



**HAL**  
open science

# Coopération oncogénique et effets métaboliques de FGF19 dans le carcinome hépatocellulaire

José Ursic Bedoya

► **To cite this version:**

José Ursic Bedoya. Coopération oncogénique et effets métaboliques de FGF19 dans le carcinome hépatocellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT003 . tel-03342548

**HAL Id: tel-03342548**

**<https://theses.hal.science/tel-03342548>**

Submitted on 13 Sep 2021

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2

Unité de recherche « VHC et Cancer » Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

## Coopération oncogénique et effets métaboliques de FGF19 dans le carcinome hépatocellulaire

Présentée par José URSIC BEDOYA  
Le 27 janvier 2021

Sous la direction du Dr Urszula HIBNER  
et du Pr Eric ASSENAT

Devant le jury composé de

Dr Urszula HIBNER, Directrice de recherche, IGMM Montpellier

Pr Eric ASSENAT, PU-PH, IGMM et CHU Montpellier

Dr. Chantal DESDOUETS, Directrice de recherche, Centre de Recherche des Cordeliers Paris

Dr Jean-Charles NAULT, MCU-PH, Centre de Recherche des Cordeliers Paris

Dr Damien GREGOIRE, Chargé de recherche, IGMM Montpellier

Dr Thierry TORDJMANN, Directeur de recherche, Faculté des sciences d'Orsay

Dr Hervé GUILLOU, Directeur de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique Toulouse

Dr Serge ROCHE, Directeur de recherche, CRBM Montpellier

Directrice

Co-directeur

Rapporteuse

Rapporteur

Co-encadrant

Examineur

Examineur

Président



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



## **Remerciements :**

### **Aux membres du jury,**

Dr Chantal DESDOUETS,

Vous avez accepté de participer à ce jury en tant que rapporteure et je vous suis très reconnaissant. Merci pour le temps et l'intérêt consacrés à mon travail. Merci également pour votre implication à l'AFEFE afin de garder des séances de recherche fondamentale de qualité.

Dr Jean-Charles NAULT,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur dans mon jury. Vous donnez l'exemple à suivre pour tous les cliniciens-chercheurs de la discipline, tout en restant très accessible. Merci pour le temps consacré à mon travail.

Dr Thierry TORDJMAN,

Je te remercie de faire partie du jury mais surtout de m'avoir transmis le goût pour la recherche (et les acides biliaries). Merci pour ta disponibilité et tes conseils.

Dr Hervé GUILLOU,

Je suis très reconnaissant que vous ayez accepté d'examiner mon travail de thèse. Les discussions que nous avons eues au sujet des FGF m'ont énormément aidé dans mon projet.

Dr Serge ROCHE,

Vous me faites l'honneur de présider la thèse et je suis très reconnaissant. Merci pour votre participation aux comités de thèse et vos remarques très constructives.

### **A mes encadrants,**

Éric,

Merci d'avoir accepté d'être co-directeur de thèse. Ton incroyable expertise dans le CHC et la cancérologie ont toujours été très utiles et ont permis de redresser le navire à plusieurs reprises. J'espère que l'on pourra construire de belles choses pour la discipline dans les années à venir.

Damien,

Je suis immensément reconnaissant envers toi pour ces années de thèse. Tu as toujours pris du temps pour me montrer comment faire les choses correctement (« une manip, un numéro ! »), sans jamais t'énerver. J'admire ta résilience, ta patience, ton sens critique et ta bienveillance (et



ton excellent goût musical !). Merci encore et j'espère qu'on ira un jour voir Arcade Fire ensemble !

Ula,

Je mesure à peine la chance que j'ai quand tu as accepté d'être ma directrice de thèse. Ton enthousiasme scientifique est contagieux et ta gentillesse au quotidien est remarquable. Sois assurée de ma profonde gratitude.

### **Aux UHL,**

J'ai été très chanceux de tomber dans une équipe aussi cool. Vous allez beaucoup me manquer (même si je ne compte pas vous lâcher tout de suite). Merci Carine pour ta bonne humeur et ton énergie. Cette thèse ne ressemblerait pas à grand-chose sans ta participation ! Merci Anthony pour ton humour (« c'est honteux »), ton calme, ton aide précieuse pour les manip et les discussions NFL. J'espère que tu vas te régaler pendant ton post-doc ! Par contre tu peux m'expliquer à quoi sert Twist dans le CHC s'il te plait ? (blague !). Merci Guillaume, ton arrivée dans le labo a été une véritable bouffée d'air frais. Tu es un mec en or que j'apprécie particulièrement. Tu as aussi tellement apporté pour mon projet en si peu de temps ! Et Marine, je n'ai pas trop eu le temps de te connaître mais tu as toujours été très à l'écoute et disponible. Je suis sûr que tu vas réussir une thèse excellente !

Merci aux anciens UHL, notamment Jackie (ta joie de vivre si démonstrative et ton franc-parler so not-british !), Katarina (ton calme et ton amabilité si appréciables), Christiane (je regrette que tu aies gardé un goût si amer pour ta fin de carrière mais sache que je t'appréciais beaucoup), Lucy (tu as énormément apporté au projet, quelle chance la mienne de pouvoir travailler avec toi au CHU pour de très nombreuses années encore je l'espère), Elsa (ojala algun dia me salga la tortilla tan rica como la tuya, jeje).

### **A l'IGMM,**

L'ambiance qui règne dans l'institut est excellente et je garderai de mémorables souvenirs de ce côté très familial. Je tiens à remercier le directeur Etienne SCHWOB, toujours très accessible et obligeant, mais également le personnel administratif, notamment le duo incomparable Françoise-Sarah pour leur rapidité et aide plus que précieuse ainsi que Suzelle pour sa patience.

Mon travail de thèse dépend énormément du bon fonctionnement de l'animalerie et je suis extrêmement reconnaissant envers le personnel de l'animalerie. Cédric, tu as toujours assuré pour nous filer un coup de main et j'apprécie beaucoup nos discussions (malgré cet accent et ces

expressions incompréhensibles de Toulousain). Merci également à Eve et Zoé pour leur amabilité et disponibilité, ainsi que Sarah.

Je tiens également à remercier tout le personnel de la plateforme d'histologie (Marine, Nelly Pirot et l'équipe du RHEM dans son ensemble), de la laverie, des plateaux d'imagerie et de MGX.

J'ai également pu rencontrer des personnes de grande qualité dans les autres équipes : Coraline (rébellion !), Iria, Marina, Marion, Ludo, Pedro, Geronimo, Sylvain, Michael, Conception, Valérie, Bénédicte.

Je tiens également à remercier le Pr PAGEAUX de me guider à travers cette longue et sinueuse route avec toujours autant d'humanité et compréhension.

Les derniers 18 mois passés à temps plein au labo n'auraient pas été possibles sans mes deux financeurs : merci à l'APEMAD (surtout Cathy !) pour les premiers mois avant que le SIRIC ne prenne le relais. Merci au Pr YCHOU et à Mme GUILLAUMON pour votre aide et disponibilité.

Merci également à Alexandra Elbakyan sans qui le travail de bibliographie aurait été encore plus pénible !

Enfin, tout cela n'aurait jamais été possible sans le soutien de ma famille. Merci à Madeleine et Jean-Pierre pour votre infinie gentillesse avec moi, votre aide avec Matias, de m'avoir fait découvrir la Lozère et surtout d'avoir mis au monde votre merveilleuse fille.

Gracias Mami por tus palabras sabias y de consuelo tan útiles estos últimos meses. Te admiro y te extraño tanto! A mi papi, que seguro me sigue guiando desde el otro mundo, espero que estés orgulloso de tu hijo. A mis increíbles hermanas y hermano: Mechi, Ragulo y Angie, son lo máximo, los admiro tanto a los tres y no saben cómo muero de ganas de volver a verlos pronto! A mis sobrinas Manoni y Mathi, gracias por sus sonrisas que calientan el corazón!

Gracias a mi Mati travieso, eres mi inspiración, gracias por hacerme recordar cuales son las cosas verdaderamente importantes en la vida.

Et bien sûr, merci à l'amour de ma vie sans qui ma vie serait bien fade. Merci pour ton soutien inconditionnel, surtout lors des derniers mois si particuliers. Hâte de vivre de nouvelles aventures à tes côtés !



## Table des matières

I.	Introduction .....	12
A.	Le carcinome hépatocellulaire .....	12
1.	Généralités.....	12
2.	Génomique du CHC .....	17
3.	Modèles murins de carcinogénèse hépatique.....	21
B.	La NASH ou MAFLD .....	32
1.	Généralités.....	32
2.	Liens entre NAFLD et CHC .....	34
3.	Modèles murins de NAFLD/NASH.....	39
C.	FGF19 (Fibroblast growth factor 19).....	43
1.	Sous-famille des FGF endocrines .....	43
2.	L'axe acides biliaires/FXR/FGF15-19/FGFR4-KLB .....	45
3.	Voies de signalisation cellulaire activées par les FGF endocrines.....	46
4.	Effets métaboliques .....	49
5.	Effets oncogéniques .....	52
6.	Ciblage de la voie FGFR4 : une thérapie prometteuse .....	55
D.	Contexte et objectifs .....	56
II.	Résultats.....	58
A.	Mise au point de la technique HGT .....	58
1.	Lorsque plusieurs plasmides sont injectés simultanément, les hépatocytes transfectés intègrent-ils tous les plasmides ? .....	58
2.	Lorsqu'une deuxième injection hydrodynamique est réalisée à 2 semaines d'intervalle, est-ce les mêmes hépatocytes qui sont transfectés ?.....	59
3.	Est-il intéressant d'introduire la luciférase Firefly pour réaliser un suivi non invasif de la croissance tumorale ?.....	60
4.	Peut-on dissocier les cellules tumorales issues des HGT pour ensuite les mettre en culture, les caractériser et réaliser une allogreffe orthotopique ? .....	61
5.	Quelles sont les combinaisons oncogéniques qui donnent lieu à des tumeurs ? .....	62
B.	Article 1 : FGF19 stimulates water intake.....	65
C.	Article 2: FGF19 cooperates with MYC to promote hepatic carcinogenesis.....	82

D.	Résultats non intégrés dans un des manuscrits.....	108
1.	Régimes utilisés et caractérisation des effets .....	108
2.	Phénotype obtenu avec les régimes HF-CD et WD .....	109
3.	Les tumeurs Ras + crispr p53 ne se développent pas davantage dans un contexte de régime NASH.....	109
4.	FGF19 renverse les effets de régimes pourvoyeurs de NASH..	111
5.	Le régime WD accélère la croissance des tumeurs MYC/FGF19/Cr p53	113
III.	Discussion .....	115
A.	Remarques générales.....	115
B.	Modèles utilisés.....	116
C.	Effets métaboliques de FGF19 .....	116
D.	Effets oncogéniques de FGF19.....	120
IV.	Références .....	125
V.	Annexes.....	152
A.	Papier CDK8.....	152

## Abréviations

AAV2	Adeno-associated virus 2
AB	Acides biliaires
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFB1	Aflatoxine B1
AFP	Alpha foetoprotéine
AGRP	Agouti-related peptide
AKT	Protein kinase B
ALAT/ALT	Alanine aminotransférase
APC	Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor
Arid1a	AT-rich interaction domain 1a
ARID2	AT-Rich Interaction Domain 2
BFP	Blue fluorescent protein
CAR	Constitutive androstane receptor
cccDNA	Covalently closed circular DNA
CCl4	Tetrachloride de carbone
CCNA2	Cycline A2
CCND1	Cycline D1
CCNE1	Cycline E1
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A,
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CREB	cAMP response element binding protein
Crispr/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins
CTGF	connective tissue growth factor
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTNNB1	Catenin beta 1
CYP2E1	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1
CYP7A1	Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns
DDR	DNA Damage Repair
DEN	Diethylnitrosamine
DUSP6	Dual Specificity Phosphatase 6
EGF	Endothelial growth factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FGF15	Fibroblast growth factor 15
FGF19	Fibroblast growth factor 19
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FGF23	Fibroblast growth factor 23
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FL-N/35	Full-Length polyprotein
FRS2a	Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2
FVB	
FXR	Farnesoid X receptor
GFP	Green fluorescent protein
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
HFA	Hollow Fiber Assay

HF-CD	High fat choline deficient
HGT	Hydrodynamic Gene Transfer
HOMA-IR	Homeostatic model assessment insulin resistance
Il-6	Interleukine 6
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
KLB	Beta-klotho
KMT2B	Lysine Methyltransferase 2B
KO	Knock-out
LPS	lipopolysaccharide
LTBR	Lymphotoxin- $\beta$ receptor
MAFLD	Metabolic Associated Fatty Liver Disease
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MBOAT7	membrane-bound O-acyltransferase domain containing 7
MCD	Methionin-cholin deficient
MLL4	mixed-lineage leukemia 4
MST1/2	Macrophage Stimulating 1/2
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
NFKB	Nuclear Factor Kappa B
NPY	Neuropeptide Y
NS5B	Nonstructural protein 5B
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PD-1	Programmed death 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PDX	Patient-Derived Xenograft
PGC1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$
PI3K	Phospho-inositol 3 kinase
PLC $\gamma$	Phospholipase C Gamma
PNPLA3	patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RFP	Red fluorescent protein
ROS	Reactive oxygen species
RXR	Retinoid X Receptor
SB	Sleeping Beauty
SCID	Severe Combined Immune-Deficient
SHP	small heterodimer partner
shRNA	short-hairpin RNA
SLC7A2	Solute Carrier Family 7 Member 2
SOX18	SRY-Box Transcription Factor 18
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein-1c
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
TERT	telomerase reverse transcriptase
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TLR	Toll like receptor
TNFSF10	TNF Superfamily Member 10

TP53	Tumor protein 53
T $\beta$ MCA	Tauro- $\beta$ -muricholic acid sodium
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHB	Virus de l'hépatite C
VHC	Virus de l'hépatite B
VLDL	Very low density lipoprotein



# I. Introduction

## A. Le carcinome hépatocellulaire

Les éléments épidémiologiques et ceux relatifs aux traitements seront traités brièvement, alors que les modèles murins de carcinome hépatocellulaire, et notamment le modèle utilisé pour mon projet de thèse seront abordés de façon plus détaillée.

### 1. Généralités

#### a) *Epidémiologie et histoire naturelle*

Le cancer primitif du foie est diagnostiqué chez près de 840000 individus et est responsable de près de 780000 décès par an dans le monde, ce qui le situe au 6<sup>ème</sup> rang en incidence et au 3<sup>ème</sup> rang en mortalité parmi l'ensemble des cancers (Bray et al. 2018). Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est l'histologie la plus fréquente chez l'adulte, elle représente près de 80% des cas, loin devant le cholangiocarcinome intra-hépatique (15% des cas) et d'autres types histologiques plus rares. La répartition à travers le monde est très hétérogène (figure 1), avec en queue de peloton la Mongolie, dont les taux d'incidence standardisés pour l'âge sont quatre fois supérieurs à ceux des pays voisins (Bray et al. 2018).

L'hétérogénéité de cette répartition géographique s'explique principalement par l'exposition dans les pays les plus touchés aux facteurs de risque de CHC que sont l'aflatoxine B1 et l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (surtout en cas de transmission materno-fœtale ou pendant l'enfance (Yuen et al. 2018)). Cependant, dans les pays au mode de vie occidental on observe une hausse dans l'incidence standardisée de CHC malgré la quasi-absence d'exposition à l'aflatoxine B1 et la vaccination très répandue contre le VHB (El-Serag and Rudolph 2007). Cette progression s'explique par l'augmentation de l'exposition à d'autres facteurs de risque, à savoir l'alcool et les maladies métaboliques (obésité, diabète de type 2) impliquées dans la NAFLD (Estes et al. 2018).

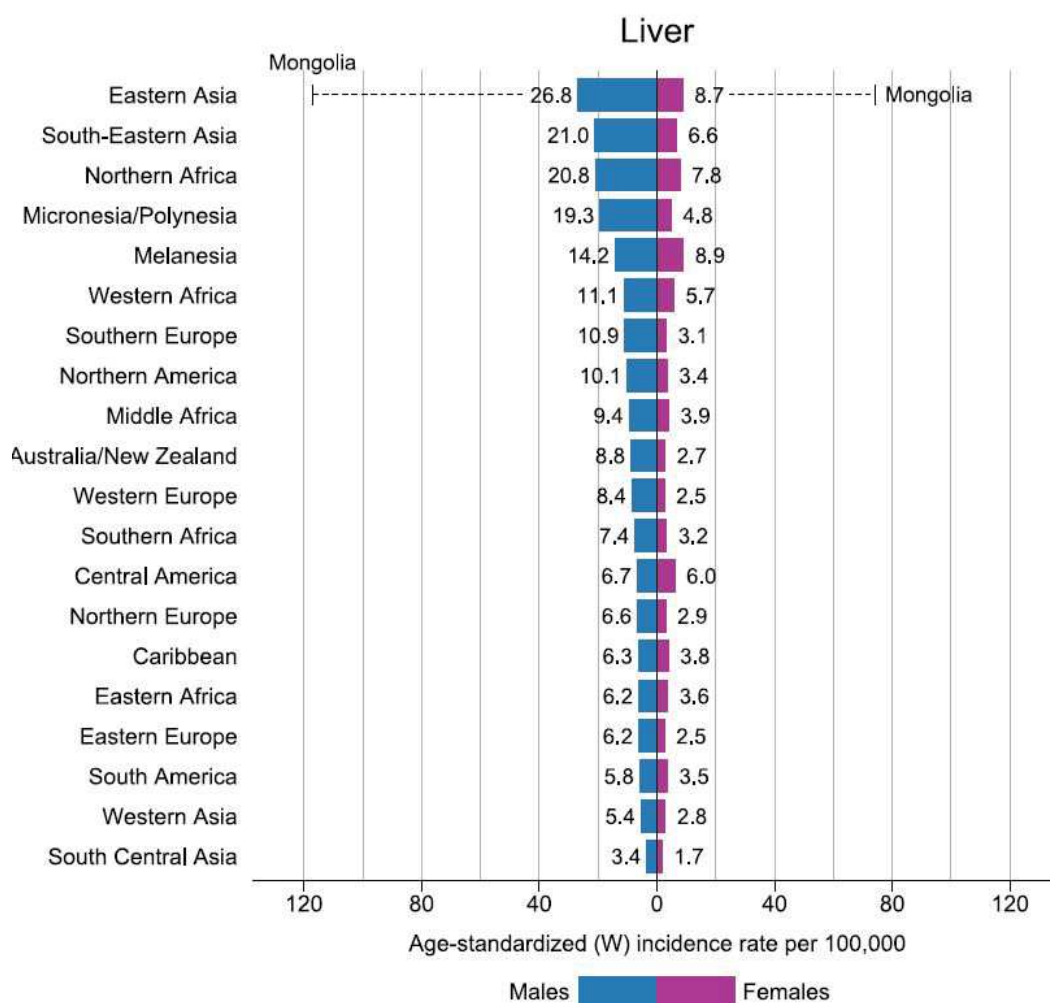


Figure 1 : taux d'incidence standardisés pour l'âge de cancers primitifs du foie selon les différentes régions du monde, d'après Bray et al, 2018.

## b) Facteurs de risque

### (1) Environnementaux

Les aflatoxines sont une classe de mycotoxines cancérigènes produites par le champignon *Aspergillus* et sont connues pour contaminer une partie de l'approvisionnement alimentaire mondial. L'aflatoxine B1 (AFB1) est le plus puissant de ces composés et a été bien caractérisée pour conduire au développement de CHC. Les conditions de température et d'humidité élevées favorisent la croissance des champignons, de sorte que les pays qui connaissent ces conditions environnementales, à savoir l'Afrique subsaharienne et l'Asie du Sud-Est, connaissent souvent une plus grande contamination. L'absence de possibilité de stocker les récoltes dans des endroits secs et à température modérée favorise également l'infection par des champignons producteurs d'AFB1 (Yan Liu and Wu 2010). On estime que l'AFB1 est l'agent causal de près de 28% des cas de CHC dans le monde. L'AFB1 est métabolisée par le système enzymatique cytochrome p450 hépatique et certains de ses métabolites favorise la production d'adduits de l'ADN (Rushing and Selim 2019) qui à leur tour peuvent induire des

mutations. Ainsi, l'exposition à l'AFB1 est associée à une mutation du gène Tp53 (R249S) qui permet un gain de fonction de p53(H. Wang et al. 2019). p53-R249S est la principale mutation identifiée dans 30 % des CHC mutés p53, et dans plus de 96 % des CHC dans les régions à haut risque(Hussain et al. 2007; L.-N. Qi et al. 2015). Même si l'AFB1 est carcinogène *per se*, il a été démontré un effet synergique avec le virus de l'hépatite B (Kew 2003) et dans une moindre mesure avec le virus de l'hépatite C (Chu et al. 2018).

La consommation chronique d'alcool serait responsable de près de 30% des décès dus au CHC dans le monde, avec une incidence plus élevée dans les pays d'Europe de l'Est (jusqu'à 60% des cas (Abbafati et al. 2020)). Même si le risque de cancer est augmenté pour des consommations quotidiennes minimales (10g/jour soit un verre de vin), le risque de développer un CHC apparaît uniquement pour des consommations importantes et en présence d'une fibrose hépatique modérée à sévère(Ganne-Carrié and Nahon 2019). Pour les patients ayant une cirrhose alcoolique le risque annuel de développer un CHC varie sensiblement en fonction des études, allant de 0.7% à 2.9% (Jepsen et al. 2020; Ioannou et al. 2019; Ganne-Carrié et al. 2018). En dehors de favoriser la fibrose hépatique et la cirrhose, ce qui constitue des lésions pré-cancéreuses, d'autres mécanismes sont directement impliqués dans l'effet oncogénique de l'alcool. L'éthanol est dégradé en acétaldéhyde dans le cytosol des hépatocytes. L'acétaldéhyde est un composé hautement réactif et directement mutagène suite à la formation d'adduits à l'ADN qui nuisent à la réparation de l'ADN, la peroxydation des lipides et des lésions mitochondriales, l'ensemble favorisant la transformation maligne(Ganne-Carrié and Nahon 2019). De même, le métabolisme de l'éthanol augmente le stress oxydatif des hépatocytes par la production accrue de ROS(Teschke 2018). Enfin, les métabolites oxydatifs (acétaldéhyde, ROS) générés par le métabolisme de l'alcool peuvent induire des changements épigénétiques par le biais d'altérations du métabolisme du folate, un composant essentiel de la synthèse et de la méthylation de l'ADN(Seitz and Stickel 2007).

Un autre facteur environnemental majeur impliqué dans l'hépatocarcinogénèse est celui de la NAFLD, cet aspect sera détaillé dans le chapitre dédié à cette pathologie.

## (2) Infectieux

Les deux virus hépatotropes capables d'infecter de façon chronique leurs hôtes humains immunocompétents, à savoir le virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC) sont les deux principaux facteurs de risque infectieux de CHC.

Le VHB infecte de façon chronique près de 3.5% de la population mondiale, soit 257 millions d'individus selon une estimation de l'OMS datant de 2015(World Health Organization 2017). La plupart de ces individus ont contracté le virus avant que le vaccin antiviral B soit disponible. Ce vaccin

a démontré une réduction de l'incidence de CHC et la mortalité liée à ce cancer(Chang et al. 1997). Le virus de l'hépatite B est le représentant humain des *Hepadnaviridae*. Il s'agit d'un virus enveloppé de 44 nm dont le génome est constitué par un ADN circulaire double brin de 3200 nucléotides(Seto et al. 2018). Peu après l'infection, l'ADN du VHB est converti en un ADN circulaire fermé par covalence (ou *cccDNA* pour *covalently closed circular DNA*) qui s'accumule dans le noyau des cellules infectées sous la forme d'un épisode stable organisé en structures nucléosomales(Levrero et al. 2009). Comme pour toute cause de maladie hépatique chronique, le VHB favorise le développement du CHC via la progression fréquente vers la cirrhose. Ceci étant dit il existe suffisamment d'arguments pour affirmer l'effet pro-oncogène du VHB même en l'absence de cirrhose. Les mécanismes oncogéniques directs sont multiples. L'intégration de l'ADN viral promeut l'instabilité génomique chez l'hôte et provoque également une mutagénèse insertionnelle (dans TERT, CCNE1 ou MLL4) semblable à celle d'un rétrovirus. Les protéines virales (HBx, HBc et preS notamment) sont également capables d'affecter les fonctions cellulaires, activer diverses voies de signalisation oncogéniques et sensibiliser les cellules du foie aux mutagènes (revu dans (Levrero and Zucman-Rossi 2016)). Enfin, la co-infection avec le virus delta (VHD) accélère la progression vers un CHC, par des mécanismes moléculaires qui restent à élucider (Puigvehí et al. 2019).

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus enveloppé à ARN de 60 nm appartenant à la famille des *Flaviviridae*. On estime qu'il y a 71 millions d'individus infectés par le VHC dans le monde (Spearman et al. 2019) et en France près de 70000 personnes infectées ignorent leur statut virologique(Brouard et al. 2015). Environ 10 à 20 % des personnes atteintes d'une infection chronique par le VHC développent des complications, notamment une cirrhose décompensée et/ou un carcinome hépatocellulaire, sur une période de 20 à 30 ans. Le risque de développer un carcinome hépatocellulaire sur 5 ans varie de 1 % chez les personnes sans fibrose hépatique à 13 % chez celles atteintes de cirrhose(Bruden et al. 2017). D'autres facteurs, tels que la co-infection virale B, le diabète, la stéatose hépatique, l'infection par le génotype 3, une forte consommation d'alcool, un âge avancé ou une thrombopénie augmentent également le risque individuel de CHC(Spearman et al. 2019). Il est attendu que le traitement par antiviraux à action directe, efficaces pour guérir l'infection virale dans plus de 95% des cas, diminue profondément l'incidence de nouveaux cas de CHC liés au VHC, mais cela prendra encore plusieurs années. Les CHC survenant dans un contexte de VHC chez l'homme sont avant tout une conséquence de l'accumulation de processus inflammatoires et fibrogéniques. Cependant, des effets pro-oncogéniques directs ont été mis en évidence également, aussi bien via l'action du virus sur sa cellule hôte

que par le biais de la réponse antivirale déclenchée par l'infection (McGivern and Lemon 2011).

Enfin, le virus AAV2 (*Adeno-associated virus 2*), un virus à ADN défectueux, a été associé au développement de CHC sur foie non cirrhotique suite à une mutagenèse insertionnelle dans plusieurs gènes impliqués dans le CHC (TERT, CCNA2, CCNE1, TNFSF10 et MLL4(J.-C. Nault et al. 2015; La Bella et al. 2020)).

### c) Traitements

Une des particularités du CHC par rapport à d'autres cancers solides vient du fait que la majorité des cas survient dans un contexte de foie cirrhotique. La cirrhose constitue non seulement une condition pré-cancéreuse mais elle limite souvent le traitement du fait de l'insuffisance hépatique qu'elle occasionne. Malgré des avancées thérapeutiques récentes, la survie à 5 ans des patients atteints de CHC ne dépasse pas 25% (Yan et al. 2017). Lorsque le CHC est découvert à un stade précoce, à savoir une tumeur unique de moins de 3cm sans atteinte vasculaire chez un patient ayant une fonction hépatique et un état général préservés, un traitement curatif peut être proposé(Villanueva 2019). Néanmoins, cela ne concerne que moins de 20% des patients(Galle et al. 2018).

#### (1) Curatifs

La survie à 5 ans lorsqu'un traitement curatif peut être proposé excède 70%. Ces traitements sont les suivants : résection chirurgicale, ablation par radiofréquence ou transplantation hépatique.

Lorsque le CHC survient dans un foie non cirrhotique, la résection chirurgicale est le traitement à privilégier(Lang et al. 2005). En revanche, dans un contexte de cirrhose le choix entre ces différents traitements dépend principalement de la fonction hépatocellulaire et la présence d'une hypertension portale cliniquement significative. Ainsi, la résection hépatique, surtout lorsqu'elle est considérée majeure (intéressant au moins trois segments hépatiques), comporte une morbi-mortalité élevée chez les patients ayant une hypertension portale(Citterio et al. 2016), auquel cas la radiofréquence doit être privilégiée. Il s'agit d'une procédure médicale dans laquelle une partie du système de conduction électrique de la tumeur est ablatée à l'aide de la chaleur générée par un courant alternatif à moyenne fréquence. Dans une série de 162 patients cirrhotiques traités par radiofréquence en première ligne, la survie globale à 5 ans était de 67.9% avec une survie sans récurrence à 25.9%(D. H. Lee et al. 2014).

La transplantation hépatique, réservée uniquement aux CHC survenant dans des foies cirrhotiques, offre l'avantage de traiter à la fois la tumeur et la cirrhose. Les résultats sont excellents (survie à 5 ans>70%), à condition de respecter certaines limites de taille, nombre de lésions et taux circulants d'alphafoetoprotéine (Duvoux et al. 2012; F. Y. Yao et al. 2015; Mazzaferro

et al. 2018). La principale limite est évidemment liée à la pénurie d'organes, obligeant à prioriser l'accès à la transplantation hépatique (Ubel et al. 2001).

Enfin, deux autres traitements radiologiques, à savoir la chimio-embolisation intra-artérielle et la radiothérapie interne sélective, se situent à l'interface entre les traitements curatifs et palliatifs. En effet, ces traitements peuvent dans certains cas permettre un *downstaging* permettant au patient d'accéder à un traitement considéré curatif.

## (2) Palliatifs

Historiquement, la recherche de traitements systémiques pour le CHC a longtemps été limitée pour diverses raisons (tumeur réputée peu chimio sensible, insuffisance hépatique associée). L'autorisation du sorafénib en 2007 (Llovet et al. 2008), un inhibiteur de récepteur tyrosine kinase multi-cible, comme premier traitement systémique validé du CHC, a donné lieu alors à une période de recherche clinique importante. Cependant pendant près de 10 ans il n'y a eu aucune nouvelle molécule ayant pu dépasser le stade d'essai clinique de phase 3. Depuis 2017, la situation évolue de manière positive et rapide avec de nouvelles options thérapeutiques en deuxième ligne : le regorafénib (inhibiteur de récepteur tyrosine kinase multi-cible (Bruix et al. 2017)), le cabozantinib (inhibiteur de récepteur tyrosine kinase multi-cible (Abou-Alfa et al. 2018)) et le ramucirumab (anticorps monoclonal anti-VEGFR2 (A. X. Zhu et al. 2019)), mais aussi en première ligne de traitement avec le lenvatinib (inhibiteur de récepteur tyrosine kinase multi-cible (Kudo et al. 2018)). Pourtant, la plus grande avancée thérapeutique récente concerne l'essai clinique de phase III positif comparant en première ligne de traitement le sorafénib à la combinaison atezolizumab (un anticorps monoclonal anti-PD-L1, *Programmed death ligand 1*) et bevacizumab (un anticorps monoclonal anti-VEGF (Finn et al. 2020)).

La combinaison atezolizumab-bevacizumab est la première combinaison à avoir montré son efficacité dans le CHC et il y a actuellement de nombreux essais cliniques testant une combinaison entre des inhibiteurs de checkpoint immunitaire (anticorps dirigés contre PD-1, PD-L1 ou CTLA-4) et des inhibiteurs de récepteur tyrosine kinase multi-cible ou des anti-angiogéniques (anticorps anti-VEGFR ou anti-VEGF).

## 2. Génomique du CHC

### a) Généralités

Le CHC est un groupe de tumeurs hétérogènes. Des récents travaux génomiques ont permis de classer schématiquement les tumeurs en deux groupes en fonction de leur paysage mutationnel, les profils de l'expression génique et des caractéristiques physiopathologiques (revu dans (Rebouissou and Nault 2020)). Cette classification identifie deux grandes



catégories de CHC, appelées « classe proliférative » et « non-proliférative » (figure 2). La classe « proliférative » comporte des tumeurs peu différenciées, agressives, caractérisées par une dérégulation de cascades de signalisation de la prolifération et de la survie cellulaire. La classe « non-proliférative » se caractérise par des tumeurs mieux différenciées, moins agressives, souvent avec l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et/ou de l'inflammation. Nous allons par la suite explorer certaines anomalies génétiques (mutations ou altération du nombre de copies) fréquemment retrouvées dans les CHC humains.

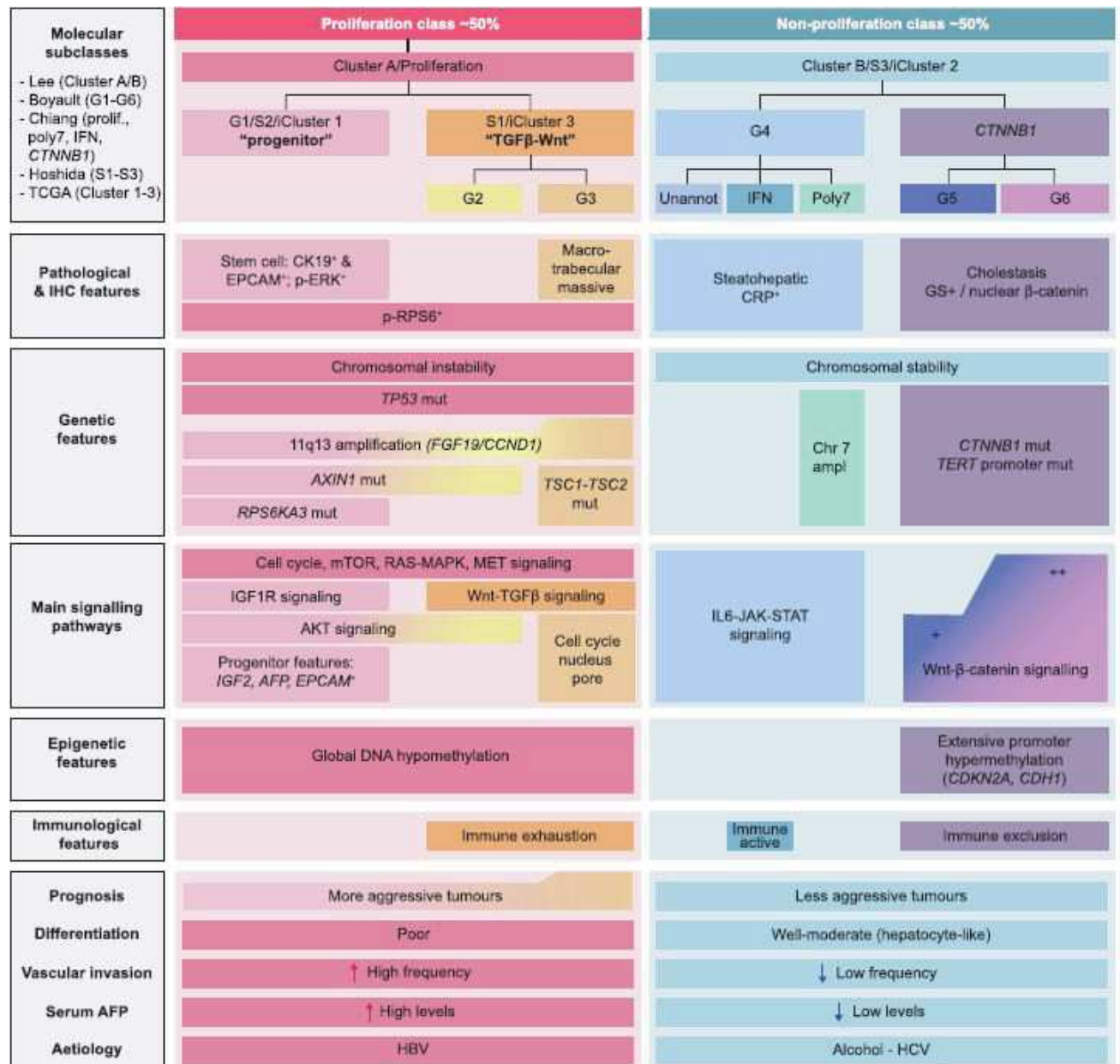


Figure 2 : Classification des CHC prenant en compte les caractéristiques moléculaires et anatomo-pathologiques. D'après Rebouissou et Nault 2020.

### *b) Télomères et télomérase*

Les télomères sont des régions hautement répétitives d'ADN non codant situées à l'extrémité des chromosomes. Ils sont responsables de la stabilité des chromosomes, en empêchant une perte d'information génétique dans chaque division cellulaire. L'intégrité du télomère est maintenue par la télomérase TERT, une transcriptase inverse qui est activée dans un nombre très limité de types cellulaires. Les hépatocytes adultes n'expriment pas TERT. Dans un contexte de maladie hépatique chronique, les hépatocytes exposés à des agressions voient leurs télomères se raccourcir. L'absence d'activité de la télomérase favorise la senescence de ces cellules, ce qui favorise l'évolution vers une cirrhose, état prédisposant à la formation d'un CHC. Au cours de l'hépatocarcinogénèse, la réactivation de la télomérase est nécessaire pour permettre une immortalisation de la cellule, étape clé dans la transformation maligne. Plus de 90% des CHC humains présentent une réactivation de la télomérase selon plusieurs mécanismes décrits (J. C. Nault et al. 2019). Il est intéressant de noter que ces phénomènes sont mutuellement exclusifs.

Le mécanisme le plus fréquent concerne la mutation activatrice du promoteur de TERT. Il s'agit de l'anomalie génétique la plus fréquemment retrouvée dans les CHC humains, avec une fréquence de près de 60% des cas (J. C. Nault et al. 2013). Les CHC d'étiologie virale B ont cette mutation sous-représentée (Y.-L. Chen et al. 2014), probablement en lien avec la capacité du VHB à activer le promoteur de TERT en s'insérant dans sa séquence génétique (J. C. Nault et al. 2013). Cette insertion de VHB dans la séquence de TERT est décrite dans près de 26% des CHC liés au VHB (Totoki et al. 2014; L.-H. Zhao et al. 2016; Sung et al. 2012). Ce phénomène de mutagénèse insertionnelle virale dans le promoteur de TERT est également décrit pour le virus AAV2 (J.-C. Nault et al. 2015). Enfin, des anomalies chromosomiques peuvent aussi induire une activation de TERT : il s'agit d'une amplification du gène codant pour TERT avec surexpression résultante de TERT dans près de 5% des cas (Totoki et al. 2014; Schulze et al. 2015; Letouzé et al. 2017) ou d'une fusion de TERT avec des gènes codant pour des membres de la famille des transporteurs de solutés tels que SLC12A7 et SLC7A2 décrits dans 3,6 % des échantillons de l'ensemble de données du « The Cancer Genome Atlas » (Barthel et al. 2017).

### *c) Voie Wnt/Beta-caténine*

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle essentiel dans l'embryogenèse, la zonation et le contrôle métabolique du foie en situation physiologique. Cette voie est une des plus fréquemment activées dans le CHC et plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cela. Par exemple, des mutations activatrices dans l'exon 3 du gène CTNNB1 codant pour la  $\beta$ -caténine sont détectées dans 15-25% des CHC, produisant une  $\beta$ -caténine mutée échappant à la phosphorylation et à la dégradation ultérieure (de La Coste



et al. 1998; W. Wang et al. 2017; Fujimoto et al. 2012). Par ailleurs, des mutations inactivatrices se produisant dans AXIN1 sont rapportées dans 10,4% des CHC (Sato et al. 2000), suivies par AXIN2 et APC, qui sont mutées dans 3,3% et 1,4%, respectivement (W. Wang et al. 2017). Les mutations de ces régulateurs négatifs donnent un phénotype différent des mutations activatrices de  $\beta$ -caténine mais diminuent tout de même la fonction biologique du complexe de destruction, favorisant ainsi l'accumulation de  $\beta$ -caténine. Il convient de noter que les mutations de CTNNB1 sont plus fréquentes dans les CHC liés au VHC (26,7%) et non viraux (21,1%) que dans les CHC liés au VHB (11,6%). Inversement, les mutations AXIN1 sont plus fréquentes dans les CHC liés au VHB (18 %) que dans les CHC liés au VHC (14 %) et non viraux (8 % (Perugorria et al. 2019)). Une hypothèse pour expliquer cette différence vient du fait que des facteurs étiologiques différents provoquent un microenvironnement local différent, qui exercerait une pression de sélection particulière favorisant un certain type de mutations.

En ce qui concerne les interactions épistatiques, il a été mis en évidence que les mutations activatrices de  $\beta$ -caténine sont associées aux mutations du promoteur de TERT ainsi qu'aux mutations de NFE2L2 et de ARID2 (Schulze et al. 2015).

#### d) *p53*

Plusieurs gènes de contrôle du cycle cellulaire possèdent une fonction de gènes suppresseurs de tumeurs dans le CHC. Un des plus étudiés est le gène *Tp53*, impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome et dont une mutation est présente dans 12-48% des cas (Fujimoto et al. 2012; Guichard et al. 2012; Hsu et al. 1991). Comme mentionné ci-dessus, dans les CHC humains on note une surreprésentation de la mutation faux-sens de la troisième base du codon 249 (AGG=>AGT) résultant en une substitution d'un acide aminé sérine par une arginine (ou  $p53^{R249S}$ ) et cette mutation survient dans un contexte d'exposition à l'AFB1 associée ou non à une infection par le VHB. Cette mutation confère un gain de fonction à *p53* via l'activation de *MYC* (Liao et al. 2017).

#### e) *Myc*

Le protooncogène *MYC*, homologue cellulaire humain du virus de la leucémie myéloïde aviaire, un oncogène rétroviral, est un facteur de transcription qui régule la prolifération cellulaire, contrôle l'expression de nombreux gènes et est impliqué dans la pathogenèse d'une pléthore de tumeurs solides, de leucémies et de lymphomes humains, ainsi que dans des tumeurs animales. *MYC* est un puissant oncogène mais, paradoxalement, il présente également une activité oncosuppressive en induisant l'apoptose et la sénescence cellulaire. L'analyse transcriptomique des nodules de régénération dans la cirrhose et les CHC précoces a mis en évidence que l'activation de *MYC* est impliquée dans le processus de

transformation maligne aux stades précoces et qu'au moins 30% des CHC ont une activation de cette voie (Kaposi-Novak et al. 2009). L'amplification du gène MYC concerne entre 6 et 17% des CHC(Ally et al. 2017) et l'activation de MYC est surreprésentée dans les CHC d'origine alcoolique et virale, contrairement à ceux liés à la NASH(Schlaeger et al. 2008).

### 3. Modèles murins de carcinogénèse hépatique

Il existe un grand nombre de modèles murins censés reproduire le CHC humain. Aucun modèle n'est parfait, mais en fonction de l'objectif d'un travail de recherche il existe des modèles plus adaptés que d'autres. Ainsi par exemple les modèles basés sur des xénogreffes de tumeurs établies à partir de patients (ou Patient-Derived Xenograft PDX) conviennent aux études servant à tester de nouvelles molécules. En revanche, l'étude des propriétés et des interactions oncogéniques d'un gène donné se prêtent à l'utilisation du modèle de transfection hydrodynamique des hépatocytes. Ce modèle est celui qui a été le plus utilisé pour mon projet et sera donc davantage détaillé dans la suite de cet exposé. Enfin, il est à noter qu'un des principaux reproches qui peut être formulé au sujet des modèles de CHC utilisant des souris c'est qu'ils surviennent quasiment tous dans un contexte de foie non cirrhotique, contrairement à la majorité des CHC humains.

#### a) Chimiques

Le rationnel de ces modèles réside dans le fait que le foie est un des principaux organes de détoxification de l'organisme, il est donc soumis à des concentrations élevées de substances devant être purifiées de l'organisme. Ainsi, l'exposition à certaines molécules génotoxiques peut créer des lésions touchant des oncogènes drivers, précipitant la formation de CHC. Les modèles chimiques induisent un paysage mutationnel riche et hétérogène.

##### (1) Diethylnitrosamine (DEN)

Un des plus anciens modèles de carcinogénèse hépatique est l'exposition au diethylnitrosamine (DEN), dont les premières descriptions datent des années 1960 (Magee 1971). Il s'agit d'un puissant agent hépatotoxique et mutagène. Le DEN stimule le cytochrome p450 hépatique, aboutissant à la formation de ROS (*Reactive Oxygen Species* (Y. Qi et al. 2008)). Plusieurs protocoles existent mais le DEN est généralement apporté par voie intrapéritonéale à 2 semaines de vie, moment propice en raison de la prolifération hépatocytaire observée à ce stade. Le fond génétique et le sexe de la souris déterminent en partie la latence et l'incidence de l'apparition de tumeurs hépatiques primitives. Les souris C57Bl/6 et BALB/c résistent davantage à la tumorigénèse induite au DEN, comparativement aux souris FVB ou C3H par exemple(Maronpot 2009). De même, les souris mâles ont une incidence d'apparition de tumeurs proche de 100%, alors qu'elle n'est que de  $\approx 30\%$  pour les femelles(Naugler et al. 2007). Cette différence

s'explique en partie par une inhibition œstrogénique de la sécrétion d'interleukine 6 (Il-6) par les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer) en réponse au DEN chez les femelles. Parmi les inconvénients de la méthode du DEN on peut citer la charge mutationnelle importante qu'elle induit mais intéressant des gènes peu représentés dans les CHC humains (*Hras, Braf, Egfr et Apc*(Connor et al. 2018)) ainsi que la latence longue d'apparition des tumeurs (en général plus de 10 mois(Maronpot 2009)). L'utilisation combinée de phénobarbital, un puissant inducteur du cytochrome p450, est efficace pour accélérer l'apparition de tumeurs, bien que le profil mutationnel s'en voit modifié avec une augmentation de la fréquence des mutations de  $\beta$ -caténine (Watson and Goodman 2002).

