis were enhanced, resulting in mild hyperglycemia and lipid accumulation in the hepatocytes. At least, we identified an aberrant activation of the AKT signaling in the liver, even during fasting, and an energetic dependence towards amino acids.

At least, we identified a novel LKB1 proteic isoform that is deleted of its N-terminal domain and part of its kinase domain. Highly expressed in the muscle and in the heart, this catalytically inactive isoform however acted as a positive dominant towards AMPK activation by full length LKB1 but as a negative dominant towards LKB1-induced cell polarization. This isoform is also able to enhance cell proliferation and to induce tumors in a xenograft model, even when expressed alone. It could play specific metabolic roles in oxidative tissues and could be oncogenic in some contexts.