

UNIVERSITÉ PARIS-SUD
ÉCOLE DOCTORALE 418 :
DE CANCÉROLOGIE
Laboratoire : Inserm U1016-Institut Cochin

THÈSE DE DOCTORAT
ASPECTS MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par
Chiara SARTOR

Hnf4 α and choline metabolism role in β -catenin activated
liver carcinogenesis

Date de soutenance : 24/09/2015

Composition du jury :

Président du jury :	Chrstian AUCLAIR
Directeur de thèse :	Sabine COLNOT
Rapporteur :	Agnès RIBEIRO
Rapporteur :	Yu WEI
Examineur :	Olivier ROSMORDUC
Examineur :	Thierry TORDJMANN

Le foie : généralités

Le foie adulte, organe le plus volumineux du corps après la peau, est considéré, du fait de son rôle majeur dans l'homéostasie tissulaire, comme un des organes les plus complexes de l'organisme (après le cerveau).

Le foie est constitué de différents types cellulaires dont les hépatocytes, cellules majoritaires puisqu'elles constituent à elles seules 70 à 80% du poids hépatique, et les cholangiocytes.

Ces deux types cellulaires constituent ce que l'on appelle le « parenchyme hépatique » et sont responsables de la plupart des fonctions assurées par le foie, telles que la production de bile, la détoxification des substances toxiques pour l'organisme, ou encore la régulation du métabolisme des lipides, des glucides et des acides aminés. Cependant, le foie est également constitué de cellules non parenchymateuses comme les cellules de Küppfer, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules étoilées, assurant plus spécifiquement des fonctions immunitaires et de vascularisation ou impliquées dans la fibrose hépatique.

Les hépatocytes et les cholangiocytes dérivent d'une cellule progénitrice commune appelée « hépatoblaste ». La différenciation de cet hépatoblaste est très finement régulée par diverses voies de signalisation et différents facteurs de transcription.

En effet, une des voies de régulation majeure est la voie de signalisation WNT/ β -caténine dont l'activation est nécessaire pour favoriser un destin cholangiocytaire. Au contraire, la différenciation de l'hépatoblaste en hépatocyte nécessite non seulement l'absence de l'activation de cette voie mais également la présence d'un facteur de transcription fondamental, contrôlant l'expression de gènes spécifiques déterminants le phénotype « hépatocyte », HNF4 α .

HNF4 α , un régulateur hépatocytaire majeur

HNF4 α est un facteur de transcription exprimé dans le foie, les reins et l'intestin, agissant dans le noyau sous forme d'homodimère. Ce facteur existe sous deux

isoformes P1 et P2. Alors que l'isoforme P2 est spécifique de l'hépatoblaste et que son expression diminue de façon continue tout au long du développement, l'isoforme P1 est spécifique de l'hépatocyte. L'inactivation constitutive d'*Hnf4α* n'est pas envisageable parce que sa perte est létale pendant le développement embryonnaire.

Dans le foie adulte, HNF4α est capable de réguler la différenciation hépatique, le stockage des lipides au sein de ce tissu, la prolifération ainsi que le maintien d'une structure tissulaire épithéliale. Ainsi, la régulation de ces différentes fonctions telles que le destin cellulaire, le métabolisme et la structure du tissu hépatique, lui confère un rôle de régulateur majeur au sein du foie.

Les premières études s'intéressant à la dérégulation de l'expression génique dans les carcinomes hépatocellulaires, ont permis de mettre en évidence une perte du facteur HNF4α au sein des tumeurs de patients atteints par ce cancer, lui conférant alors un rôle de suppresseur de tumeur. De plus, cette perte d'expression est associée à un mauvais pronostic.

Des expériences sur des lignées de cellules humaines d'hépatocarcinomes (Hep3B et HepG2) ont montré que la restauration du facteur HNF4α par la transduction d'un adénovirus exprimant ce facteur de transcription, annihile la capacité migratoire des cellules et favorise leur adhérence.

De plus, chez les rongeurs, d'autres expériences ont montré que la restauration de l'expression d'*Hnf4α* au cours de la cancérogenèse hépatique par administration de Diethylnitrosamine (DEN) a pour conséquence de ralentir la croissance tumorale, tandis que la suppression d'*Hnf4α* après administration de DEN aggravait le phénotype.

Le métabolisme hépatique

Le foie est la glande la plus volumineuse de l'organisme possédant des fonctions à la fois endocrine et exocrine.

Grâce à sa fonction exocrine, le foie, par l'intermédiaire des hépatocytes, va produire la bile ; cette dernière va ensuite être sécrétée et va pouvoir être

collectée et concentrée au niveau de la vésicule biliaire qui, à son tour pourra la sécréter au niveau du duodénum après les repas.