### (2) Tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>)

Le CCl<sub>4</sub> est une molécule hépatotoxique induisant le cytochrome p450, la formation de ROS, entraînant une activation des cellules étoilées hépatiques (fibroblastes activés du foie) et des cellules de Kupffer. L'exposition répétée à cette molécule n'entraîne pas directement de mutagenèse, mais elle aboutit à une fibrose hépatique sévère et étendue pouvant *in fine* résulter en l'apparition de CHC. Ce modèle a l'avantage de récapituler de façon plus fidèle le processus oncogénique de CHC sur foie cirrhotique. Néanmoins, la latence d'apparition des tumeurs est longue et variable(Dragani, Manenti, and Della Porta 1986). Le CCl<sub>4</sub> peut être combiné à une injection de DEN à 2 semaines de vie, ce qui accélère l'apparition de tumeurs(Dapito et al. 2012).

### (3) Aflatoxine B1

Un modèle d'exposition à l'AFB1 consistant à exposer les souris par une injection unique au 7<sup>e</sup> jour de vie permet d'obtenir des CHC à 12 mois. Il existe une différence de susceptibilité génétique, avec uniquement 27% des souris C57Bl/6J qui développent des tumeurs contrairement à 90% des souris DBA/2J(McGlynn et al. 2003). La principale critique à ce modèle vient du fait qu'il ne provoque pas de mutation de *Tp53*, événement majeur dans la carcinogénèse humaine induite par l'AFB1.

#### b) Souris génétiquement modifiées ou Genetically Engineered Mouse Models (GEMM)

Contrairement aux modèles chimiques, l'objectif est en général de définir la charge mutationnelle à l'origine de la formation de la tumeur. Il s'agit dans la majorité de cas de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs ou la surexpression d'un oncogène. Schématiquement on distingue les GEMM ayant une modification germinale ou hépato-spécifique, par transgénèse dirigée à l'aide du promoteur de l'albumine ou à l'aide de l'utilisation des mécanismes de recombinaison de type Cre-loxP et Cre-loxP-stop (Bouabe and Okkenhaug 2013). Pour la mutation germinale on peut citer par exemple les souris porteuses de l'allèle Z du gène de l'alpha 1 antitrypsine, provoquant l'apparition de tumeurs après 1-1.5 ans dans 100% des souris

(Geller et al. 1994), alors que pour le deuxième modèle un exemple très utilisé est celui des souris ayant une inactivation hépatique de la protéine PTEN (Phosphatase and tensin homolog), à l'origine de CHC après 44 semaines dans 66% des souris (Watanabe et al. 2007). On inclut également dans cette catégorie les modèles d'inflammation chronique responsables de CHC au long cours, dont certains seront détaillés par la suite.

### (1) Modèles d'hépatites virales B et C

Les hépatites virales chroniques B et C sont des facteurs de risque majeurs de CHC. Bien que ces deux virus n'infectent pas les souris, il existe des modèles murins exprimant les protéines virales impliquées dans la carcinogénèse hépatique.

Pour ce qui est du VHB, le premier modèle exprimait la protéine de surface (HBs), mais les souris étaient indemnes de lésion néoplasique (Chisari et al. 1985). Par la suite, le modèle avec surexpression de la protéine virale X (HBx) a apporté des arguments en faveur des effets oncogéniques directs du VHB, avec l'apparition de lésions d'hépatocarcinome dans 84% des souris mâles de fond génétique CD-1 entre 13 et 16 mois (Koike et al. 1994). De façon intéressante l'effet oncogénique est dose dépendant dans ce modèle. Par la suite, il a été montré grâce à des souris double transgéniques que HBx coopérait avec des oncogènes tels que *KRAS* (Ye et al. 2014) ou *C-Myc* (Terradillos et al. 1997) pour accélérer la tumorigénèse. Parmi les mécanismes oncogéniques de HBx, les hépatocytes des souris transgéniques FL-HBx ont une apparition précoce de noyaux polyploïdes ( $\geq 4n$ ) et des marqueurs de cellules progénitrices de cancer (Ahodantin et al. 2019). En revanche, 70% des échantillons tumoraux humains montrent plutôt une inactivation de HBx (Amaddeo et al. 2015).

Les modèles murins d'expression des protéines virales C apportent des arguments en faveur d'un effet oncogénique direct. Ainsi, dans les souris transgéniques FL-N/35 (pour *Full-Length polyprotein*), qui expriment la totalité de protéines du VHC spécifiquement dans les hépatocytes, on observe l'apparition de CHC dans 29% des souris mâles après 13 mois (Lerat et al. 2002) et ce malgré une stéatose isolée sans fibrose. Les hépatocytes exprimant les protéines virales (et notamment la polymérase NS5B) sont responsables d'une signalisation paracrine qui affecte les cellules environnantes via la synthèse de cytokines inflammatoires (Yu et al. 2012; Vegna et al. 2016; Simonin et al. 2013) et du ligand de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Moreau et al. 2015a).

## (2) Modèles de souris transgéniques récapitulant les principaux gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes

De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs dont le rôle était suspecté dans le CHC ont pu être étudiés grâce à des modèles murins. Une des voies les plus fréquemment dérégulées dans le CHC est celle de Wnt/ $\beta$ -caténine, que ce soit par une mutation activatrice de CTNNB1 ou une inactivation d'une protéine inhibant la dégradation de  $\beta$ -caténine. Ainsi, les souris ayant l'exon 14 du gène Apc (Adenomatous polyposis coli) flanqué par des séquences loxP (ou Apc<sup>lox/lox</sup>) qui reçoivent une injection faible dose d'adénovirus codant pour la Cre recombinase développent des CHC au bout de 9 mois dans 2/3 des cas (Colnot et al. 2004). Les CHC obtenus sont de morphologie trabéculaire, de différenciation variable mais montrent tous des signes d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, tels que le marquage à la glutamine synthétase en immunohistochimie. L'inconvénient de ce modèle est que les mutations inactivatrices d'Apc ne se rencontrent qu'exceptionnellement (1-2% des tumeurs) dans les CHC humains, alors que la voie est dérégulée dans près de 25% des cas (Zucman-Rossi et al. 2015). Concernant les souris ayant une induction hépato-spécifique d'une forme de  $\beta$ -caténine activée, elles développent une hépatomégalie mais pas de CHC (Harada et al. 2002). Il faut alors un deuxième événement oncogénique pour aboutir à une tumorigénèse, tels qu'une mutation activatrice de H-Ras (Harada et al. 2004) ou une injection de DEN (Nejak-Bowen et al. 2010).

Plusieurs modèles murins ont permis de mieux comprendre le rôle de p53 dans l'hépatocarcinogénèse. L'inactivation hépato-spécifique de p53 induit des carcinomes d'apparence mixte hépato-cholangiocytaires dans 80% des cas et d'aspect CHC dans 10% des cas, après 12-16 mois (Katz et al. 2012). Par ailleurs, la voie de signalisation du Rétinoblastome (Rb) est souvent altérée dans les CHC humains, que ce soit par une délétion de CDKN2A (2-12% (Guichard et al. 2012; Totoki et al. 2014)) ou une mutation du gène RB1 (3-8% (Ahn et al. 2014)). Expérimentalement, un modèle de triple KO de gènes de la famille de Rb1 par inactivation hépatospécifique de Rb, p107 et p130 provoque la formation de tumeurs dans 100% des souris après 3-4 mois (Viatour et al. 2011).

La voie de signalisation cellulaire PI3K/AKT/MTOR est dérégulée dans près de 10% des CHC humains, le plus souvent à travers une mutation inactivatrice de TSC1 et TSC2 (Schulze et al. 2015) et plus rarement par une mutation inactivatrice de PTEN. Le seul modèle murin représentatif de ces tumeurs est celui des souris PTEN *knock-out* hépato-spécifiques, responsables de CHC après 44 semaines dans 66% des souris (Watanabe et al. 2007).

Des mutations des gènes codant pour des modificateurs épigénétiques peuvent également favoriser l'apparition de CHC. En effet, ces modificateurs font partie de complexes dont le rôle est de modifier la structure de la chromatine et la position des nucléosomes. LA perte de fonction de certains de ces gènes est associé à la carcinogenèse et sont donc considérés comme des gènes suppresseurs de tumeurs. La protéine Arid1a (*AT-rich interaction domain 1a*) fait partie du complexe de remodelage de la chromatine et le gène correspondant est muté dans 4-17% des CHC humains (Guichard et al. 2012). L'inactivation hépato-spécifique de cette protéine n'induit pas directement de tumeur chez la souris, mais favorise la progression des tumeurs induites par le DEN par un mécanisme *non-cell autonomous* via l'induction de la sécrétion de l'angiopoïétine 2, résultant en une angiogénèse exacerbée (Hu et al. 2018). Dans ce modèle, les tumeurs répondent au sorafénib, inhibiteur multikinase ayant un effet anti-angiogénique. De façon similaire, l'inactivation hépatique de ARID2, un autre composant du complexe de remodelage de la chromatine, aboutit à une invasion accrue, avec des métastases pulmonaires plus fréquentes (Jiang et al. 2020).

Le modèle murin mTERC-null mice (déficient en la composante ARN de la télomérase (Blasco et al. 1997)) apporte des arguments supplémentaires en faveur du rôle de TERT dans la progression du CHC. En effet, ces souris ont une incidence et une croissance réduites des lésions tumorales dans différents scénarios oncogéniques, en lien avec une diminution des lésions à l'ADN et une augmentation de l'apoptose des cellules transformées (Lechel et al. 2007). Cependant, elles développent également des lésions pré-néoplasiques de bas grade plus fréquemment (Farazi et al. 2003). La télomérase a ainsi un rôle antagoniste sur l'initiation et la progression des lésions de CHC.

La voie de signalisation du facteur de transcription C-Myc est activée dans au moins 30% des CHC humains (Kaposi-Novak et al. 2009). Différents modèles de souris vont conforter le rôle causal de ce proto-oncogène. Le plus spectaculaire est celui de souris ayant une surexpression hépatique conditionnelle par le système Tet-off de Myc : les animaux non traités à la doxycycline développent tous des tumeurs agressives en moyenne 12 semaines après et ces tumeurs régressent rapidement après administration de doxycycline (Shachaf et al. 2004). De même, plusieurs modèles de coopération oncogénique impliquant Myc ont été développés, dont on peut citer ceux avec TGF- $\alpha$  (Santoni-Rugiu et al. 1996) ou p53 (Klocke et al. 2001).

### *c) Modèles basés sur la greffe de tissu ou cellules ; xénogreffes et allogreffes*

La définition d'une xénogreffe est la greffe d'une entité vivante (cellule, tissu ou organe) d'une espèce vers une autre. Dans le contexte de la recherche sur le CHC il s'agit généralement de la greffe de cellules



tumorales humaines dans une souris. Ces cellules peuvent être injectées en sous-cutané, intra-péritonéal ou orthotopique (directement dans le foie). Ces modèles sont largement utilisés pour tester le potentiel thérapeutique de nouvelles drogues en préclinique. Cependant, pour éviter un rejet de greffe, il est indispensable d'utiliser des souris immuno-déficientes, tout au moins pour la réponse immune acquise (Morton and Houghton 2007). Les principaux fonds génétiques utilisés dans ce contexte sont les souris *nude* (déficientes en lymphocytes T), les souris athymiques (pas de maturation des lymphocytes T), les souris SCID (pour *Severe Combined Immune-Deficient*, déficientes en lymphocytes B et T), et les souris Rag2 knock-out (pas de production de lymphocytes B et T matures).

Habituellement les cellules tumorales injectées sont issues de lignées tumorales utilisées dans des laboratoires à travers le monde, on peut citer par exemple les lignées *Hep3B* (CHC bien différencié, AFP positif(Knowles, Howe, and Aden 1980)) ou *HepG2* (hépatoblastome, AFP positif(Y. Li et al. 2001)). Plus récemment la méthode dite des xénogreffes dérivées de patients (ou PDX pour *Patient-Derived Xenograft*) a connu un essor considérable. Il s'agit d'une technique dont les premières descriptions datent des années 1970(Shimosato et al. 1976). Les PDX sont générées par la greffe de fragments de tumeur primaire ou les cellules cancéreuses dérivées de la tumeur du patient dans une souris immunodéprimée. Pour ce faire, les tumeurs des patients sont souvent obtenues directement à partir du bloc opératoire, sectionnées puis implantées dans les souris. Parfois, les sections de tumeur obtenues peuvent être traitées par des moyens mécaniques ou la digestion chimique avant la greffe. Les modèles sont ensuite entretenus en passant les tumeurs de souris à souris. Un fragment tumoral du patient est habituellement conservé pour être analysé et comparé aux tumeurs obtenues chez la souris.

Or, lorsque ce modèle est utilisé pour étudier une drogue dont l'effet pourrait passer par l'interaction avec le microenvironnement tumoral, l'immunodéficiences est problématique. Dans ce cas-là il convient alors d'utiliser un modèle syngénique (allogreffe de cellules ou tissu provenant de la même espèce), dont le principal avantage est celui de permettre d'étudier l'interaction entre les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral. Parmi les lignées les plus utilisées dans ce contexte on peut citer les *Hep 1-6*(Darlington et al. 1980) obtenues à partir de tumeurs dans des souris C57Bl/6.

Un avantage indéniable du modèle de xénogreffe orthotopique c'est la possibilité de réaliser la greffe sur un foie cirrhotique, obtenu préalablement par l'administration orale quotidienne de CCl4 pendant 12 semaines(Reiberger et al. 2015).

Enfin, dans un but de respect de la « règle des 3R » (Réduire, Remplacer, Raffiner) en recherche animale, le modèle des *Hollow Fiber Assay* HFA (ou test des fibres creuses) permet l'implantation de multiples fibres de polyfluorure de vinylidène, en une seule fois, chez une seule souris *nude*. Les lignées de cellules tumorales sont placées dans des fibres creuses semi-perméables. Les fibres sont placées dans un milieu de culture *in vitro* pendant 24-48 heures avant d'être implantées par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale. Après le rétablissement post-opératoire de la souris (3-4 jours), des drogues peuvent être administrées. Après quelques jours de traitement médicamenteux, la HFA est retiré chirurgicalement et les cellules survivantes sont récupérées pour être analysées afin de déterminer l'efficacité des médicaments (Hollingshead et al. 1995). Cette méthode a permis par exemple de tester l'effet du tyrosinase sur 5 lignées humaines de CHC en n'utilisant que 30 souris (X. L. Li et al. 2008).

#### d) *Modèle d'injection hydrodynamique*

Ce modèle, qui sera appelé HGT (pour *Hydrodynamic Gene Transfer*) par la suite, a été développé à la fin des années 1990 de façon quasi-simultanée par une équipe de l'université de Pittsburgh (F. Liu, Song, and Liu 1999) et une de l'université de Wisconsin (G. Zhang et al. 1997; G. Zhang, Budker, and Wolff 1999). Cette méthode se base sur l'injection dans la veine caudale de la souris d'un volume important d'une solution contenant des plasmides (ADN nu). La surcharge cardiaque droite passagère créée par l'injection permet un reflux sanguin dans les veines sus-hépatiques, élargissant les *fenestrae* endothéliaux et perméabilisant ainsi pendant quelques secondes une fraction des hépatocytes (figure 3).



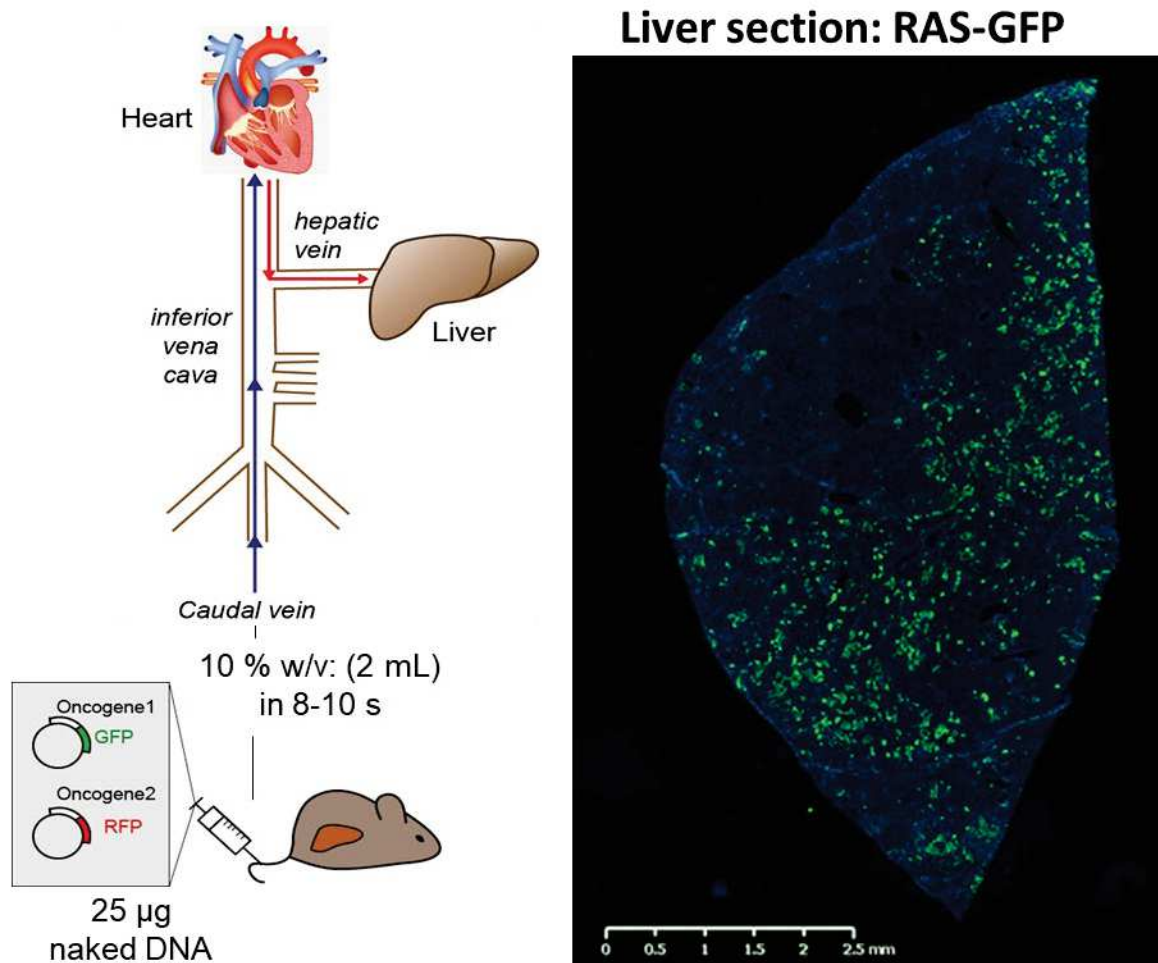


Figure 3: principe de l'injection hydrodynamique. Un volume large est injecté en quelques secondes dans la veine caudale puis par un mécanisme d'hyperpression se produit un reflux par les veines sus-hépatiques pour perméabiliser certains hépatocytes et permettre à la solution (contenant des plasmides) de pénétrer dans ces cellules. A droite, exemple de coupe de foie observée au microscope à épifluorescence montrant de très nombreux hépatocytes fluorescents suite à l'injection d'un plasmide fluorescent vert (GFP).

Les papiers *princeps* de cette méthode sont riches en enseignements pratiques. En effet, il apparaît que le volume idéal à injecter se situe entre 8 et 12% du poids de la souris (soit 0.1mL/g de poids). Le foie reçoit près de 1000 fois plus d'ADN que les reins, la rate, les poumons ou le cœur. De même, la pénétration de l'ADN dans le foie dépend du temps d'injection, avec une expression maximale de gènes introduits lorsque la solution est injectée en 5 secondes, une faible diminution lorsque l'injection dure 8 ou 15 secondes et une décroissance d'un facteur supérieur à 100 lorsque l'injection se fait en 30 secondes au lieu de 15. L'expression du transgène dépend de la quantité d'ADN injecté, avec un plateau atteint au-delà de 5µg. Cette injection peut induire une hausse modérée et transitoire des ALAT (alanine aminotransférase), traduisant une minime nécrose de certains hépatocytes. Par ailleurs, le principe physiologique du transfert hydrodynamique de gènes, où la solution arrive dans le lobule par la veinule hépatique cible presque exclusivement les hépatocytes situés dans la zone

acinaire 3 (c'est-à-dire ceux proches de la veinule hépatique (G. Zhang, Budker, and Wolff 1999)). Le principal inconvénient de cette méthode est celui de l'effet transitoire de la transfection : l'expression tissulaire maximale du transgène se situe 8h après l'injection, avant une décroissance rapide entraînant une expression décriue d'un facteur >1000 après 6 jours, probablement sous l'effet de la dégradation par des nucléases.

Pour que cette méthode devienne véritablement utile dans la recherche sur le CHC, il a fallu qu'elle soit combinée à un système permettant une expression stable des transgènes (Yant et al. 2000). Cette stabilité est possible notamment grâce à l'intégration dans le génome de la souris par un système de transposase *Sleeping Beauty* (SB) (Ivics et al. 1997). Ce système consiste en un transposon constitué d'une cassette d'expression génétique flanquée d'une séquence d'ADN spécifique de répétitions inversées et d'une source d'enzyme transposase (SB transposase) qui reconnaît cette séquence d'ADN. Au cours de la transposition médiée par la SB, la transposase SB excise le transposon de l'ADN plasmidique délivré et l'intègre dans l'une des  $\approx 10^8$  paires de bases dinucléotidiques TA dispersées dans le génome, garantissant ainsi l'insertion chromosomique quasi-aléatoire du transgène. L'insertion se produit rarement à l'intérieur d'une séquence codante (Vigdal et al. 2002). La combinaison HGT et transposase SB a initialement été utilisée pour corriger des anomalies métaboliques génétiques d'origine hépatique. Ainsi, l'injection d'un plasmide codant pour le facteur de coagulation VIII simultanément avec la transposase SB dans un modèle de souris d'hémophilie A ayant été préalablement rendues immunotolérantes au facteur VIII permet d'obtenir une sécrétion de ce facteur au-delà de 6 mois post-injection (Ohlfest et al. 2005).

La première utilisation de ce système pour obtenir un CHC chez la souris a été décrit en 2005 (Carlson et al. 2005). Dans cette étude, les auteurs ont introduit un mutant de RAS ( $NRAS^{G12V}$ ) dans des souris déficientes en p19Arf, un gène suppresseur de tumeurs. Les tumeurs apparaissaient 30-40 jours après injection dans 100% des homozygotes et après  $\approx 100$  jours dans 87,5% des hétérozygotes. Les tumeurs avaient un aspect de CHC avec parfois des caractéristiques de cholangiocarcinome, comme la présence de structures ductulaires. Certaines souris développaient également des petites lésions tumorales exprimant NRAS muté à proximité du site d'injection (à la base de la queue), mais il n'y avait pas de tumeurs dans s'autres organes (Carlson et al. 2005). Afin d'inactiver les gènes suppresseurs de tumeurs, la technique du Crispr/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins) en utilisant un guide ciblant un gène en particulier est efficace (Xue et al. 2014) et a progressivement remplacé l'utilisation de *short-hairpin RNA* (shRNA) dans cette application.

Depuis le premier papier de 2005, plusieurs dizaines d'articles ont été publiés en utilisant la technique d'injection hydrodynamique pour obtenir des tumeurs intra-hépatiques, résumés dans le tableau 1. Cette méthode constitue un excellent moyen d'étudier la potentielle coopération entre oncogènes/gènes suppresseurs de tumeurs, en utilisant beaucoup moins de ressources (animales, matérielles, financières et temporelles) que la génération de souris double transgéniques. De même, elle permet d'étudier l'interaction entre la tumeur et son microenvironnement chez des souris immunocompétentes, contrairement aux xéno greffes. Enfin, en permettant l'expression des transgènes dans seule une fraction des hépatocytes (moins de 10% en moyenne), elle récapitule le processus oncogénique dans le foie de façon plus physiologique que les modèles transgéniques classiques où tous les hépatocytes sont concernés. La preuve la plus convaincante de la validité de cette technique pour explorer le potentiel coopératif de deux oncogènes/gènes suppresseurs de tumeurs vient d'un papier publié récemment dans *Gastroenterology* par le groupe de A Lujambio (Molina-Sánchez et al. 2020). Dans ce papier, 23 combinaisons différentes ont été utilisées, dont la moitié avec c-Myc et l'autre moitié avec une mutation activatrice de CTNNB1. Parmi ces 23 combinaisons, 9 ont donné lieu à des tumeurs dans au moins 20% des souris en moins de 6 mois : MYC;sg-p53, MYC;sg-Kmt2b, MYC;sg-Kmt2c, MYC;sg-Pten, MYC;CTNNB1, MYC;sg-Axin1, CTNNB1;sg-Pten, CTNNB1;Tert, et MYC;Tert. La morphologie, l'infiltration stromale et les voies de signalisation cellulaire impliquées de ces tumeurs ont ensuite été analysées par histologie, cytométrie en flux et RNA-seq. Elles ont aussi été dissociées pour établir des lignées cellulaires, produisant ainsi un nouvel outil pour tester la réponse à différentes drogues.

Référence	Souris	Combinaison	Latence d'apparition des tumeurs	Commentaires
(Carlson et al. 2005)	Arf <sup>-/-</sup> ou Arf <sup>+/-</sup>	NRAS <sup>G12V</sup>	2 mois	Caractéristiques cholangiocytaires
(Tward et al. 2007)	FVB/N	c-Met et ΔN90-β-caténine	3 mois	
(S. A. Lee et al. 2007)	FVB/N	N-Ras <sup>G12V</sup> ou Spry2 <sup>Y55F</sup> et ΔN90-β-caténine	3 mois et 6 mois	
(Patil et al. 2009)	FVB/N	Cycline D1 et c-Met	6 mois	
(C. R. Xu et al. 2009)	FVB/N	N-Ras <sup>G12V</sup> et Bmi1	6 mois	
(S. A. Lee et al. 2010)	FVB/N	Spry2 <sup>Y55F</sup> et c-Met	6 mois	
(Calvisi et al. 2011)	FVB/N	Myr-AKT	6 mois	

(Stauffer et al. 2011)	FVB/N et C57Bl/6	Myr-AKT $\Delta$ N90- $\beta$ -caténine	et	1 mois	
(Fan et al. 2012)	FVB/N	Myr-AKT NICD	et	3 semaines	Cholangiocarcinome
(Chunmei Wang et al. 2012)	FVB/N	Myr-AKT Spry2 <sup>Y55F</sup>	et	3-4 mois	
(Chow et al. 2012)	FVB/N	C-Myc		6 semaines	Hépatoblastome
(Ho et al. 2012)	FVB/N	Myr-AKT et N-Ras <sup>G12V</sup>		3-4 semaines	Caractéristiques cholangiocytaires
(H. L. Ju et al. 2013)	C57Bl/6	N-Ras <sup>G12V</sup> shp53	et	1-3 semaines	Tumeurs indifférenciées
(Xue et al. 2014)	FVB/N	Crispr p53 et Crispr pTen	et	3 mois	Caractéristiques cholangiocytaires
(Tao et al. 2016)	FVB/N	h-Met et $\beta$ -caténine muté (S33Y ou S45Y)		2-3 mois	
(Engelholm et al. 2017)	FVB/N	Crispr entraînant une fusion Dnajb1-Prkaca		14 mois	CHC fibrolamellaire
(Yongzhen Liu et al. 2017)	Souris HBV (C57-Tg(HBV Alb-1)Bri44)	Crispr p53 ou Crispr Pten	ou	7 mois	
(C. Q. Song et al. 2017)	P53 <sup>-/-</sup> hépatique	C-Myc et Nf1		1 mois	
(Z. Xu et al. 2018)	FVB/N	Crispr pTen et c-Met	et	3 mois	
(J. J. Liu et al. 2018)	C57Bl/6	c-Met et PIK3CA <sup>H1047R</sup>	et	3 mois	
(Qiao et al. 2019)	FVB/N	c-Met et crispr AXIN1		2-3 mois	
(Ruiz de Galarreta et al. 2019)	C57Bl/6	C-Myc et crispr p53 ou $\Delta$ N90- $\beta$ -caténine		1 mois	
(F. Wang et al. 2020)	C57Bl/6	$\Delta$ N90- $\beta$ -caténine et c-Met		2-3 mois	
(Molina-Sánchez et al. 2020)		9 combinaisons		Variable	Cf détail dans le texte

## B. La NASH ou MAFLD

### 1. Généralités

#### a) Définition et nomenclature

La première description d'une maladie ayant toutes les caractéristiques histologiques d'une maladie du foie liée à l'alcool (stéatose macrovésiculaire, hépatite lobulaire, nécrose focale avec infiltrats inflammatoires mixtes, corps de Mallory-Denk et fibrose d'étendue variable) survenant chez des sujets ne consommant pas d'alcool date de 1980 (Ludwig et al. 1980). Cette nouvelle pathologie a été nommée, par défaut, stéatohépatite non alcoolique (ou NASH pour son acronyme en anglais, *Non Alcoholic SteatoHepatitis*). Suivant la même logique, quelques années plus tard la forme syndromique non inflammatoire et à prédominance stéatosique a été baptisée NAFLD (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) (Schaffner and Thaler 1986)). Contrairement à ce qui s'est passé avec l'hépatite virale C, initialement appelée hépatite non-A non-B mais dont le nom a rapidement été changé après la découverte de l'agent causal, et ce malgré des débats réguliers au sein de la communauté hépatologique, une nouvelle appellation n'a été proposée que près de 40 ans après sa découverte. Il s'agit de la MAFLD, pour *Metabolic Associated Fatty Liver Disease* (Eslam, Sanyal, et al. 2020). Cette définition a le mérite d'intégrer l'élément étiopathogénique principal, à savoir le syndrome métabolique. Ce délai dans le changement de nomenclature traduit aussi la complexité à dessiner les contours de cette maladie très hétérogène et difficile à définir.

La définition de la **NAFLD** est large : présence de stéatose à l'échographie hépatique et absence de cause évidente de maladie hépatique causale, dont la consommation d'alcool ( $\geq 30\text{g/jour}$  pour les hommes ou  $\geq 20\text{g/jour}$  pour les femmes (Marchesini et al. 2016)).

Pour ce qui est de la **MAFLD** (figure 4), il faut la présence de stéatose à l'échographie hépatique et un des trois critères suivants : surpoids/obésité, diabète de type 2 ou dysfonction métabolique (définie par la présence d'au moins deux des critères suivants : a) tour de taille  $\geq 102$  chez les hommes et  $88$  cm chez les femmes, b) tension artérielle  $\geq 130/85$  mmHg ou traitement médicamenteux spécifique, c) triglycérides  $\geq 1,5$  g/L ou traitement médicamenteux spécifique, d) HDL-cholestérol  $< 0,4$  g/L pour les hommes et  $< 0,5$  g/L pour les femmes, e) intolérance au glucose (c'est-à-dire glycémie à jeun de  $5,6$  à  $6,9$  mmol/L, ou glycémie de  $7,8$  à  $11,0$  mmol/L deux heures après une charge en glucose ou taux d'HbA1c de  $5,7$  à  $6,4$  %), f) Évaluation du modèle d'homéostasie - score de résistance à l'insuline (HOMA-IR)  $\geq 2.5$ , g) Niveau de protéine C-réactive (CRP)  $> 2$  mg/L (Eslam, Newsome, et al. 2020). Un des principaux avantages de cette définition est celle de ne plus exclure les patients ayant une consommation chronique modérée d'alcool, comme cela arrive fréquemment en pratique clinique courante (Kwon, Greenon, and Conjeevaram 2014). De même,



d'après une étude comparant les critères diagnostiques de NAFLD et MAFLD dans une large cohorte de plus de 13000 patients, l'utilisation des critères de MAFLD permet de diagnostiquer des patients ayant plus de facteurs de risque de progression vers une maladie hépatique sévère (S. Lin et al. 2020), donc plus à même de pouvoir bénéficier d'une éventuelle intervention pour la prévenir. Enfin, pour les formes inflammatoires, plutôt que la dichotomie NASH/non-NASH, la définition de MAFLD propose de donner le score d'activité et de fibrose, comme cela est fait pour les autres maladies hépatiques chroniques.

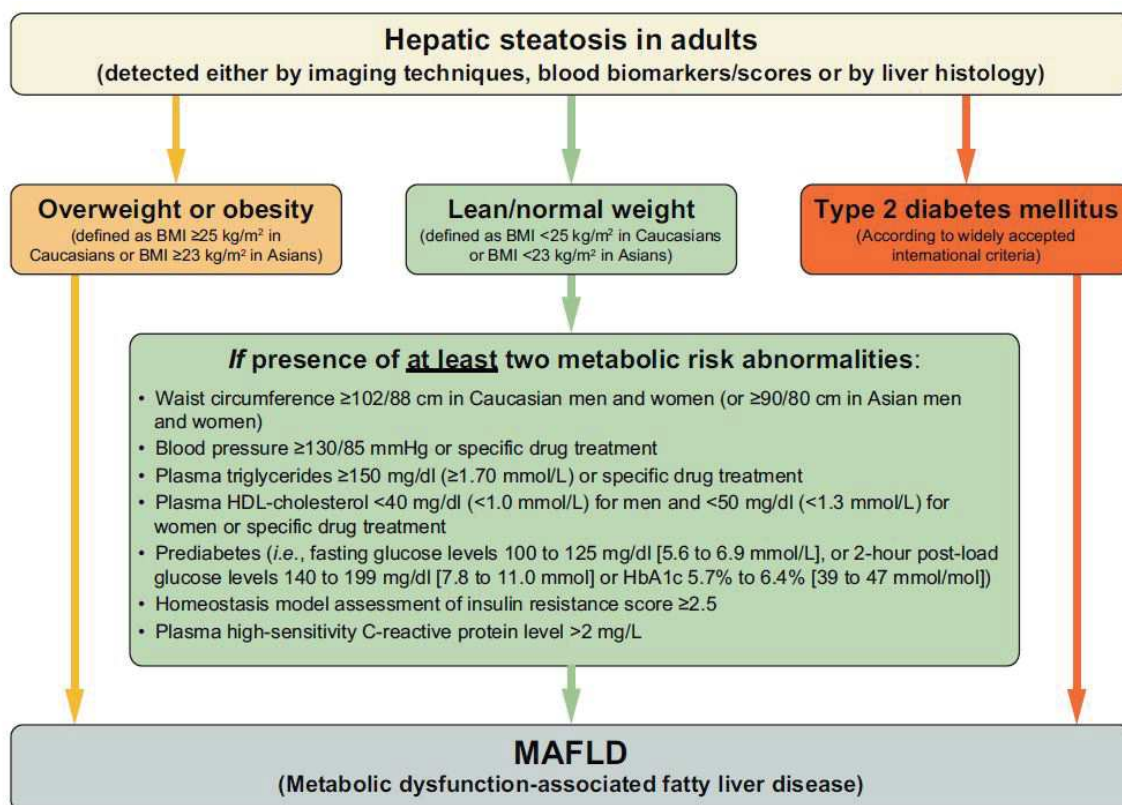


Figure 4 : définition de la MAFLD, d'après Eslam et Newsome 2020.

Etant donnée la récence de cette dénomination, dans le reste de cet exposé nous utiliserons préférentiellement les termes de NAFLD/NASH puisque les études en question ont utilisé ces définitions.

### b) Epidémiologie

Le poids de la NAFLD/NASH a progressivement augmenté au cours des trente dernières années. Cela traduit bien sûr une meilleure reconnaissance de cette maladie mais également une augmentation de l'incidence due à des changements de mode de vie et d'alimentation, surtout dans les pays occidentaux (Gerber et al. 2012; Barrera and George 2014). Une méta-analyse publiée en 2016 estime à partir de 45 études que la prévalence mondiale de NAFLD est proche de 25%, avec d'importantes disparités entre les continents, avec des valeurs extrêmes de 13% en Afrique et 30% en Amérique du Sud (Younossi, Koenig, et al. 2016). Une étude issue de la

cohorte en population générale française CONSTANCES, incluant plus de 200000 adultes suivis entre 2012 et 2018 estime que la prévalence de la NAFLD en France est de 18.2% (intervalle de confiance à 95% [17.9-18.4]), ce qui correspond à près de 8.5 millions d'individus. Parmi ceux-là 2.6% auraient une fibrose avancée, soit près de 221000 individus (Nabi et al. 2020). D'après des études de modélisation, la croissance de la NAFLD devrait continuer en France, pour atteindre une prévalence de 23.6% en 2030, dont 5% atteints d'une NASH (Estes et al. 2018). Conséquence directe de cette hausse dans l'incidence, les coûts médicaux annuels estimés directement imputables à la NAFLD dépassent 35 milliards d'euros dans quatre pays européens (Royaume-Uni, France, Allemagne et Italie) et 100 milliards de dollars aux États-Unis (Younossi, Blissett, et al. 2016).

Le poids relatif de la NAFLD/NASH parmi les causes de cirrhose décompensée progresse également. Aux États-Unis, il s'agit désormais de la deuxième étiologie de transplantation hépatique derrière la cirrhose alcoolique (Wong et al. 2015). Pareillement, le nombre de CHC dus à la NAFLD/NASH progresse dans les pays occidentaux. Ainsi, le nombre de transplantations hépatiques réalisées aux États-Unis pour CHC secondaire à une NASH a été multiplié par 4 entre 2002 et 2012 (Wong, Cheung, and Ahmed 2014). D'après la modélisation sus-citée, la croissance en cas incidents de CHC dus à la NASH en France entre 2016 et 2030 serait de 125% (Estes et al. 2018).

## 2. Liens entre NAFLD et CHC

### a) *Données cliniques et épidémiologiques*

La NAFLD, similairement à toute étiologie de maladie hépatique chronique, est à risque d'évoluer vers un carcinome hépatocellulaire. Ce qui fait une des particularités de la NAFLD c'est la proportion élevée de CHC incidents sans cirrhose associée, soit jusqu'à un tiers des cas selon les séries (Yasui et al. 2011; Tateishi et al. 2015; Marchesini et al. 2016). Cette caractéristique donne un indice des liens étroits et complexes entre NAFLD et CHC, en partie en raison des facteurs confondants que constituent l'obésité et le diabète de type 2, fréquemment rencontrés dans la NAFLD et eux-mêmes des facteurs de risque de CHC. Le stade de la maladie influence également le risque de développer un CHC, avec un risque plus élevé pour les formes inflammatoires (NASH) et fibrosantes, bien qu'il soit désormais reconnu qu'une stéatose seule à un instant donné peut ultérieurement évoluer vers une fibrose hépatique et augmente le risque de développer un CHC (Adams et al. 2005; Angulo et al. 2015; Vilar-Gomez et al. 2018).

Bien que le principal facteur de risque de développer un CHC dans un contexte de NAFLD soit la présence d'une cirrhose, ce risque est très variable entre les patients. Une étude récente portant sur plus de 7000 patients ayant une cirrhose d'origine NAFLD a permis d'évaluer à un instant

donné le risque individuel de développer un CHC à 1 et 5 ans, ce qui permet de classer les patients en risque faible (risque à 1 an <1% à 5 ans <5%), risque intermédiaire (1-3% à 1 an, 5 à 15% à 5 ans) et risque élevé (>3% à 1an, >15% à 5 ans). Parmi les 25 facteurs prédictifs potentiels évalués dans cette étude, 7 ont été inclus dans le modèle final: âge, sexe, IMC, diabète, numération plaquettaire, albumine sérique et rapport ASAT/ALAT sériques(Ioannou et al. 2019).

### *b) Physiopathologie*

La physiopathologie des CHC survenant dans un contexte de NASH répond globalement à l'hypothèse des *hits* multiples parallèles (Tilg and Moschen 2010) et fait intervenir principalement des facteurs (épi)génétiques, inflammatoires et le microbiote intestinal.

Les études d'association génétique humaine ont identifié des polymorphismes (SNP pour single nucleotide polymorphism) de plusieurs gènes, qui seraient associés à la progression de la NAFLD, tels que le *PNPLA3* (codant pour la protéine *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*(Falleti et al. 2011)) et aussi plus récemment *MBOAT7* (membrane-bound O-acyltransferase domain containing 7(Luukkonen et al. 2016; Mancina et al. 2016)). Ainsi, le polymorphisme rs738409 C>G de *PNPLA3* augmente le risque de développer un CHC sur NAFLD par un facteur approximatif de 2 pour les hétérozygotes et de 5 pour les homozygotes(Y. L. Liu et al. 2014). En outre, une réduction de l'acétylation H4K16 de l'histone H4, aussi bien globale que spécifique de certains gènes a été signalée dans l'hépatocarcinogenèse liée à la NASH. L'interprétation de ce résultat propose que cette modification épigénétique aurait comme conséquence une inhibition des gènes liés à la mort cellulaire (De Conti et al. 2017).

Il est certainement simpliste d'essayer de distinguer un *primum movens* dans la physiopathologie du CHC dans un contexte de NAFLD. Toutefois, il n'y a pas de doute du rôle majeur de la lipotoxicité liée à l'accumulation de lipides dans le foie, secondaire à un déséquilibre métabolique (régime alimentaire inadapté, sédentarité, syndrome métabolique). Lorsque des acides gras s'accumulent dans le cytoplasme des hépatocytes, ils perturbent l'homéostasie lipidique et entraînent une stimulation de l'oxydation mitochondriale des acides gras (Begrache et al. 2013; Shingo Tanaka et al. 2013). Cette oxydation mitochondriale des acides gras produit des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des espèces réactives azotées (Perla et al. 2017). Ces espèces réactives vont s'ajouter à celles produites par les macrophages et les neutrophiles recrutés dans le contexte inflammatoire chronique de la NAFLD (Wilson et al. 2015) et provoquer des lésions à l'ADN (Federico et al. 2007). Dans un contexte de maladie hépatique chronique (telle que la NASH), les lésions de l'ADN donnent lieu à des niveaux élevés d'apoptose et de régénération, mécanismes médiés par la caspase 8,



molécule impliquée dans l'initiation de l'apoptose (Boege et al. 2017). Par ailleurs, bien que les lésions de l'ADN soient détectées et réparées par la cellule grâce à un mécanisme appelé DDR (*DNA Damage Repair*), le nombre élevé de lésions ou encore son dysfonctionnement dans le contexte de la NAFLD, par une susceptibilité individuelle ou par des mécanismes liés à la pathologie, permettrait la perpétuation de cellules génétiquement instables et aboutir à la transformation maligne des hépatocytes (Gao et al. 2004; Z. Lin et al. 2016).

D'autre part, une source supplémentaire de stress oxydatif dans les hépatocytes est l'inhibition de l'autophagie induite par l'excès d'acides gras libres et triglycérides dans le contexte de NAFLD (J. Kim et al. 2011). Pour affronter ce stress oxydatif, l'hépatocyte active la voie p62-KEAP1-NFE2L2, dans laquelle p62 phosphorylé, un substrat et adaptateur d'autophagie, perturbe la liaison cytoplasmique de KEAP1 à NFE2L2, de sorte que NFE2L2 peut agir comme facteur de transcription (Taniguchi et al. 2016; Ichimura et al. 2013) de gènes impliqués dans la réponse aux niveaux élevés de ROS, tels que la glutathion-S-transférase et la thiorédoxine réductase 1 dont l'activité est associée à la survie cellulaire en conditions de stress oxydatif (Taguchi, Motohashi, and Yamamoto 2011). Lorsque la capacité antioxydante des hépatocytes est dépassée, soit en raison d'une accumulation excessive de lipides, soit d'une altération de l'autophagie, les dommages à l'ADN qui en résultent entraînent finalement une mort cellulaire (Satoshi Tanaka et al. 2016).

L'activation de la voie p62-KEAP1-NFE2L2 peut également avoir d'autres conséquences facilitant l'initiation tumorale. En effet, p62 activé stabilise le proto-oncogène MYC, ce qui stimule la prolifération. p62 activé stimule aussi la voie mTORC, protégeant ainsi les cellules initiatrices de CHC contre la mort induite par le stress oxydatif (Umemura et al. 2016). De même, une activation prolongée de NFE2L2 par p62 (Inami et al. 2011) stimule la prolifération des cellules de CHC et l'expression du marqueur progéniteur biliaire ou hépatique cytokératine 19, associé à un mauvais pronostic chez l'homme (Petrelli et al. 2014). D'ailleurs, une mutation résultant en une activation de cette voie p62-KEAP1-NFE2L2 est retrouvée dans 5 à 15% des CHC humains (Zucman-Rossi et al. 2015).

Un nombre croissant d'études suggère que la dysbiose contribue au développement de la NAFLD/NASH et qu'elle pourrait également favoriser le développement du CHC (Boursier and Diehl 2015; L. Zhu et al. 2013). Cette dysbiose, bien qu'on ne sache pas tout à fait s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la NAFLD, est associée à deux mécanismes qui favorisent la progression de la maladie : une altération de l'épithélium digestif et une altération de la composition du pool d'acides biliaires. Une perte de l'étanchéité intestinale secondaire à l'altération épithéliale entraîne la translocation du lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi

cellulaire des bactéries à Gram négatif qui peut atteindre le foie par la veine porte et exacerber l'inflammation et la fibrose hépatique (Gäbele et al. 2011). Le microbiote intestinal joue un rôle dans le contrôle de la composition des acides biliaires, et cette interaction a un effet sur le métabolisme de l'hôte (Chávez-Talavera et al. 2017). Par exemple, des études menées sur des modèles murins exempts de germes et traités aux antibiotiques montrent un effet majeur sur la diversité des acides biliaires et la taille de leur pool (Sayin et al. 2013; Swann et al. 2011). La modification de la composition en acides biliaires secondaire à la dysbiose peut entraîner un revirement métabolique (« metabolic shift ») des hépatocytes. Dans un modèle de *jet-lag* chronique (Kettner et al. 2016), provoquant des perturbations hépatiques proches de la NASH, les auteurs montrent que ce revirement métabolique induit une reprogrammation de la cellule semblable à ce qui se passe dans les cellules cancéreuses (augmentation de la synthèse lipidique, augmentation du stress oxydatif, augmentation de la biosynthèse permettant une division cellulaire rapide). Les auteurs relient ce changement métabolique à la dysrégulation du métabolisme hépatique du cholestérol et des acides biliaires et impliquent les récepteurs nucléaires FXR et CAR (*constitutive androstane receptor*) dans cette progression. Ainsi, les souris FXR<sup>-/-</sup> dans ce modèle avaient des concentrations intrahépatiques d'acides biliaires extrêmement élevées, développaient une NASH plus rapidement et l'incidence de CHC spontanés était plus que doublée (Kettner et al. 2016).

Enfin, la réponse immunitaire joue évidemment un rôle dans le développement du CHC dans un contexte de NAFLD (figure 5 (Anstee et al. 2019)). Nous nous focaliserons uniquement sur les lymphocytes T et les macrophages. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et NK ont des rôles différents dans ce contexte. Ainsi, dans le modèle de régime *high-fat choline deficient* (ou HF-CD (Wolf et al. 2014a)), la transition entre NASH et CHC est déclenchée en partie par l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et NK intrahépatiques. Les voies de signalisation activées dans les hépatocytes dans ce contexte sont la voie canonique NF- $\kappa$ B et le récepteur LTBR (*lymphotoxin- $\beta$  receptor*). En revanche les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont plutôt un rôle dans la clairance des cellules transformées sénescents, que ce soit par l'activation de Ras (Kang et al. 2011) ou par l'inhibition de l'expression d'un oncogène (Rakhra et al. 2010). Dans un contexte de NASH, il existe une perte sélective intrahépatique de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> secondaire à la perturbation du métabolisme lipidique et cela accélère la carcinogénèse (Ma et al. 2016).

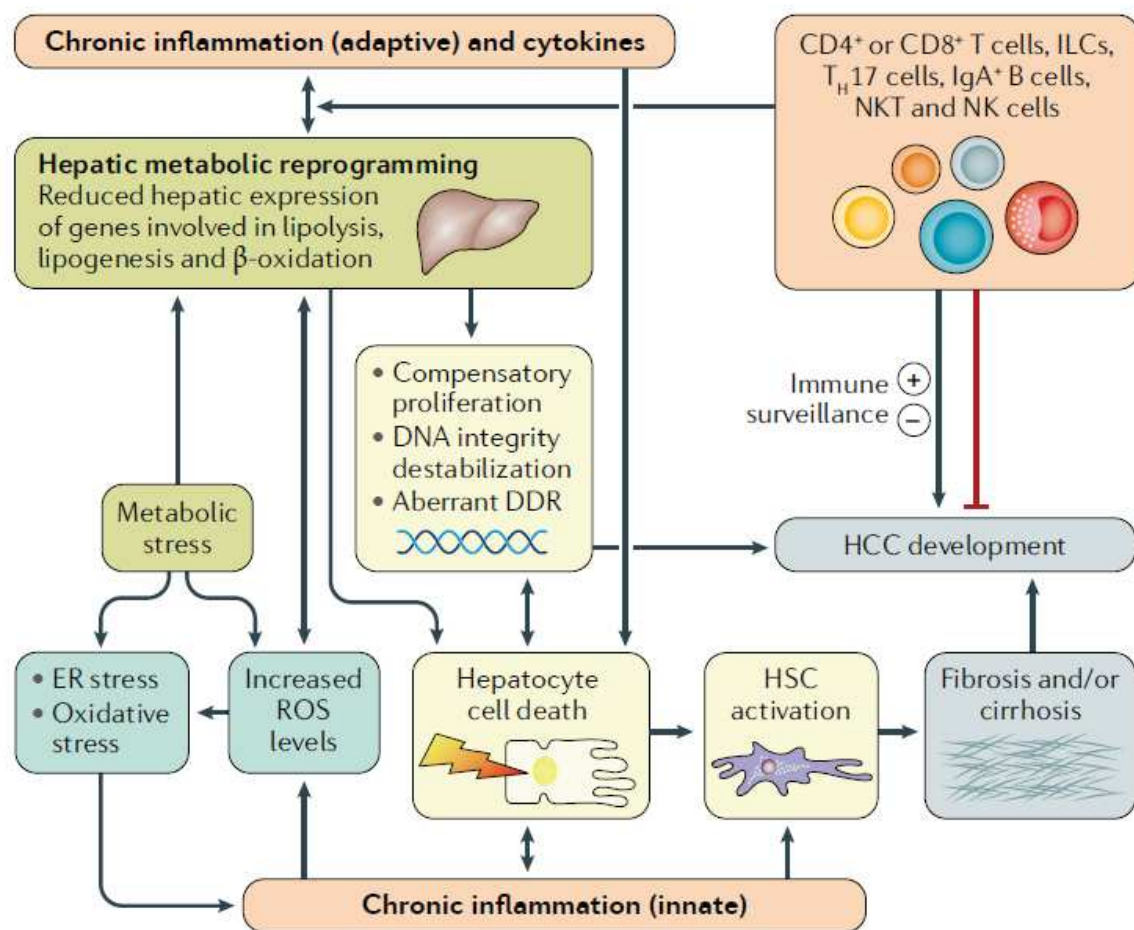


Figure 5 : Reprogrammation métabolique et tumorigénèse induite par une inflammation chronique adaptative et innée du foie. D'après Anstee et al 2019.

Le recrutement des cellules immunitaires fait intervenir l'inflammation stérile qui produit des DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns* (Kubes and Mehal 2012)) ainsi que les motifs issus de pathogènes ou PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) arrivant dans le foie à cause de la perte d'étanchéité de l'épithélium digestif (Arrese et al. 2016). Ces DAMPs et PAMPs se lient à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, tels que les TLR (*Toll like receptor*) pour déclencher une réponse inflammatoire locale médiée par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'interleukine 6 (Feldstein 2010; Peverill, Powell, and Skoien 2014). Les macrophages résidents du foie (cellules de Kupffer) expriment à leur surface des TLR et sont donc activés au cours de la NAFLD. Leur rôle dans la progression de la maladie puis dans la carcinogénèse sont contradictoires. D'une part, on constate la perte de cellules de Kupffer dans les premiers stades de l'apparition de la NASH induite par le régime *methionine and choline deficient* (MCD), suivie par l'infiltration de macrophages Ly6C+ dérivés des monocytes circulants (Reid et al. 2016). D'autre part, il a été démontré dans le modèle de CHC induit par le DEN que l'activation pro-inflammatoire des cellules de Kupffer est importante

dans le développement du HCC, à travers l'expression du récepteur de surface des cellules myéloïdes pro-inflammatoires TREM1 (J. Wu et al. 2012). Néanmoins, une fois que la tumeur primaire est établie, les macrophages infiltrant le foie ou les monocytes pro-inflammatoires peuvent jouer un rôle majeur dans la progression du CHC (J. Wu et al. 2012; C. Ju and Tacke 2016).

### 3. Modèles murins de NAFLD/NASH

S'agissant d'une maladie très hétérogène, multifactorielle et dont l'évolution est difficile à prédire, les modèles murins sont également multiples et peinent à récapituler l'ensemble des caractéristiques de la maladie. Ainsi, une comparaison entre le profil transcriptomique d'échantillons hépatiques issus de neuf modèles de NAFLD/NASH et des échantillons hépatiques humains à différents stades de la maladie ne retrouve que très peu de chevauchement (Teufel et al. 2016). Dans cette analyse, le modèle le plus proche de la pathologie humaine est celui du régime riche en graisses (apport calorique à 59%) et avec de l'eau supplémentée en glucose et fructose (Teufel et al. 2016).

Dans l'idéal un modèle murin de NASH devrait présenter le spectre anatomopathologique complet allant de la stéatose à la stéatohépatite avec fibrose et le développement ultérieur de CHC dans un contexte d'insulinorésistance, hyperinsulinémie et surpoids. Nous allons explorer certains modèles ci-dessous, avec une attention particulière aux modèles qui sont à l'origine de CHC.

#### a) Régimes pourvoyeurs de NASH

##### (1) Régimes HFD (high-fat diet) classiques

Depuis la description initiale par Samuels *et al.* dans les années 1940 décrivant l'effet sur des rats d'un régime dont 70% des calories était d'origine lipidique (Samuels, Gilmore, and Reinecke 1948), les régimes dits HFD ont été largement utilisés pour obtenir des phénotypes de NAFLD et NASH. Il existe de nombreuses variantes, avec notamment un pourcentage variable de calories provenant des graisses (de 40 à 75%). La susceptibilité aux régimes HFD varie significativement en fonction du sexe puisque les souris mâles développent des lésions plus précoces et sévères (les femelles sont protégées par les œstrogènes) et du fond génétique, les souris C57Bl/6 étant plus susceptibles que les BALB/c et les C3H/HeN (Nevzorova et al. 2020).

Le régime HFD à 60% *ad libitum* provoque une obésité, une stéatose hépatique et une intolérance à l'insuline mais peine à reproduire des lésions inflammatoires ou une fibrose chez les souris C57Bl/6 (Ito et al. 2007). Pour reproduire les lésions de NASH, il doit être donné par une sonde de gastrostomie, limitant de fait la portée de cette technique (Deng et al. 2005). De même, les souris ne développent pas de CHC dans ce modèle.

## (2) Régime déficient en méthionine et en choline (MCD)

Le régime déficient en méthionine et en choline (MCD) a été largement utilisé pour modéliser la NAFLD. Le régime MCD est riche en saccharose (40 %) et fournit une quantité modérée de graisses (10 %), mais il est déficient en méthionine et en choline. La choline est un constituant des membranes cellulaires et mitochondriales et un précurseur du neurotransmetteur acétylcholine. La méthionine est un acide aminé essentiel qui ne peut donc pas être synthétisé *de novo* et est un composé crucial pour la synthèse de la cystéine, de la lécithine, de la phosphatidylcholine et de nombreuses autres macromolécules. La carence dans ces deux composants entraîne une altération dans la synthèse de la phosphatidylcholine, ce qui cause une diminution de l'assemblage et sécrétion hépatocytaire des VLDL (Z. M. Yao and Vance 1988). Par conséquent, les lipides s'accumulent dans la le foie. De même, il survient une diminution de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, une induction du stress oxydatif dérivé du CYP2E1 et un épuisement des antioxydants hépatiques, favorisant les ROS et la stéatohépatite (Rinella and Green 2004). L'avantage de ce modèle réside dans la vitesse de l'apparition des lésions, avec une stéatohépatite et une fibrose après seulement trois et huit semaines respectivement. En revanche, les souris sont cachectiques du fait d'un hypermétabolisme et elles ne développent pas de syndrome métabolique (Rinella and Green 2004), ce qui a conduit à l'abandon progressif de ce modèle.

## (3) Régime déficient en choline (CD) et variantes

Un régime déficient en choline et ayant comme seule source de protéines des acides aminés (ou *Choline deficient L-amino-defined diet*) permet l'obtention d'un phénotype proche du régime obtenu avec le régime MCD, n'exhibant donc pas les caractéristiques du syndrome métabolique (Anstee and Goldin 2006).

En revanche, la combinaison entre la déficience en choline et un régime HFD (45 à 60% des calories d'origine lipidique), appelé régime HF-CD permet d'obtenir des résultats très intéressants. En effet, l'exposition à long terme récapitule les troubles métaboliques chroniques menant à la NAFLD avancée. En plus d'une stéatose sévère, le foie des souris HF-CD présente la majorité des caractéristiques de la NASH humaine, notamment des hépatocytes ballonnés, l'infiltration de cellules immunitaires, les noyaux glycogénés et les corps de Mallory. De plus, ce régime induit un stress oxydatif et des dommages mitochondriaux et provoque une légère fibrose péricellulaire accompagnée d'une activation des cellules étoilées hépatiques. À 24 semaines, les souris ont des signes de cirrhose avec une réaction ductulaire, une fibrose périsinusoïdale panlobulaire intense, une formation de nodules régénératifs et des signes d'hypertension portale (Wei et al. 2020). Enfin, dans un délai de 6-12 mois, les animaux développent



des tumeurs d'aspect similaire aux CHC humains(Wolf et al. 2014b; Wei et al. 2020).

#### (4) Régime WD et variantes

Partant du constat que le régime « occidental » participe à la physiopathologie de la NAFLD, plusieurs régimes appelés « Western Diet » ont été développés. Chez l'homme, un régime alimentaire "occidental" se caractérise par une consommation élevée de viande rouge/transformée, de céréales raffinées, de boissons sucrées riches en fructose, d'œufs, de sucreries/desserts et une faible consommation de fruits et légumes ou de produits laitiers. Ce régime alimentaire induit l'obésité, le syndrome métabolique et la NAFLD. Ainsi, la plupart de ces régimes sont riches en calories d'origine lipidique (40-60%), en cholestérol (0.1 à 2%) et en fructose.

L'ajout de 2% de cholestérol à un régime HFD classique augmente considérablement la leptine sérique, l'interleukine-6, le poids du foie et l'insulinorésistance, ce qui conduit à un phénotype qui ressemble beaucoup aux caractéristiques cliniques de la NASH chez les patients atteints de syndrome métabolique, et ce de façon plus rapide qu'un régime HFD classique(Henkel et al. 2017). La principale limite de ce régime est liée aux concentrations de cholestérol très largement au-dessus d'une consommation possible chez l'homme.

La responsabilité de la consommation accrue de fructose, notamment sous forme liquide (sodas, jus de fruits et autres boissons sucrées, sirop d'huile de maïs ajouté dans divers aliments), dans l'augmentation d'incidence de NAFLD dans les pays occidentaux est largement reconnue de nos jours (Abdelmalek et al. 2010; Jensen et al. 2018; Ouyang et al. 2008). Les mécanismes à l'origine de cette atteinte impliquent une action directe par le fructose, en stimulant la lipogenèse de novo et en inhibant la  $\beta$ -oxydation hépatique des acides gras, entraînant une accumulation de graisses dans le foie (revu dans(Jensen et al. 2018)). En plus de ces effets directs, le fructose contribue à la dysbiose intestinale, à l'altération de la fonction de la barrière intestinale et à l'augmentation de la translocation des métabolites bactériens, éléments contribuant grandement à la progression de la NAFLD (revu dans(Lambertz et al. 2017)). Pour tenter d'obtenir chez la souris des effets similaires il a été proposé d'ajouter un mélange de glucose et fructose (mimant le sirop d'huile de maïs) dans l'eau destinée aux souris. Les souris nourries 16 semaines avec un régime HFD avec ajout de glucose/fructose dans l'eau développent un phénotype comprenant obésité, résistance à l'insuline, stress oxydatif hépatique, infiltration macrophagique et fibrose modérée(Kohli et al. 2010).

Enfin, depuis une première description en 2011(Charlton et al. 2011), de plus en plus d'études combinent ces trois éléments : apport calorique élevé

provenant des graisses, supplémentation en cholestérol et apport de fructose dans l'eau *ad libitum* (Tsuchida et al. 2018; Xiaoqin Wu et al. 2020; Dasgupta et al. 2020). Ce type de régime permet d'obtenir un phénotype de NASH dans des délais raisonnables (4-6 mois) et récapitule la majorité des marques de fabrique de la NASH humaine. Des lésions de CHC apparaissent dans 89% des souris mâles après 8 à 13 mois de régime.

### *b) Souris génétiquement modifiées*

La délétion hépatospécifique de PTEN (*AlbCrePten<sup>flox/flox</sup>*) provoque spontanément chez les souris femelles une stéatose, une ballonnisation hépatocytaire, une intolérance à l'insuline et un CHC après 18 mois (Horie et al. 2004).

Les souris *Ob/ob* (déficientes en leptine) et *db/db* (mutation du récepteur de la leptine) sont deux modèles largement utilisés en recherche métabolique et diabétologique. Ces souris développent une stéatose et une insulino-résistance mais à moins d'être traitées avec du DEN, ces animaux ne développent ni stéatohépatite ni CHC spontané (Park et al. 2010).

Un autre modèle développé est celui des souris MUP-uPA, qui expriment des quantités élevées d'activateur du plasminogène urokinase ectopique (uPA) dans les hépatocytes. Lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisses (HFD à 60%), elles progressent vers une NASH et développent des CHC dans 85% des cas, en raison principalement d'un stress du réticulum endoplasmique à l'origine d'une sécrétion de TNF par des macrophages inflammatoires (Nakagawa et al. 2014).

Enfin, le fond génétique des souris influence également la susceptibilité aux différents régimes. Ainsi, les souris issues d'un croisement stable isogénique entre les fonds génétiques C57BL/6J et 129S1/SvImJ (nommées DIAMOND par les investigateurs, pour *diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease*) donne lieu à des souris fortement susceptibles au régime Western Diet avec eau enrichie en glucose-fructose (Asgharpour et al. 2016). Ces souris développent un phénotype plus proche de celui retrouvé chez l'homme, avec notamment des similitudes transcriptomiques et des CHC ressemblant aux sous-classes S1 et S2 de la classification de Hoshida.

## C. FGF19 (Fibroblast growth factor 19)

### 1. Sous-famille des FGF endocrines

FGF19 appartient à la superfamille des *fibroblast growth factor*, qui comprend 22 membres (mais 23 protéines puisque FGF19 et FGF15, son orthologue chez la souris, sont comptabilisés ensemble). Dans cette superfamille de FGF, on distingue les FGF intracellulaires qui ont un rôle de cofacteurs pour des canaux sodiques voltage-dépendants et les FGF sécrétés. Leur expression est quasi ubiquitaire et jouent un rôle essentiel dans les premiers stades du développement embryonnaire. Chez l'adulte ils fonctionnent comme des facteurs homéostatiques importants pour l'entretien, la réparation, la régénération et le métabolisme des tissus (Ornitz and Itoh 2015).

Parmi les FGF sécrétés, on distingue la sous-famille de FGF canoniques qui agissent en auto ou paracrine et la sous-famille des FGF endocrines, qui agissent à distance par voie endocrine (équivalents à une hormone). FGF15/19 fait partie des FGF endocrines avec FGF21 et FGF23 (Angelin, Larsson, and Rudling 2012). Tous les FGF sécrétés agissent à travers un récepteur tyrosine kinase membranaire de la famille des FGFR (*Fibroblast growth factor receptor*), qui comprend 5 membres (FGFR1 à 4 et FGFR1 pour *FGFR like 1*). FGFR1, et 3, mais pas FGFR4, sont alternativement épissés dans le domaine de liaison au ligand extracellulaire pour donner deux isoformes principales, b et c, chacune présentant une spécificité de liaison au ligand distincte (Goetz and Mohammadi 2013). Un corécepteur est indispensable à son effet biologique : il s'agit de l'héparine ou l'héparan sulfate pour les FGF canoniques d'une part, de  $\alpha$  ou  $\beta$ -klotho pour les FGF endocrines d'autre part (Goetz and Mohammadi 2013). Les FGF endocrines ont une faible affinité pour l'héparine/héparan sulfate, ce qui permet leur circulation mais réduit également leur affinité pour les FGFR. Par conséquent, la liaison des FGF endocrines à leurs récepteurs prédominants exige le corécepteur obligatoire  $\alpha$  ou  $\beta$ -klotho. L'expression des corécepteurs  $\alpha$ -Klotho et  $\beta$ -Klotho est limitée aux tissus cibles des FGF endocrines, où ces corécepteurs s'associent constitutivement aux FGFR apparentés des FGF endocrines (Kurosu et al. 2007; Goetz and Mohammadi 2013).  $\alpha$ -Klotho s'exprime principalement dans le rein, la glande parathyroïde et le plexus choroïde, tandis que  $\beta$ -klotho est abondant dans le foie et dans le tissu adipeux brun et blanc (Angelin, Larsson, and Rudling 2012).

Les trois membres des FGF endocrines (FGF15/19, FGF21 et FGF23) sont structurellement proches : les effets tissu-spécifiques dépendent principalement de leur affinité aux récepteurs et corécepteurs auxquels ils se lient. Ainsi, FGF23 peut se lier à FGFR1c, 3c et 4 mais a comme seul cofacteur  $\alpha$ -klotho. FGF21 peut se lier à FGFR1c et 3c (Suzuki et al. 2008). FGF19 peut se lier à FGFR1c, 2c, 3c et 4. FGF19 et 21 partagent le



corécepteur  $\beta$ -klotho (Xinle Wu et al. 2010a). La spécificité de certains effets de FGF19, comme l'effet sur la synthèse des acides biliaires, est due à sa forte affinité pour FGFR4. Par contre certains des effets redondants entre FGF19 et 21 (métabolisme glucidique et lipidique) sont dus à l'activation par ces deux molécules du complexe FGFR1c/KLB (A. L. Wu et al. 2011), dénotant une « promiscuité » à des doses supra-physiologiques.

En tant que molécules endocrines, apparentées à des hormones, les FGF endocrines sont sécrétées par un tissu et exercent leurs effets sur un tissu à distance. L'expression de ces molécules est régulée par des récepteurs nucléaires qui agissent en tant que facteurs de transcription. FGF23 est sécrété par l'os (ostéocytes et ostéoblastes) en réponse à la vitamine D. Il est impliqué principalement dans la régulation du phosphore circulant et des concentrations sériques de vitamine D (Krajisnik et al. 2007). La mutation activatrice du gène codant pour FGF23 est responsable du rachitisme hypophosphatémique autosomique dominant (ADHR Consortium 2000). FGF21 est exprimé principalement par les hépatocytes mais également par le tissu adipeux blanc et le pancréas. Il est sécrété en réponse à un jeûne prolongé ou un régime cétogène via le facteur transcriptionnel PPAR $\alpha$  et ainsi induire une gluconéogenèse, une thermogénèse et l'oxydation des acides gras hépatiques (Potthoff et al. 2009; Inagaki et al. 2007; Badman et al. 2007). Une fraction de FGF21 ( $\approx 0.5\%$ ) traverse la barrière hémato-encéphalique (Hsuchou, Pan, and Kastin 2007) et exercer des effets centraux au niveau du noyau hypothalamique ventrolatéral, seule région du cerveau exprimant FGFR1 (A. J. Li et al. 1996). Un passage à travers la BHE a également été décrit pour FGF19 à des concentrations supra-physiologiques (Hsuchou, Pan, and Kastin 2013). Les rôles de FGF19 seront décrits en détail par la suite. Le tableau 2 récapitule les principales caractéristiques des FGF endocrines.

<b>Molécule</b>	<b>Tissu producteur</b>	<b>Tissu(s) effecteur(s)</b>	<b>Régulation(s)</b>	<b>Régulateur transcriptionnel</b>
<b>FGF19</b>	Intestin grêle (entérocytes)	Foie, vésicule biliaire	Acides biliaires, glycogène	FXR
<b>FGF21</b>	Foie (hépatocytes), tissu adipeux blanc, pancréas	Tissu adipeux blanc, pancréas, foie, système nerveux central	Glucose, triglycérides	PPAR $\alpha$
<b>FGF23</b>	Os (ostéocytes et ostéoblastes)	Rein, parathyroïde	Phosphore, parathormone	VDR

Tableau 2 : la sous-famille de FGF endocrines.

## 2. L'axe acides biliaires/FXR/FGF15-19/FGFR4-KLB

### a) *Acides biliaires : molécules de signalisation*

Les acides biliaires (AB) sont des molécules amphipathiques synthétisées dans l'hépatocyte à partir du cholestérol, sécrétées dans la bile puis transportées dans le tube digestif. Chez l'homme la sécrétion journalière est d'environ 0.5g, avec une élimination physiologique dans les selles équivalente, soit 5% du pool circulant. Les 95% restants sont réabsorbés, principalement de façon active au niveau de l'iléon terminal, avant de revenir dans le foie par la circulation portale (cycle entéro-hépatique (Tabibian et al. 2013)). Le rôle historique des AB est celui d'émulsifier les lipides et vitamines liposolubles alimentaires afin de permettre leur absorption. Cependant, leur action en tant que molécules de signalisation, longtemps méconnue, est actuellement au premier plan des recherches sur les AB. En effet, les AB agissent à distance sur des voies très variées telles que le métabolisme lipidique (Pols, Nomura, et al. 2011), l'inflammation (Pols, Noriega, et al. 2011) ou la fertilité masculine (Baptissart et al. 2014). Afin d'exercer ces actions, les AB se lient à des récepteurs spécifiques, dont deux principaux : FXR (récepteur nucléaire) et TGR5 (récepteur membranaire).

### b) *Fonctionnement de l'axe*

Suite à un repas, la vésicule biliaire se contracte, libérant son contenu dans le cholédoque puis dans le tube digestif. Les acides biliaires font le trajet jusqu'à l'iléon terminal, où ils rentrent dans les entérocytes. Une fois à l'intérieur des entérocytes, les AB activent le récepteur nucléaire FXR. Dans le noyau, FXR dimérise avec *Retinoid X Receptor* (RXR) ce qui permet leur interaction avec l'ADN au niveau des éléments de réponse de FXR (FXRRE) modifiant ainsi la transcription des gènes cibles (Makishima et al. 1999; H. B. Wang et al. 1999). L'activation du FXR dans les entérocytes induit la transcription de FGF19 chez l'homme et de son orthologue FGF15 chez la souris. Après l'induction dans les entérocytes iléaux, FGF15/19 voyage à travers la circulation portale et active FGFR4 dans les hépatocytes. Une cascade de signalisation intra-cellulaire va aboutir à la répression de la transcription des enzymes Cyp7a1 et Cyp8b1, enzymes clés de la transformation du cholestérol en acides biliaires. Cyp7a1 est d'ailleurs l'enzyme limitante de cette voie (Holt et al. 2003). La conséquence directe est donc la diminution de synthèse des acides biliaires par le foie, constituant une boucle de rétrocontrôle finement régulée (figure 6).

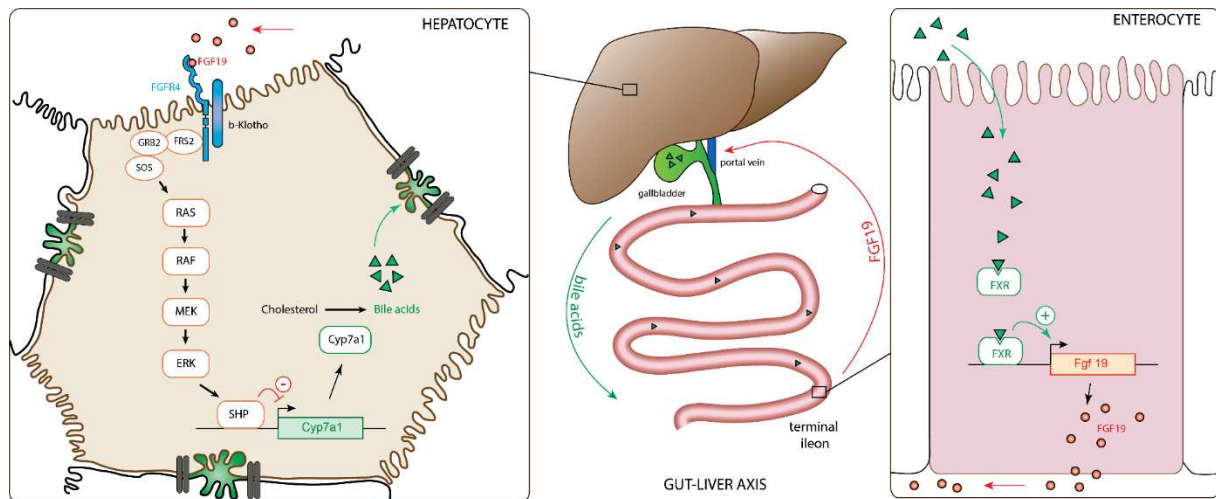


Figure 6 : **régulation de la synthèse des acides biliaires par la voie FXR/FGF19/FGFR4.** Après un repas, le contenu de la bile est déversé dans le tube digestif. Les acides biliaires atteignent l'iléon, rentrent dans les entérocytes et activent le récepteur FXR qui agit comme facteur de transcription de FGF19. FGF19 est sécrété dans la circulation portale jusqu'à atteindre les hépatocytes. Il se lie à son récepteur FGFR4 qui forme un hétéro-dimère avec  $\beta$ -klotho pour déclencher des voies de signalisation aboutissant à la répression de Cyp7a1, enzyme limitante de la synthèse des acides biliaires.

Par ailleurs, il a été rapporté que les hépatocytes expriment FGF19 lorsqu'ils sont soumis à des concentrations élevées d'acides biliaires *in vitro* (K. H. Song et al. 2009) et *in vivo* en cas de cholestase extrahépatique (Schaap et al. 2009) ou intrahépatique (Wunsch et al. 2015; Hasegawa et al. 2019). L'expression de FGF19 par les hépatocytes est donc possible en l'absence d'amplification de FGF19. Toutefois, ces observations n'ont pas été reproduites dans le modèle murin de ligature de la voie biliaire principale (Inagaki et al. 2005). Ces résultats contradictoires sont mal élucidés mais une hypothèse serait que dans ce dernier modèle il y a un déséquilibre en faveur d'acides biliaires antagonistes de FXR (Y. Zhang et al. 2012).

### 3. Voies de signalisation cellulaire activées par les FGF endocrines

La liaison d'un FGF à son récepteur induit la formation d'un complexe ternaire FGF-FGFR-cofacteur, ce qui va activer le domaine intracellulaire de la tyrosine kinase du FGFR par phosphorylation de résidus tyrosine spécifiques. Les voies de signalisation intracellulaires en aval du récepteur activé sont nombreuses, telles que les voies RAS-MAP kinases, PI3K-AKT, PLC $\gamma$  et STAT (figure 7). Nous détaillerons ici les voies les plus étudiées en ce qui concerne l'effet de FGF19.

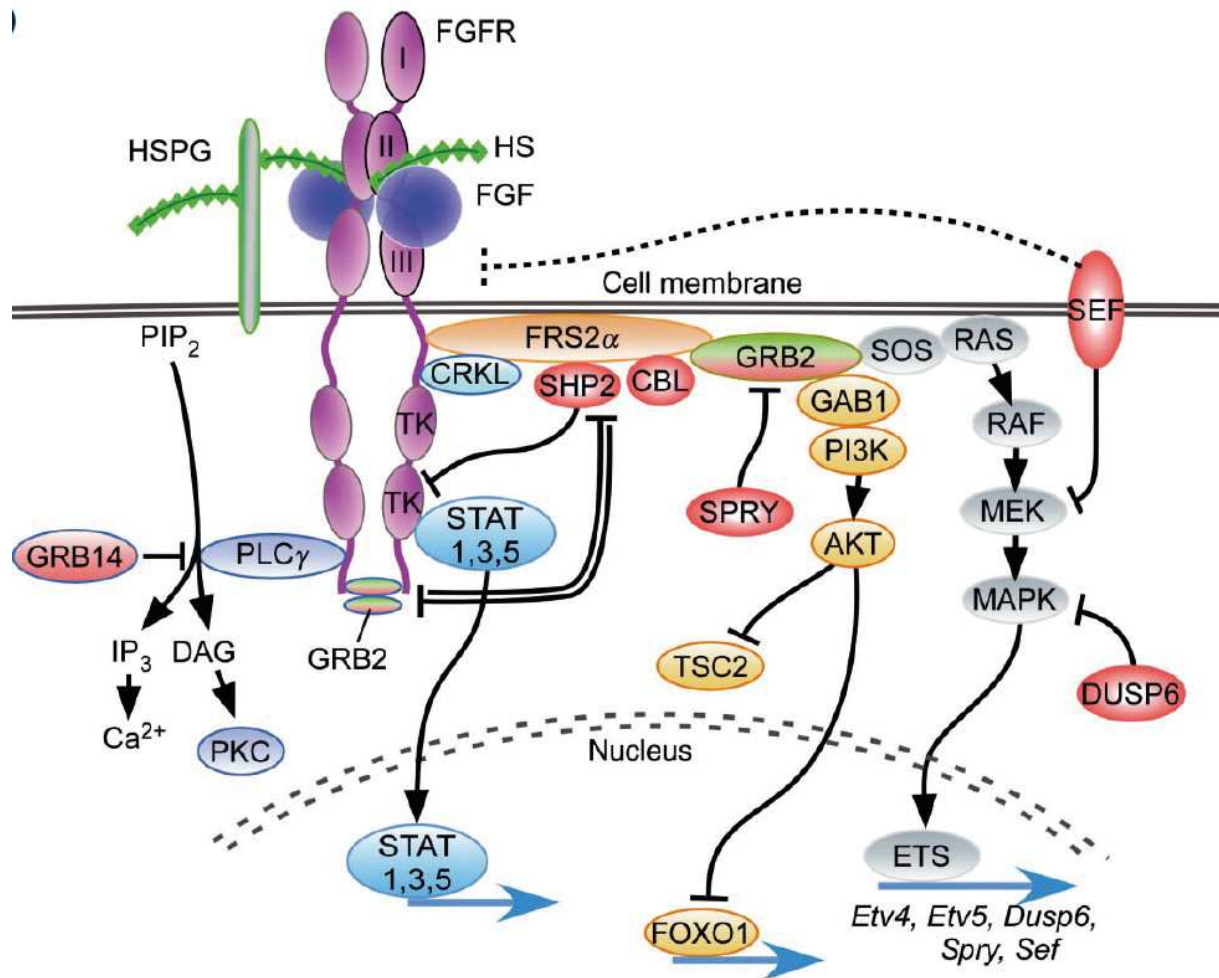


Figure 7 : voies de signalisation cellulaires activées lors de la liaison d'un FGF à son récepteur tyrosine kinase FGFR (à noter ici il s'agit d'un FGF canonique). D'après Ornitz et Itoh 2015.

### a) Ras/MAPK/Erk

La signalisation par FGFR est initiée par la phosphorylation de FRS2 $\alpha$ , qui est associée de manière constitutive à la région juxtamembranaire du FGFR, puis interagit avec la protéine CRKL liée au résidu Y463 phosphorylé et est à son tour phosphorylé par la kinase FGFR activée. FRS2 $\alpha$  phosphorylé recrute la protéine d'adaptation GRB2, qui recrute ensuite le facteur d'échange de nucléotides guanine SOS (C. Wang et al. 2014). Le recrutement de SOS permet ensuite l'activation de la GTPase RAS et aboutit à l'activation de la voie des MAPK (revu dans (Ornitz and Itoh 2015)).

En aval, l'activation de cette voie permet l'activation des membres de la famille des facteurs de transcription Ets, tels que Etv4 et Etv5 et les régulateurs négatifs des voies de signalisation de FGF tels que SHP2, CBL, SPRY, SEF et DUSP6.

L'inhibition de la synthèse des acides biliaires passe par l'activation de cette voie (C. Wang et al. 2014), en partie grâce à l'augmentation de la stabilité de SHP (*small heterodimer partner*) par une inhibition de la dégradation par

le protéasome de SHP, via un mécanisme dépendant de pERK (Miao et al. 2009). SHP est un inhibiteur de nombreux facteurs de transcription.

De nombreuses autres fonctions biologiques de FGF19 sont régulées par l'activation de la voie Ras/MAPK/Erk: synthèse protéique (Kir et al. 2011), glycogénogénèse (Kir et al. 2011), hypertrophie des fibres musculaires striées (Benoit et al. 2017).

En ce qui concerne les effets oncogéniques de FGF19 et la voie Ras/MAPK/Erk, les données sont d'interprétation délicate. Ainsi, le papier qui est souvent cité comme preuve que l'effet prolifératif de FGF19 sur les hépatocytes passe par l'activation de FGFR4 et la voie Ras/MAPK/Erk (Xinle Wu et al. 2010b) utilise une lignée de cellules musculaires striées (L6) et n'étudie pas le lien entre prolifération et phosphorylation de Erk. De même, le traitement par FGF19 de la lignée de CHC SNU423 ne provoque pas d'activation de la voie Ras/MAPK/Erk, contrairement au traitement par FGF2 ou EGF (Sawey et al. 2011b). En revanche, un article plus récent étudiant 34 lignées cellulaires de tumeurs hépatiques montre que l'utilisation de trametinib, un inhibiteur de Mek, inhibe la prolifération des lignées ayant une amplification avec surexpression de FGF19 et des partenaires habituels de cette voie (FXR, FGFR4 et KLB (Caruso et al. 2019)). La même molécule était inefficace en cas d'amplification de FGF19 sans surexpression.

#### *b) Voie STAT 3 (Signal Transducers and Activators of Transcription-3)*

L'activation du récepteur FGFR par son ligand permet la phosphorylation du résidu tyrosine 677 et 705 de Stat3, aboutissant à la translocation nucléaire et l'activation de ses gènes cibles en aval (Dudka, Sweet, and Heath 2010; Massafra et al. 2017).

Ce mécanisme entre en jeu lorsque FGF19 inhibe la synthèse d'acides gras hépatiques par l'inhibition de SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein-1c*), régulé en partie par l'activation de STAT3 et la stabilisation de SHP (Bhatnagar, Dammron, and Hillgartner 2009).

De façon plus surprenante, une activation de STAT3 pourrait survenir également dans l'hépatocyte indirectement, *via* l'interleukine 6 (IL-6). Dans une étude utilisant un modèle de surexpression hépatique de FGF19 induite par un vecteur AAV (*adeno-associated virus*), les auteurs ont montré que des très fortes concentrations de FGF19 (de l'ordre de 300ng/mL soit plus de 1000 fois les taux circulants chez l'homme (Lundåsen et al. 2006)) induisent une sécrétion d'IL-6 par les cellules de Kupffer, ce qui ensuite active la voie STAT3 dans l'hépatocyte. Cette induction de STAT3 serait responsable, au moins en partie, des effets hépatoprolifératifs de FGF19 (Zhou, Yang, et al. 2017).



### c) *Autres voies*

Des résultats sur une lignée cellulaire de cancer du colon (HCT116) montrent que FGF19 agit sur la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine (Pai et al. 2008) en stimulant la phosphorylation de GSK3 $\beta$ , ce qui va inhiber la dégradation de  $\beta$ -caténine et permettre sa translocation nucléaire pour agir en tant que facteur de transcription. Une étude sur des lignées de CHC (Huh7 et Hep3B) montre que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par FGF19 induit l'expression de l'amphiréguline. Cette dernière active EGFR, et cette voie participe aux effets prolifératifs de FGF19 (Latasa et al. 2012). Sawey *et al.* (Sawey et al. 2011b) ont également étudié les liens entre FGF19 et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans une lignée surexprimant FGF19 (Huh7) et une lignée sans surexpression (SNU423). Ils ont montré que FGF19 activait la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et que l'inactivation de  $\beta$ -caténine par un shRNA diminuait la prolifération de Huh7 mais pas de SNU423. Cette voie serait également impliquée dans la facilitation de la transition épithéliale-mésenchymateuse à l'origine d'un effet pro-métastatique de FGF19 (J. Chen et al. 2019; H. Zhao et al. 2016).

Par ailleurs, une étude récente montre que les acides biliaires et FGF15/19 agissent sur la voie Hippo. L'activation de FGFR4 entraîne la phosphorylation de NF2, ce qui soulage l'effet inhibiteur de Raf sur les kinases Hippo Mst1/2. Mst1/2 activé phosphoryle et stabilise ensuite SHP, ce qui induit l'inhibition de Cyp7a1 (Ji et al. 2019).

## 4. Effets métaboliques

Parallèlement à l'effet majeur d'inhibition de la synthèse des acides biliaires, FGF19 exerce de nombreux effets métaboliques. Dans les modèles murins (rats ou souris) soumis au long cours à des doses supra-physiologiques de FGF19 on observe un phénotype de métabolisme activé, à savoir un poids plus faible, une masse grasse diminuée et une masse musculaire accentuée (Tomlinson et al. 2002; Ryan et al. 2013). Les tissus à l'origine de ce phénotype sont nombreux : foie, tissu musculaire strié, tissu adipeux et système nerveux central. L'ensemble de ces effets considérés bénéfiques dans un contexte de maladie hépatique chronique et/ou de syndrome métabolique a conduit au développement d'analogues activateurs de FGF19 en cours d'étude dans des essais cliniques (Harrison et al. 2018; Mayo et al. 2018).

### a) *Effets centraux*

Les effets centraux de FGF19 ne requièrent pas nécessairement un passage à travers la barrière hémato-encéphalique puisque des projections neuronales hypothalamiques agissant via AGRP (*Agouti-related peptide*) et le neuropeptide Y (NPY) expriment FGFR1 (mais pas FGFR4 (Marcelin et al. 2014; S. Liu et al. 2018)). Ainsi, l'injection intrapéritonéale de FGF19 chez la souris augmente la phosphorylation de ERK dans les neurones NPY du noyau arqué hypothalamique, ce qui diminue l'activation des neurones

AGRP/NPY. De même, l'injection intracérébrale ventriculaire de FGF19 diminue l'activation des neurones NPY/c-Fos de l'hypothalamus (c-Fos étant un marqueur d'activation neuronale) dans un modèle de souris obèses nourries par un régime riche en graisses (Marcelin et al. 2014).

FGF19 donné en injection intracérébrale ventriculaire dans des modèles de souris *ob/ob* et nourries par un régime riche en graisses réduit la consommation alimentaire et la prise de poids, améliore la tolérance au glucose et à l'insuline, et diminue l'insulinémie à jeun (Fu et al. 2004; Marcelin et al. 2014). Des effets similaires sont obtenus dans un modèle de souris diabétiques de type 1, le mécanisme invoqué étant la suppression de néoglucogénèse hépatique induite par une inhibition de la sécrétion de corticoïdes par les surrénales secondaire à l'inhibition par FGF19 de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Perry et al. 2015). L'injection intracérébrale ventriculaire de l'inhibiteur de FGFR1 PD173074 provoque les effets opposés : augmentation de la consommation alimentaire, du poids corporel total et détérioration de la tolérance à l'insuline (Ryan et al. 2013). Ces résultats indiquent que les effets centraux bénéfiques de FGF19 sur l'homéostasie du glucose sont médiés au moins en partie par l'activation centrale de FGFR1 par le FGF19.

#### *b) Foie*

Dans le foie, FGF15/19 empêche le développement et provoque la régression des principales caractéristiques de la NASH : stéatose, inflammation, fibrose et syndrome métabolique. Des études de gain de fonction de FGF19, soit à partir d'une surexpression transgénique, soit par un traitement avec une protéine FGF19 recombinante ou modifiée, ont montré que FGF19 protège contre l'accumulation de triglycérides et de cholestérol dans le foie et diminue ainsi la stéatose (Alvarez-Sola et al. 2017; Tomlinson et al. 2002). En outre, une étude a montré que le knock-out *Fgf15* chez les souris nourries avec un régime riche en graisses aggrave la stéatose (Alvarez-Sola et al. 2017). Une deuxième étude, qui a soumis des souris knock-out *Fgf15* à un régime riche en graisses n'a pas constaté d'aggravation de la stéatose, mais a mis en évidence une altération de l'expression des gènes de l'homéostasie des lipides (Schumacher et al. 2017). FGF15/19 réduirait la stéatose en régulant négativement les gènes impliqués dans l'absorption (CD36) et la synthèse des lipides (*Scd1*, *Fas*, *Fatp4*, *Elovl6*, *Acly*, *Mogat1*, *Dgat2* (Schumacher et al. 2017; Zhou, Learned, et al. 2017; Tomlinson et al. 2002; Alvarez-Sola et al. 2017)). En plus de réduire l'accumulation de lipides, FGF19 protège les hépatocytes contre la lipoapoptose et réduit le stress du réticulum endoplasmique (Alvarez-Sola et al. 2017; Zhou, Learned, et al. 2017).