En revanche, la capacité du foie d'absorber et d'élaborer par la suite les substances présentes dans la circulation sanguine est, au contraire, une activité endocrine hépatique.

Le foie est également très important dans le métabolisme des carbohydrates. En effet, en réponse aux différentes hormones (insuline et glucagon) synthétisées par le pancréas, le foie va contrôler en particulier la concentration sanguine de glucose.

A l'état nourri (concentration élevée de glucose dans le sang), l'insuline produite est capable d'induire l'expression de différents gènes, qui, dans le foie, vont être responsables de l'utilisation du glucose et aussi de la production de glycogène.

À jeun (concentration basse de glucose dans le sang), dans le foie l'utilisation des stocks de glycogène aura lieu, ainsi que la néoglucogenèse (production *de novo* de glucose).

Le foie est aussi impliqué dans le métabolisme des acides gras. La production d'acides gras est active quand le niveau de glucose sanguin est élevé. Les acides gras peuvent être stockés dans l'organe ou bien être exportés dans la circulation sanguine au sein de macromolécules, les VLDL (very low density lipoprotein). Outre leur production, le foie peut également utiliser les acides gras comme source d'énergie, à travers la β -oxydation ou la ω -oxydation quand cette dernière n'est pas efficace.

Le foie est constitué d'unités fonctionnelles microcirculatoires appelées « lobules » ou « *acini* hépatiques ». Le lobule est une structure hexagonale avec au centre une veine centrolobulaire et aux extrémités une triade portale, composée par une branche de la veine porte, de l'artère hépatique et un canal biliaire.

Les hépatocytes se classent en deux sous-groupes : hépatocytes périportaux et péricentraux, en fonction de leur position au sein du lobule. Chaque fonction

hépatique en réalité ne peut être accomplie que par l'un des deux groupes d'hépatocytes (spécialisation des cellules).

L'environnement au niveau de l'espace porte (triade portale) est riche en oxygène, nutriments et toxines divers de l'organisme apportés par le sang de l'artère hépatique et de la veine porte, qui ensuite traverse le lobule jusqu'à la veine centrolobulaire *via* les sinusoides (capillaires entre les hépatocytes); ainsi il existe tout au long du lobule hépatique un gradient d'oxygène, de nutriments et de déchets, qui diminue de la triade portale à la veine centrolobulaire. Ce gradient a pour conséquence de restreindre certaines fonctions à un de deux cotés : par exemple la glycolyse se déroule au niveau péricentral alors que la gluconéogenèse est une fonction assurée par l'espace porte. Cette zonation métabolique est à présent bien caractérisée sur le plan moléculaire et met en jeu une voie de signalisation clé dans le métabolisme hépatique, la voie WNT/ β -caténine. En effet, cette voie de signalisation est active au niveau de l'espace péricentral et absente au niveau de l'espace porte, ceci pouvant expliquer les différents programmes métaboliques au sein du tissu hépatique.

L'hépatocarcinome ; une détection et une prise en charge difficiles

Le foie peut être sujet à différentes pathologies, pouvant affectées les cholangiocytes (ex : ductopenie, ciliopathies, cirrhose biliaire et cholangiocarcinome...) et les hépatocytes. Différents types d'affections peuvent apparaître : un empêchement du flux sanguin ou la présence d'un ou de plusieurs facteurs étiologiques comme l'alcool, les infections par les virus de l'hépatite B ou C, ou l'exposition à l'aflatoxine-B1, pouvant donner lieu à une inflammation chronique, une lésion tissulaire conduisant à la nécrose du tissu. Malgré son caractère quiescent en situation physiologique, le foie possède néanmoins une capacité de régénération remarquable lui permettant en situation pathologique de mettre en place un mécanisme de prolifération compensatoire. Cependant, à long terme ces cycles de nécrose/régénération peuvent conduire à l'apparition de tissu cicatriciel (présence de collagène) et de nodules, ces derniers pouvant à terme se transformer en carcinome hépatocellulaire.

Au cours de ces vingt dernières années, l'incidence du cancer primitif du foie (carcinome hépatocellulaire dans 80% des cas, et cholangiocarcinome dans 10% des cas) a particulièrement augmenté dans les pays développés particulièrement en raison d'une augmentation du nombre de cas de cirrhose (due notamment aux facteurs de risque décrits précédemment).

A l'heure actuelle, les méthodes de détection trop sensibles pour envisager un diagnostic précoce et précis et le manque d'alternatives thérapeutiques pour la prise en charge des patients atteints d'un hépatocarcinome, en font un cancer de très mauvais pronostic et un problème de santé publique majeur.