Il a également été démontré que FGF19 réduit le développement de la stéatose en modifiant la composition du pool d'acides biliaires pour contenir plus de T $\beta$ MCA, un puissant antagoniste de FXR, ayant pour conséquence



une diminution de l'activité intestinale du FXR et une diminution de la synthèse intestinale des céramides. La réduction de la production intestinale de céramides diminue l'activation de SREBP1c dans le foie et atténue ensuite la stéatose (Zhou, Learned, et al. 2017). En modifiant le pool d'acides biliaires, FGF19 réduit également l'absorption du cholestérol entérocytaire, augmente l'efflux de cholestérol transintestinal et augmente la teneur en stérols fécaux (de Boer et al. 2017).

FGF15/19 améliore l'homéostasie du glucose par plusieurs mécanismes. Les souris surexprimant FGF19 réduisent les niveaux sériques d'insuline, de glucagon et de glucose à jeun. Ces souris avaient également une meilleure réponse lors des tests de tolérance à l'insuline et au glucose (Tomlinson et al. 2002; Zhou, Learned, et al. 2017). L'évaluation du modèle homéostatique de la fonction cellulaire des cellules  $\beta$  pancréatiques et de la résistance à l'insuline (HOMA-IR), un indicateur de la résistance à l'insuline, était réduite chez les souris transgéniques (Zhou, Learned, et al. 2017). L'inverse était observé chez les souris déficientes en FGF15 qui avaient une augmentation de la glycémie à jeun et une intolérance au glucose (Schumacher et al. 2017; Kir et al. 2011).

FGF19 régule également la néoglucogenèse et la glycogenèse hépatiques. Dans le foie, l'activation par FGF19 de FGFR4-KLB provoque la déphosphorylation et l'inactivation de CREB (*cAMP response element binding protein*) et conduit par conséquent à l'inhibition de l'expression de PGC1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) et d'autres gènes impliqués dans la néoglucogenèse (Potthoff et al. 2011a).

Par ailleurs, FGF15/19 exerce des effets sur les hépatocytes qui sont similaires à ceux de l'insuline, notamment la stimulation de la synthèse des protéines et du glycogène et la suppression de la néoglucogénèse (Potthoff et al. 2011a; Kir et al. 2011). Cependant, une différence importante par rapport à l'insuline est que FGF15/19 inhibe plutôt que de stimuler la synthèse des acides gras (Bhatnagar, Dammron, and Hillgartner 2009) et que ces effets « insulin-like » empruntent des voies de signalisation intracellulaires différentes à celles de l'insuline (MAPK pour FGF19, AKT/mTOR pour l'insuline (Kir et al. 2011)). Autre différence notable avec l'insuline concerne le timing du pic de sécrétion de ces hormones en post-prandial: 15 minutes pour l'insuline et 45-60 minutes pour FGF19 (Kir et al. 2011; Potthoff et al. 2011b).

Les données concernant l'effet de FGF15/19 sur le développement de la fibrose hépatique dans un contexte de NASH sont plus controversées. Dans un modèle de souris ayant un régime à forte teneur en graisses (40%), en fructose et en cholestérol (parfois appelé « Western Diet »), la surexpression du FGF19 ou le traitement par l'analogue de FGF19 M70 réduisait le développement de la fibrose hépatique (Zhou, Learned, et al.

2017). Cependant, dans le modèle de régime riche en graisses (60%) et dans le modèle de fibrose hépatique induite au CCl<sub>4</sub>, les souris déficientes en FGF15 sont protégées contre la fibrose hépatique (Uriarte et al. 2015; Schumacher et al. 2017). Dans une étude utilisant le modèle CCl<sub>4</sub>, le gène codant pour CTGF (connective tissue growth factor) s'est révélé être une cible de FGF15/19 dans les hépatocytes. L'inactivation de Fgf15 réduit le CTGF dérivé des hépatocytes et améliore la fibrose induite par le CCl<sub>4</sub>. Le knockout de Fgf15 augmente également la taille totale du pool d'acides biliaires et peut donc augmenter l'activité de FXR dans les cellules hépatiques étoilées, ce qui réduit leur activation, réduisant ainsi leur production de matrice extracellulaire (Uriarte et al. 2015). Comment concilier ces observations contradictoires entre ces études ? Dans ces deux modèles il est possible que la réduction de la fibrose résulte d'une inhibition des signaux d'activation des cellules étoilées hépatiques, résultant soit d'une diminution de la stéatohépatite (modèle gain de fonction de FGF19), soit par une activation de FXR dans ces cellules (modèle FGF15 KO).

### *c) Tissu adipeux, muscle et intestin grêle*

FGF19 agit également sur les tissus adipeux et musculaires. Le tissu adipeux n'exprime pas FGFR4, les effets de FGF19 passent donc par FGFR1-KLB (Kurosu et al. 2007). Les souris traitées avec du FGF19 recombinant et la surexpression transgénique de FGF19 réduit la masse grasseuse et le poids corporel total (Tomlinson et al. 2002; Zhou, Learned, et al. 2017; Benoit et al. 2017). Lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisses, les souris transgéniques FGF19 résistent à la prise de poids et à l'augmentation du tissu adipeux blanc rétropéritonéal et épидидymaire (Tomlinson et al. 2002). L'inactivation de Fgf15 augmente la masse grasse et le poids corporel total lors de ce même régime (Alvarez-Sola et al. 2017). Des souris transgéniques surexprimant FGF19 montrent également une augmentation du tissu adipeux brun, de la thermogénèse et de la dépense énergétique (Fu et al. 2004; Tomlinson et al. 2002).

En outre, FGF19 agit sur le tissu musculaire strié. Les souris traitées avec des doses modérées de FGF19 ont une augmentation du poids des muscles soléaire, tibial antérieur et gastrocnémiens. L'explication vient d'une augmentation de la surface des fibres musculaires, alors que le nombre de fibres musculaires n'est pas modifié. FGF19 protège également contre l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone, l'obésité et l'âge (Benoit et al. 2017). Il est à noter que ces effets nécessitent l'expression de  $\beta$ -klotho et ne sont pas obtenus avec l'administration de FGF21.

## **5. Effets oncogéniques**

Il existe dans la littérature de nombreux arguments en faveur d'un effet oncogénique de FGF19, nous les détaillerons ci-après. Il est notable que, contrairement aux effets métaboliques qui sont souvent communs entre FGF15 et FGF19, l'orthologue murin ne semble pas induire d'effet pro-

oncogénique (Zhou, Luo, et al. 2017a). Une des explications proposées provient du fait que ces deux protéines n'ont que 53% d'homologie dans leurs séquences en acides aminés (Nishimura et al. 1999). Notamment, FGF15 possède un résidu cystéine non apparié (Cys-135) qui forme un pont disulfure intermoléculaire pour structurer un homodimère, qui serait la forme circulante de FGF15. Cette particularité mènerait à une signalisation différente de FGF19 et particulièrement dans les signaux oncogéniques (Zhou, Luo, et al. 2017a).

#### a) *Modèles de surexpression de FGF19*

Historiquement le premier article décrivant un effet oncogénique de FGF19 a été publié alors que le rôle de régulation de la synthèse des acides biliaires n'était pas encore décrit. Ce papier décrivait l'apparition de tumeurs compatibles avec un CHC apparaissant après 10 mois dans des souris FVB transgéniques avec surexpression musculaire de FGF19 (Nicholes et al. 2002). Les tumeurs en question étaient majoritairement positives à la glutamine synthétase et avaient une mutation activatrice de  $\beta$ -caténine, suggérant le besoin d'un deuxième évènement oncogénique pour donner lieu aux tumeurs. De même, les souris ne développaient pas de tumeur en cas d'inactivation de FGFR4 (French et al. 2012).

Un deuxième modèle murin de surexpression de FGF19, cette fois-ci hépatique, est obtenu suite à l'injection dans la veine caudale d'une solution contenant un *adeno-associated virus* (AAV) codant pour FGF19 (Zhou, Luo, et al. 2017b). Cette injection, réalisée aux alentours de 11 semaines de vie permet d'obtenir une expression hépatique de FGF19 au long cours, avec des concentrations circulantes largement supra-physiologiques (proches de 400ng/mL). Les souris développaient des lésions de CHC 6 à 12 mois après l'injection. De façon remarquable, ces effets n'étaient pas observés avec FGF15, alors que les effets métaboliques étaient très proches entre les deux groupes (amélioration de l'homéostasie du glucose, réduction du pool d'acides biliaires, diminution du poids corporel, ...).

#### b) *Arguments chez l'homme : amplicon 11q13.3 (CCND1) et surexpression de FGF19*

Les données issues de CHC humains qui montrent un potentiel rôle de FGF19 en tant qu'oncogène *driver* partent du constat principal que le gène codant pour FGF19 est amplifié dans 4 à 15% des cas selon les séries (Sawey et al. 2011a; K. Wang et al. 2013; Schulze et al. 2015). En fait, FGF19 est situé dans un amplicon (11q13.3) fréquemment amplifié dans plusieurs types de cancers et situé à proximité (45kb) du gène CCND1 codant pour la cycline D1, également reconnu pour être un oncogène *driver* (Deane et al. 2001). La particularité du CHC vient du fait que les deux gènes sont presque systématiquement co-amplifiés et exprimés par la tumeur (Sawey et al. 2011a). Cela pose la question de l'implication de chacun de ces oncogènes dans les effets prolifératifs des cellules tumorales ayant cette

amplification. Lorsque des hépatoblastes p53<sup>-/-</sup>/Myc exprimant un vecteur FGF19, CCND1, ou les deux étaient transplantés en orthotopique chez des souris *nude*, les souris développaient des tumeurs après 6 semaines dans les trois cas. Cependant, les tumeurs étaient plus volumineuses en cas de co-expression de FGF19/CCND1, suggérant une coopération entre les deux oncogènes (Sawey et al. 2011a). A noter, cette coopération était médiée par  $\beta$ -caténine : la surexpression de FGF19 augmente l'activation de  $\beta$ -caténine, ce qui conduit à son tour à une activation de cycline D1 (Sawey et al. 2011a). L'amplification de CCND1/FGF19 est d'ailleurs mutuellement exclusive avec les mutations activatrices de CTNNB1 dans les cohortes humaines, ce qui va dans le sens d'une redondance fonctionnelle (Schulze et al. 2015). Enfin, l'amplification 11q13.3 ne survient quasiment que dans un contexte de foie cirrhotique et de façon plus fréquente dans les stades tumoraux avancés (Schulze et al. 2015).

Par ailleurs, l'étude de deux séries asiatiques de CHC opérés a mis en évidence une surexpression de FGF19 (en qPCR ou immunohistochimie) dans près de 50% des tumeurs. Les patients ayant cette surexpression avaient une récurrence de CHC plus fréquente et une moins bonne survie globale (Miura et al. 2012; Hyeon et al. 2013). Plus récemment, une étude japonaise portant sur une cohorte de 304 patients ayant un CHC a mis en évidence des niveaux circulants de FGF19 plus élevés que chez des sujets sains ou de patients ayant une maladie hépatique chronique sans CHC. De même, les patients ayant un traitement à visée curative avaient des concentrations circulantes de FGF19 qui diminuaient significativement. En revanche, les performances diagnostiques de FGF19 étaient moyennes (AUROC à 0.795 (Maeda et al. 2019)).

### c) Mécanismes : *cell-autonomous* ?

Une des particularités de FGF19 en tant qu'oncogène vient de sa capacité à être sécrété et agir par voie autocrine, paracrine et endocrine. Une amplification avec surexpression de FGF19 peut donc avoir un effet sur la cellule portant l'amplification mais également les cellules voisines et des cellules à distance (effets « non-cell autonomous »). Les mécanismes expliquant les effets oncogéniques de FGF19 sont donc probablement multiples.

Le modèle de surexpression musculaire de FGF19 est un bon exemple de cet effet à distance (Nicholes et al. 2002). Le modèle de surexpression hépatique de FGF19 via une infection par AAV propose un mécanisme d'effet *non-cell autonomous* médié par l'interleukine 6 et STAT3. Ainsi, FGF19 induit une sécrétion d'IL-6 par les cellules de Kupffer, ce qui ensuite active la voie STAT3 dans l'hépatocyte, précipitant sa transformation (Zhou, Yang, et al. 2017). D'autres dialogues avec les cellules stromales hépatiques sont possibles comme cela a été démontré avec les FGF de la sous-famille de FGF8 (comprenant FGF8, 17 et 18). Dans une étude testant l'effet de ces

trois protéines, les auteurs ont mis en évidence que FGF17 et FGF18 stimulent la croissance des myofibroblastes dérivés du HCC. De même, les trois membres de cette sous-famille induisaient la prolifération et la capacité à s'organiser des cellules endothéliales hépatiques (Gauglhofer et al. 2011).

Afin d'exercer ses effets prolifératifs, FGF19 nécessite que son récepteur (FGFR4) et corécepteur (KLB) soient exprimés correctement par les hépatocytes, comme cela a été démontré *in vitro* (Caruso et al. 2019) et *in vivo* (French et al. 2012). Une étude récente publiée dans *Hepatology* montre que dans les cellules d'hépatocarcinome l'activation de FGFR4 par FGF19 stimule l'expression de SOX18 via la phosphorylation de FRS $\alpha$  et GSK3 $\beta$ . SOX18 est un facteur de transcription qui à son tour augmente l'expression de FGFR4, créant une boucle de rétrocontrôle positif (J. Chen et al. 2019).

## 6. Ciblage de la voie FGFR4 : une thérapie prometteuse

Les éléments présentés ci-dessus ont comme conséquence logique de s'intéresser à la perturbation de l'activation du récepteur FGFR4 comme potentielle cible thérapeutique des CHC avec amplification (voire surexpression ?) de FGF19.

Des anticorps monoclonaux bloquant FGFR4 ont été produits et testés *in vitro* et *in vivo*. Ces anticorps neutralisants inhibent la signalisation de FGFR4 dans les cellules de CHC, ainsi que leur prolifération et la formation de colonies *in vitro* et leur croissance sous forme de xénogreffes dans des souris *nude* (French et al. 2012). Ces anticorps anti-FGFR4 inhibent aussi le développement du CHC chez des souris transgéniques FGF19 traitées au DEN (French et al. 2012). Les inhibiteurs tyrosine kinase non spécifiques de FGFR4 sont également efficaces dans les lignées de CHC exprimant FGFR4 et FGF19 (Schmidt et al. 2016). Un inhibiteur sélectif de FGFR4 a également été mis au point, le BLU9931. Ce composé forme des liaisons covalentes avec un résidu cystéine proche du site de liaison à l'ATP de ce récepteur. Ce site présente un très haut degré de spécificité pour FGFR4 et n'est pas présent dans FGFR1 et 3, ce qui permet de contourner les réponses toxiques potentielles dues à l'inhibition de FGFR1 et 3. Cet inhibiteur irréversible de FGFR4 est efficace contre les CHC exprimant l'ensemble de l'axe FGF19/FGFR4/KLB, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* dans un modèle de xénogreffes de tumeurs chez des souris *nude*, mais n'ont aucun effet sur les CHC qui n'expriment pas ces gènes (Hagel et al. 2015). Une deuxième molécule, dérivée du BLU9931, a été développée par la même équipe : le fisogatinib (ou BLU554). Des données d'un essai clinique de phase I ont été publiés récemment : 11% des patients étaient considérés répondeurs, avec une médiane de durée de réponse de 5.3 mois. Les répondeurs appartenaient tous au groupe ayant des tumeurs avec un marquage FGFR4 positif en immunohistochimie (R. D. Kim et al. 2019). Le profil de tolérance était satisfaisant, avec principalement des diarrhées, une asthénie et une



augmentation des enzymes hépatiques (R. D. Kim et al. 2019). Une étude ancillaire à cet essai clinique où il était réalisé un séquençage des tumeurs en cours de traitement a révélé l'apparition chez certains patients de mutations sur la séquence de FGFR4 offrant une résistance acquise au fisolatinib. Ces résultats confirment qu'il existe une dépendance à la voie FGF19/FGFR4 dans les tumeurs ayant une surexpression de cette voie (Hatlen et al. 2019). Un essai clinique de phase Ib/II avec cette même molécule est en cours (identifiant *Clinical Trials* NCT04194801).

Enfin, un anticorps monoclonal anti-FGFR4, appelé U3-1784, est également en cours d'étude chez l'homme (phase I en attente des résultats, identifiant *Clinical Trials* NCT02690350) après des résultats prometteurs dans des modèles animaux (Bartz et al. 2019).

#### D. Contexte et objectifs

Un des grands axes de recherche du laboratoire concerne l'étude de l'interaction bidirectionnelle entre le microenvironnement et les cellules tumorales de CHC. Pour mon travail de thèse nous avons décidé d'introduire pour la première fois un modèle de microenvironnement pathologique similaire à la NASH humaine et d'utiliser principalement la technique d'injection hydrodynamique. Cette technique a été préférée puisqu'elle permet d'utiliser des souris immunocompétentes, ce qui constitue un avantage majeur pour étudier le microenvironnement, mais également parce qu'elle permet d'étudier la coopération entre oncogènes. Après la mise au point de cette technique entre nos mains, ce qui sera détaillé dans les résultats, nous avons décidé de nous focaliser sur un oncogène en particulier, à savoir FGF19.

Nous avons choisi d'étudier cet oncogène pour plusieurs raisons. D'une part, dans l'état actuel de nos connaissances, l'axe FGF19/FGFR4 est une des rares voies de signalisation impliquées dans le CHC pouvant être ciblées pharmacologiquement, comme cela a été discuté ci-dessus. D'autre part, les études de coopération oncogénique avec FGF19 sont très rares. Par ailleurs, FGF19 exerce des effets paradoxaux à première vue, à savoir d'une part une protection hépatique dans un contexte de régime pourvoyeur de NASH, qui en soi est un facteur de risque du CHC, et d'autre part des effets oncogéniques en cas de surexpression chronique. Cette dualité d'effets est encore insuffisamment caractérisée dans la littérature. Enfin, il existe chez l'homme deux situations cliniques où les taux circulants de FGF19 (ou un analogue de structure très proche) sont élevés au long cours, soit lors d'un traitement par des analogues de FGF19, soit lorsqu'un CHC sécrète FGF19. La caractérisation des effets métaboliques résultant de taux circulants de FGF19 (ou un analogue) revêt donc une importance primordiale.

Dans ce contexte, les questions auxquelles nous avons essayé de répondre sont les suivantes :

- FGF19 coopère-t-il avec d'autres oncogènes fréquemment impliqués dans le CHC ? Si oui, quels sont les mécanismes en jeu ?
- L'exposition à des concentrations élevées de FGF19 déclenche-t-elle des effets métaboliques non encore décrits ?
- Comment intégrer les effets paradoxaux de FGF19 sur le foie dans un modèle murin de NASH ?



## II. Résultats

En raison des modalités inhabituelles du début de ma thèse (les deux premières années je n'étais présent au laboratoire que 1,5 jours par semaine) et en raison des résultats obtenus au cours de ces premières années, le sujet de ma thèse a progressivement évolué pour me focaliser sur la coopération oncogénique concernant FGF19. Nous avons tout de même obtenu certains résultats qui ne feront pas l'objet d'une publication, au moins dans l'immédiat, mais qui méritent d'être discutés.

Je vais donc présenter les résultats de la façon suivante :

- D'abord la mise au point de la technique et les différentes combinaisons essayées
- Ensuite la description d'un phénotype inattendu de type diabète insipide dans les souris transfectées par FGF19 qui sera présenté sous forme de manuscrit quasi-définitif en format *Brief Communication* pour la revue *Molecular Metabolism*
- Puis la description des résultats obtenus sur la coopération oncogénique entre FGF19 et autres oncogènes majeurs de l'hépatocarcinogénèse, sous forme du manuscrit en cours de préparation mais non définitif (plusieurs expériences en cours)
- Enfin, les résultats sur les différents régimes pourvoyeurs de NASH et l'effet de FGF19 dans ce contexte, qui pour l'instant ne sont pas intégrés dans un manuscrit en préparation.

### A. Mise au point de la technique HGT

Nous avons débuté mon projet de thèse en important au laboratoire la technique d'injection hydrodynamique. Bien que les deux papiers princeps (G. Zhang, Budker, and Wolff 1999; F. Liu, Song, and Liu 1999) donnent beaucoup de détails techniques (âge des souris, poids idéal, vitesse d'injection, quantité de plasmides à injecter) et que les publications avec ce système sont nombreuses, nous avons plusieurs interrogations.

#### 1. Lorsque plusieurs plasmides sont injectés simultanément, les hépatocytes transfectés intègrent-ils tous les plasmides ?

Afin de répondre à cette question, nous avons fait une expérience pilote où nous avons injecté un mélange de trois plasmides codant chacun pour une protéine fluorescente différente : cherry, venus et cerulean (8µg chacun). Les souris ont été collectées quatre jours plus tard. Les foies ont été fixés en paraformaldéhyde 4% pendant 4 heures puis sucrose 15% pendant 16h avant d'être mis en cassette avec la matrice d'intégration OCT. Les cassettes ont été stockés à -80°C puis coupées au cryostat. Les coupes ont été fixées au DAPI + Vectashield. Voici (figure 8) une image représentative de deux souris en microscopie à épifluorescence. On observe une intégration des trois plasmides dans l'immense majorité des hépatocytes

transfectés, avec toutefois des différences quantitatives de taux d'expression de protéines fluorescentes.

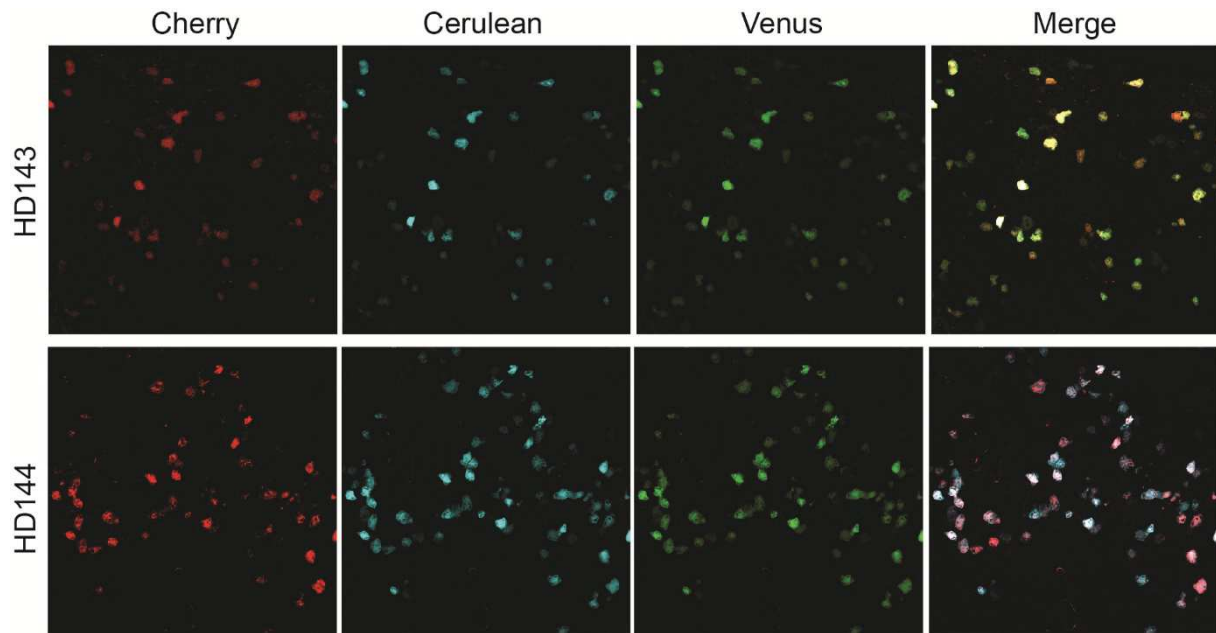


Figure 8 : coupes de foie au microscope à épifluorescence (10X) montrant les hépatocytes transfectés par un des trois plasmides. La dernière image correspond à la fusion des trois précédentes.

## 2. Lorsqu'une deuxième injection hydrodynamique est réalisée à 2 semaines d'intervalle, est-ce les mêmes hépatocytes qui sont transfectés ?

Dans la littérature la seule description de HGT sériées vient d'un des papiers princeps (F. Liu, Song, and Liu 1999), où, en l'absence de technologie *Sleeping Beauty Transposase* les auteurs ont voulu induire une expression durable du gène introduit par des HGT répétées à trois semaines d'intervalle. Le résultat est nettement en défaveur de leur objectif, avec un aspect identique de décroissance d'expression du transgène à partir de 8h post-HGT. En revanche, la topographie des hépatocytes transfectés n'a pas été évaluée.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé deux injections à deux semaines d'intervalle avant de collecter la souris une semaine plus tard. Les hépatocytes transfectés ont été visualisés grâce à l'expression de deux molécules fluorescentes différentes, RFP et GFP. Sur les trois coupes analysées (figure 9), on distingue seuls 4 hépatocytes sur 217 (1.8%) exprimant les deux fluorophores. Nous concluons que les injections HGT sériées permettent la transfection d'hépatocytes indépendants.

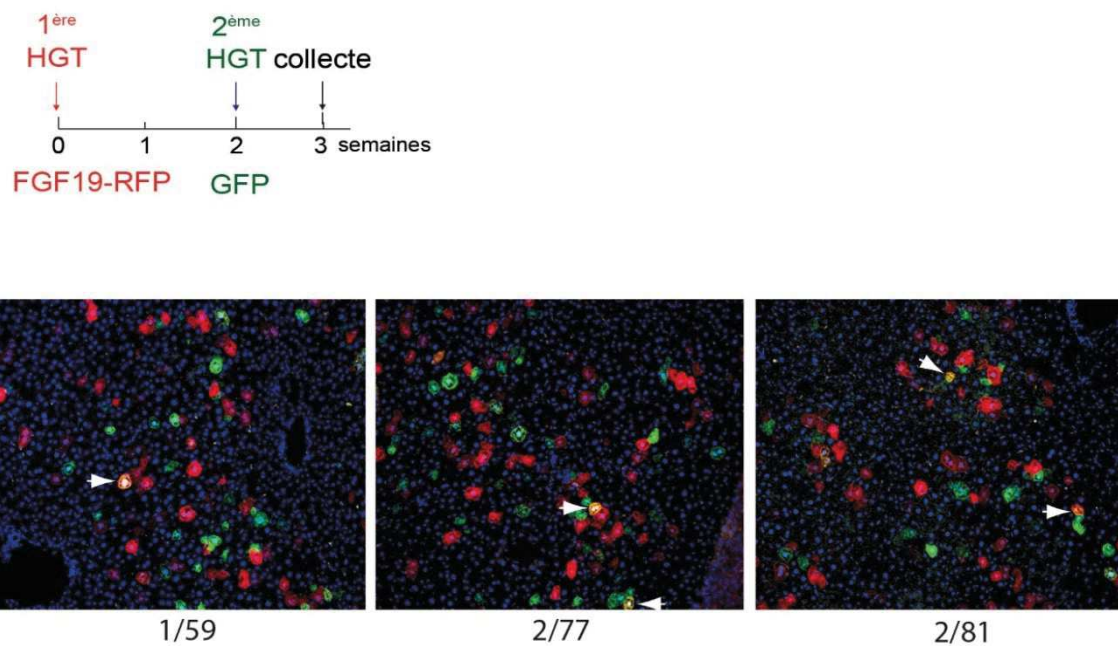


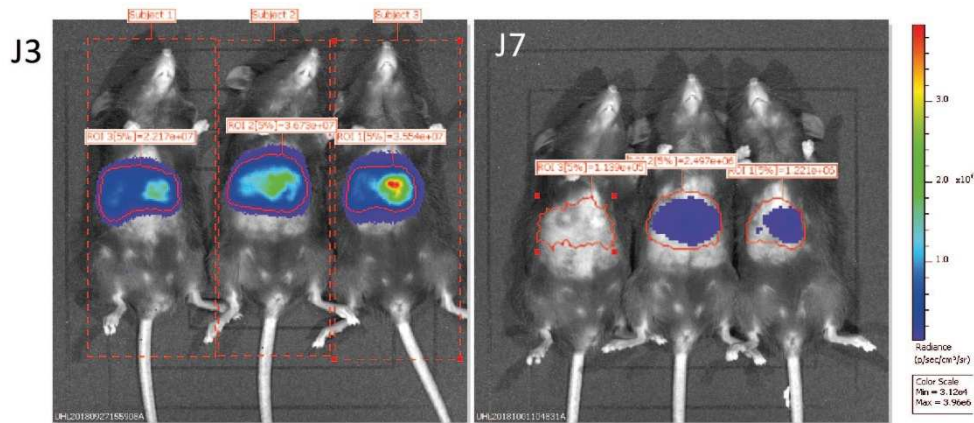
Figure 9 : lors d'une double HGT, les hépatocytes transfectés le sont majoritairement une seule fois. Coupes (10X). Les flèches blanches indiquent les hépatocytes exprimant à la fois RFP et GFP.

### 3. Est-il intéressant d'introduire la luciférase Firefly pour réaliser un suivi non invasif de la croissance tumorale ?

Lorsque l'institut s'est doté d'une caméra à bioluminescence, nous avons évalué son utilisation pour le suivi non invasif de nos souris, en incluant au moment de l'HGT un plasmide codant pour la luciférase, intégré ou non à la transposase *Sleeping Beauty*.

Cette méthode nous a donné des résultats mitigés : les souris injectées avec le plasmide contenant simultanément la luciférase et la transposase SB perdent leur signal bioluminescent après deux semaines en moyenne et n'aboutissent pas à la formation de tumeurs. En revanche, lorsque le plasmide codant seul pour la luciférase est inclus, cela ne semble pas changer les résultats. Voici un exemple d'image obtenue (figure 10).

Nos résultats suggèrent que la luciférase est immunogène et son inclusion présente donc des inconvénients pour les expériences sur des animaux immunocompétents.



**Figure 10: évolution de la bioluminescence après HGT.** Trois souris injectées avec une combinaison Ras + crispr p53 + SB13-luc (*Sleeping Beauty transposase 13X luciferase*) sont montrées à J3 puis J7 de l'injection. On note une décroissance significative de l'intensité lumineuse correspondant à une élimination des hépatocytes transfectés.

#### 4. Peut-on dissocier les cellules tumorales issues des HGT pour ensuite les mettre en culture, les caractériser et réaliser une allogreffe orthotopique ?

Un des avantages de la technique d'HGT est celle de permettre d'obtenir des tumeurs de combinaison génétique définie. Cependant, la technicité de l'injection ne laisse qu'une fenêtre limitée de poids (entre 17 et 21g), donc d'âge (entre 8 et 12 semaines pour les souris femelles, entre 8 et 10 pour les mâles), pour réussir la transfection. Cela ne permet donc pas de réaliser des HGT dans des souris soumises à un régime pourvoyeur de NASH puisqu'elles prennent rapidement du poids.

Afin de contourner ce problème et d'avoir un modèle permettant d'étudier les interactions entre un microenvironnement pathologique dans un contexte de NASH et une combinaison oncogénique définie, nous avons entrepris de dissocier les cellules tumorales issues de tumeurs obtenues par HGT. Pour cela nous avons utilisé un kit de dissociation tumorale (Miltenyi #130-096-730). Ensuite, nous avons mis en culture ces cellules pour pouvoir les injecter par voie orthotopique (figure 11). Malgré de nombreux échecs, nous avons réussi à produire des lignées cellulaires issues de trois combinaisons différentes :

- N-Ras<sup>G12D</sup> + crispr p53
- Myc + crispr p53
- Myc + FGF19 + crispr p53.

Les expériences réalisées avec ces lignées sont détaillées dans les manuscrits.



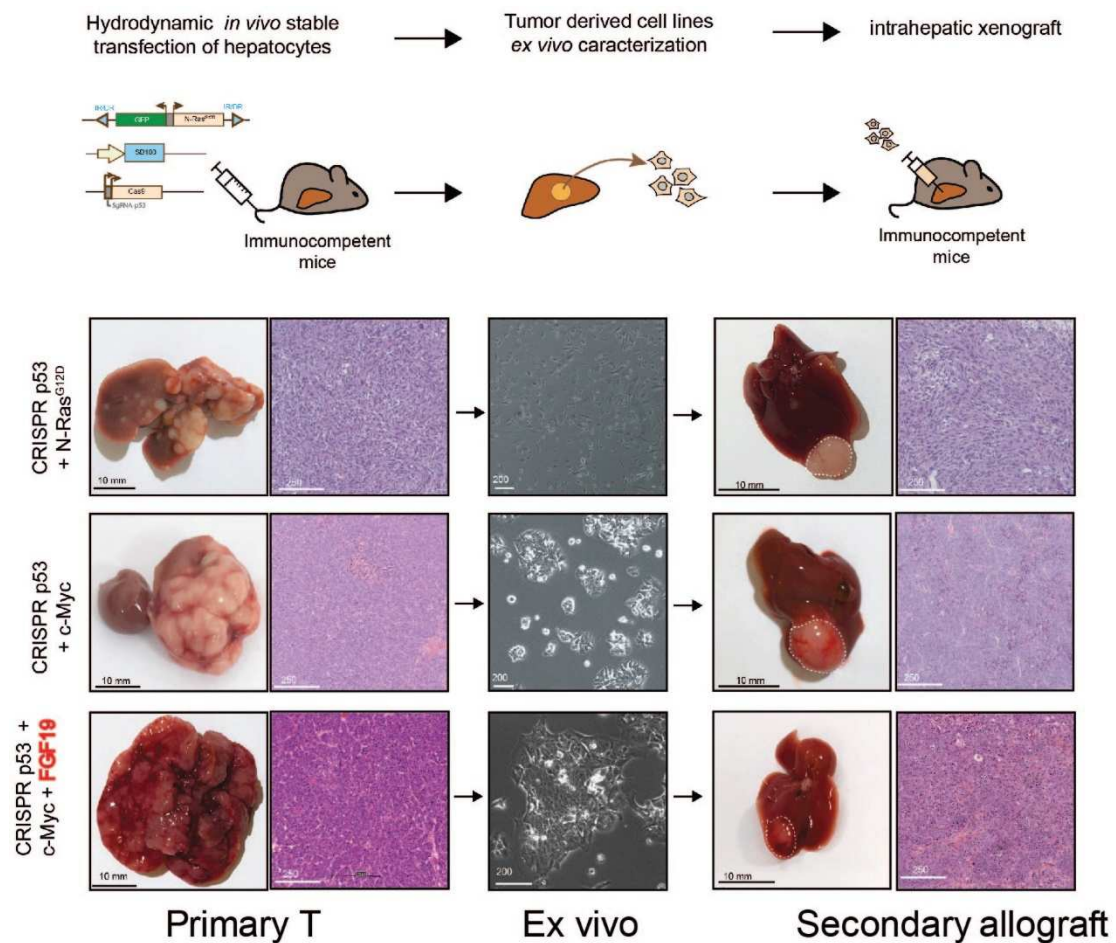


Figure 11 : Schéma expérimental de la dissociation tumorale de tumeurs issues de la technique HGT pour ensuite être injectées avec une technique d'allogreffe orthotopique.

Récemment, nous avons adopté une technique de dissociation de tumeurs plus douce, qui semble augmenter le taux de succès dans la mise en culture de cellules tumorales.

## 5. Quelles sont les combinaisons oncogéniques qui donnent lieu à des tumeurs ?

Au cours de ma thèse et surtout les deux premières années, nous avons cloné différents plasmides et généré de nombreuses combinaisons d'oncogènes et/ou gènes suppresseurs de tumeurs, afin de valider la technique et pouvoir comparer les éventuelles tumeurs entre elles. De même, nous avons utilisé la technique d'injection hydrodynamique dans des souris de fond génétique différent (C57Bl/6J et FVB) et dans des souris génétiquement modifiées, d'intérêt pour deux autres projets du laboratoire.

Le premier projet en question concerne l'étude des effets oncogéniques des kinase cycline-dépendantes CDK8 et CDK19. Nous avons généré des tumeurs après injection de la combinaison N-Ras<sup>G12D</sup> + Crispr p53 dans des souris ayant une inactivation hépatospécifique de CDK8 (CDK8<sup>ΔHep</sup>). Le manuscrit en question, dont je fais partie des co-auteurs, est en cours de

révision et a été déposé dans le site de preprint BioRxiv. Vous trouverez en annexe la version de BioRxiv(Bacevic et al. 2019).

Le deuxième projet concerne l'étude des fonctions oncogéniques de différents mutants de p53 dans le CHC. Ce projet est à une phase préliminaire, mais nous avons déjà généré des tumeurs avec trois mutants différents (R249S, R249A et R175H) combinés avec N-Ras<sup>G12D</sup>.

Voici la liste de plasmides ou combinaisons pour lesquelles nous n'avons pas obtenu de tumeurs :

- Myc/p53<sup>R249S</sup>/Cre (fond génétique p53<sup>f/f</sup> après 1 mois)
- Crispr p53 seul ou RFP/cr p53 (après 6 mois)
- FGF19/ crispr RSK2 (après 6 mois)
- FGF19/ crispr RSK2/crispr p53 (après 6 mois)
- RFP/cr RSK2/ cr p53
- RFP, BFP ou GFP seuls
- FGF19/ $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup>/crispr p53 (après 4 mois)
- $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup> (après 3 mois)
- $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup>/cr p53 (après 3 mois)
- $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup>/cr p16-19 (après 4 mois)
- $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup>/cr KEAP1/cr p16-19 (après 6 mois)

En dehors des plasmides que nous avons utilisé comme contrôle et qui n'ont pas de pouvoir oncogénique propre (comme pour les protéines fluorescentes RFP, GFP ou BFP), plusieurs éléments (ou hypothèses) peuvent expliquer l'absence de tumeurs pour ces plasmides/comбинаisons :

- L'élimination des hépatocytes transfectés, comme cela a été décrit avec Ras muté par un mécanisme de sénescence (Kang et al. 2011)
- Un délai d'attente trop court. En effet, certaines de nos combinaisons sont extrêmement rapides (2-3 semaines) pour induire de volumineuses tumeurs, alors que d'autres ne génèrent des tumeurs qu'après 9-12 mois. Cependant, nous n'avons pas collecté toutes nos souris après 12 mois d'attente.
- L'absence d'effet coopératif entre les oncogènes en question.

Voici un tableau récapitulatif des combinaisons qui nous ont permis d'obtenir des tumeurs :

<b>Combinaison</b>	<b>Fond génétique</b>	<b>Latence (semaines)</b>	<b>Pénétrance</b>
N-Ras <sup>G12D</sup> /crispr p53 (ou sh p53)	C57Bl/6J ou FVB	3-4	66/83 (79%)
N-Ras <sup>G12D</sup> /Cre	P53 f/f	3-4	8/27 (31%)

N-Ras <sup>G12D</sup> /p53 <sup>R249S</sup>	C57Bl/6J	3-5	7/20 (44%)
N-Ras <sup>G12D</sup> /p53 <sup>R249S</sup> /Cre	P53 f/f	3-4	3/3 (100%)
N-Ras <sup>G12D</sup> /p53 <sup>R249A</sup>	C57Bl/6J	4	3/5 (60%)
N-Ras <sup>G12D</sup> /p53 <sup>R175H</sup>	C57Bl/6J	4	1/5 (20%)
N-Ras <sup>G12D</sup> /crispr p16- 19	C57Bl/6J	7	1/8 (12,5%)
N-Ras <sup>G12D</sup> /Myc	P53 f/f	1,5-2	8/8 (100%)
Myc/cr p53	C57Bl/6J ou FVB	4-7	12/23 (52%)
Myc/p53 <sup>R249S</sup>	C57Bl/6J	4	2/7 (29%)
Myc/FGF19	C57Bl/6J	1-3	14/15 (93%)
Myc/FGF19/cr p53	C57Bl/6J	1-3	15/15 (100%)
FGF19	C57Bl/6J	37-52	0% avant 28 semaines 6/10 (60%) après 37 semaines
FGF19/crispr p53	C57Bl/6J	39	0% avant 28 semaines 2/5 (40%) à 39 semaines
Myc/RFP	C57Bl/6J	4-8	2/10 (20%)
FGF19/ $\beta$ -caténine <sup>S33Y</sup>	C57Bl/6J	12-15	9/10 (90%)
Myc/ $\beta$ -caténine <sup>S33Y</sup>	FVB	3-4	5/6 (83%)
Myc/N-Ras <sup>G12D</sup>	P53 f/f	2-3	18/19 (95%)



## B. Article 1 : FGF19 stimulates water intake

Ce premier papier, dont la soumission devrait être faite prochainement s'intéresse à un phénotype dont nous nous sommes aperçus fortuitement (*serendipity*) lors des premières injections de souris avec le plasmide FGF19. En effet, la sciure des cages de ces souris était régulièrement trempée d'eau, sans raison apparente. Nous ne pouvions pas mesurer la diurèse des souris pour des raisons pratiques, nous avons donc commencé à peser les biberons de ces cages pour vérifier si ces souris consommaient plus d'eau que les autres souris, ce qui était effectivement le cas. Logiquement, les urines étaient diluées, les souris FGF19 avaient donc un syndrome polyuro-polydipsique et ce phénotype était parfaitement reproductible et stable dans le temps.

Ce qui aurait pu s'arrêter à une simple curiosité expérimentale nous a conduit à explorer ce phénotype. On peut s'interroger sur ce choix de sujet physiologique pour un laboratoire centré sur le cancer. Cependant, plusieurs raisons nous ont poussé à poursuivre cette voie. Tout d'abord, ce phénotype n'a jamais été décrit dans la littérature à notre connaissance. Ensuite, dans l'optique de notre projet centré sur les effets oncogéniques de FGF19, deux mesures simples et non invasives (pesée des biberons et mesure de l'osmolarité urinaire) permettaient de nous assurer de l'efficacité de la transfection. De même, la description de ce phénotype pourrait être pertinente pour les situations de surexpression de FGF19 ou de traitement par un analogue de FGF19 chez l'homme. Enfin, mon appétence personnelle pour la physiologie a certainement joué un rôle.

Une étude plus poussée de la littérature concernant les effets métaboliques des molécules de la sous-famille des FGF endocrines nous a révélé que ce phénotype était décrit pour un paralogue de FGF19, à savoir FGF21 (Camporez et al. 2013; P. Song et al. 2018; Turner et al. 2018). Etant donné que FGF19 et FGF21 sont tous les deux capables d'activer le complexe récepteur FGFR1c/  $\beta$ -klotho et qu'ils partagent certains effets métaboliques, nous avons orienté notre projet à tenter de reproduire les effets vus avec FGF21, tout en montrant que notre phénotype était bien indépendant de FGF21.

# FGF19 stimulates water intake

José Ursic-Bedoya <sup>1,2</sup>, Carine Chavey <sup>1</sup>, Lucy Meunier<sup>1,2</sup>, Guillaume Desandré<sup>1</sup>, Iria Gonzalez-Dopeso Reyes<sup>1</sup>, Eric Assénat <sup>1,2</sup>, Urszula Hibner <sup>1</sup>, Damien Gregoire <sup>1,✉</sup>

1. Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France

2. Department of hepatogastroenterology, Hepatology and Liver Transplantation Unit, Saint Eloi Hospital, University of Montpellier, France

✉ Corresponding author

## Contact information of the corresponding author

III. Damien Gregoire, ph.D.

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

1919, route de Mende

34293 Montpellier Cedex, France

Email : [damien.gregoire@igmm.cnrs.fr](mailto:damien.gregoire@igmm.cnrs.fr)

Phone : +33 (0)4 34 35 96 59

## Abstract

**Objectives:** Fibroblast growth factor (FGF19), a hormone with pleiotropic metabolic functions, is overexpressed in a sub-group of hepatocellular carcinoma (HCC). FGF19 analogues are under investigation for treatment of metabolic disorders. However, the knowledge of effects of chronic exposure to elevated concentrations of FGF19 is still partial. Thus, we aimed to develop a model of transgenic mice with long-term FGF19 hepatic overexpression.

**Methods:** Hydrodynamic gene transfer in C57Bl/6J male and female mice was used to induce FGF15 and FGF19 overexpression. To mimic HCC with FGF19 overexpression we generated a tumor cell line derived from Myc-Crispr p53-FGF19 tumors that we injected orthotopically.

**Results:** We obtained long-term FGF19 supraphysiological concentrations (mean value of 10 ng/ml  $CI_{95\%} = [3.5-15.0]$  2 weeks' post-transfection). FGF19 was biologically active since enzymes involved in bile acid synthesis were inhibited and body weight was decreased. We further show that FGF19 stimulates water intake and decreases urine osmolality, a phenotype lasting at least over a 6-month period. This phenotype, is independent of another endocrine FGF, FGF21, although it mimics some of its features.

**Conclusions:** Our data suggest that supraphysiological FGF19 concentrations, close to those observed in a subset of HCC patients, can induce a phenotype of diabetes insipidus, likely through signaling in the central nervous system.

## 1. Introduction

Fibroblast growth factor 19, FGF19, or its mouse ortholog FGF15, are expressed by the enterocytes of the terminal ileum and function as hormones. Notably, FGF15/19 controls bile acids synthesis and nutrient metabolism (Angelin, Larsson, and Rudling 2012), and has been reported to play a role in the regulation of glucose and lipid metabolism, as well as in energy expenditure and body adiposity (Gadaleta and Moschetta 2019).

FGF15/19 belongs to the endocrine FGF subfamily, along with FGF21 and FGF23. Endocrine FGF act through the binding to a FGF receptor (FGFR 1 to 4) in complex with a co-receptor,  $\alpha$ -klotho for FGF23,  $\beta$ -klotho (KLB) for FGF15/19 and FGF21 (Suzuki et al. 2008; X. Wu et al. 2010). While many of the FGF15/19 activities are mediated specifically by FGFR4/KLB signaling, FGF15/19 and FGF21 also display overlapping metabolic activities through FGFR1c/KLB signaling (A. L. Wu et al. 2011). The latter are at least partly mediated by central nervous system activation of FGFR1/KLB in the hypothalamus (Lan et al. 2017; Perry et al. 2015).

In physiological conditions, FGF21 is expressed by hepatocytes (Markan et al. 2014), while FGF15/19 is expressed by enterocytes (Inagaki et al. 2005). Nonetheless, FGF19 has been reported to be expressed by hepatocytes when subjected to high levels of bile acids, such as occurring during extrahepatic (Schaap et al. 2009) and intrahepatic cholestasis (Wunsch et al. 2015; Hasegawa et al. 2019). Moreover, FGF19 gene is frequently amplified in hepatocellular carcinoma (HCC, 4-15% (Sawey et al. 2011; Wang et al. 2013; Schulze et al. 2015)), the most frequent primary liver cancer, and patients with HCC display higher circulating levels of FGF19 than control patients (Maeda et al. 2019). Potent and selective FGFR4 inhibitors and monoclonal antibodies have been developed (Kim et al. 2019; Bartz et al. 2019) and are currently tested in clinical trials for FGF19-driven hepatocarcinoma, underscoring the therapeutic promise of targeting the FGF 19 pathway in HCC.

On the other hand, because of their metabolic effects, FGF19 and FGF21 have generated a great interest in pharmacological research for treatment of metabolic conditions such as type 2 diabetes mellitus (Geng, Lam, and Xu 2020) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) (Harrison et al. 2020).

Therefore, it is of crucial importance to better delineate the complex interplay of FGF19 roles and actions. Here, we report that the FGF19 expression and secretion by hepatocytes in a mouse model gives rise to long-lasting effects on water homeostasis.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Vectors: cloning of FGF19/15

Plasmids constructs pSBbi-RN-FGF19 and pSBbi-BB-FGF15 were respectively generated by cloning the human FGF19 amplified from Huh7 cDNA and the mice FGF15 amplified from ileum cDNA onto the pSBbi-RN (Addgene #60519) and psBbi-BB (Addgene #60521) plasmids digested by the SfiI restriction enzyme. Primer sets for amplification of the inserts (FGF19-SfiI-for-5'-ATCGGGCCTCTGAGGCCAGGGAGGTGCCATGCGGA-3'/FGF19-SfiI-rev-5'-CGATGGCCTGACAGGCCGCCCTGGCAGCAGTGAAGA-3' and FGF15-SfiI-for-5'-ATCGGGCCTCTGAGGCCCGGAGGTGTCATGGCGAG-3'/FGF15-SfiI-rev-5'-CGATGGCCTGACAGGCCCGGAATCCTGTCATTTCTG-3') contained the SfiI recognition site.

### 2.2 Mice experiments

All reported animal procedures were carried out in accordance with the rules of the French Institutional Animal Care and Use Committee and European Community Council (2010/63/EU). Animal studies were approved by institutional ethical committee (Comité d'éthique en expérimentation animale Languedoc-Roussillon (#36)) and by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (D. Gregoire: APAFIS#11196-2018090515538313v2).

**Hydrodynamic Gene Delivery:** Hydrodynamic injections were performed in 6 to 8 week-old C57Bl/6J female (unless stated otherwise) mice as described previously. Briefly, 0.1 mL/g of a solution of sterile saline (0.9% NaCl) containing plasmids of interest were injected into lateral tail vein in 8-10 s. psBbi-EF1a-FGF19-dTomato (12.5 µg), psBbi-EF1a- dTomato (12.5 µg), psBbi-EF1a-FGF15-TagBFP (12.5 µg) or psBbi-EF1a-TagBFP (12,5µg) were injected together with sleeping beauty transposase SB100X (2.5 µg, ratio of 5:1). pCMV(CAT)T7-SB100 was a gift from Zsuzsanna Izsvak (Addgene plasmid # 34879).

**Allografts:** C57Bl/6J female mice (Charles River) mice were anesthetized with intra-peritoneal injection of Xylazine-Ketamine mixture. After incision of abdominal wall and peritoneum, the left lateral lobe of the liver was pulled out of the mouse body. 5000 cells, resuspended in 5 µL of 25% Matrigel (BD) - PBS, were injected using a 10µL Hamilton syringe in the left lobe of the liver. After injection, liver was put back in normal position and the abdomen was sutured. Mice were monitored daily during 3 weeks, then euthanized before collected and fixed following classical procedures.

Water consumption was measured by cages (n=2-5 mice) three times a week. For the double bottle assay, mice were acclimated to cages with two bottles containing water for two weeks. They were then given access to bottles with water containing 3% sucrose (Sigma-Aldrich #16104) or water. Water and water containing sucrose intake was measured every two days. The position of bottles was changed every two days.

### 2.3 Blood samples for ELISA experiments

Mice were fasted for 4-6 hours then killed by anesthetic overdose with isoflurane. Plasma was collected after centrifugation. Plasma FGF19, FGF21 and copeptin were measured by ELISA, according to the manufacturers'

instructions: human FGF19 ELISA kit (Biovendor, RD191107200R), mouse FGF21 ELISA kit (Sigma-Aldrich, EZRMFGF21-26K), Copeptin mouse ELISA kit (MyBioSource, MBS2600763). For copeptin measure mice were subjected to 4 hours' water deprivation.

## 2.4 RNA isolation, qPCR

The RNA was extracted from liver tissue and purified using RNeasy mini kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Reverse transcription of total RNA (1 µg) was done with QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen), and cDNA quantified using LC Fast start DNA Master SYBR Green I Mix (Roche) with primers detailed below on LightCycler480 apparatus (Roche). Gene expression levels were normalized with hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT). Primer pairs used for qPCR: Hprt 5'- GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3' and 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3', FGF19 5'- CCAGATGGCTACAATGTGTACC-3' and 5'-CAGCATGGGCAGGAAATGA-3', Cyp7a1 5'-CTGCAACCTTCTGGAGCTTA-3' and 5'-ATCTAGTACTGGCAGTTGTTT-3', Cyp8b1 5'- CCTGTTTCTGGGTCCTCTTATTC-3' and 5'-TCTCCTCCATCACGCTGTC-3' and were designed using LightCycler® Probe Design Software.

## 2.5 FGF19 injection and brain immunohistochemistry

C57Bl/6J female 10-week-old mice were administered intraperitoneally 0.2mg/kg recombinant human FGF19 protein (R&D Systems, 969-FG-025) diluted in a solution of PBS + BSA 0.1%. Control mice received vehicle solution alone (n=3/group). Mice were then housed in individual cages. Two hours after the injection, mice were anesthetized with an overdose of ketamine/xylazine and then perfused transcardially with a saline solution (0.9% NaCl) followed by 50 ml of 4% paraformaldehyde prepared in phosphate buffer 0,1M (PB), pH 7.4. The brains were removed and stored for 24 h in 4% paraformaldehyde and then cryopreserved in a solution containing 30% sucrose in PB. Once the samples sank in the 30% sucrose solution they were frozen in Tissue Freezing Medium (MicomMicrotech, TFM-5). OCT blocks were cut in serial coronal sections (35 µm) using a cryostat and collected in a solution containing glycerol and ethylene glycol in PBS and stored at -80°C.

Free-floating sections were rinsed with Tris buffer pH 7.4 containing 1% of Triton X-100 (TBS-T), incubated in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS to block the endogenous peroxidase and then, saturated in a solution containing 1% of gelatin from cold fish water skin (Sigma G7041), 1% BSA (Sigma, A7030) and 0.4% Triton X-100 in TBS for 1 hour. Finally, sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody: rabbit anti-c-Fos (Santa Cruz, sc52, 1:200). The sections were rinsed with TBS-T and incubated with the biotinylated secondary antibody anti-rabbit (Vector Laboratories, BA1000 ,1:500) for 1 h. After washing, sections were incubated with avidin-biotin-complex (Vector Laboratories PK-6100, RRID: AB\_2336819) for 1 h. Once washed in TBS, the peroxidase reaction was visualized using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, D5637) and 0.03% hydrogen peroxide. Sections were mounted on SuperFrost Ultra Plus® slides, dried, dehydrate and coverslipped with Pertex (Sigma, 03989). The colorimetric signals were visualized using a Nanozoomer (Hamamatsu).

## 2.6 Statistical Analyses

Data sets were tested with 2-tailed unpaired Student *t* tests or Mann-Whitney U tests, correlations were analyzed with Pearson's  $\chi^2$  test using Prism Software version 8 (GraphPad). Significant *P* values are shown as: \**P* <0.05, \*\**P* <0.01, \*\*\**P* <0.001, and \*\*\*\**P* <0.0001.



Comparisons of the mRNA expression levels between groups were assessed using Mann-Whitney U test. Spearman's rank-order correlation was used to test the association between continuous variables. Univariate survival analysis was performed using Kaplan-Meier curve with log-rank test.

### 3. Results

#### Mouse model of FGF19 expression

We used hydrodynamic gene transfer (HGT) technique (F. Liu, Song, and Liu 1999; G. Zhang, Budker, and Wolff 1999) to generate a mouse model in which FGF19 is overexpressed by a fraction of hepatocytes. The rapid injection of a large volume of solution (10% w/v) in the tail vein of the mouse leads to *in vivo* transfection of hepatocytes. Combination of plasmids encoding for the Sleeping Beauty transposase SB100X and FGF19 was used to establish stable expression of the human hormone (Figure 1A). We could detect one to two percent of transfected hepatocytes by epifluorescence microscopy, that were still present 6 months after the injection (Figure 1B). The long-term stable expression of the transgene was confirmed by RT-qPCR analysis (Figure 1C). The level of FGF19 in plasma, detected by ELISA, was around 10 ng/ml (3.5-15.0, 95% C.I of mean) 2 weeks' post-transfection and remained high after 6 months, despite its gradual decrease in time, to reach 1 ng/ml (0.76 -1.11, 95% C.I of mean) (Figure 1D). These concentrations are supra-physiological, as healthy human subjects have circulating concentrations between 50-350 pg/mL (Angelin, Larsson, and Rudling 2012). Of note, however, the concentrations obtained with our model are 100 to 1000-fold inferior to those reported in a model of AAV infection (1 µg/mL (Zhou, Luo, et al. 2017a)). Moreover, these concentrations are close to those observed in 5% of HCC patients (Maeda et al. 2019). FGF19-expressing mice showed previously characterized transcriptional repression of *Cyp7a1* and *Cyp8b1*, enzymes of bile acids synthesis from cholesterol (Figure 1E) and effect on body weight (Lan et al. 2017) (Figure 1F). These effects indicate that the secreted FGF19 is active, and that the circulating levels are compatible with its physiological functions. Histological analysis of livers revealed no visible effect of FGF19 overexpression (Figure 1G).

#### FGF19 overexpression increases water intake

While studying metabolic effects on FGF19 mice, we serendipitously observed that their cages were more wet than control mice. This prompted us to measure the water intake by the animals. We observed that FGF19 expressing mice drank 6.6 to

7.8 mL/day (95%CI of the mean) compared to 2.9 to 3.1 mL/day for control animals hydrodynamically injected with an empty vector (p-value <0.0001) (Figure 2A). Strikingly, this phenotype was stable upon time, and was still visible after 5 months of FGF19 overexpression. Concomitantly, we confirmed our impression of increased urine production (wet cages) by a significant decrease of urine osmolality (Figure 2B), thus recapitulating a diabetes insipidus phenotype.

To determine if diabetes insipidus phenotype was sex dependent, we similarly overexpressed FGF19 by HGT in C57Bl/6J males. Again, the FGF19 expression increased water intake (mean water consumption during the first month after HGT of 5.8mL/mouse/day, CI<sub>95%</sub> = [4.2; 7.4]). Despite similar levels of FGF19 concentration in plasma, the phenotype was less strong in males compared to females, indicating a potential role for hormonal regulation (Figure 2C).

Next, we tested if this effect was recapitulated in a second experimental system, in which FGF19 is produced by tumor cells. We injected orthotopically tumor cell lines derived from Myc-Crispr p53 or Myc-Crispr p53-FGF19 tumors. Myc-Crispr p53 tumor development had no impact on water intake whereas mice injected with FGF19-expressing cells showed progressive rise of water intake from 3 to 7 mL/day as tumors were growing (Figure 2D). Mean FGF19 circulating levels at 3 weeks in mice injected with Myc-Crispr 53-FGF19 tumors were 153 ng/mL (81- 225, 95% C.I.).

Since the increase of water intake was observed with human FGF19 expressed in mouse, we next investigated whether the overexpression of FGF19 mouse ortholog, FGF15, had the same effects. We carried out hydrodynamic gene transfer with FGF15 encoding plasmid, similarly to what was done with FGF19. Interestingly, overexpression of FGF15 in hepatocytes did not affect water intake or urine osmolality (Figure 2E).

### **FGF19 effect on the central nervous system**

The phenotype we report is reminiscent of what is described with FGF21, for which pharmacologic administration also increased water consumption in mice (Camporez et al. 2013; Talukdar et al. 2016; Song et al. 2018; Turner et al. 2018). In a physiological context, FGF21 has been shown to stimulate water drinking in response to dehydration caused by metabolic stresses such as ketogenic diet or alcohol consumption (Song et al. 2018). Because FGF21 has also been involved in sugar appetite (Talukdar et al. 2016), we submitted control and FGF19 overexpressing

mice to a two-bottle preference study between water and 3% sucrose. Strikingly, we observed the same phenotype as with FGF21, i.e. FGF19 overexpressing mice showed reduced appetite for 3% sucrose water (Figure 3A).

A possible mechanism for FGF19 to phenocopy the FGF21 effect is that the former increases the latter's secretion. However, measurements of FGF21 plasmatic levels indicated that FGF19 expression had no effect on the FGF21 levels, ruling out an indirect effect (Figure 3B).

Since FGF19 is known to exert effects on the central nervous system through FGFR1c/ $\beta$ -klotho signaling (Marcelin et al. 2014; S. Liu et al. 2018; Perry et al. 2015) and that FGF21 effect on water homeostasis is mediated in part by neurons of the hypothalamus, we explored the effect of FGF19 in the hypothalamus. First, we sought to determine if the diabetes insipidus phenotype could be due to an inhibitory effect on the secretion of arginine vasopressin (AVP or antidiuretic hormone, one of the main regulators of body fluids). FGF19 overexpression did not affect plasma concentration of copeptin, a surrogate marker for AVP (Figure 3C).

Next, we investigated if FGF19 could activate the neurons of the paraventricular nucleus (PVN), one of the hypothalamus nucleus involved in the drinking response, as it has been shown for FGF21 (Song et al. 2018). We could not detect increased C-fos expression, a surrogate marker for neuron activation, in the PVN after FGF19 i.p. injection (Figure 3D). We conclude that FGF19 is capable to induce behavioral changes independently of FGF21, however the exact mechanisms involved in this regulation remain unknown.

## Discussion

The present study provides evidence that FGF19 is a dipsogenic hormone. We report a new activity for FGF19, which will add to the wide array of reported effects for this hormone. One remarkable result we obtained is the long-term phenotype after hepatic FGF19 expression. Contrarily to similar reported actions of endocrine FGFs on water intake after a single injection (Song et al. 2018; Turner et al. 2018), we present a long-lasting diabetes insipidus phenotype.

Since our model elicited supra-physiological FGF19 concentrations, we don't know whether FGF19 is implicated in water homeostasis in physiological conditions. However, HCC patients with tumor expression of FGF19 can have increased circulating levels of FGF19, close to the ones obtained with our model (Miura et al.

2012) and we showed that the allograft of tumor cells expressing FGF19 can trigger the same phenotype. Hence, this phenotype might be relevant in a subset of HCC patients.

Surprisingly, this strong phenotype has not been reported for other mouse models with overexpression of FGF19 (Zhou, Luo, et al. 2017b; Nicholes et al. 2002). Whether this phenotype has been unnoticed or is not seen with very high levels of circulating FGF19 remains to be determined. Nonetheless, the first hypothesis seems more likely since we reproduced this phenotype in a model with higher FGF19 concentrations (orthotopic graft of tumor cells expressing FGF19), close to those obtained with AAV-driven FGF19 liver overexpression (Zhou, Luo, et al. 2017a).

FGF15 shares only 53% of the amino acid sequence with FGF19 (Nishimura et al. 1999). Notably, FGF15 has an unpaired cysteine residue (Cys-135) that forms an intermolecular disulfide bridge to structure a homodimer, which would be the circulating form of FGF15. It has been suggested that this particularity leads to a different signaling and metabolic effects compared to FGF19 (Zhou, Luo, et al. 2017a). An impaired agonism of the FGFR1c/KLB receptor might explain the absence of dipsogenic features of FGF15 compared to FGF19.

With respect to the mechanism by which FGF19 exerts its effects on water intake and preference, we show that it mimics some features of FGF21 (behavioral change, no effect on AVP secretion), suggesting a central effect without being able to identify the hypothalamic region involved. FGF19 is a potent inhibitor of bile acids synthesis by the liver and transgenic mice overexpressing FGF19 have reduced bile acid pool size (Zhou, Learned, et al. 2017), which in turn represses nuclear bile acid receptor FXR. It has been shown that FXR inactivation leads to a decrease in urine osmolality (X. Zhang et al. 2014) through the regulation of aquaporin water channel (aquaporin 2) in the renal collecting ducts. Therefore, the exact mechanisms in play for this phenotype has yet to be demonstrated, and we are currently analyzing bile acids pool composition in control and FGF19+ mice to investigate this hypothesis.

Taken together, our study demonstrates that high FGF19 circulating concentrations elicit water intake and urine dilution in mice, independently of FGF21. To determine the relevance of these findings in patients with increased FGF19 notably due to focal amplification in HCC or in response to FGF19 analogs treatment for NASH will be of great interest.

## Acknowledgments

We acknowledge Montpellier Biocampus facilities: the imaging facility (MRI), the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” (RHEM). We are grateful to zootechnicians of IGMM animal housing facility, Cédric Orféo, Eve Lasserre, Zoé Lebrere, for their work. We thank members of our lab for helpful discussions and comments. This work was funded by IEVA-Plan cancer INSERM THE (UH, JZR), and supported by SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa\_Inserm\_DGOS\_12553. The funders had no role in study design, data collection and analysis or publication process.

## Conflict of interest

The authors disclose no conflict of interest.

## References

- Angelin, Bo, Tobias E. Larsson, and Mats Rudling. 2012. "Circulating Fibroblast Growth Factors as Metabolic Regulators - A Critical Appraisal." *Cell Metabolism* 16 (6): 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.001>.
- Bartz, Rene, Keisuke Fukuchi, Toshiaki Ohtsuka, Tanja Lange, Katrin Gruner, Ichiro Watanabe, Shinko Hayashi, et al. 2019. "Preclinical Development of U3-1784, a Novel FGFR4 Antibody against Cancer, and Avoidance of Its On-Target Toxicity." *Molecular Cancer Therapeutics* 18 (10): 1832–43. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0048>.
- Camporez, João Paulo G., François R. Jornayvaz, Max C. Petersen, Dominik Pesta, Blas A. Guigni, Julie Serr, Dongyan Zhang, et al. 2013. "Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice." *Endocrinology* 154 (9): 3099–3109. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1191>.
- Gadaleta, Raffaella Maria, and Antonio Moschetta. 2019. "Metabolic Messengers: Fibroblast Growth Factor 15/19." *Nature Metabolism* 1 (6): 588–94. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0074-3>.
- Geng, Leiluo, Karen S. L. Lam, and Aimin Xu. 2020. "The Therapeutic Potential of FGF21 in Metabolic Diseases: From Bench to Clinic." *Nature Reviews Endocrinology* 16 (11): 654–67. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0386-0>.
- Harrison, Stephen A., Stephen J. Rossi, Angelo H. Paredes, James F. Trotter, Mustafa R. Bashir, Cynthia D. Guy, Rajarshi Banerjee, et al. 2020. "NGM282 Improves Liver Fibrosis and Histology in 12 Weeks in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis." *Hepatology* 71 (4): 1198–1212. <https://doi.org/10.1002/hep.30590>.
- Hasegawa, Yasuhiro, Masanobu Kawai, Kazuhiko Bessho, Kie Yasuda, Takehisa Ueno, Yoshinori Satomura, Akiko Konishi, et al. 2019. "CYP7A1 Expression in Hepatocytes Is Retained with Upregulated Fibroblast Growth Factor 19 in Pediatric Biliary Atresia." *Hepatology Research* 49 (3): 314–23. <https://doi.org/10.1111/hepr.13245>.
- Inagaki, Takeshi, Mihwa Choi, Antonio Moschetta, Li Peng, Carolyn L. Cummins, Jeffrey G. McDonald, Guizhen Luo, et al. 2005. "Fibroblast Growth Factor 15 Functions as an Enterohepatic Signal to Regulate Bile Acid Homeostasis." *Cell Metabolism* 2 (4): 217–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>.
- Kim, Richard D., Debashis Sarker, Tim Meyer, Thomas Yau, Teresa Macarulla, Joong Won Park, Su Pin Choo, et al. 2019. "First-in-Human Phase I Study of Fisolitinib (BLU-554) Validates Aberrant FGF19 Signaling as a Driver Event in Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Discovery* 9 (12): 1696–1707. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0555>.
- Lan, Tian, Donald A. Morgan, Kamal Rahmouni, Junichiro Sonoda, Xiaorong Fu, Shawn C. Burgess, William L. Holland, Steven A. Kliewer, and David J. Mangelsdorf. 2017. "FGF19, FGF21, and an FGFR1/β-Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia." *Cell Metabolism* 26 (5): 709–718.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.005>.
- Liu, F, Y Song, and D Liu. 1999. "Hydrodynamics-Based Transfection in Animals by Systemic Administration of Plasmid DNA." *Gene Therapy* 6 (7): 1258–66. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>.
- Liu, Shunmei, Genevieve Marcelin, Clemence Blouet, Jae Hoon Jeong, Young Hwan Jo, Gary J. Schwartz, and Streamson Chua. 2018. "A Gut–Brain Axis Regulating Glucose Metabolism Mediated by Bile Acids and Competitive Fibroblast Growth Factor Actions at the Hypothalamus." *Molecular Metabolism* 8 (December 2017): 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.003>.
- Maeda, Takahiro, Hiroaki Kanzaki, Tetsuhiro Chiba, Junjie Ao, Kengo Kanayama, Susumu Maruta, Yuko Kusakabe, et al. 2019. "Serum Fibroblast Growth Factor 19 Serves as a Potential Novel Biomarker for Hepatocellular Carcinoma." *BMC Cancer* 19 (1): 1088. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6322-9>.
- Marcelin, Geneviève, Young Hwan Jo, Xiaosong Li, Gary J. Schwartz, Ying Zhang, Nae J. Dun, Rong Ming Lyu,

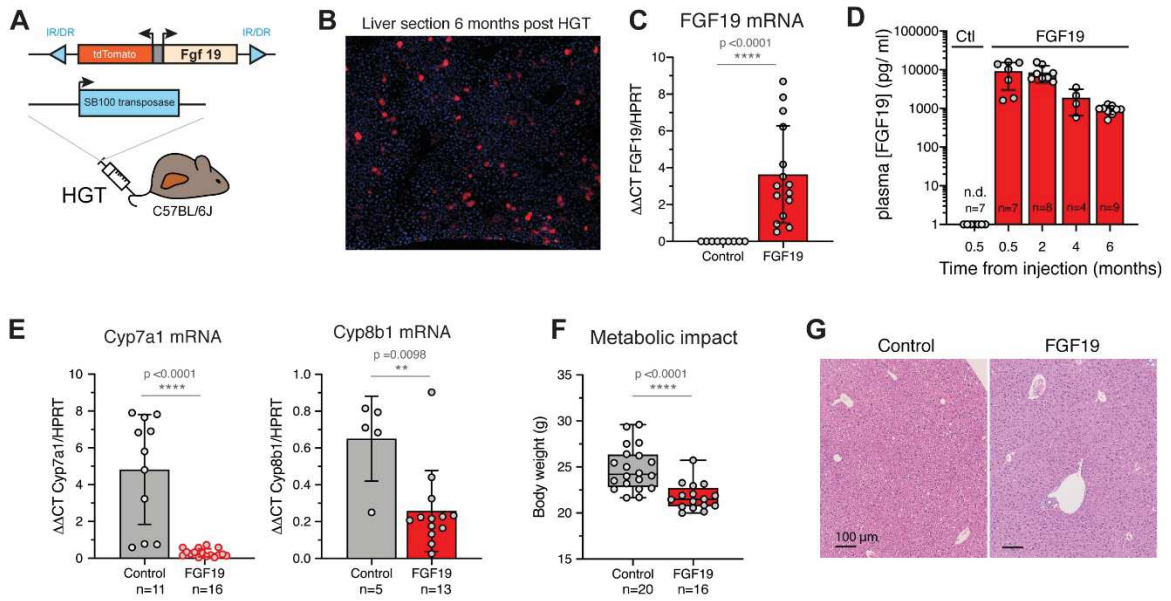


- Clémence Blouet, Jaw K. Chang, and Streamson Chua. 2014. "Central Action of FGF19 Reduces Hypothalamic AGRP/NPY Neuron Activity and Improves Glucose Metabolism." *Molecular Metabolism* 3 (1): 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.002>.
- Markan, Kathleen R., Meghan C. Naber, Magdalene K. Ameka, Maxwell D. Anderegg, David J. Mangelsdorf, Steven A. Kliewer, Moosa Mohammadi, and Matthew J. Potthoff. 2014. "Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake during Refeeding and Overfeeding." *Diabetes* 63 (12): 4057–63. <https://doi.org/10.2337/db14-0595>.
- Miura, Seiki, Noboru Mitsuhashi, Hiroaki Shimizu, Fumio Kimura, Hiroyuki Yoshidome, Masayuki Otsuka, Atsushi Kato, Takashi Shida, Daiki Okamura, and Masaru Miyazaki. 2012. "Fibroblast Growth Factor 19 Expression Correlates with Tumor Progression and Poorer Prognosis of Hepatocellular Carcinoma." *BMC Cancer* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-56>.
- Nicholes, Katrina, Susan Guillet, Elizabeth Tomlinson, Kenneth Hillan, Barbara Wright, Gretchen D Frantz, Think A Pham, et al. 2002. "A Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma: Ectopic Expression of Fibroblast Growth Factor 19 in Skeletal Muscle of Transgenic Mice." *American Journal of Pathology* 160 (6): 2295–2307. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61177-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61177-7).
- Nishimura, Tetsuya, Yukari Utsunomiya, Masamitsu Hoshikawa, Hideyo Ohuchi, and Nobuyuki Itoh. 1999. "Structure and Expression of a Novel Human FGF, FGF-19, Expressed in the Fetal Brain." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1444 (1): 148–51. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00255-3).
- Perry, Rachel J., Sangwon Lee, Lie Ma, Dongyan Zhang, Joseph Schlessinger, and Gerald I. Shulman. 2015. "FGF1 and FGF19 Reverse Diabetes by Suppression of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis." *Nature Communications* 6: 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7980>.
- Sawey, Eric T., Maia Chanrion, Chunlin Cai, Guanming Wu, Jianping Zhang, Lars Zender, Alice Zhao, et al. 2011. "Identification of a Therapeutic Strategy Targeting Amplified FGF19 in Liver Cancer by Oncogenomic Screening." *Cancer Cell* 19 (3): 347–58. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.040>.
- Schaap, Frank G., Niels A. van der Gaag, Dirk J. Gouma, and Peter L.M. Jansen. 2009. "High Expression of the Bile Salt-Homeostatic Hormone Fibroblast Growth Factor 19 in the Liver of Patients with Extrahepatic Cholestasis." *Hepatology* 49 (4): 1228–35. <https://doi.org/10.1002/hep.22771>.
- Schulze, Kornelius, Sandrine Imbeaud, Eric Letouzé, Ludmil B Alexandrov, Julien Calderaro, Sandra Rebouissou, Gabrielle Couchy, et al. 2015. "Exome Sequencing of Hepatocellular Carcinomas Identifies New Mutational Signatures and Potential Therapeutic Targets." *Nature Genetics* 47 (5): 505–11. <https://doi.org/10.1038/ng.3252>.
- Song, Parkyong, Christoph Zechner, Genaro Hernandez, José Cánovas, Yang Xie, Varun Sondhi, Martin Wagner, et al. 2018. "The Hormone FGF21 Stimulates Water Drinking in Response to Ketogenic Diet and Alcohol." *Cell Metabolism* 27 (6): 1338-1347.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.001>.
- Suzuki, Masashi, Yuriko Uehara, Kaori Motomura-Matsuzaka, Junko Oki, Yoshinori Koyama, Miho Kimura, Masahiro Asada, Akiko Komi-Kuramochi, Syuichi Oka, and Toru Imamura. 2008. "Bklotho Is Required for Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 Signaling through FGF Receptor (FGFR) 1c and FGFR3c." *Molecular Endocrinology* 22 (4): 1006–14. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0313>.
- Talukdar, Saswata, Bryn M. Owen, Parkyong Song, Genaro Hernandez, Yuan Zhang, Yingjiang Zhou, William T. Scott, et al. 2016. "FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference." *Cell Metabolism* 23 (2): 344–49. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.008>.
- Turner, Tod, Xian Chen, Matthew Zahner, Alan Opsahl, George DeMarco, Magalie Boucher, Bryan Goodwin, and Mylène Perreault. 2018. "FGF21 Increases Water Intake, Urine Output and Blood Pressure in Rats." *PLoS ONE* 13 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202182>.

- Wang, Kai, Ho Yeong Lim, Stephanie Shi, Jeeyun Lee, Shibing Deng, Tao Xie, Zhou Zhu, et al. 2013. "Genomic Landscape of Copy Number Aberrations Enables the Identification of Oncogenic Drivers in Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology* 58 (2): 706–17. <https://doi.org/10.1002/hep.26402>.
- Wu, Ai Luen, Sally Coulter, Christopher Liddle, Anne Wong, Jeffrey Eastham-Anderson, Dorothy M. French, Andrew S. Peterson, and Junichiro Sonoda. 2011. "FGF19 Regulates Cell Proliferation, Glucose and Bile Acid Metabolism via FGFR4-Dependent and Independent Pathways." *PLoS ONE* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017868>.
- Wu, Xinle, Hongfei Ge, Bryan Lemon, Steven Vonderfecht, Jennifer Weiszmann, Randy Hecht, Jamila Gupte, et al. 2010. "FGF19-Induced Hepatocyte Proliferation Is Mediated through FGFR4 Activation." *Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5165–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068783>.
- Wunsch, Ewa, Malgorzata Milkiewicz, Urszula Wasik, Jocelyn Trottier, Agnieszka Kempniska-Podhorodecka, Elwyn Elias, Olivier Barbier, and Piotr Milkiewicz. 2015. "Expression of Hepatic Fibroblast Growth Factor 19 Is Enhanced in Primary Biliary Cirrhosis and Correlates with Severity of the Disease." *Scientific Reports* 5 (March): 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep13462>.
- Zhang, Guofeng, Vladimir Budker, and J A Wolff. 1999. "High Levels of Foreign Gene Expression in Hepatocytes after Tail Vein Injections of Naked Plasmid DNA." *Human Gene Therapy* 10 (10): 1735–37. <https://doi.org/10.1089/10430349950017734>.
- Zhang, Xiaoyan, Shizheng Huang, Min Gao, Jia Liu, Xiao Jia, Qifei Han, Senfeng Zheng, et al. 2014. "Farnesoid X Receptor (FXR) Gene Deficiency Impairs Urine Concentration in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (6): 2277–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323977111>.
- Zhou, Mei, R. Marc Learned, Stephen J. Rossi, Alex M. DePaoli, Hui Tian, and Lei Ling. 2017. "Engineered FGF19 Eliminates Bile Acid Toxicity and Lipotoxicity Leading to Resolution of Steatohepatitis and Fibrosis in Mice." *Hepatology Communications* 1 (10): 1024–42. <https://doi.org/10.1002/hep4.1108>.
- Zhou, Mei, Jian Luo, Michael Chen, Hong Yang, R. Marc Learned, Alex M. DePaoli, Hui Tian, and Lei Ling. 2017a. "Mouse Species-Specific Control of Hepatocarcinogenesis and Metabolism by FGF19/FGF15." *Journal of Hepatology* 66 (6): 1182–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.027>.
- . 2017b. "Mouse Species-Specific Control of Hepatocarcinogenesis and Metabolism by FGF19/FGF15." *Journal of Hepatology* 66 (6): 1182–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.027>.

## Figures

Figure 1. Ursic-Bedoya et al.



**Figure 1: *in vivo* stable transfection of hepatocytes with FGF19 leads to long term secretion of biologically active FGF19.** **A.** Mouse model strategy based on hydrodynamic gene transfer (HGT). **B.** Cryosection of liver 6 months after HGT, showing stably transfected hepatocytes that express TdTomato. **C.** qPCR quantification of FGF19 mRNA in livers 6 months after HGT. **D.** Plasma levels of FGF19 detected by ELISA. Plasmids combined with transposase are indicated, control-RFP («Ctl») and FGF19-RFP («FGF19») respectively. The number of mice analyzed for each time point is indicated. n.d.: not detectable. **E.** qPCR quantification of mRNA expression of Cyp7a1 and Cyp8b1, target genes of FGF19/FGFR4 pathway. Mann-Whitney test statistical significance is indicated. **F.** Body weight of control and FGF19 HGT mice at 6 months. **G.** HES staining of liver sections of control and FGF19 HGT mice after 6 months, showing no visible alteration of liver physiology.

Figure 2. Ursic-Bedoya et al.

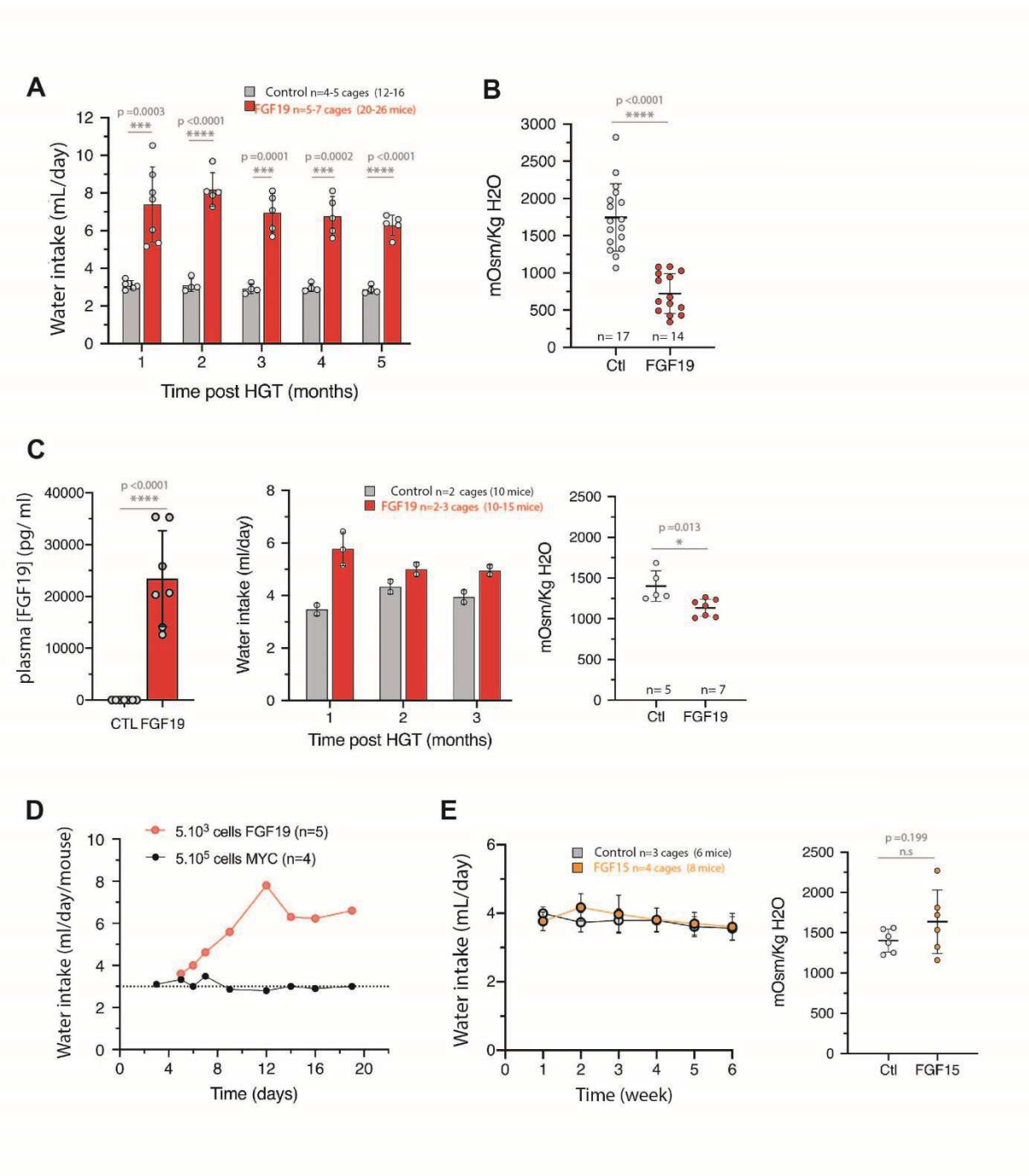
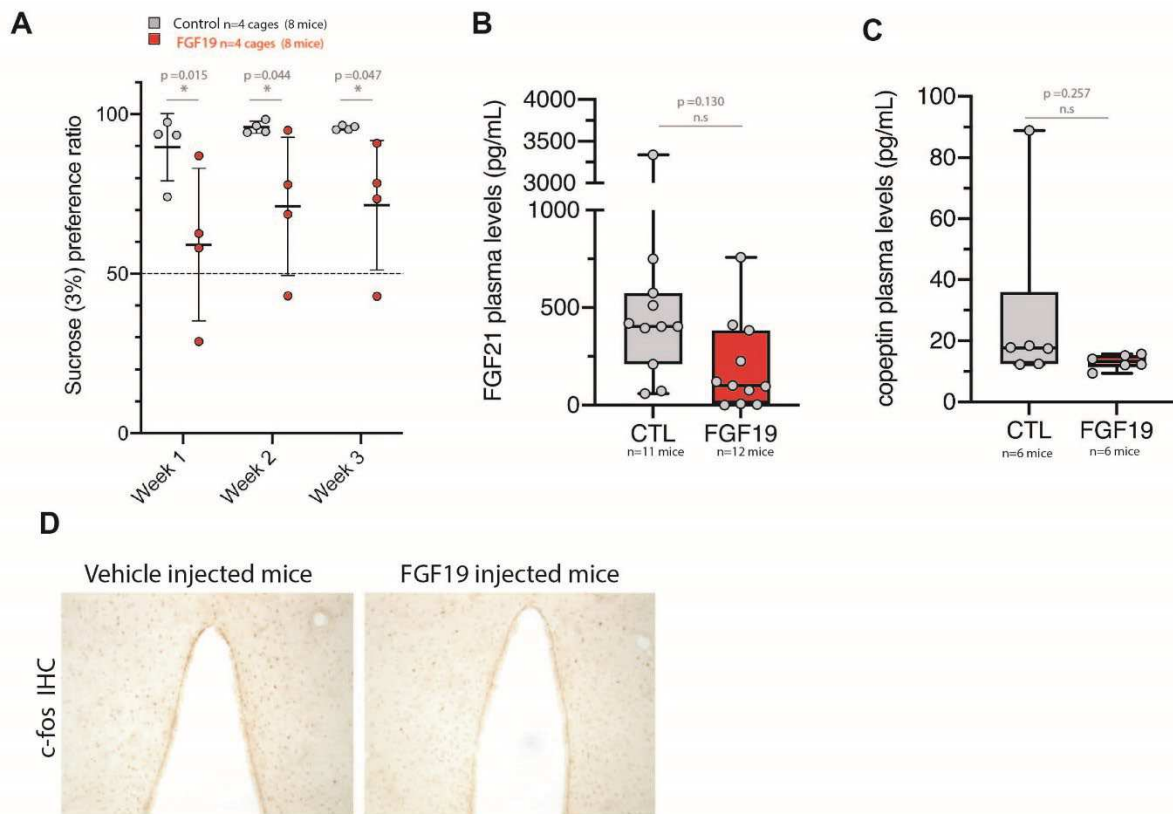


Figure 2: FGF19 increases water intake and urine production. A. Water consumption of control or FGF19+ mice. the number of cage (and mice) analyzed for each time point are indicated. B. Urine osmolarity of control and FGF19 + mice at 3 months post HGT C. Effect of allografted tumoral cells on water consumption. Dotted line represent the average consumption of C57bl6J mice on the same period in the animal facility (n=XX). n.d: not detectable. D. Effect of FGF19 overexpression on male mice. FGF19 ELISA at 3 weeks post HGT. Water intake. Urine Osmolarity. unpaired t-test statistical significance is indicated. E. FGF15 overexpression does not increase water intake.

Figure 3. Ursic-Bedoya et al.



**Figure 3: FGF19 shares some mechanisms redundant with FGF21 suggesting a central nervous system effect.** A. Sucrose (3%) preference ratio in a double bottle experiment B. FGF21 plasma levels determined by ELISA in control and FGF19 HGT mice. C. Copeptin plasma levels determined by ELISA in control and FGF19 HGT mice. unpaired t- test significance n.s: not significance are shown D. Representative images of C-fos immunohistochemistry on the hypothalamus paraventricular nucleus.



## C. Article 2: FGF19 cooperates with MYC to promote hepatic carcinogenesis

Le cœur de mon projet est développé dans ce manuscrit. Ce manuscrit est bien avancé, mais suite à des résultats de RNA-seq montrant une forte hétérogénéité dans un des groupes, nous avons décidé d'envoyer de nouveaux prélèvements qui sont en cours de séquençage au moment de l'écriture de ces lignes. Au vu de l'importance de ces résultats et d'autres expériences *in vivo* actuellement en cours qui peuvent modifier la tournure du projet, je mets ici le *draft* non fini, avec notamment une discussion qui sera très certainement remaniée en profondeur.

Le manuscrit s'intéresse aux mécanismes d'hépatocarcinogénèse propres à FGF19 mais également en collaboration avec d'autres oncogènes/gènes suppresseurs de tumeurs fréquents dans le CHC.

Notre première piste a été d'associer FGF19 et l'inactivation de p53 par la technologie Crispr/Cas9. En effet, des études de cohorte de patients atteints un CHC ont montré que l'amplification de FGF19 était significativement associée aux mutations de p53 (Schulze et al. 2015) et que cette association était surreprésentée dans la sous-classe de CHC prolifératifs, sous-classe G3 de la classification de Boyault (Boyault et al. 2007). Cependant les premières expériences avec cette combinaison ne nous ont pas permis d'obtenir des tumeurs avant 9 mois post-injection, et ce sans accélération par rapport à FGF19 seul.

L'observation que les tumeurs obtenues dans le premier papier mettant en évidence l'effet oncogénique FGF19 étaient toutes marquées à la glutamine synthétase (Nicholes et al. 2002) nous a incité à explorer une deuxième piste, à savoir un potentiel effet coopératif avec des mutations activatrices de  $\beta$ -caténine. Cet effet a été confirmé par nos expériences, avec des tumeurs bien différenciées apparaissant 3 à 4 mois après l'injection des plasmides FGF19 +  $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup>.