Le cancer est une pathologie qui se développe dans un contexte d'accumulation de mutations génétiques et/ou des modifications épigénétiques. Son initiation et sa progression sont liées à des « caractéristiques distinctives » (Hallmarks), notamment décrites dans la littérature par *Hanahan* et *Weinberg* (2000 et 2010). Les cellules tumorales commencent notamment à être indépendantes aux facteurs de croissance, acquièrent un potentiel de réplication illimité, elles deviennent insensibles à la mort cellulaire par apoptose. Enfin, la prolifération anarchique des cellules tumorales va être à l'origine d'une adaptation de la tumeur qui devra non seulement augmenter son apport intratumoral en oxygène et en nutriments, grâce à une néoangiogenèse, mais également adapter sa vitesse de production d'énergie en changeant son métabolisme.

Adaptation métabolique tumorale

En cancérologie, le métabolisme est de plus en plus étudié du fait de son rôle clé au cours de la progression tumorale et de l'adaptation des cellules cancéreuses à leur environnement ; le plus connu est l'effet Warburg.

Dans une cellule normale et en présence d'oxygène la phosphorylation oxydative est la voie majeure et la plus efficace pour produire de l'énergie. Au contraire, en présence de faibles taux d'oxygène (hypoxie), la glycolyse est alors la voie privilégiée. L'effet Warburg est l'utilisation de la glycolyse, même s'il y a de l'oxygène à disposition.

La choline a été décrite récemment comme un nutriment essentiel et est principalement absorbée avec l'alimentation, même si une partie peut être aussi recyclée dans l'organisme. L'apport de la choline est essentiel dans la cellule car elle possède deux rôles fondamentaux : elle peut être donneur de groupes méthyles et est également capable d'être à l'origine des phospholipides membranaires, grâce à un ensemble des réactions appelé « Kennedy pathway ». En oncologie, un intérêt particulier s'est récemment porté sur la choline suite aux analyses de *Glunde et al.* (2011) montrant que l'expression de différentes enzymes de la voie d'utilisation de la choline est augmentée dans différents types des cancers par rapport aux tissus sains. De manière très intéressante, avec un essai clinique en cours, une de ces enzymes, la Choline Kinase α , paraît être cible thérapeutique spécifique potentielle.

Contexte et objectifs de mes travaux de thèse

Le laboratoire dispose de différents modèles murins, dont je me suis servie pendant ma thèse : deux modèles d'inactivation hépatospecifique et inducible du gène *Hnf4a* et du gène *Apc*. APC est fondamental pour le recrutement de la β -caténine dans son complexe de dégradation, où elle va subir une première phosphorylation par la CK1 puis des phosphorylations par la GSK3. Ce signal de phosphorylations est essentiel pour conduire à la dégradation protéasomale de la β -caténine. Si APC n'est pas fonctionnel, la β -caténine n'est plus dégradée, elle peut transloquer dans le noyau, même s'il n'y a pas des signaux WNT à la membrane, et activer la transcription de ses gènes cibles.

Mon équipe d'accueil avait montré précédemment que la voie de signalisation WNT/ β -caténine était nécessaire pour établir et maintenir la zonation métabolique, condition préalable pour la fonctionnalité de l'organe, mais qu'elle est aussi cause d'un pourcentage non négligeable (11-32%) de carcinomes hépatocellulaires (CHC), qui surviennent après mutation activatrice du gène codant la β -caténine.

Mes travaux se sont inscrits dans la continuité de travaux auxquels j'ai participé, et ont eu pour principaux objectifs : (1) d'explorer le rôle du facteur de transcription Hnf4 α dans la physiologie et les cancers du foie, en lien avec la signalisation β -caténine ; (2) de déterminer si une imagerie tumorale par tomographie par émission de positrons (TEP) spécifique de la captation de choline pouvait prédire les CHC mutés pour la β -caténine et si le métabolisme de la choline pouvait présenter une piste diagnostique et thérapeutique des cancers du foie.

Premier projet : caractériser le rôle suppresseur de tumeur de Hnf4 α in vivo dans un modèle de cancérogenèse hépatique liée à la β -caténine

J'ai utilisé le modèle d'inactivation d'*Hnf4 α* et les expériences effectuées ont permis de confirmer que HNF4 α dans le foie adulte contrôle négativement la prolifération et l'accumulation des lipides dans l'organe. Mais de manière intéressante, j'ai également pu montrer qu'il intervient dans la maintenance de l'architecture et de l'organisation du tissu hépatique ; en effet, dans 1/4 des souris invalidées les triades portales sont désorganisées. La veine porte présente une sténose (son lumen est fortement réduit), il y a plus des canaux biliaires et le diamètre de l'artère hépatique est augmenté, mimant une pathologie humaine : « l'hypertension portale idiopathique ».

L'inactivation d'*Hnf4 α* a été aussi effectuée de manière focale pour tester son rôle dans la carcinogenèse hépatique (comme simple inactivation ou double avec la perte d'*Apc* dans les mêmes cellules), en sachant les résultats préliminaires dans la littérature précédemment énumérés dans le paragraphe « HNF4 α , un régulateur hépatocytaire majeur », qui suggèrent pour ce facteur de transcription un rôle de suppresseur de tumeur dans le foie.