De façon simultanée aux expériences avec  $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup> nous avons décidé de combiner MYC et FGF19. Le rationnel derrière cette combinaison est multiple. D'une part, la voie de signalisation propre à MYC est très fréquemment activée dans le CHC (Kaposi-Novak et al. 2009). D'autre part, il a été montré, au moins pour l'adénocarcinome bronchique, que MYC coopère avec Ras (Kortlever et al. 2017). FGF19 étant supposé activer la voie des MAPK, comme Ras, on pouvait s'attendre à un effet coopératif entre FGF19 et MYC. Enfin, d'un point de vue pratique cette combinaison avait l'avantage de nous permettre de comparer à un groupe contrôle, puisque nous avons déjà généré des tumeurs Myc + crispr p53.

Cette combinaison nous a effectivement permis de générer des tumeurs après seulement 2-3 semaines avec les combinaisons MYC + FGF19 +/-



crispr p53 et ce de façon reproductible. Nous avons ensuite exploré les mécanismes à l'origine de ce phénotype assez spectaculaire grâce aux différentes techniques que nous avons mis au point précédemment (double injection hydrodynamique, greffe orthotopique de lignées cellulaires issues de tumeurs obtenues par HGT).

**FGF19 cooperates with MYC  
to promote hepatic carcinogenesis**

José Ursic-Bedoya<sup>1,2</sup>, Carine Chavey<sup>1</sup>, Guillaume Desandré<sup>1</sup>, Anthony Lozano<sup>1</sup>, Benjamin Rivière<sup>1,2</sup>, Eric Assenat<sup>1,2</sup>, Urszula Hibner\*<sup>1</sup>, Damien Gregoire\*<sup>1,✉</sup>

1. Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France

2. Department of hepatogastroenterology, Hepatology and Liver Transplantation Unit, Saint Eloi Hospital, University of Montpellier, France

✉ Corresponding author

Contact information of the corresponding author

[Damien Gregoire, Ph.D.](#)

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier

1919, route de Mende

34293 Montpellier Cedex, France

Email : [damien.gregoire@igmm.cnrs.fr](mailto:damien.gregoire@igmm.cnrs.fr)

Phone : +33 (0)4 34 35 96 59

## Abstract

Deregulated expression of the fibroblast growth factor (FGF19), a hormone whose physiological function is the regulation of bile acid homeostasis, is a hallmark of a subgroup of poor prognosis hepatocellular carcinoma (HCC). FGF19 analogues as well as inhibitors of its signaling are under investigation for treatment of, respectively, metabolic disorders and HCC. However, the interplay between the metabolic and the oncogenic functions of FGF19 is still fragmentary and improving its understanding will likely be key for designing future therapeutic strategies. We have developed an efficient preclinical mouse model that allowed an in-depth analysis of the effects of FGF19 on hepatic tumorigenesis. Hydrodynamic gene transfer was used to create tumours of defined genetic backgrounds. We report that while FGF19 is by itself a weak oncogene, it efficiently cooperates with several oncogenic events characteristic of HCC, such as activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway or deregulated Myc expression. We further show that acceleration of carcinogenesis by FGF19 operates in non-cell autonomous manner and is associated with highly efficient neoangiogenesis in the growing tumours.

## Introduction

Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19) is emerging as a possible oncogenic driver and therapeutic target in hepatocellular carcinoma (HCC). Focal amplification of chromosome locus 11q13, a region containing FGF19, but also cyclinD1 (CCND1), has been identified as one of the most frequent amplification events in HCC tumours (Guichard et al., 2012; Sawey et al., 2011; Schulze et al., 2015). This genetic alteration is associated with more aggressive tumours, higher risk of recurrence post-resection and lower survival rates (Ahn et al., 2014; Miura et al., 2012; Schulze et al., 2015). FGF19 amplification has been proposed as a feature of HCC subgroup G3 together with p53 inactivation (Calderaro et al., 2019). The co-amplification with CCND1, which has been shown to have oncogenic effects in HCC, complicates the interpretation of the available data in patients. Moreover, amplification of the locus does not necessarily leads to FGF19 overexpression (Caruso et al., 2019), on the contrary some patients have high levels of FGF19 without amplification (Hatlen et al., 2019).

Implication of FGF19 in driving hepatocellular carcinogenesis is supported by two different mouse models, in which very high ectopic expression of FGF19 promotes the development of HCC (Nicholes et al., 2002; Zhou et al., 2014, 2017a). Targeting the FGF19 receptor, the tyrosine kinase FGFR4, with antibodies (Desnoyers et al., 2008) or inhibitors (Hagel et al., 2015) impacts tumour growth in preclinical models. A new inhibitor of FGFR4, Fisogatinib, has demonstrated clinical activity as a monotherapy in phase I clinical trial (Kim et al., 2019) (NCT02508467).

Under physiological conditions, FGF19 is a postprandial hormone with pleiotropic effects, including regulation of bile acid synthesis and glucose homeostasis (Gadaleta and Moschetta, 2019). How these metabolic effects of FGF19 impact tumorigenesis, the direct or indirect nature of its action, remain to be determined. For example, FGF19 is well known to control bile acid synthesis in the liver through repression of Cyp7a1 enzyme, and bile acids are major regulators of liver carcinogenesis (Ji et al., 2019; Kettner et al., 2016). FGF19 variants/analogues have been developed in an effort to uncouple metabolic/bile acid regulation from its tumorigenic properties (Gadaleta et al., 2018; Zhou et al., 2014). Such an engineered analogue of FGF19, NGM282, is currently under clinical trials for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis (Harrison et al., 2018).

Despite this clinical importance, mechanisms by which FGF19 promotes hepatic carcinogenesis have yet to be elucidated. Here, we investigated mechanisms underlying the FGF19 oncogenic effects in a preclinical model of hepatic carcinogenesis, by using hydrodynamic gene transfer to generate mouse models of FGF19 overexpression in combination with several frequent HCC oncogenic events.

## Material and Methods

### Mice experiments

All reported animal procedures were carried out in accordance with the rules of the French Institutional Animal Care and Use Committee and European Community Council (2010/63/EU). Animal studies were approved by institutional ethical committee (Comité d'éthique en expérimentation animale Languedoc-Roussillon (#36)) and by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (D. Gregoire: APAFIS#11196-2018090515538313v2).

### Hydrodynamic gene transfer

Hydrodynamic injections were performed in 6 to 8 weeks-old female mice as described previously (Liu et al., 1999; Zhang et al., 1997). Briefly, 0.1 mL/g of a solution of sterile saline (0.9% NaCl) containing plasmids of interest were injected into lateral tail vein in 8-10 s. LentiCRISPRv2-sgTp53 (12.5 µg) and pSBBI-FGF19 (12.5 µg) or pT3-EF1a-Myc (12.5 µg) pT3-EF1a-N-RAS<sup>G12D</sup>-GFP (12.5 µg) were injected together with sleeping beauty transposase SB100X (2.5 µg, ratio of 5:1). pCMV(CAT)T7-SB100 was a gift from Zsuzsanna Izsvak (Addgene plasmid #34879). SgTp53 sequence (from Zhang Lab database): 5'-ATAAGCCTGAAAATGTCTCC-3'. Plasmids constructs pSBbi-RN-FGF19, pSBbi-BB-CCND1 and pSBbi-BB-FGF15 were respectively generated by cloning the human FGF19 amplified from Huh7 cDNA and the mice FGF15 amplified from ileum cDNA onto the pSBbi-RN (Addgene #60519) and psBbi-BB (Addgene #60521) plasmids digested by the SfiI restriction enzyme. Plasma FGF19 concentrations were measured using human FGF19 ELISA kit (Biovendor, RD191107200R), according to the manufacturers' instructions.

### Immunohistochemistry and image analysis

Livers were fixed for 24 h in neutral buffered formalin 10%, dehydrated, and embedded in paraffin, cut into 3-µm-thick sections mounted on slides, then dried at 37°C overnight. Tissue sections were stained with hematoxylin, eosin (HE) with Leica autostainer for preliminary analysis. IHC were performed on a VENTANA Discovery Ultra automated staining instrument (Ventana Medical Systems), using VENTANA reagents except if noticed above, according to the manufacturer's instructions. Briefly, slides were de-paraffinized then epitope retrieval was performed with CC1 solution (cat# 950-124) at high temperature (eg, 95-100°C) or with CC2 solution (cat# 950-123) at 91°C or with Discovery Ribo CC solution (cat# 05470331001) at 95°C a period time that is suitable for each specific antibody. Endogenous peroxidase was blocked with Discovery Inhibitor (cat# 760-4840). Antibody used: CD31 (Abcam 28364).

For brightfield detection, slides were developed using the DISCOVERY OmniMap anti-rabbit HRP detection Kit (cat# 05269679001) or the HQ conjugated antibody anti-rabbit IgG (cat# 07017812001) followed by an HRP conjugated anti-HQ antibody (cat# 07017936001) according to the manufacturer's instructions. Slides were incubated with DAB (cat# 05266645001) then counterstained with hematoxylin II (cat# 790-2208) for 8 min, followed by Bluing reagent (cat# 760-2037) for 4 min. Slides were then dehydrated with Leica autostainer and coverslipped with Pertex mounting medium with CM6 coverslipper (Microm).

Immunohistochemistry staining of GS (BD Transduction Laboratories, 610517, 1:200) and RFP (Rockland, 600-401-379), were performed using classical procedures, with antigen retrieval in citrate buffer, and biotinylated secondary antibody coupled to streptavidin-peroxidase complex (ABC Vectastain kit; Vector Laboratories). Slides were digitally processed using the Nanozoomer scanner (Hamamatsu). CD31 staining quantification was done using the QuPath v0.1.2 software. Tumors were hand drawn from whole liver tissue sections and DAB positive and hematoxylin negative pixels were detected using an optimized "Positive pixel detection" method for DAB high intensity detection

(Hematoxylin Threshold = 0.1; DAB threshold = 0.45; Gaussian Blur Sigma = 1.0; Downsample Factor = 2).

## RNA isolation, qPCR and RNA-Seq analysis

The RNA was extracted from either cells or liver tissue and purified using RNeasy mini kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Reverse transcription of total RNA (1µg) was done with QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen), and cDNA quantified using LC Fast start DNA Master SYBR Green I Mix (Roche) with primers detailed below on LightCycler480 apparatus (Roche). Gene expression levels were normalized with hypoxanthine phospho-ribosyltransferase (HPRT). Primer pairs used for qPCR: Glul 5'-TAGCTGTACACAAAGCGGGTGTGA-3' and 5'-AGTGGAAATGTCAATCTCAGCC-3', c-myc 5'- CCGAGTGCATTGACCCCTCA-3' and 5'- GAGAAGGCCGTGGAATCGGA-3'. FGF19 5'-Hprt 5'- GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3' and 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'

For RNA-Seq analysis, RNA was extracted from snap frozen individual tumors, using RNeasy mini kit (Qiagen) with DNase treatment. RNA integrity was validated using RNA BioAnalyzer (Agilent), all RIN > 9.0. The preparation of the library was done with the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina). The sequencing was performed in an Illumina Hiseq 2500 sequencer by the Sequencing Platform of Montpellier (GenomiX, MGX, France; www.mgx.cnrs.fr), with 50 base pairs (bp) single end reads to an estimated depth of 25 million reads per sample. In order to perform a quality control of the sequencing, FastQC over the fastq files containing the raw reads. All the reads that passed the quality control were aligned to the mouse reference genome (*Mus musculus* NCBI Mm10). and the counts per gene were quantified using the tool STAR 2.6.0a(2). The Ensembl mouse genome annotations (release 93) were used for establishing the coordinates of each gene and their corresponding transcripts. Differential gene expression analysis was performed in R using the DESeq2 library.

## Human studies

A total of 173 patients from the prospective HCC "Liverpool" cohort conducted in the Montpellier University Hospital were included. All the patients had FGF19 plasma concentration measured using human FGF19 ELISA kit (Biovendor, RD191107200R), according to the manufacturers' instructions. Hepatic histopathological analyses were performed by an experimented pathologist (B.R.) according to standard scoring systems used in HCC. Histopathological features were semi- quantitatively evaluated: surface of glutamine synthetase and p53 staining (0, <5%; 1, 5%–30%; 2, 30%–50%; 3, >50%), intensity of glutamine synthetase and p53 staining (0, absent; 1, low; 2, strong), morphology in percentage of the total tumor surface (microtrabecular, macrotrabecular, pseudoglandular or compact), tumor differentiation (poor, moderate, good).

## Statistical Analysis

Data sets were tested with 2-tailed unpaired Student *t* tests or Mann-Whitney U tests, correlations were analyzed with Pearson's  $\chi^2$  test using Prism Software version 8 (GraphPad). Significant *P* values are shown as: \**P* <0.05, \*\**P* <0.01, \*\*\**P* <0.001, and \*\*\*\**P* <0.0001.

Data visualization and statistical analysis were performed using R software version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>) and Bioconductor packages. Comparisons of the mRNA expression levels between groups were assessed using Mann-Whitney U test. Spearman's rank-order correlation was used to test the association between continuous variables. Univariate survival analysis was performed using Kaplan-Meier curve with log-rank test.

## Results

### FGF19 cooperates with MYC and mutant $\beta$ -catenin to trigger hepatic carcinogenesis

In order to investigate the oncogenic cooperation between FGF19 overexpression and driver mutations in HCC, we used hydrodynamic gene transfer (HGT) approach (Liu et



al., 1999; Zhang et al., 1999) to combine overexpression of the human hormone with inactivation of the p53 tumour suppressor, activated  $\beta$ -catenin, or MYC overexpression, three major oncogenic events in HCC (Zucman-Rossi et al., 2015). We also used HGT to combine FGF19 and cyclinD1 (CCND1) overexpression, reproducing the focal amplification of 11q13 (Figure 1A).

First, we investigated the phenotype of animals in which ectopic expression of FGF19 was the only oncogenic event. Supra-physiological concentrations of FGF19 in plasma (1-10 ng/mL) were obtained, and persisted over months. At one year of age, C57Bl6/J female mice developed tumors (incidence 5/6, one tumour/liver) (Figure 1B). Thus, despite the fact that the levels of circulating FGF19 were 10 to 100 lower than in previously described mouse models of FGF19 overexpression (Nicholes et al., 2002; Zhou et al., 2017b), we observed a similar, weak oncogenic effect of FGF19 overexpression.

When FGF19 overexpression was associated with inactivation of p53 by the Crispr/Cas9 technology (Bacevic et al., 2019), we observed no acceleration of tumorigenesis (Figure 1B). At 6 months, we could not detect any tumor foci in cr-p53/FGF19 livers (n=0/12). Similarly, cyclinD1 overexpression did not impacted tumorigenesis after nine months, as no tumor foci were observed (n=0/5). After one year, the incidence of tumorigenesis in FGF19/CCND1/Crp53 animals remained identical to that of FGF19 animals (n=2/5, 1 tumour /mouse). Therefore, our results indicate that there is no oncogenic cooperation between FGF19 overexpression and p53 inactivation or CCND1 overexpression.

On the contrary, we observed that after 3 to 4 months, all mice injected with FGF19 +  $\beta$ -catenin<sup>S33Y</sup> mice presented tumors (n=9/9; 100%) while no tumours were present in the control mice injected with either FGF19 or  $\beta$ -catenin<sup>S33Y</sup> (Figure 1D). FGF19+ $\beta$ -catenin<sup>S33Y</sup> livers presented multiple well differentiated tumours. Plasma concentration of FGF19 were ten times higher than in FGF19 alone livers, indicating that tumor cells secrete FGF19. Liver tumors reported to develop by one year of age in a transgenic mice model with FGF19 overexpression or after AAV-FGF19 injection were often found to show activated beta-catenin signaling or to be positive for Glutamine synthetase (GS) immunochemistry (Nicholes et al., 2002; Zhou et al., 2017b, 2017a). In agreement

we these results, we found all the tumors resulting from FGF19 HGT were positive for GS staining (n=5/5; 100%), whereas FGF19 transfected hepatocytes did not show GS staining outside of tumours (Figure 1B). Thus, overexpression of FGF19 does not cause  $\beta$ -catenin pathway activation. Our results thus suggest that tumours that arise after one year in FGF19 HGT animals result from sporadic activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway that presumably cooperates with the FGF19 overexpression. Altogether, our results indicate that FGF19 cooperates with  $\beta$ -catenin pathway to promote hepatic carcinogenesis.

The oncogenic cooperation was even stronger when FGF19 was associated with overexpression of MYC. To avoid animal suffering we had to sacrifice the FGF19+MYC mice after 3 to 4 weeks (Figure 1E). All animals in this cohort (10 out of 10; 100%) presented tumours, with an average burden of 41 tumours per liver (26-56 CI<sub>95%</sub> of the mean). The mice transfected with MYC+RFP were asymptomatic and were collected between one and three months after HGT. Only 2 mice out of 10 presented tumors (20%) with a maximum number of three tumours per liver. Anatomopathological analysis revealed that the FGF19+MYC tumours (named "MF") were moderately differentiated and resembled the tumours obtained in MYC transgenic mice (Figure 1D). In agreement with the observed oncogenic effect of FGF19 in this model, serum levels of FGF19 reached 163 ng/mL (95%CI: 87-238), indicating that tumors actively secrete the hormone. We conclude that FGF19 strongly cooperates with MYC in hepatic carcinogenesis.

### **FGF19/FGF15 cooperates with MYC through paracrine signaling**

In contrast to the lack of effect of p53 invalidation in slow-growing tumours triggered by FGF19 alone, combining p53 inactivation with MYC and FGF19 gave rise to a further acceleration of the already aggressive tumours initiate by the combination of the latter two oncogenes. Indeed, the triple transgenic mice (MYC/FGF19/p53KO, named "MPF") had to be sacrificed as soon as two weeks after injection (mice with tumors n=9/9), with too many tumours to count, and a liver/body ratio averaging 31% (Figure 2A). This is in contrast to MYC/p53KO-driven tumorigenesis ("MP"), where tumors arose between 4 and 7 weeks, with a reduced penetrance (10/15, 67%), an average of 4.3 tumours per liver and a mean liver/body ratio of 7%.

Oncogenic cooperation was observed with the human hormone FGF19 expressed in mouse. FGF19 murine ortholog, named FGF15, has been proposed to have reduced oncogenic functions compared to the human protein (Zhou et al., 2017b). Therefore, we tested if FGF15 cooperates with MYC. Strikingly, hydrodynamic injections of plasmids encoding FGF15 and MYC gave rise to multiple tumours in one month, whereas FGF15 injection alone had no impact on tumorigenesis (Figure 2B).

In order to investigate the early stages of tumorigenesis, we collected samples one week after the injection of plasmids. Numerous tumor foci were already present in MYC+FGF19 injected livers (Figure 2C), confirming the strong impact of FGF19 on tumor development, while p53 inactivation in this oncogenic context gave rise to even higher tumour burden and an increased size of tumor foci (95%CI of the mean size: MP: 4-5  $\mu\text{m}^2$ , MF: 14-20 $\mu\text{m}^2$ , MPF: 68-86  $\mu\text{m}^2$ ). Altogether, our data show that FGF19/FGF15 strongly accelerates tumorigenesis in the context of MYC overexpression.

Since FGF19 is a secreted hormone we wished to elucidate if its oncogenic effects were cell-autonomous or rather might act through paracrine signaling. To study this issue, we sought to express the MYC and FGF19 oncogenes in distinct hepatocytes in the same liver. To do so we set up a model of serial hydrodynamic gene transfers experiment. The first HGT introduced into hepatocytes the FGF19 or the control plasmid encoding the RFP. Two weeks later, a second HGT was performed with a plasmid encoding MYC (Figure 3A). We reasoned that some FGF19 transfected hepatocytes might take up the second transgene, but most transfected cells will likely have been transfected with a single vector. In contrast to the serial transfection of the control plasmid followed by MYC encoding one, the series of FGF19 followed by MYC HGT gave rise to multiple fast-growing tumors (Figure 3A). Strikingly, analysis of the tumors by IHC and RT-qPCR revealed that 30 % expressed both MYC and FGF19, indicating that hepatocytes can be hydrodynamically transfected twice. However, the majority of tumours only expressed MYC (n=23/30) (Figure 3B). Since in the absence of FGF19 transfection, tumours did not develop within the studied timeframe, these results indicate that FGF19 exerts its oncogenic effect in trans, strongly suggesting a paracrine mechanism of action.

### **Oncogene specificity of the FGF19 tumorigenic effect**

We have discovered a strong pro-tumorigenic cooperation of FGF19 both with activated  $\beta$ -catenin and with MYC. Next, we asked if this was a non-specific effect or else if the acceleration of tumorigenesis required a combination of specific oncogenic events. We combined FGF19 overexpression with the action of an oncogenic form of Ras GTPase, N-Ras<sup>G12D</sup> (hereafter named “Ras”). FGF19 did not abrogate oncogene-induced senescence caused by activated Ras in hepatocytes (Kang et al., 2011), and we observed no tumour formation in Ras + FGF19 injected mice (Figure 4A). Moreover, when associated with p53 inactivation and Ras, FGF19 overexpression did not increase either tumor burden or size (Figure 4A). To confirm these findings, we next performed orthotopic allografts with cells dissociated from Ras-crp53 HGT tumors, into livers of mice previously submitted to HGT with FGF19 or control plasmids. Despite the presence of both FGFR4 and KLB receptors in the allografted tumour cells, an FGF19-enriched liver environment (mean serum [FGF19]: 11 ng/mL) did not promote tumour growth (Figure 4B).

A possible explanation for the lack of effect of FGF19 on tumorigenesis driven by Ras in conjunction with p53 invalidation is that FGF19 acts via activation of the Ras/MAPK pathway downstream of FGFR4 activation, as previously proposed (Caruso et al., 2019; Wu et al., 2010). To ascertain this point, we analyzed the Ras/MAPK pathway activation in MYC/FGF19 tumors. Surprisingly, immunoblotting with anti-phospho-ERK antibody as well as RTqPCR analysis of Ras/MAPK target genes showed a strong repression of the pathway in the FGF19 tumors (Figure 4C, D), indicating that FGF19 oncogenic effects in combination with MYC are unlikely to operate via the Ras/MAPK pathway.

### **FGF19 modulates multiple pathways**

In order to investigate molecular mechanisms involved in FGF19 oncogenic properties in cooperation with MYC, we established transcriptional profiles by RNAseq analysis of MP, MF and MPF tumours (n=3,5,5 respectively). Principal component analysis showed that crp53 did not segregate with FGF19 tumours (Figure 5A). With thresholds set up to Fold Change superior to 4 and p-value <0.05, we identified with 1230 genes for which expression was deregulated in MPF vs MP tumors, 1445 genes for MF vs MP, with 811 genes in common (Figure 5B). Most of these genes were repressed in FGF19 expressing tumours (Figure 5C). Enrichment plots (pre-ranked GSEA)

indicated that MPF and MF tumours are associated with the subgroup well differentiated (Chiang et al.) / S3 subgroup.

*This section will be completed after the sequencing of other Myc + crp53 tumor samples (ongoing).*

### **FGF19 promotes vasculogenesis**

We next performed deconvolution analysis with recently released mMCP counter software (Petitprez et al., 2020) to quantify tissue-infiltrating stromal cells. Monocytes/macrophages were the most abundant cell types in all the tumours (Figure 7A), but we did not detect significant differences induced by FGF19 overexpression regarding immune composition (Figure 7A). In contrast, FGF19 tumors contained significantly less fibroblasts and more endothelial cells than Myc-crp53 tumors (Figure 7C). Immunohistochemical staining for the endothelial marker CD31 and its quantification by the QPath software confirmed a well-developed vasculature in FGF19 tumors (Figure 7D). Moreover, the FGF19 signaling apparently led to a more regular organization of the tumor vessels.

Since a fuller maturation and a higher density of vessels is expected to lead to a better oxygenation of the tumours we next looked for hypoxia signature in the RNAseq data. In agreement with the increased number and a better organization of the endothelial cells we found that FGF19 tumors showed a reduced hypoxia signature, consistent with a more efficient neoangiogenesis. (Figure 7E). In further confirmation of these data, FGF19 tumors were devoid of necrotic areas (Figure 7F).

Altogether our results show that FGF19 promotes vasculogenesis, which is probably involved in its effects on tumour growth.

### **Effects of high FGF19 circulating levels in HCC patients**

Next, we addressed the issue of FGF19 circulating levels in HCC patients. Previous reports showed that patients with HCC have higher FGF19 circulating levels than healthy controls or patients with chronic liver disease (Maeda et al., 2019) and that some HCC are able to express FGF19 (Miura et al., 2012), which is associated with a poorer prognosis. We thus measured the plasma concentrations of patients included in the prospective “Liverpool” cohort conducted in the Montpellier university hospital. A total of 173 patients had FGF19 measurement at inclusion in the study. Among them, 78 patients had histological analyses (diagnostic biopsy or surgical sample). A cutoff of 700ng/mL was chosen to classify patients between “FGF19 high >700pg/mL” and

“FGF19 low <700pg/mL”. The cutoff was decided based on previous reports on physiological FGF19 circulating levels (Angelin et al., 2012; Lundåsen et al., 2006). 38 patients (22% of the whole cohort) was considered “FGF19 high”, in accordance with previous reports (Maeda et al., 2019) (Figure 7-A). The characteristics of the patients according to the group (FGF19 “high” or “low”) are described in Figure 7-B. In this cohort, FGF19 high circulating levels are not associated with a worse prognosis, despite a steeper initial descent in the survival curve, with median survival times of 2.3 and 2.8 years in FGF19 “high” and “low” groups respectively (Figure 7-C). In line with these results, FGF19 “high” tumors are less often poorly differentiated than FGF19 “low” tumors, the morphology is comparable (no overrepresentation of macrotrabecular tumors in FGF19 “high” group, figure 7-D) and glutamine synthetase intensity + surface score is higher in FGF19 “high” group, suggesting more frequent  $\beta$ -catenin activation (Figure 7-E).

*Discussion (This section will be substantially modified after the new RNA-seq analyses and ongoing experiments)*

In this study, we have shown in mouse models expressing FGF19 in combination with different oncogenic events that FGF19 cooperates with MYC overexpression, notably by promoting vasculogenesis in the developing tumors. Although the FGF19 locus amplification has been identified as a frequent genetic event in hepatocellular carcinoma years ago, the demonstration of the oncogenic importance of this pathway in human HCC is still missing or partial, and the molecular mechanisms involved remain to be determined. Our mouse models will be a great tool to characterize FGF19 oncogenic effects.

First, FGF19 has multiple metabolic effects, and notably on insulin regulation as well as control of bile acids pool, which are known to regulate hepatocyte proliferation (Ji et al., 2019). Therefore, there is the possibility that long term FGF19 oncogenic effects reported here and in previous mouse models are indirect. As FGF19 is a secreted protein, could act both directly on tumor cells and FGF19 has probably pleiotropic effects regarding tumorigenesis as well.

Plasma levels of FGF19 were more physiologically relevant than two previous transgenic (Nicholes et al., 2002) and AAV (Zhou et al., 2017) models, and we observed the same phenotype of tumors developing after 9-12 months. Therefore,



oncogenic effects of FGF19 can be considered as a weak oncogenic effect. We observed no oncogenic cooperation with inactivation of p53, which goes against previous reports considering FGF19 as a key oncogenic event in G3 subgroup. Tumors seem to appear only when additional activation of Wnt/ $\beta$ -catenin is present. Our RNAseq analysis in MYC + FGF19 tumors (with or without p53 inactivation) identified that FGF19+ tumors transcriptomic signature correlates with groups S3 (Hoshida et al., 2009) G4-G6(Boyault et al., 2007). Importantly, we found that FGF19 has a strong cooperative effect with MYC overexpression, but not with N-Ras<sup>G12D</sup>, indicating some specificity. The absence of cooperation with Ras/MAPK activation is surprising considering previous reports that FGF19 could act via activation of this pathway.

Expression of FGFR4/KLB tandem is lost in poorly differentiated tumors. Therefore, for these tumors, overexpression of FGF19 must act through tumor-microenvironment modulation, as tumor cells, devoid from the receptors, do not respond to the hormone. It would be very interesting to carry out the same experiments with MYC cells, but all tumor cell lines we could establish from Myc +crp53 HGT tumors were devoid of FGFR4 and KLB expression, probably due to their poorly differentiated status. FGF19 focal amplification has been reported to be a relatively late event in HCC evolution (Schulze et al., 2015). Interestingly, due to the secretion of FGF19 and its paracrine oncogenic effects, expression of FGF19 by a subset of tumor cells should be promoting tumor growth.

Considering the oncogenic role of FGF19/FGFR4 pathway in hepatocellular pathway, it is surprising that activating mutations of the kinase receptor have not been described in genetic analysis of patients: only 6 mutations in FGFR4 gene have been described, 1 in the kinase domain, out of 1047 patients tumours analysed (cBioportal TCGA data). This contrasts with head and neck squamous cell carcinoma (Gao et al., 2019) or rhabdomyosarcoma (Taylor VI et al., 2009) for which activating mutations increasing autophosphorylation are frequent.

FGF19 inhibitor Fisogatinib recent phase I clinical study elicited clinical responses in patients with tumor FGF19 overexpression in advanced HCC (Kim, 2019). Use of FGF19 as a biomarker for patient selection. Our results suggest combination with antiangiogenic molecules, such as bevacizumab, could be a therapeutic approach to test for FGF19 overexpressing patients. Investigations of how FGF19 overexpression impacts response to immunotherapy could also be of great interest.

## Acknowledgments

We acknowledge Montpellier Biocampus facilities: the imaging facility (MRI), the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” - RHEM facility supported by SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa\_Inserm\_DGOS\_12553, the european regional development foundation and the occitanian region (FEDER-FSE 2014-2020 Languedoc Roussillon) for processing our animal tissues. We thank Aurélie Covinhes and Yoan Buscail for excellent technical help. We are grateful to zootechnicians of IGMM animal housing facility for their work. We thank members of our labs for helpful discussions and comments. This work was funded by EVA-Plan cancer INSERM THE, and supported by SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa\_Inserm\_DGOS\_12553. JUB was funded by SIRIC Montpellier (Site de Recherche Intégrée sur le Cancer). The funders had no role in study design, data collection and analysis or publication process.

## References

- Ahn, S.M., Jang, S.J., Shim, J.H., Kim, D., Hong, S.M., Sung, C.O., Baek, D., Haq, F., Ansari, A.A., Lee, S.Y., et al. (2014). Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: Implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. *Hepatology* 60, 1972–1982.
- Angelin, B., Larsson, T.E., and Rudling, M. (2012). Circulating fibroblast growth factors as metabolic regulators - A critical appraisal. *Cell Metab.* 16, 693–705.
- Bacevic, K., Prieto, S., Caruso, S., Camasses, A., Dubra, G., Ursic-Bedoya, J., Lozano, A., Butterworth, J., Zucman-Rossi, J., Hibner, U., et al. (2019). CDK8 and CDK19 kinases have non-redundant oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *BioRxiv*.
- Boyault, S., Rickman, D.S., De Reyniès, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Hérault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., et al. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45, 42–52.
- Calderaro, J., Ziol, M., Paradis, V., and Zucman-Rossi, J. (2019). Molecular and histological correlations in liver cancer. *J. Hepatol.*
- Caruso, S., Calatayud, A.L., Pilet, J., La Bella, T., Rekik, S., Imbeaud, S., Letouzé, E., Meunier, L., Bayard, Q., Rohr-Udilova, N., et al. (2019). Analysis of Liver Cancer Cell

Lines Identifies Agents With Likely Efficacy Against Hepatocellular Carcinoma and Markers of Response. *Gastroenterology* 157, 760–776.

Desnoyers, L.R., Pai, R., Ferrando, R.E., Hötzel, K., Le, T., Ross, J., Carano, R., D'Souza, A., Qing, J., Mohtashemi, I., et al. (2008). Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models. *Oncogene* 27, 85–97.

Gadaleta, R.M., and Moschetta, A. (2019). Metabolic Messengers: fibroblast growth factor 15/19. *Nat. Metab.* 1, 588–594.

Gadaleta, R.M., Scialpi, N., Peres, C., Cariello, M., Ko, B., Luo, J., Porru, E., Roda, A., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2018). Suppression of Hepatic Bile Acid Synthesis by a non-tumorigenic FGF19 analogue Protects Mice from Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Sci. Rep.* 8, 1–10.

Gao, L., Lang, L., Zhao, X., Shay, C., Shull, A.Y., and Teng, Y. (2019). FGF19 amplification reveals an oncogenic dependency upon autocrine FGF19/FGFR4 signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 38, 2394–2404.

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

Hagel, M., Miduturu, C., Sheets, M., Rubin, N., Weng, W., Stransky, N., Bifulco, N., Kim, J.L., Hodous, B., Brooijmans, N., et al. (2015). First selective small molecule inhibitor of FGFR4 for the treatment of hepatocellular carcinomas with an activated FGFR4 signaling pathway. *Cancer Discov.* 5, 424–437.

Harrison, S.A., Rinella, M.E., Abdelmalek, M.F., Trotter, J.F., Paredes, A.H., Arnold, H.L., Kugelmas, M., Bashir, M.R., Jaros, M.J., Ling, L., et al. (2018). NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 391, 1174–1185.

Hatlen, M.A., Schmidt-Kittler, O., Sherwin, C.A., Rozsahegyi, E., Rubin, N., Sheets, M.P., Kim, J.L., Miduturu, C., Bifulco, N., Brooijmans, N., et al. (2019). Acquired on-target clinical resistance validates fgfr4 as a driver of hepatocellular carcinoma. *Cancer Discov.* 9, 1686–1695.

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

carcinoma. *Cancer Res.* **69**, 7385–7392.

Ji, S., Liu, Q., Zhang, S., Chen, Q., Wang, C., Zhang, W., Xiao, C., Li, Y., Nian, C., Li, J., et al. (2019). FGF15 Activates Hippo Signaling to Suppress Bile Acid Metabolism and Liver Tumorigenesis. *Dev. Cell* **48**, 460-474.e9.

Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547–551.

Kettner, N.M., Voicu, H., Finegold, M.J., Coarfa, C., Sreekumar, A., Putluri, N., Katchy, C.A., Lee, C., Moore, D.D., and Fu, L. (2016). Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell* **30**, 909–924.

Kim, R.D., Sarker, D., Meyer, T., Yau, T., Macarulla, T., Park, J.W., Choo, S.P., Hollebecque, A., Sung, M.W., Lim, H.Y., et al. (2019). First-in-human phase i study of fisogatinib (BLU-554) validates aberrant FGF19 signaling as a driver event in hepatocellular carcinoma. *Cancer Discov.* **9**, 1696–1707.

Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1258–1266.

Lundåsen, T., Gälman, C., Angelin, B., and Rudling, M. (2006). Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J. Intern. Med.* **260**, 530–536.

Maeda, T., Kanzaki, H., Chiba, T., Ao, J., Kanayama, K., Maruta, S., Kusakabe, Y., Saito, T., Kobayashi, K., Kiyono, S., et al. (2019). Serum fibroblast growth factor 19 serves as a potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **19**, 1088.

Miura, S., Mitsunashi, N., Shimizu, H., Kimura, F., Yoshidome, H., Otsuka, M., Kato, A., Shida, T., Okamura, D., and Miyazaki, M. (2012). Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **12**.

Nicholes, K., Guillet, S., Tomlinson, E., Hillan, K., Wright, B., Frantz, G.D., Pham, T.A., Dillard-Telm, L., Tsai, S.P., Stephan, J.P., et al. (2002). A mouse model of hepatocellular carcinoma: Ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **160**, 2295–2307.

Petitprez, F., Levy, S., Sun, C.M., Meylan, M., Linhard, C., Becht, E., Elarouci, N., Tavel, D., Roumenina, L.T., Ayadi, M., et al. (2020). The murine Microenvironment Cell Population counter method to estimate abundance of tissue-infiltrating immune and

stromal cell populations in murine samples using gene expression. *Genome Med.* *12*, 1–15.

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

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

Taylor VI, J.G., Cheuk, A.T., Tsang, P.S., Chung, J.Y., Song, Y.K., Desai, K., Yu, Y., Chen, Q.R., Shah, K., Youngblood, V., et al. (2009). Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J. Clin. Invest.* *119*, 3395–3407.

Wu, X., Ge, H., Lemon, B., Vonderfecht, S., Weiszmann, J., Hecht, R., Gupte, J., Hager, T., Wang, Z., Lindberg, R., et al. (2010). FGF19-induced hepatocyte proliferation is mediated through FGFR4 activation. *J. Biol. Chem.* *285*, 5165–5170.

Zhang, G., Vargo, D., Budker, V., Armstrong, N., Knechtle, S., and Wolff, J.A. (1997). Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum. Gene Ther.* *8*, 1763–1772.

Zhang, G., Budker, V., and Wolff, J.A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* *10*, 1735–1737.

Zhou, M., Wang, X., Phung, V., Lindhout, D.A., Mondal, K., Hsu, J.Y., Yang, H., Humphrey, M., Ding, X., Arora, T., et al. (2014). Separating tumorigenicity from bile acid regulatory activity for endocrine hormone FGF19. *Cancer Res.* *74*, 3306–3316.

Zhou, M., Yang, H., Learned, R.M., Tian, H., and Ling, L. (2017a). Non-cell-autonomous activation of IL-6/STAT3 signaling mediates FGF19-driven hepatocarcinogenesis. *Nat. Commun.* *8*, 1–16.

Zhou, M., Luo, J., Chen, M., Yang, H., Learned, R.M., DePaoli, A.M., Tian, H., and Ling, L. (2017b). Mouse species-specific control of hepatocarcinogenesis and metabolism by FGF19/FGF15. *J. Hepatol.* *66*, 1182–1192.

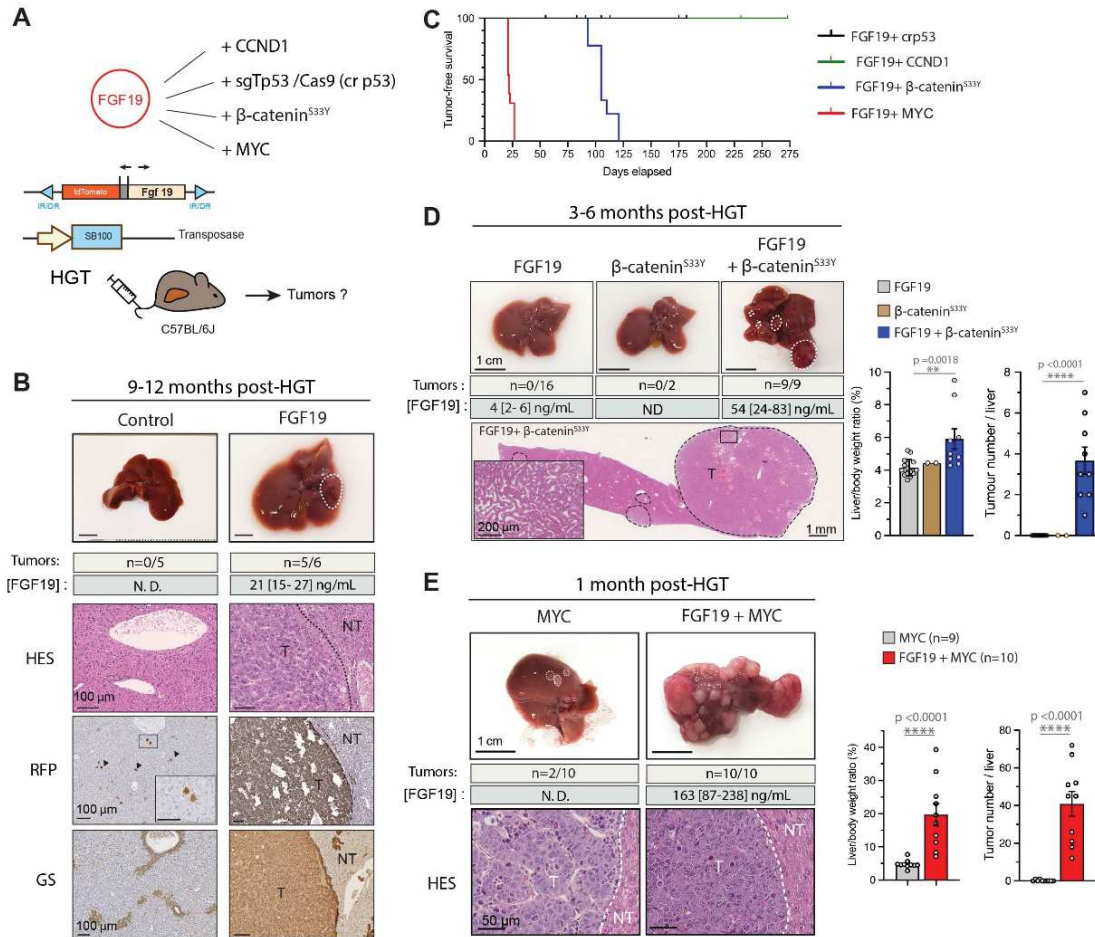
Zhou, M., Luo, J., Chen, M., Yang, H., Learned, R.M., DePaoli, A.M., Tian, H., and Ling, L. (2017c). Mouse species-specific control of hepatocarcinogenesis and metabolism by FGF19/FGF15. *J. Hepatol.* *66*, 1182–1192.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.C., and Llovet, J.M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 149, 1226–1239.



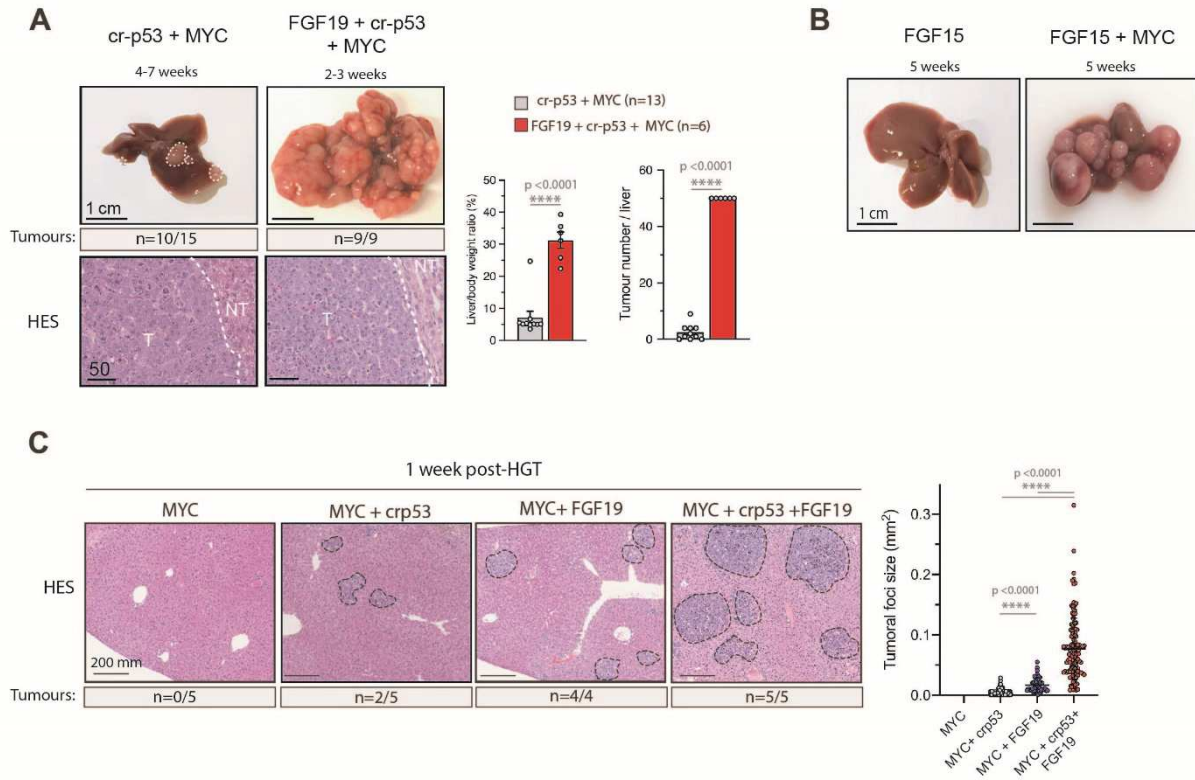
# Figures

Figure 1. Ursic-Bedoya et al.