Ce rôle suppresseur de tumeur était également attendu des données récentes obtenues dans l'équipe, puisque une approche thérapeutique anti miR-34a réalisée in vivo, avait permis de montrer que l'effet anti-tumoral obtenu sur les tumeurs β -caténine activées est orchestré pour partie par la restauration d'un niveau élevé d'Hnf4 α (qui est une cible de miR-34a). J'ai participé à ce travail publié dans Gut en 2015 : « Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in

liver cancer with β -catenin-mutations » de *Gougelet et al.* présent dans la section résultats de ce manuscrit.

Cependant, dans notre modèle les résultats sont différents. Nos expériences ont montré que dans un contexte de cancérogenèse liée à la suractivation de la voie β -caténine, la perte du facteur HNF4 α n'avait pas d'impact sur l'initiation ou la progression tumorale, ne les rendant pas plus précoces ou plus agressives.

Deuxième projet : Vers un diagnostic des tumeurs activées pour la β -caténine basé sur le métabolisme de la choline

Le modèle murin de cancérogenèse hépatique lié à l'inactivation d'*Apc* a également permis d'élucider certaines caractéristiques des cancers du foie activés pour la β -caténine. Dans les souris avec une inactivation totale hépatique, une dérégulation du métabolisme de lipides a été mise en évidence par une approche métabolomique. En effet, dans les foies de ces souris invalidées pour *Apc* on remarque une diminution de la quantité de triglycérides et en parallèle une augmentation des sphingolipides et des phospholipides, ces derniers lipides étant en grande majorité issus du métabolisme de la choline.

Le but de nos travaux de recherche n'est pas seulement d'acquiescer une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et la croissance tumorale hépatique mais également de contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de la voie de la choline sur des biopsies de patients atteints de carcinomes hépatocellulaires (muté ou pas pour la β -caténine) et sur notre modèle murin pour analyser les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Le TEP avec le F-choline est déjà utilisé en pratique clinique, comme aide au TEP plus classique avec le Fluoro-deoxyglucose (FDG), parce qu'il a été démontré que la sensibilité du TEP FDG est faible pour les cancers du foie et que l'utilisation de la F-choline permet une visualisation plus aisée des tumeurs. Nous avons entrepris, à la fois sur une cohorte de patients et sur nos modèles

murins transgéniques, une analyse de TEP (pour tomographie à émission de positrons), et avons cherché à établir une corrélation entre les tumeurs avec une hyperactivation de la β -caténine et l'hyperfixation par la tumeur de la F-choline.

Dans les tumeurs humaines, le statut mutationnel de la β -caténine a été confirmé par recherche des mutations sur l'ADN et par analyse d'expression de ces gènes cibles (Glutamine Synthetase et Axin2). J'ai ainsi obtenu 6 tumeurs mutées β -caténine et six non mutées. Or, toutes les tumeurs mutées β -caténine captaient activement la choline, alors que les non mutées étaient toutes négatives pour cette captation.

En ce qui concerne les modèles murins, en parallèle avec le modèle Apc mimant une cancérogenèse dépendante de la β -caténine, j'ai utilisé un modèle de cancérogenèse indépendant de la β -caténine : il s'agit de souris C57BL/6 injectées avec du Diethylnitrosamine 14 jours après la naissance qui développent des cancers du foie en six mois. Là encore, une hyperfixation de F-choline est spécifique du statut d'activation de la signalisation β -caténine. Aussi bien chez la souris que chez l'homme, cette hyperfixation s'accompagne de la surexpression d'ARNm permettant la synthèse d'enzymes et de transporteurs liés au métabolisme de la choline.

Nous avons ensuite procédé à une étude mécanistique. Nous avons effectué des expériences de flux avec la ^{14}C -choline, sur des cultures primaires de foie et sur des explants de tumeurs. Dans le cas d'une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine, les cultures et explants présentent une incorporation des groupements méthyles de la choline sur l'ADN, ainsi qu'une augmentation de la quantité de phospholipides, produits à partir de la choline.

Or parallèlement, la méthylation de l'ADN a été trouvée augmentée dans le foie des souris activés pour la β -caténine associée à une augmentation de la prolifération, ces deux phénomènes étant dépendants de la choline, puisqu'ils sont tous deux abolis quand les souris sont nourries avec un régime déficient en choline et méthionine.

Ces résultats sont extrêmement encourageants car ils montrent qu'un simple examen non invasif pourrait permettre un diagnostic génétique du cancer du

foie (détection du CHC muté β -caténine), permettant par la suite d'établir une stratégie thérapeutique ciblée et personnalisée.