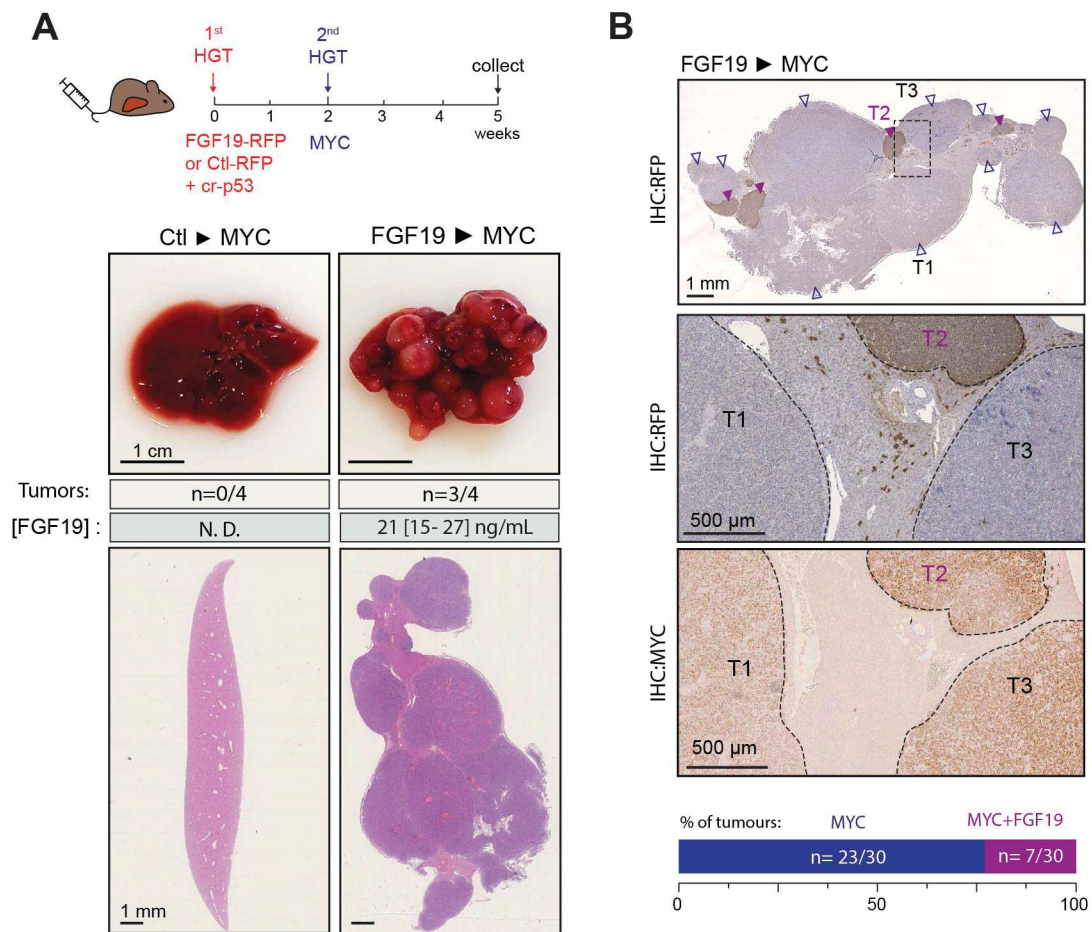
**Figure 1: FGF19 cooperates with MYC and  $\beta$ -catenin** A. Mouse model strategy based on hydrodynamic gene transfer (HGT) with Sleeping-Beauty transposase. B. Representative gross image of liver and stainings for the indicated markers in liver sections after HGT with empty vector or FGF19 9 to 12 months after transfection. Scale-bar: 100  $\mu$ m. C. Tumor-free survival curve (Kaplan-Meier) for FGF19 + crp53, FGF19 + CCND1, FGF19+ b-catenin and FGF19 + MYC groups (n=4-10/ group). D. Left panel: Representative gross image of liver and HES stainings after HGT with FGF19,  $\beta$ -catenin<sup>S33Y</sup> or FGF19 +  $\beta$ -catenin<sup>S33Y</sup>. Right panel: liver/body weight ratio and tumor number per liver. Mann-Whitney test statistical significance is indicated. E: Left panel: Representative gross image of liver and HES stainings after HGT with Myc alone or FGF19 + Myc. Right panel: liver/body weight ratio and tumor number per liver. Mann-Whitney test statistical significance is indicated. Abbreviations: HES: Hematoxylin & Eosin & Safran. RFP: red fluorescent protein. CCND1: cyclin D1.

Figure 2. Ursic-Bedoya et al.



**Figure 2: FGF19 and FGF15 cooperate with MYC.** A. Left panel: gross image of liver and HES staining of representative liver section from Myc + RFP group at 1-3 months or Myc + FGF19 group at 3 weeks. Right panel: liver/body weight ratio and total tumor number per liver. Mann-Whitney test statistical significance is indicated. B. Gross image of liver representative from Myc + FGF15 or FGF15 groups at 5-6 weeks. C. Left panel: HES staining of representative liver section from Myc + Ctl, Myc + crp53, Myc + FGF19 or Myc + FGF19 + cr p53 group at 1 week. Right panel: comparison of tumor foci size between the four groups. Mann-Whitney test statistical significance is indicated.

Figure 3. Ursic-Bedoya et al.

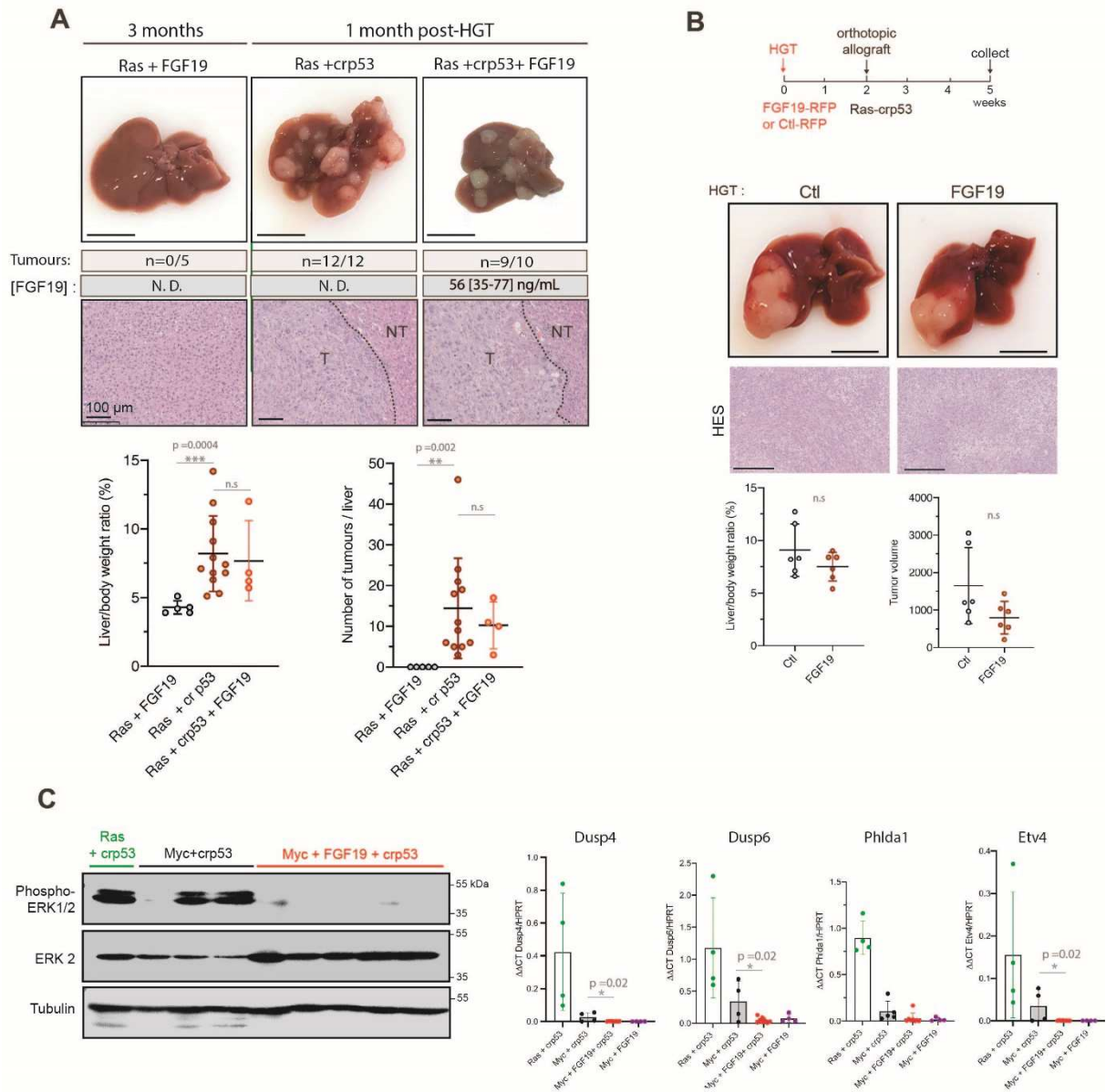


**Figure 3: FGF19 paracrine cooperation with MYC.**

A. Experimental setting of double HGT experiment: C57Bl/6J female mice (n=4/group) were subjected to a first HGT with plasmids encoding either FGF19-RFP + cr p53 or control (RFP + cr p53) then two weeks later a new HGT with a plasmid encoding Myc. Mice were then euthanized three weeks after the second HGT. Gross image of liver and HES staining of representative liver section from each group. B. Stainings for the indicated markers in tumors from FGF19 > Myc mice (upper panel). Proportion of Myc or Myc + FGF19 positive tumors obtained from qPCR data. Abbreviations: HGT, Hydrodynamic Gene Transfer; RFP: Red Fluorescent Protein; Ctl: control; HES, Hematoxylin Eosin & Saffron.



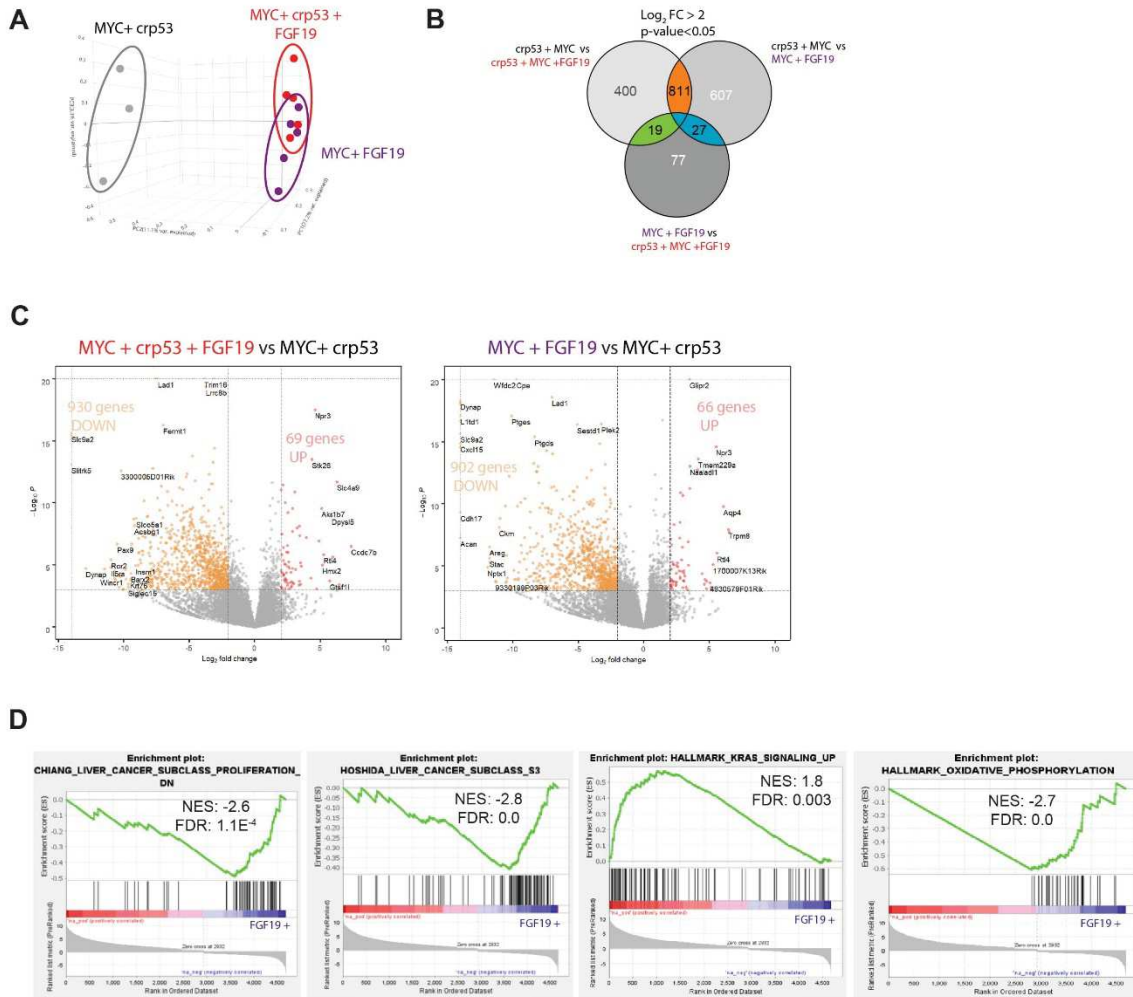
Figure 4. Ursic-Bedoya et al.



**Figure 4: FGF19 does not activate Ras-MAPK pathway nor cooperates with mutant Ras in HCC.**

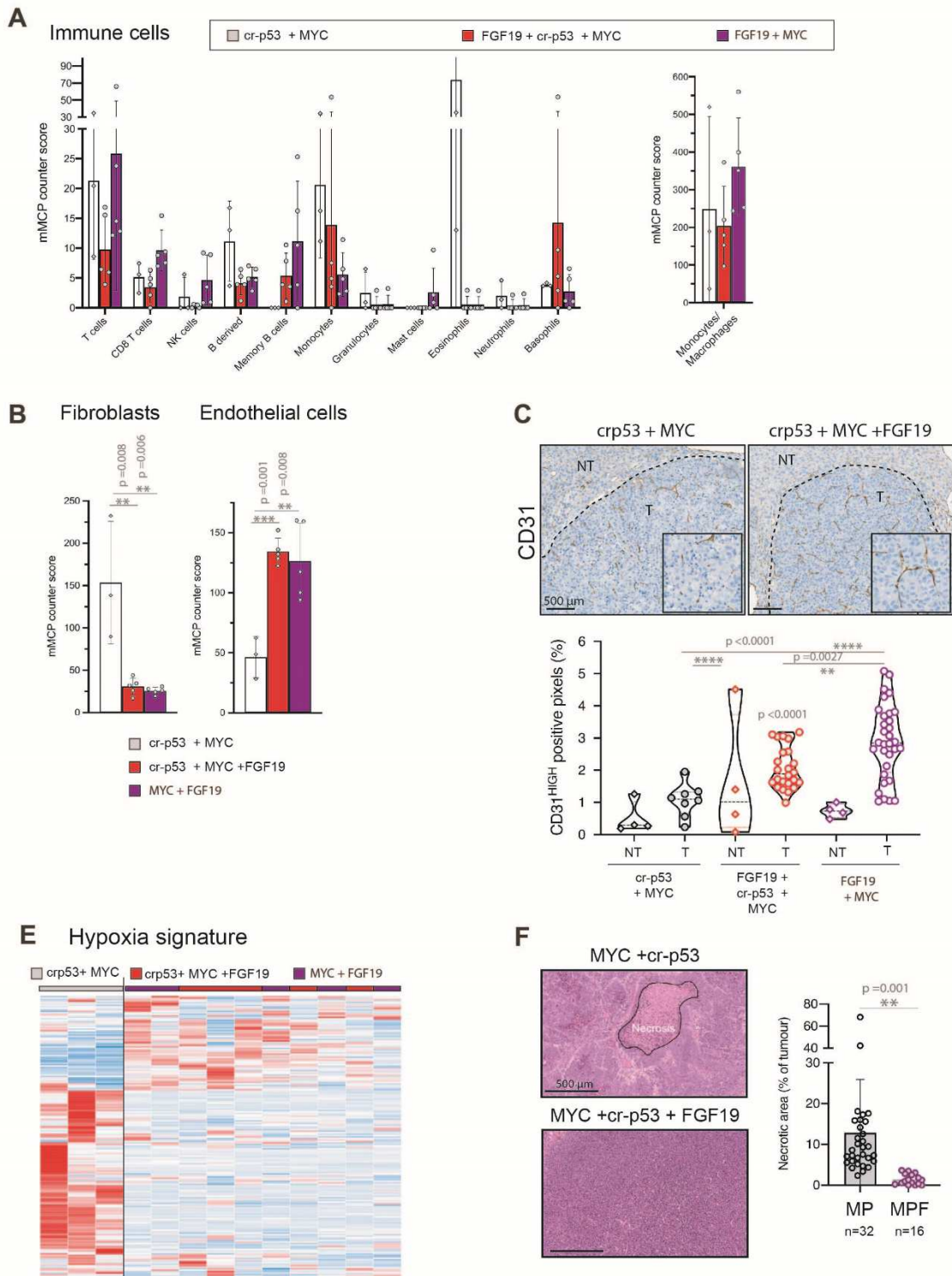
A. Representative livers 4 weeks (Ras + cr p53 and Ras+ FGF19 + cr p53) or 12 weeks after HGT (upper panel). Liver/body weight ratio and total tumors per liver (lower panel). Mann-Whitney test statistical significance is indicated. B. Experimental setup: C57Bl/6J female mice were hydrodynamically injected with plasmids encoding FGF19 or empty vector (RFP) then two weeks later they received orthotopic allograft of tumor cell lines Ras + cr p53, then were euthanized three weeks later. Representative macroscopic liver image and HES staining from tumor section (black bar: 500µm). Liver/body weight ratio and tumor volume per liver (lower panel). Mann-Whitney test statistical significance is indicated. C. Western blotting of Tubulin was used as loading control. Expression of MAPK signature genes was analyzed by real-time quantitative PCR in Ras + cr p53 (n = 4), Myc + cr p53 (n = 4), Myc + FGF19 + cr p53 (n = 8) and Myc + FGF19 (n = 4) tumors. Abbreviations: HPRT, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase; NS, not significant.

Figure 5. Ursic-Bedoya et al.



**Figure 5: Transcriptomic analyses of Myc +/- cr p53 +/- FGF19 tumors.** A. Principal Component Analysis (PCA) of gene expression profiles of HCCs obtained with the three combinations. B. Venn diagram showing differentially upregulated genes between the three groups. C. Volcano plot representing the log<sub>2</sub> of the fold change (FC) between the expression between tumors and the -log<sub>10</sub> of the p value. Selected genes are highlighted. D. Enrichment plots (pre-ranked GSEA) from Myc + cr p53 tumors (left) versus FGF19 positive tumors (right, Myc + FGF19 and Myc + FGF19 + cr p53). Abbreviations: FDR, false discovery rate; NES, normalized enrichment score.

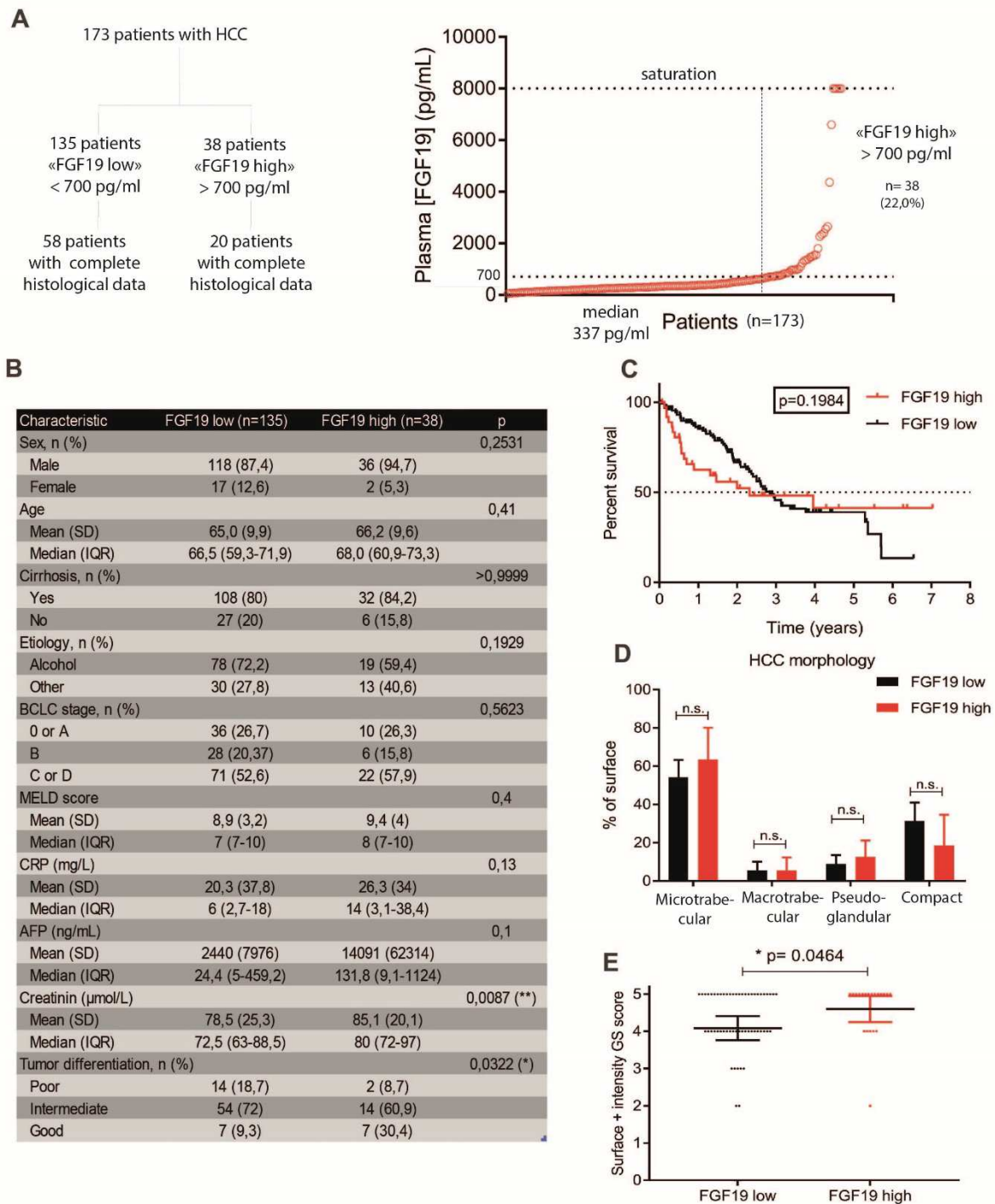
Figure 6. Ursic-Bedoya et al.



**Figure 6: FGF19 promotes vasculogenesis.** A. Cell populations in tumors obtained after deconvolution with the mMCP counter tool, represented in mMCP counter score. B mMCP counter score of fibroblasts and endothelial cells (Welch's t test). D. Staining for endothelial cell marker CD31 in tumors from representative mice and positive surface quantification using QuPath software (unpaired student t test). Scale bar: 500  $\mu$ m. E. Heatmap of gene expression values (shown as Z score) for «Hypoxia Hallmark Signature». F. Representative HES staining in tumors (HES: hematoxylin, eosin & saffron) showing necrotic areas. Right panel: necrosis quantification using QuPath software. Mann-Whitney test statistical significance is indicated. MP: Myc + crp53. MPF: Myc + crp53 + FGF19.



Figure 7. Ursic-Bedoya et al.



**Figure 7: FGF19 in patients from the Liverpool cohort.** A. «Flow-chart» of the patients included in FGF19 plasma concentration analyses. B. Patients characteristics. Chi2 or Fischer's exact test statistical significance are indicated. C. Survival curve for FGF19 «high» and «low» groups. Log-rank (Mantel-Cox) test statistical significance is indicated. D. HCC morphology according to the group. E. Glutamine synthetase (GS) surface + intensity sum score. Mann-Whitney test statistical significance is indicated.

## D. Résultats non intégrés dans un des manuscrits

L'étude du dialogue entre foie pathologique et tumeur est un des objectifs du laboratoire depuis longtemps. Le regard était initialement tourné vers l'interaction entre l'infection virale C et le CHC (Simonin et al. 2013; Moreau et al. 2015b; Vegna et al. 2016) avant de changer de stratégie et se concentrer sur le foie pathologique dans un contexte de NASH. Dans un second temps et au vu des effets métaboliques de FGF19 nous avons également réalisé des expériences de surexpression de FGF19, tumorale ou non, combinée à un régime pourvoyeur de NASH.

### 1. Régimes utilisés et caractérisation des effets

Dans mon projet de thèse nous avons donc réalisé tout un volet d'expériences visant à caractériser deux types de régimes pourvoyeurs de NASH, à savoir le régime *high-fat choline deficient* (HF-CD) et une variante du régime *Western Diet* (WD) (riche en graisses, contenant 0.1% de cholestérol et un apport libre en eau supplémentée en glucose et fructose). La composition calorique des différents régimes utilisés dans mon projet sont détaillés dans la figure 12.

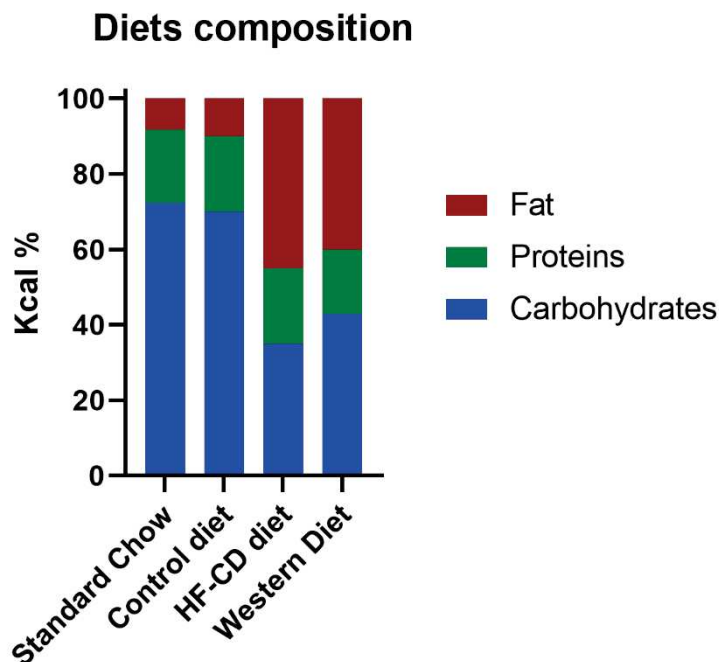


Figure 12 : composition calorique des différents régimes utilisés.

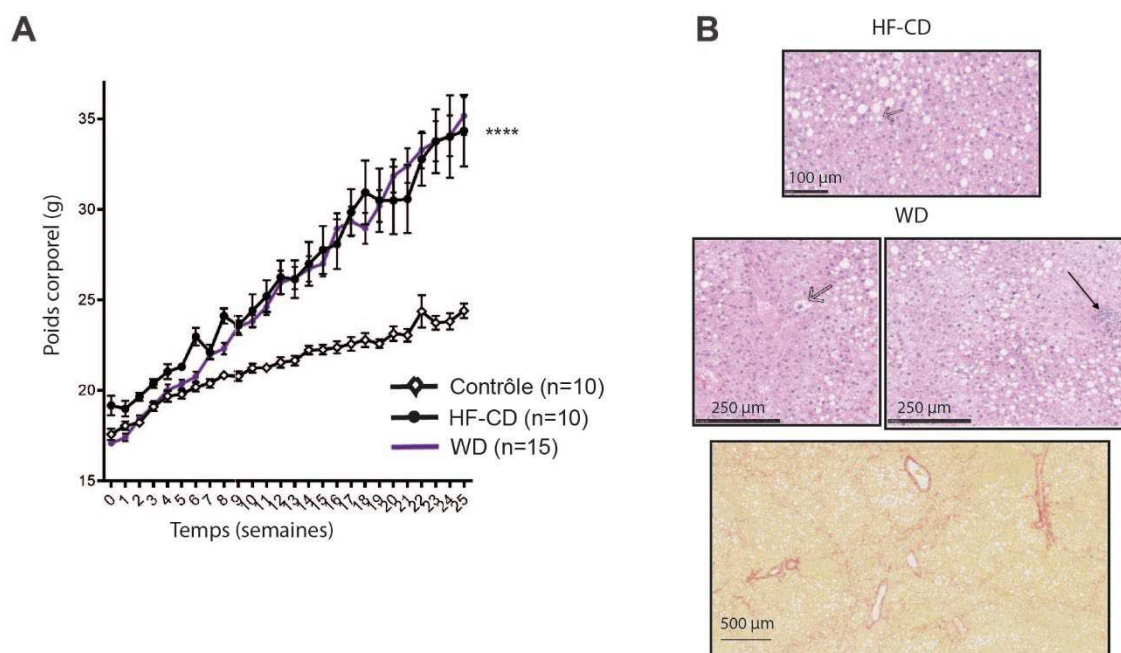
Nous avons décidé de mener la majorité de ces expériences chez des souris immunocompétentes C57Bl/6J femelles. Le choix des femelles peut surprendre puisqu'elles sont moins susceptibles de développer une NASH dans ces modèles. Cependant, étant donné que nos expériences avec la technique d'injection hydrodynamique étaient faites majoritairement chez des souris femelles pour des questions pratiques (meilleure visibilité de la veine de la queue, possibilité de changer les souris de cages pour les répartir

en groupes homogènes après l'injection) et que nous voulions combiner les deux modèles (régimes et HGT) nous avons décidé de maintenir ce choix.

Afin de caractériser la composition corporelle des souris soumises aux différents régimes, nous avons réalisé une mesure de la composition corporelle (masse grasse, masse maigre, masse hydrique libre et eau corporelle totale) en temps réel, grâce à un appareil Echo-MRI 700™.

## 2. Phénotype obtenu avec les régimes HF-CD et WD

En accord avec la littérature, où le phénotype de NASH n'est habituellement obtenu qu'au-delà de 3 mois de traitement, nous avons mis les souris sous régime pendant 25 semaines. Les régimes HF-CD et WD provoquent une prise de poids significative et globalement homogène au cours du temps. L'aspect histologique des foies des souris soumises au régime WD montre une stéatose avec des hépatocytes ballonnés, des foyers inflammatoires, et une fibrose débutante. Contrairement au régime WD, le régime HF-CD ne provoque pas chez nos souris femelles d'inflammation ou de fibrose. Aucuns des souris analysées à 6 mois n'avait de tumeur hépatique.

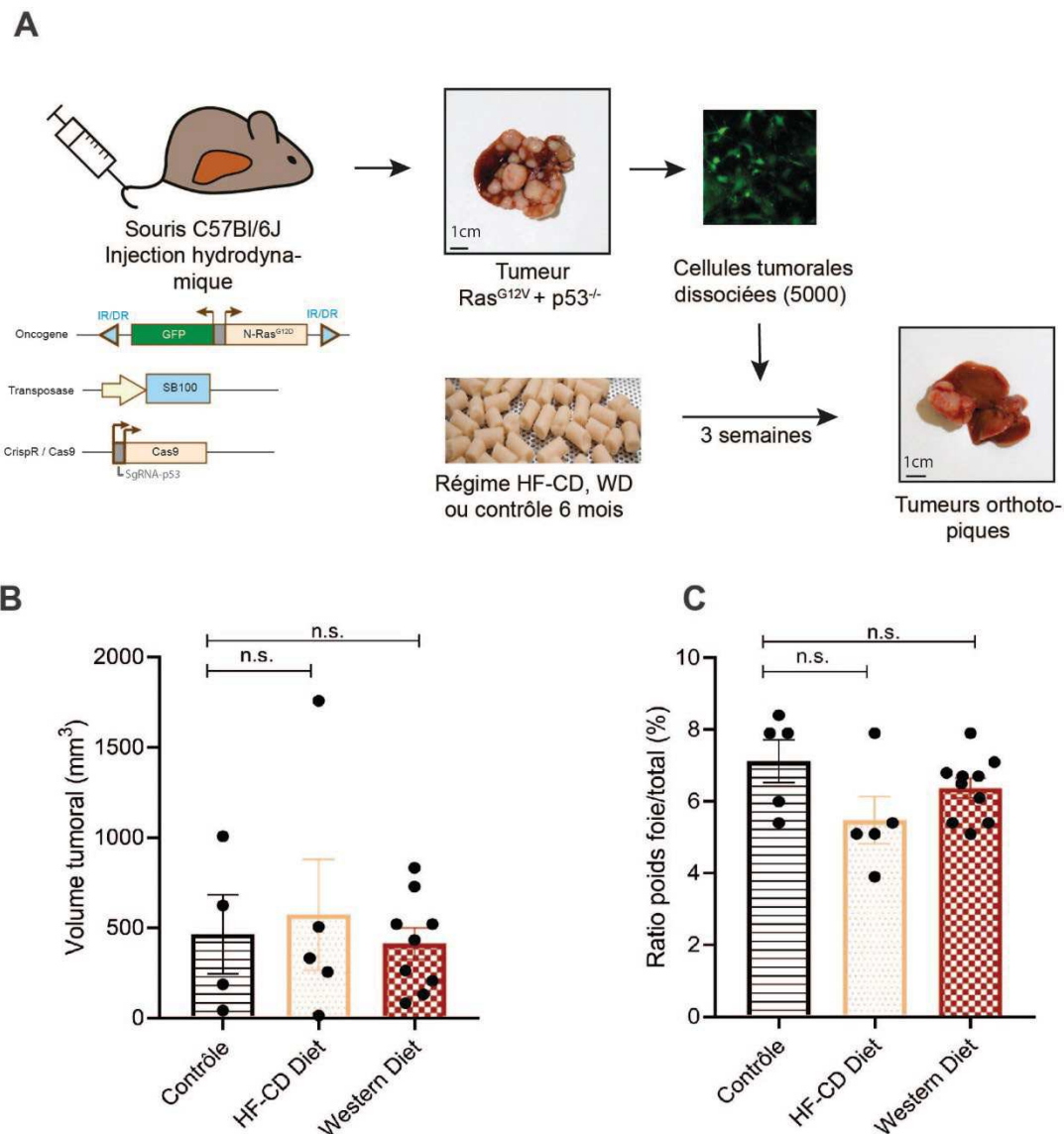


**Figure 13: effets des régimes HF-CD et WD.** A. Courbe d'évolution du poids corporel des souris femelles alimentées par un régime contrôle, HF-CD ou WD. Test statistique utilisé: Mann-Whitney, \*\*\*\*  $<0.0001$ . B. Panneau supérieur: coupe de foie après coloration HES représentative de l'aspect du foie après 25 semaines de régime HF-CD. La flèche représente un hépatocyte ballonné. Panneau central: coupes de foie après coloration HES représentative de l'aspect du foie après 25 semaines de régime Western Diet. Flèche creuse: hépatocyte ballonné. Flèche pleine: infiltrat inflammatoire. Panneau inférieur: coupe de foie après coloration au rouge Sirius après 25 semaines de régime WD.

## 3. Les tumeurs Ras + crispr p53 ne se développent pas davantage dans un contexte de régime NASH

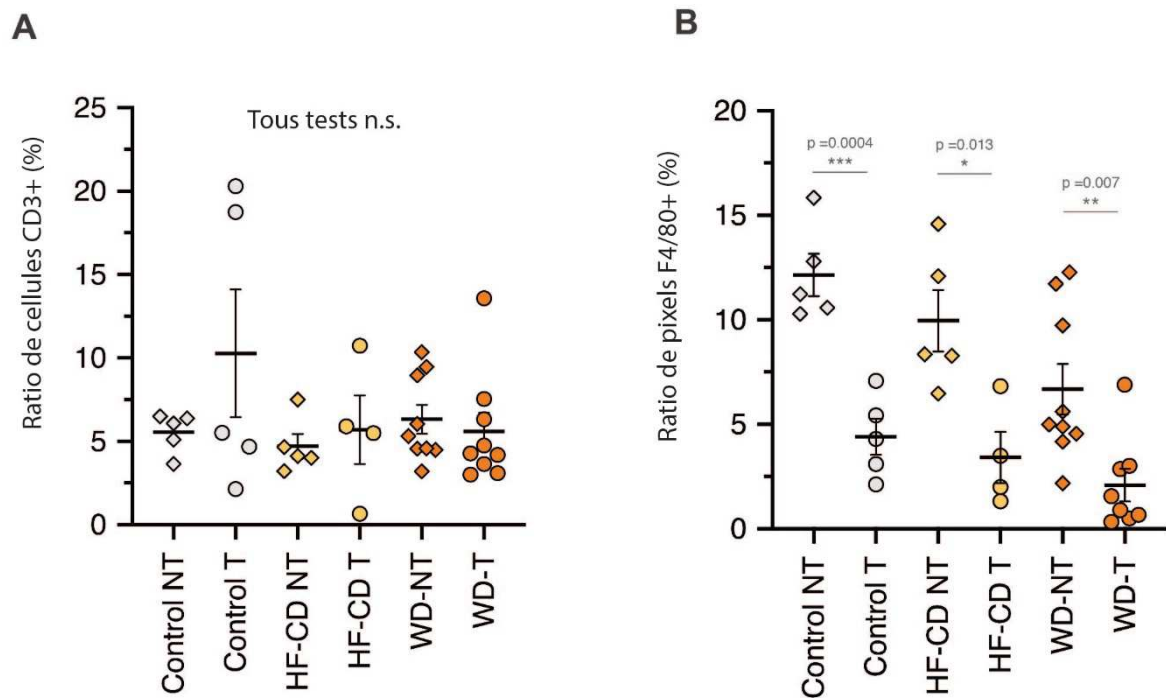
Pour explorer la relation entre l'environnement pathologique et la croissance tumorale, nous avons réalisé des xénogreffes orthotopiques de

cellules tumorales dissociées obtenues à partir de tumeurs N-Ras<sup>G12D</sup> + Crispr p53 chez des souris soumises à 6 mois de régime. Dans cette expérience pilote, nous n'avons pas vu de différence dans la croissance tumorale entre les trois régimes (figure 14) ni dans l'infiltration par des macrophages (marquage F4/80) et lymphocytes T (marquage CD3, figure 15).



**Figure 14: effets des régimes HF-CD et WD sur la croissance tumorale après injection orthotopique de cellules tumorales dissociées N-Ras + cr p53.** A. Schéma expérimental. 5000 cellules tumorales dissociées suspendues dans du matrigel ont été injectées en orthotopique (lobe latéral gauche hépatique) chez des souris nourries pendant 6 mois par un des trois régimes (n=5 pour les régimes contrôle et HF-CD, n=10 pour le régime WD). B. Volume tumoral trois semaines après l'injection orthotopique. C. Rapport poids du foie/ poids corporel total au moment de l'euthanasie. N.S: non significatif, test statistique utilisé: Mann-Whitney.



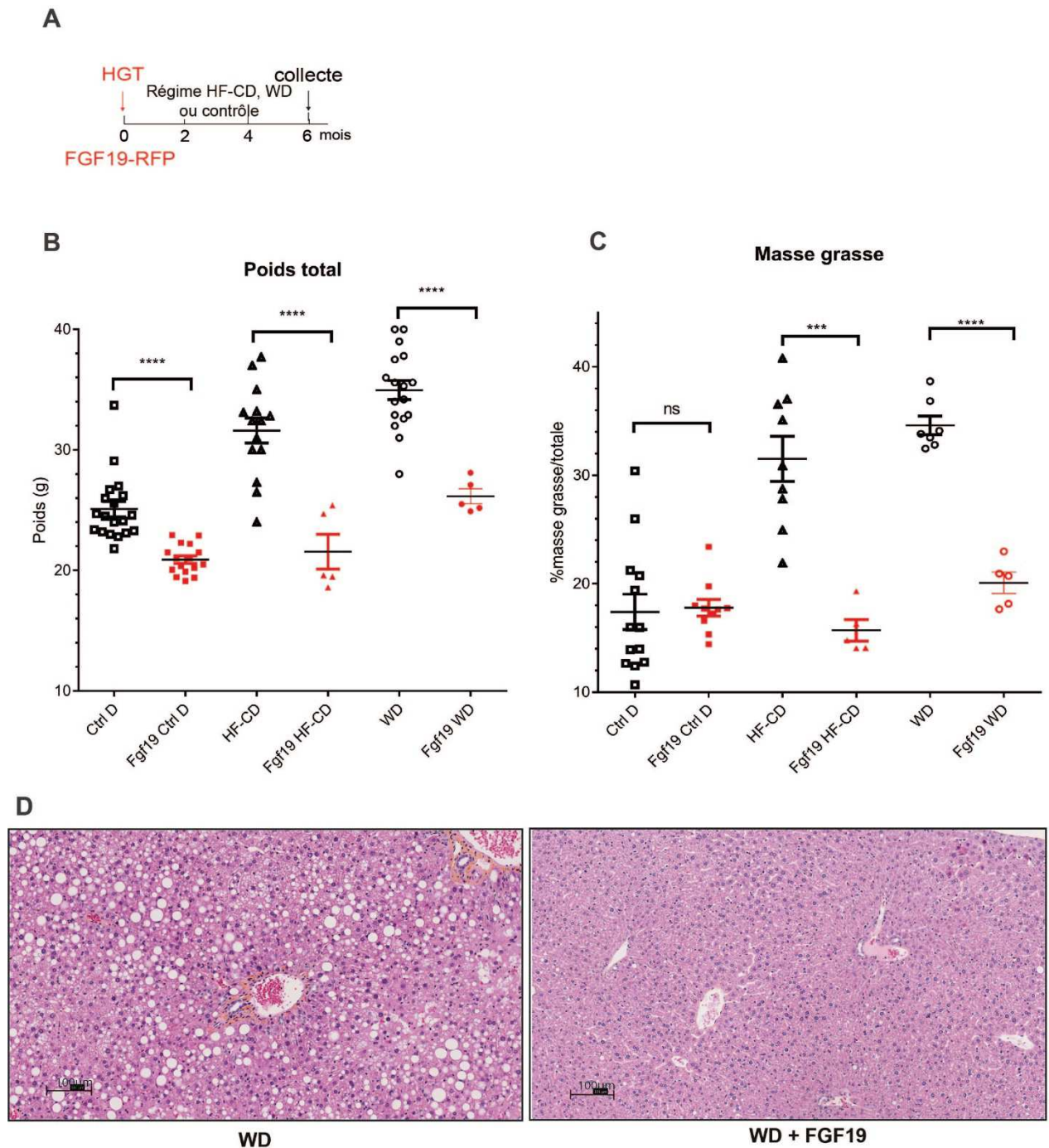


**Figure 15: effets des régimes HF-CD et WD sur l'infiltration tumorale et non-tumorale en macrophages et lymphocytes T après injection orthotopique de cellules tumorales dissociées N-Ras + cr p53. A.** Quantification en cellules CD3+ après marquage par immunohistochimie. Quantification semi-automatisée à l'aide du logiciel d'analyse QuPath. **B.** Quantification en pixels F4/80+ après marquage par immunohistochimie. Quantification semi-automatisée à l'aide du logiciel d'analyse QuPath. N.S: non significatif, test statistique utilisé: Mann-Whitney.

#### 4. FGF19 reverse les effets de régimes pourvoyeurs de NASH

Ensuite, nous avons cherché à reproduire les résultats de la littérature concernant les effets hépatoprotecteurs de FGF19 dans un contexte de régime pourvoyeur de NASH (Zhou, Learned, et al. 2017). Pour cela, nous avons commencé par réaliser une injection hydrodynamique de FGF19 ou un plasmide contrôle puis nous avons soumis les souris aux différents régimes pendant 6 mois.

Les résultats confirment ce qui est décrit dans la littérature : FGF19 protège de la prise de poids et de masse grasse secondaire aux régimes (figure 16 B et C). De même, on observe une nette régression de la stéatose (figure 16 D).



**Figure 16: FGF19 protège des effets des régimes HF-CD et WD.** A. Schéma expérimental: 5-15 souris par groupe ont été injectées par FGF19 ou un plasmide contrôle par la méthode HGT puis ont été soumises à un régime contrôle, HF-CD ou WD pendant 6 mois. B et C: Courbes d'évolution du poids corporel (B) ou du pourcentage de masse grasse (C) des souris femelles alimentées par un régime contrôle, HF-CD ou WD. Test statistique utilisé: Mann-Whitney, \*\*\* $<0.001$ , \*\*\*\* $<0.0001$ . D. Coupes de foie après coloration HES représentative de l'aspect du foie après 25 semaines de régime WD avec ou sans FGF19.

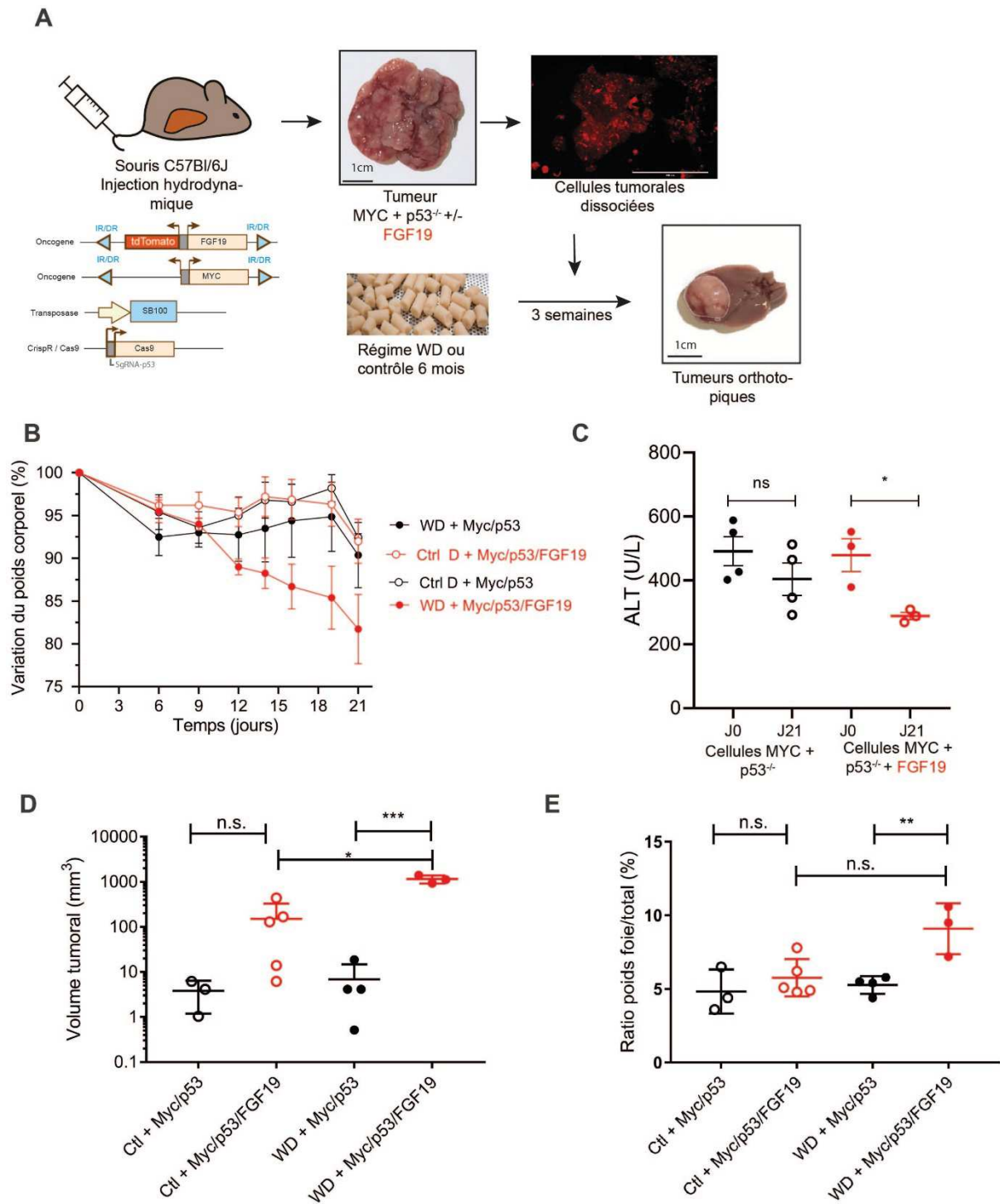


## 5. Le régime WD accélère la croissance des tumeurs MYC/FGF19/Cr p53

Enfin, nous avons cherché à savoir si l'effet de protection métabolique de FGF19 pouvait aussi intervenir dans des délais plus courts. Pour cela nous avons réalisé une expérience d'injection orthotopique de cellules tumorales dissociées surexprimant FGF19, obtenues suite à une injection hydrodynamique de Myc + crispr p53 + FGF19. Le groupe contrôle a consisté en des cellules tumorales dissociées provenant d'une tumeur Myc + crispr p53 (figure 17-A).

Les souris injectées avec les cellules Myc + crispr p53 + FGF19 préalablement soumises au régime WD ont une perte de poids de près de 20%, supérieure à celle des autres groupes où elle se situe entre 5 et 7% (figure 17-B). Cette perte pondérale peut être expliquée partiellement par la charge tumorale, mais elle n'est pas observée pour la combinaison Ras + crispr p53 injectée dans le même contexte (données non montrées). Il s'agit donc au moins en partie un effet de FGF19. De même, l'activité sérique des ALT (alanine aminotransférase), marqueur habituel d'activité inflammatoire qui augmente avec le régime WD, diminue significativement après trois semaines de l'injection de cellules tumorales exprimant FGF19 (figure 17-C)

La majorité des souris injectées avec les deux combinaisons oncogéniques développe des tumeurs après trois semaines, avec cependant une charge tumorale significativement plus importante pour les souris injectées avec les cellules tumorales exprimant FGF19 (figure 17 D et E). De façon surprenante, alors que des effets métaboliques bénéfiques semblent être bien présents, nous constatons que la charge tumorale des tumeurs Myc + cr p53 + FGF19 augmente significativement chez les souris soumises au régime WD (figure 17-D et E). Nos résultats suggèrent donc que des altérations pathologiques de foie liées à NASH auraient un effet accélérateur sur la croissance de tumeurs déclenchées par certaines, mais pas toutes, combinaisons des événements oncogéniques. Nous n'avons pas exploré les potentiels mécanismes sous-jacents mais ce résultat ouvre de nombreuses perspectives.



**Figure 17: effets du régime WD sur la croissance tumorale après injection orthotopique de cellules tumorales dissociées Myc + cr p53 ou Myc + cr p53 + FGF19.** **A.** Schéma expérimental. 5000 (pour Myc + cr p53 + FGF19) ou 50000 (pour Myc + cr p53) cellules tumorales dissociées suspendues dans du matrigel ont été injectées en orthotopique (lobe latéral gauche) chez des souris nourries pendant 6 mois par un des trois régimes (n=4-5 par groupe) puis les souris ont été euthanasiées à 3 semaines. **B.** Variation relative du poids corporel après l'injection orthotopique. **C.** Activité enzymatique des ALT (alanine aminotransférase) chez les souris nourries par du régime WD au moment de l'injection orthotopique puis à 3 semaines. **D.** Volume tumoral final. **E.** Rapport poids du foie/ poids corporel total au moment de l'euthanasie. N.S: non significatif, test statistique utilisé: Mann-Whitney.

## IV. Discussion

### A. Remarques générales

Ces années à préparer le doctorat ont été un véritable défi. Mon parcours de médecin avec finalement peu d'expérience « de paillasse » a pu ralentir le projet en raison de mes limites dans la connaissance de certaines techniques. Malgré tout, le projet a pu avancer et prendre une tournure fascinante.

Une fois la technique d'injection hydrodynamique maîtrisée, après plusieurs mois d'échecs et une longue courbe d'apprentissage, le projet a enfin pu décoller.

Nous avons comme projet initial d'obtenir plusieurs combinaisons oncogéniques, dont au moins une représentative de la classe de tumeurs dite « non-prolifératives », dont la mutation du gène CTNNB1 est fréquente. Néanmoins, nous n'arrivions pas à obtenir de tumeur avec le plasmide  $\beta$ -caténine<sup>S33Y</sup>, nous avons donc abandonné ce volet du projet.

En ce qui concerne les premières combinaisons que nous avons utilisé et qui donnaient lieu à des tumeurs, à savoir N-Ras<sup>G12D</sup> + crispr p53 et MYC + crispr p53, celles-ci ont déjà fait l'objet de plusieurs publications. Il nous fallait donc une combinaison inédite dans la littérature. Nous nous sommes donc focalisés sur FGF19.

La perspective de pouvoir surexprimer FGF19 m'interpelait particulièrement. En effet, j'avais pu m'intéresser à la physiologie des acides biliaires pendant mon stage de Master 2 dans le laboratoire de Thierry Tordjmann à Orsay et ce sujet me paraissait passionnant. De même, l'étude des effets de cette hormone était en pleine expansion au début de ma thèse, avec la possibilité d'agir sur la voie FXR/FGF19/FGFR4/KLB à plusieurs niveaux en fonction du contexte : agonisme de FXR ou FGF19 pour le traitement de maladies métaboliques comme la NASH (Harrison et al. 2018) ou hépatiques comme la cholangite biliaire primitive (Nevens et al. 2016), antagonisme du récepteur FGFR4 pour le traitement des CHC surexprimant cette voie (Hagel et al. 2015).

Malgré l'amplitude des effets de FGF19 nous avons obtenu des phénotypes robustes et reproductibles. Paradoxalement, alors que cela est d'habitude une force dans un projet scientifique, cela nous a également pénalisé, au moins à court terme, puisque nous avons utilisé nos ressources sur plusieurs fronts. Les années à venir nous diront si à moyen terme ce choix était judicieux.

## B. Modèles utilisés

L'approche de mon projet a été essentiellement fonctionnelle, avec des expériences visant à rechercher un effet donné puis essayer de comprendre le mécanisme à l'origine de celui-ci. Dans l'époque actuelle, la recherche biomédicale est de plus en plus centrée sur les *big data*. L'analyse d'une quantité de données de plus en plus importante permet d'inférer des processus biologiques complexes. De même, la mise à disposition publique de ces données devient la norme. Il est désormais possible par exemple d'analyser la composition génétique de plus de 1000 CHC humains à partir de la base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) en quelques clics.

L'intérêt du maintien d'approches expérimentales fonctionnelles animales peut donc se poser dans ce contexte. Je pense que ce type d'approches a encore toute sa place et peut être complémentaire des données de *big data*. L'amplification fréquente du locus 11q13.3 dans le CHC en est un bon exemple : FGF19 et cycline D1 sont souvent co-amplifiés, et sans les modèles murins et cellulaires de surexpression de FGF19 (Sawey et al. 2011; Nicholes et al. 2002), on aurait pu penser que seule la cycline D1 pouvait exercer un rôle oncogénique dans ce contexte.

Quand la question d'une éventuelle coopération entre deux oncogènes se pose, les modèles animaux sont aussi d'une grande utilité. En effet, ils permettent d'établir un lien de causalité plus robuste qu'une seule association épidémiologique. Dans mon projet nous avons décidé d'utiliser le modèle de transfection hydrodynamique des hépatocytes. A mon sens, les trois principaux inconvénients de ce modèle sont la courbe d'apprentissage assez longue avant de pouvoir le maîtriser, la fenêtre étroite d'injection (souris de poids compris entre 17-21g idéalement) et l'hétérogénéité/reproductibilité imparfaite avec certaines combinaisons oncogéniques (par exemple Myc + crispr p53). Toutefois, les avantages du modèle sont nombreux et justifient le temps investi dans la maîtrise de cet outil : modèle plus proche de ce qui se passe chez l'homme avec peu d'hépatocytes porteurs de l'évènement oncogénique, rapidité dans le développement des tumeurs, possibilité d'utiliser des souris immunocompétentes (étude du microenvironnement et de la réponse immunitaire), souffrance animale minime, possibilités quasi-infinies de combinaisons oncogéniques, possibilité d'obtenir une lignée cellulaire après dissociation tumorale, coût relativement faible par rapport au maintien d'une lignée de souris transgéniques, ... Même si ces dernières années il y a de plus en plus d'articles qui utilisent cette technique, il me semble qu'elle mériterait une plus large diffusion à travers les équipes de recherche centrées sur les CHC. Est-ce la difficulté technique qui limite son utilisation ?

En ce qui concerne les différents modèles de NASH, nous avons utilisé deux différents, alors qu'il en existe des dizaines. La principale difficulté pour

juger de leur pertinence vient du fait que nous avons utilisé uniquement des souris femelles, alors qu'elles sont moins sujettes à développer des lésions de NASH et que les données de la littérature proviennent majoritairement de souris mâles. Quoi qu'il en soit, entre nos mains et dans notre animalerie, le régime WD pendant 6 mois nous a permis d'obtenir un phénotype satisfaisant : prise de poids significative et homogène, intolérance au glucose, stéatohépatite et fibrose débutante chez certaines souris. Nous n'avons pas pu, faute de temps et de moyens, exploiter complètement les échantillons que nous avons obtenu. Notamment, nous avons généré des tumeurs Myc/FGF19/crispr p53 chez des souris nourries par le régime WD pendant 6 mois. De façon inattendue, celles-ci se développent de façon plus prononcée en cas de régime WD par rapport à un régime contrôle, tout en exerçant les effets métaboliques globalement hépatoprotecteurs. Cette observation mérite d'être explorée davantage, et nous avons prévu de réaliser une analyse transcriptomique de ces tumeurs prochainement.

### C. Effets métaboliques de FGF19

FGF19 est une molécule pléiotropique dont de nombreux effets métaboliques ont déjà été décrits. Le principal résultat de ce volet concerne la découverte du phénotype de syndrome polyuro-polydipsique secondaire à des taux circulants élevés de FGF19. Ce phénotype n'a jamais été décrit auparavant, raison pour laquelle il nous a semblé pertinent de le caractériser et préparer un manuscrit décrivant nos résultats.

Cependant, le premier manuscrit présenté dans la partie résultats a présenté plusieurs défis :

- Le premier, évident, est celui de devoir explorer un domaine dans lequel nous n'avions aucune expérience, il a donc fallu passer de nombreuses heures à faire de la bibliographie et à trouver des collaborateurs qui pourraient nous aider à mieux définir la question et les moyens de l'explorer
- Le deuxième a été celui de mener ce projet parallèlement au projet sur les effets oncogéniques en essayant de trouver des expériences qui pourraient être utiles dans les deux pour ne pas y consacrer trop de ressources.

La principale force de ce volet concerne la reproductibilité de ce phénotype. En effet, nous avons pu l'obtenir après une seule injection hydrodynamique, dans plusieurs dizaines de souris des deux sexes, à plusieurs mois d'intervalle. La consommation d'eau d'une souris C57Bl/6J est très stable aux alentours de 3mL par jour, valeur qui double au moins avec des taux circulants élevés de FGF19. Cela s'accompagne d'une augmentation de la diurèse, avec une urine diluée, résultat également très reproductible.

Une critique qui peut être formulée au sujet de nos résultats est celle de l'absence d'utilisation de cages métaboliques individuelles pour objectiver la polyurie. Ces cages sont onéreuses, ne sont pas disponibles dans notre institut et obligent à mettre les souris dans des cages individuelles, ce qui engendre de la souffrance animale. La diminution de l'osmolarité urinaire, preuve indirecte de l'excrétion urinaire de l'eau excédentaire, est un bon marqueur de substitution et bien plus simple à mettre en œuvre.

Il nous semble surprenant que ce phénotype n'ait jamais été décrit alors que des modèles de surexpression de FGF19 chez la souris existent depuis presque vingt ans. De même, un phénotype très similaire a été décrit par plusieurs équipes avec FGF21, molécule de la même famille (Turner et al. 2018; Talukdar et al. 2016; Song et al. 2018), bien que les équipes qui ont exploré cet effet utilisaient des injections ponctuelles de FGF21 et non pas un modèle de souris transgénique avec surexpression stable au cours du temps de FGF21. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer que ce phénotype n'ait pas été déjà décrit : soit il n'est pas obtenu avec une injection unique de FGF19, soit le phénotype est passé inaperçu ou a été jugé inintéressant.

La piste de l'absence d'effet après une seule injection de FGF19 est particulièrement séduisante puisqu'elle permettrait d'expliquer notre résultat « négatif » de marquage de c-Fos dans le noyau paraventriculaire hypothalamique, comme précédemment décrit pour FGF21 (Song et al. 2018). Cela impliquerait aussi que l'effet observé pour FGF19 survienne par un autre mécanisme. Cela semble cependant difficile à imaginer que FGF19 et FGF21 produisent le même phénotype mais par des mécanismes complètement différents, alors que leurs effets métaboliques partagés (thermogenèse, métabolisme glucidique...) passent par les mêmes voies de signalisation et les mêmes effecteurs. Quelle est la plausibilité biologique que ces deux molécules apparentées produisent un phénotype similaire par des mécanismes différents ?

Pour répondre à cette question il faut regarder quels sont les effets différentiels exercés par FGF19 par rapport à FGF21. Etant donné que FGF19 active FGFR4, contrairement à FGF21, il s'agit principalement des effets liés à l'activation de FGFR4. Dans le foie l'activation de FGFR4 inhibe la synthèse des acides biliaires, ce qui a pour effet de réduire le pool d'acides biliaires et modifier la composition de ce pool vers un profil très hydrophile dans un modèle murin de surexpression de FGF19 (Zhou, Learned, et al. 2017). Ce profil hydrophile est globalement antagoniste du récepteur nucléaire des acides biliaires FXR. Or, FXR est exprimé dans de nombreux tissus, dont les reins. De façon très intéressante, les souris FXR-KO ont une polyurie avec un défaut de concentration des urines (Zhang et al. 2014), rappelant ce que nous observons. Un deuxième article paru en 2018 montre un lien entre acides biliaires et régulation tubulaire rénale de la réabsorption



d'eau, cette fois-ci avec le récepteur membranaire des acides biliaires TGR5 (Li et al. 2018).

Pour explorer cette piste, nous avons débuté une collaboration pour analyser le pool et la composition d'acides biliaires dans la bile, sérum, iléon et foie des souris surexprimant FGF19. Les résultats préliminaires, reçus au moment de l'envoi du manuscrit confirment que nos souris ont également un pool d'acides biliaires diminué et hydrophile. Reste à savoir si cela a un effet sur l'homéostasie de l'eau ; nous sommes en train de mener une expérience où les souris surexprimant FGF19 sont traitées par de l'acide obéticholique, un agoniste spécifique de FXR qui est utilisé en pratique clinique pour le traitement de la cholangite biliaire primitive (Nevens et al. 2016) et qui a montré des résultats mitigés pour le traitement de la NASH dans un essai clinique de phase 3 (Younossi et al. 2019). Si l'acide obéticholique renverse (ou au moins réduit) le phénotype de diabète insipide, cela serait un argument très fort en faveur d'un effet rénal secondaire à la modification du pool d'acides biliaires.

Un autre argument en faveur d'un possible effet rénal vient d'un des résultats du RNA-seq des tumeurs Myc/FGF19 +/- crispr p53. Il apparaît qu'un des gènes les plus significativement surexprimés dans les tumeurs FGF19+, comparativement aux tumeurs Myc/crispr p53, est le gène NPR3 (*Natriuretic peptide receptor C*). Celui-ci code pour un récepteur du peptide atrial natriurétique, une des hormones responsables de la régulation de la balance hydroélectrolytique via la stimulation de l'excrétion rénale de sodium. Cela nous a mis sur la piste d'un éventuel effet sur la régulation de la natrémie, raison pour laquelle nous avons regardé la natrémie des patients de la cohorte Liverpool en fonction de la concentration circulante de FGF19. Il apparaît que la natrémie des patients FGF19 > 700ng/mL est significativement plus faible que celle des patients FGF19 < 700 ng/mL, avec des médianes respectivement à 137 vs 140mmol/L. Cette différence persiste après exclusion des patients sous diurétiques. Cette baisse de la natrémie peut être considérée cliniquement significative puisque la majorité des patients de cette cohorte sont cirrhotiques et l'hyponatrémie (sodium plasmatique < 135mmol/L) est un facteur indépendant de mortalité dans la cirrhose (Kim et al. 2008).

En ce qui concerne la portée de nos résultats et la pertinence pour les patients atteints de CHC surexprimant FGF19 nous avons donc des perspectives intéressantes qui s'ouvrent. Une autre population dans laquelle il serait intéressant d'explorer un éventuel effet rénal de FGF19 est celle des patients traités par l'analogue de FGF19 (NGM-282 ou aldafermine), mais cela suppose obtenir des données des essais cliniques en cours, ce qui semble difficile, en attente d'une éventuelle mise sur le marché de cette drogue.

#### D. Effets oncogéniques de FGF19

Le volet oncogénèse est plus abouti même s'il soulève encore des nombreuses interrogations. Grâce au modèle d'injection hydrodynamique nous avons pu étayer le rôle oncogénique de FGF19 dans le CHC.

Une des richesses, ou difficultés selon le point de vue adopté, de mon projet réside dans le fait que nous étudions l'effet oncogénique d'une hormone. Alors que la majorité des oncogènes agissent de façon *cell autonomous* sur la cellule porteuse de l'oncogène, pour FGF19 il faut tenir compte des potentiels effets liés à la sécrétion de cette molécule. Les cellules hypothétiquement affectées sont donc nombreuses : hépatocytes adjacents, cellules stromales, cholangiocytes mais également toute cellule de l'organisme via la circulation systémique. La question du mécanisme (ou des mécanismes) par lequel FGF19 exerce son effet oncogénique est majeure. La littérature offre certaines réponses, notamment avec l'article mettant en évidence un effet *non-cell autonomous* induit par la sécrétion d'Il-6 par les macrophages résidents du foie, ce qui active la voie STAT3 dans les hépatocytes (Zhou, Yang, et al. 2017). En revanche, ce mécanisme ne donne le phénotype qu'à long terme, avec des tumeurs qui apparaissent au bout de 9-12 mois. Notre travail nous amène à proposer un autre mécanisme : les hépatocytes ayant une surexpression de Myc, avec ou sans surexpression concomitante de FGF19, sont transformés lorsqu'ils sont soumis à des concentrations locales élevées de FGF19. Même si nous ne l'avons pas formellement démontré, ce processus ne semble pas impliquer une cytokine intermédiaire (comme Il-6) et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, toutes les tumeurs ont une surexpression de Myc, suggérant que seuls les hépatocytes ayant été transfectés peuvent être transformés. De même, dans cette expérience les tumeurs apparaissent au bout de 2-3 semaines seulement, délai beaucoup plus court que celui impliquant Il-6/STAT3. Enfin, le fait que la combinaison Myc + FGF15 soit à l'origine de tumeurs qui apparaissent avec une cinétique très similaire à Myc + FGF19 est un autre argument en faveur d'un mécanisme indépendant de Il-6/STAT3 puisqu'il est décrit dans un autre article (du même groupe de recherche) que FGF15 ne provoque pas d'activation de la voie STAT3 (Zhou, Luo, et al. 2017).

En ce qui concerne la (les) voie(s) de signalisation cellulaire qui serai(en)t à l'origine de cet effet oncogénique impliquant Myc et FGF19, nous travaillons toujours à leur identification. Les voie des MAP kinases et Il-6/STAT3 ne semblent pas être impliquées. Plusieurs arguments dans notre travail indiquent que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle prépondérant. Cela est en accord avec d'autres articles dans la littérature (Pai et al. 2008; Sawey et al. 2011). Il nous reste à définir les molécules faisant le lien entre ces deux voies de signalisation. Nous avons récemment

lancé de nouvelles analyses transcriptomiques et nous avons des candidats prometteurs que nous chercherons à valider prochainement.

Pour ce qui est de l'effet coopératif de MYC avec FGF19, vue la fréquence de l'activation de cette voie dans le CHC, et son association avec des tumeurs de mauvais pronostic, cela pourrait avoir des implications cliniques. Plus précisément, une augmentation de la concentration circulante de FGF19 pourrait être un événement déclenchant la transformation de nodules dysplasiques avec une surexpression de la voie de signalisation Myc. Concernant la cause de cette éventuelle augmentation de la concentration circulante de FGF19, plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Premièrement, il existe dans la littérature des descriptions de situations où les hépatocytes peuvent exprimer FGF19, surtout en cas de cholestase (Schaap et al. 2009; Wunsch et al. 2015). Dans ce cas-là, les concentrations locales, voire circulantes, de FGF19 devraient être élevées. La question qui découle est de savoir si les patients ayant une surexpression hépatique de FGF19 sont-ils plus à risque de développer un CHC ? Il n'y a pas d'argument chez l'homme, mais pour mettre en évidence un tel effet il faudrait un suivi prospectif assez long avec des dosages répétés de FGF19 et une imagerie à la recherche de CHC, ce qui ne se justifierait qu'en cas de cirrhose associée. Un argument épidémiologique qui va contre cette hypothèse est la faible incidence de CHC chez les patients atteints de cholangite biliaire primitive au stade de cirrhose (une des pathologies où cette surexpression a été objectivée).

De façon plus récente il faut bien sûr évoquer le traitement par analogues de FGF19 (NGM-282 ou aldafermine) qui sont en cours d'évaluation pour diverses pathologies hépatiques telles que la cholangite biliaire primitive (Mayo et al. 2018), la cholangite sclérosante primitive (Hirschfield et al. 2019) et la NASH (Harrison et al. 2018, 2020). Cet analogue de FGF19 est théoriquement dépourvu de potentiel oncogénique par une délétion de 5 acides aminés couplée à la substitution de trois acides aminés (Zhou et al. 2014). La compagnie pharmaceutique à l'origine de cette molécule est également celle qui emploie les chercheurs ayant publié les articles reliant FGF19 à Il-6/STAT3. Cette équipe a bien montré que leur analogue ne déclenchait pas de sécrétion d'Il-6 par les macrophages puis activation de STAT3 dans les hépatocytes. Or, si une autre voie de signalisation indépendante d'Il-6/STAT3 stimulant l'hépatocarcinogenèse peut être activée, on pourrait logiquement imaginer un risque accru de CHC chez les patients ayant des lésions pré-cancéreuses hépatiques. Si on regarde les essais cliniques déjà publiés, il n'y a pas de données qui vont dans ce sens. Cependant, l'essai sur les patients ayant une NASH exclut les patients cirrhotiques, et dans les deux autres études sur la cholangite biliaire primitive et la cholangite sclérosante primitive, la durée de traitement est

courte (4 ou 12 semaines respectivement). Cet analogue pourrait-il stimuler l'apparition d'hépatocarcinomes chez des patients cirrhotiques traités pendant de longues périodes ?

De notre côté, il me semble que nous avons maintenant la responsabilité d'approfondir cette question sur nos modèles expérimentaux : nous pourrions cloner l'analogue de FGF19 dans un plasmide pouvant être injecté par voie hydrodynamique en combinaison avec Myc ou nous procurer de l'analogue et traiter nos souris après injection hydrodynamique par Myc.

Un autre résultat important de notre travail est celui qui montre que FGF19 semble stimuler la néoangiogenèse. Cette caractéristique incite à l'inclusion des anti-angiogéniques dans l'approche thérapeutique visant ces tumeurs. De façon intéressante, l'anti-angiogénique bevacizumab, anticorps monoclonal anti-VEGF, fait partie de l'arsenal thérapeutique de première ligne en combinaison avec l'atezolizumab (Finn et al. 2020). Il n'y a pas de données dans la littérature en faveur d'une réponse différente en fonction de l'expression de FGF19, mais la question mérite d'être posée. En attendant, nous envisageons de vérifier dans nos souris que la densité des vaisseaux plus élevée (aspect quantitatif) dans les tumeurs FGF19+ intéresse des vaisseaux fonctionnels (aspect qualitatif) par la réalisation d'une expérience d'injection d'une molécule fluorescente avant la collecte des souris porteuses de tumeurs.

La question de la place de notre travail dans la classification des événements oncogéniques propres au CHC mérite d'être discutée. Plusieurs de nos résultats sont à contre-courant de ce qui a été décrit pour FGF19. Les analyses du RNA-seq montrent que les tumeurs MYC + FGF19 +/- cr p53 expriment plutôt des gènes de la sous-classe non-proliférative de Chiang (Chiang et al. 2008) et S3 de Hoshida (Hoshida et al. 2009), alors que d'habitude l'amplification de FGF19 est considérée comme une caractéristique de la classe proliférative. Nous avons deux possibles explications à cela. Premièrement, dans les tumeurs humaines FGF19 est quasi-systématiquement amplifié avec CCND1, oncogène driver reconnu. Il est donc difficile de faire la part des choses entre les deux oncogènes, et une caractéristique attribuée à un des deux peut en réalité être propre à l'autre et inversement. Deuxièmement, la potentielle confusion entre amplification et surexpression de FGF19 pourrait perturber l'interprétation des données chez l'homme. En effet, il n'y a pas de corrélation systématique entre amplification et surexpression, il existe des tumeurs qui ont l'amplification sans surexpression et inversement (Hatlen et al. 2019).

Afin de faire la part des choses entre amplification et surexpression, nous avons décidé de regarder dans une cohorte de patients atteints de CHC la concentration circulante de FGF19, meilleur reflet de la surexpression (et plus facile à obtenir en pratique) de FGF19. En effet, FGF19 exerce des

effets oncogéniques par voie paracrine et endocrine et nous avons montré dans notre manuscrit que la surexpression par la cellule (pré-)tumorale n'est pas nécessaire si elle est soumise à des concentrations élevées de FGF19. Il serait extrêmement intéressant d'explorer l'origine de cette surexpression dans notre cohorte : est-elle liée à une amplification de FGF19 dans la tumeur ? Ou bien il s'agit d'une expression aberrante par le parenchyme non tumoral ? Enfin, on pourrait imaginer qu'il s'agisse d'une stimulation des entérocytes, cependant peu probable vu que cette situation ne semble pas exister dans les études où des dosages de FGF19 ont été faits chez des patients indemnes de pathologie hépatique (Lundâsen et al. 2006; Angelin, Larsson, and Rudling 2012). Dans tous les cas, nous essayons de récupérer du matériel histologique de certains de ces patients pour tenter de répondre à cette interrogation.

La confrontation de nos résultats à l'étude de Caruso et al. portant sur un panel de 34 lignées cellulaires de CHC soulève également beaucoup de questions (Caruso et al. 2019). Dans cette étude, les auteurs démontrent que les lignées ayant une amplification de FGF19 ne constituent pas un groupe homogène, puisque celles qui surexpriment l'ensemble des composants de la voie FGF19/FGFR4/KLB ont des caractéristiques très différentes de celles qui ont une amplification sans surexpression protéique associée de FGF19. Une des principales différences réside dans le rôle de la voie des MAP kinases et la réponse au tramétinib, un inhibiteur de MEK, molécule en aval de FGFR4. Nos données ne suggèrent pas une implication de cette voie, cependant pour avoir une preuve supplémentaire nous sommes en train de mener une expérience *in vivo* où les souris sont traitées par le tramétinib une semaine après l'injection de la combinaison Myc + FGF19. Dans cette expérience nous traitons un autre groupe de souris avec l'inhibiteur de FGFR4 pour lequel il y a le plus de données, le fisogatinib (ou BLU-554). En effet, il semble indispensable de tester si les tumeurs que nous obtenons sont sensibles à l'inhibition de FGFR4.

Par ailleurs, Caruso et al. montrent que les lignées cellulaires ayant une amplification avec surexpression de FGF19 sont les mieux différenciées, ayant un profil plutôt hépatocytaire, tout en faisant partie du sous-groupe prolifératif. Cela s'intègre bien avec nos analyses transcriptomiques et l'agressivité des tumeurs *in vivo*.

Mon projet est un bon exemple de l'utilité des modèles précliniques pour l'étude de la compréhension de mécanismes physiopathologiques observés chez l'homme. La méthode d'injection hydrodynamique est ainsi fascinante par les possibilités offertes quasi-illimitées de combinaisons entre oncogènes/inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, ceci afin de contrôler la composition génétique des tumeurs générées. Elle permet également de surexprimer dans les hépatocytes des protéines sécrétées, ce qui permet d'étudier les effets d'une exposition chronique à cette molécule.

L'étude des propriétés de FGF19 se prête donc particulièrement bien à cette technique. Il reste encore de très nombreuses interrogations quant aux mécanismes oncogéniques de FGF19, et la meilleure compréhension de ceux-là pourrait avoir un impact chez les patients à moyen ou long terme.



## V. Références

- Abbafati, C., D. B. Machado, B. Cislighi, O. M. Salman, M. Karanikolos, M. McKee, K. M. Abbas, et al. 2020. "Global Burden of 369 Diseases and Injuries in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019." *The Lancet* 396 (10258): 1204–22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).
- Abdelmalek, Manal F., Ayako Suzuki, Cynthia Guy, Aynur Unalp-Arida, Ryan Colvin, Richard J. Johnson, and Anna Mae Diehl. 2010. "Increased Fructose Consumption Is Associated with Fibrosis Severity in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 51 (6): 1961–71. <https://doi.org/10.1002/hep.23535>.
- Abou-Alfa, Ghassan K, Tim Meyer, Ann-Lii Cheng, Anthony B El-Khoueiry, Lorenza Rimassa, Baek-Yeol Ryoo, Irfan Cicin, et al. 2018. "Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma." *The New England Journal of Medicine* 379 (1): 54–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1717002>.
- Adams, Leon A., James F. Lymp, Jenny St. Sauver, Schuyler O. Sanderson, Keith D. Lindor, Ariel Feldstein, and Paul Angulo. 2005. "The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study." *Gastroenterology* 129 (1): 113–21. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.04.014>.
- ADHR Consortium. 2000. "Autosomal Dominant Hypophosphataemic Rickets Is Associated with Mutations in FGF23." *Nature Genetics* 26 (3): 345–48. <https://doi.org/10.1038/81664>.
- Ahn, Sung Min, Se Jin Jang, Ju Hyun Shim, Deokhoon Kim, Seung Mo Hong, Chang Ohk Sung, Daehyun Baek, et al. 2014. "Genomic Portrait of Resectable Hepatocellular Carcinomas: Implications of RB1 and FGF19 Aberrations for Patient Stratification." *Hepatology* 60 (6): 1972–82. <https://doi.org/10.1002/hep.27198>.
- Ahodantin, James, Myriam Bou-Nader, Corinne Cordier, Jérôme Mégret, Patrick Soussan, Chantal Desdouets, and Dina Kremsdorf. 2019. "Hepatitis B Virus X Protein Promotes DNA Damage Propagation through Disruption of Liver Polyploidization and Enhances Hepatocellular Carcinoma Initiation." *Oncogene* 38 (14): 2645–57. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0607-3>.
- Ally, Adrian, Miruna Balasundaram, Rebecca Carlsen, Eric Chuah, Amanda Clarke, Noreen Dhalla, Robert A. Holt, et al. 2017. "Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma." *Cell* 169 (7): 1327–1341.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.046>.
- Alvarez-Sola, Gloria, Iker Uriarte, M. Ujue Latasa, Maite G. Fernandez-Barrena, Raquel Urtasun, Maria Elizalde, Marina Barcena-Varela, et al. 2017. "Fibroblast Growth Factor 15/19 (FGF15/19) Protects from Diet-Induced Hepatic Steatosis: Development of an FGF19-Based Chimeric Molecule to Promote Fatty Liver Regeneration." *Gut* 66 (10): 1818–28. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312975>.
- Amaddeo, Giuliana, Qian Cao, Yannick Ladeiro, Sandrine Imbeaud, Jean Charles Nault, Daphne Jaoui, Yann Gaston Mathe, et al. 2015. "Integration of Tumour and Viral Genomic Characterisations in HBV-Related Hepatocellular Carcinomas." *Gut* 64 (5): 820–29. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306228>.
- Angelin, Bo, Tobias E. Larsson, and Mats Rudling. 2012. "Circulating Fibroblast Growth Factors as Metabolic Regulators - A Critical Appraisal." *Cell Metabolism* 16 (6): 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.001>.
- Angulo, Paul, David E. Kleiner, Sanne Dam-Larsen, Leon A. Adams, Einar S. Bjornsson, Phunchai Charatcharoenwitthaya, Peter R. Mills, et al. 2015. "Liver Fibrosis, but No Other Histologic

- Features, Is Associated with Long-Term Outcomes of Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Gastroenterology* 149 (2): 389–397. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>.
- Anstee, Quentin M., and Robert D. Goldin. 2006. “Mouse Models in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis Research.” *International Journal of Experimental Pathology* 87 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>.
- Anstee, Quentin M., Helen L. Reeves, Elena Kotsiliti, Olivier Govaere, and Mathias Heikenwalder. 2019. “From NASH to HCC: Current Concepts and Future Challenges.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 16 (7): 411–28. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>.
- Arrese, Marco, Daniel Cabrera, Alexis M Kalergis, and Ariel E Feldstein. 2016. “Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH.” *Digestive Diseases and Sciences* 61 (5): 1294–1303. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4049-x>.
- Asgharpour, Amon, Sophie C Cazanave, Tommy Pacana, Mulugeta Seneshaw, Robert Vincent, Bubu A Banini, Divya Prasanna Kumar, et al. 2016. “A Diet-Induced Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Cancer.” *Journal of Hepatology* 65 (3): 579–88. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>.
- Bacevic, Katarina, Susana Prieto, Stefano Caruso, Alain Camasses, Geronimo Dubra, José Ursic-Bedoya, Anthony Lozano, et al. 2019. “CDK8 and CDK19 Kinases Have Non-Redundant Oncogenic Functions in Hepatocellular Carcinoma.” *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/789586>.
- Badman, Michael K., Pavlos Pissios, Adam R. Kennedy, George Koukos, Jeffrey S. Flier, and Eleftheria Maratos-Flier. 2007. “Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR $\alpha$  and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States.” *Cell Metabolism* 5 (6): 426–37. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>.
- Baptissart, Marine, Aurélie Vega, Emmanuelle Martinot, Aurélien J Pommier, Sander M Houten, Geoffroy Marceau, Angélique de Haze, et al. 2014. “Bile Acids Alter Male Fertility through TGR5 Signaling Pathways.” *Hepatology (Baltimore, Md.)*, no. 1103: 1–39. <https://doi.org/10.1002/hep.27204>.
- Barrera, Francisco, and Jacob George. 2014. “The Role of Diet and Nutritional Intervention for the Management of Patients with NAFLD.” *Clinics in Liver Disease* 18 (1): 91–112. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.009>.
- Barthel, Floris P, Wei Wei, Ming Tang, Emmanuel Martinez-Ledesma, Xin Hu, Samirkumar B Amin, Kadir C Akdemir, et al. 2017. “Systematic Analysis of Telomere Length and Somatic Alterations in 31 Cancer Types.” *Nature Genetics* 49 (3): 349–57. <https://doi.org/10.1038/ng.3781>.
- Bartz, Rene, Keisuke Fukuchi, Toshiaki Ohtsuka, Tanja Lange, Katrin Gruner, Ichiro Watanabe, Shinko Hayashi, et al. 2019. “Preclinical Development of U3-1784, a Novel FGFR4 Antibody against Cancer, and Avoidance of Its On-Target Toxicity.” *Molecular Cancer Therapeutics* 18 (10): 1832–43. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0048>.
- Begrache, Karima, Julie Massart, Marie Anne Robin, Fabrice Bonnet, and Bernard Fromenty. 2013. “Mitochondrial Adaptations and Dysfunctions in Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Hepatology* 58 (4): 1497–1507. <https://doi.org/10.1002/hep.26226>.
- Bella, Tiziana La, Sandrine Imbeaud, Camille Peneau, Iadh Mami, Shalini Datta, Quentin Bayard, Stefano Caruso, et al. 2020. “Adeno-Associated Virus in the Liver: Natural History and Consequences in Tumour Development.” *Gut* 69 (4): 737–47. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318281>.
- Benoit, Bérengère, Emmanuelle Meugnier, Martina Castelli, Stéphanie Chanon, Aurélie Vieille-Marchiset, Christine Durand, Nadia Bendridi, et al. 2017. “Fibroblast Growth Factor 19 Regulates

- Skeletal Muscle Mass and Ameliorates Muscle Wasting in Mice." *Nature Medicine* 23 (8): 990–96. <https://doi.org/10.1038/nm.4363>.
- Bhatnagar, Sushant, Holly A. Dammron, and F. Bradley Hillgartner. 2009. "Fibroblast Growth Factor-19, a Novel Factor That Inhibits Hepatic Fatty Acid Synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 284 (15): 10023–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808818200>.
- Blasco, María A., Han Woong Lee, M. Prakash Hande, Enrique Samper, Peter M. Lansdorp, Ronald A. DePinho, and Carol W. Greider. 1997. "Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA." *Cell* 91 (1): 25–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)80006-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80006-4).
- Boege, Yannick, Mohsen Malehmir, Marc E. Healy, Kira Bettermann, Anna Lorentzen, Mihael Vucur, Akshay K. Ahuja, et al. 2017. "A Dual Role of Caspase-8 in Triggering and Sensing Proliferation-Associated DNA Damage, a Key Determinant of Liver Cancer Development." *Cancer Cell* 32 (3): 342–359.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.010>.
- Boer, Jan Freark de, Marleen Schonewille, Marije Boesjes, Henk Wolters, Vincent W. Bloks, Trijnie Bos, Theo H. van Dijk, et al. 2017. "Intestinal Farnesoid X Receptor Controls Transintestinal Cholesterol Excretion in Mice." *Gastroenterology* 152 (5): 1126–1138.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.037>.
- Bouabe, Hicham, and Klaus Okkenhaug. 2013. "Gene Targeting in Mice: A Review." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1064: 315–36. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-601-6\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-601-6_23).
- Boursier, Jerome, and Anna Mae Diehl. 2015. "Implication of Gut Microbiota in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *PLoS Pathogens* 11 (1): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004559>.
- Boyault, Sandrine, David S. Rickman, Aurélien De Reyniès, Charles Balabaud, Sandra Rebouissou, Emmanuelle Jeannot, Aurélie Héroult, et al. 2007. "Transcriptome Classification of HCC Is Related to Gene Alterations and to New Therapeutic Targets." *Hepatology* 45 (1): 42–52. <https://doi.org/10.1002/hep.21467>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brouard, Cécile, Yann Le Strat, Christine Larsen, Marie Jauffret-Roustide, Florence Lot, and Josiane Pillonel. 2015. "The Undiagnosed Chronically-Infected HCV Population in France. Implications for Expanded Testing Recommendations in 2014." *PLoS ONE* 10 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126920>.
- Bruden, Dana J T, Brian J McMahon, Lisa Townshend-Bulson, Prabhu Gounder, Jim Gove, Julia Plotnik, Chriss Homan, et al. 2017. "Risk of End-Stage Liver Disease, Hepatocellular Carcinoma, and Liver-Related Death by Fibrosis Stage in the Hepatitis C Alaska Cohort." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66 (1): 37–45. <https://doi.org/10.1002/hep.29115>.
- Bruix, Jordi, Shukui Qin, Philippe Merle, Alessandro Granito, Yi Hsiang Huang, György Bodoky, Marc Pracht, et al. 2017. "Regorafenib for Patients with Hepatocellular Carcinoma Who Progressed on Sorafenib Treatment (RESORCE): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial." *The Lancet* 389 (10064): 56–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32453-9).
- Calvisi, Diego F., Chunmei Wang, Coral Ho, Sara Ladu, Susie A. Lee, Sandra Mattu, Giulia Destefanis, et al. 2011. "Increased Lipogenesis, Induced by AKT-MTORC1-RPS6 Signaling, Promotes Development of Human Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 140 (3): 1071–1083.e5.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.12.006>.

- Camporez, João Paulo G., François R. Jornayvaz, Max C. Petersen, Dominik Pesta, Blas A. Guigni, Julie Serr, Dongyan Zhang, et al. 2013. "Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice." *Endocrinology* 154 (9): 3099–3109. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1191>.
- Carlson, Corey M, Joel L Frandsen, Nicole Kirchhof, R. S. Mclvor, and David A Largaespada. 2005. "Somatic Integration of an Oncogene-Harboring Sleeping Beauty Transposon Models Liver Tumor Development in the Mouse." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (47): 17059–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502974102>.
- Caruso, Stefano, Anna Line Calatayud, Jill Pilet, Tiziana La Bella, Samia Rekik, Sandrine Imbeaud, Eric Letouzé, et al. 2019. "Analysis of Liver Cancer Cell Lines Identifies Agents With Likely Efficacy Against Hepatocellular Carcinoma and Markers of Response." *Gastroenterology* 157 (3): 760–76. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.05.001>.
- Chang, M H, C J Chen, M S Lai, H M Hsu, T C Wu, M S Kong, D C Liang, W Y Shau, and D S Chen. 1997. "Universal Hepatitis B Vaccination in Taiwan and the Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group." *The New England Journal of Medicine* 336 (26): 1855–59. <https://doi.org/10.1056/NEJM199706263362602>.
- Charlton, M, A Krishnan, K Viker, S Sanderson, S Cazanave, A. McConico, Howard Masuoko, and Gregory Gores. 2011. "Fast Food Diet Mouse: Novel Small Animal Model of NASH with Ballooning, Progressive Fibrosis, and High Physiological Fidelity to the Human Condition." *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (5): G825–34. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00145.2011>.
- Chávez-Talavera, Oscar, Anne Tailleux, Philippe Lefebvre, and Bart Staels. 2017. "Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 152 (7): 1679-1694.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.055>.
- Chen, Jie, Feng Du, Yunzhi Dang, Xiaowei Li, Meirui Qian, Weibo Feng, Chenyang Qiao, et al. 2019. "Fibroblast Growth Factor 19–Mediated Up-Regulation of SYR-Related High-Mobility Group Box 18 Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Transactivating Fibroblast Growth Factor Receptor 4 and Fms-Related Tyrosine Kinase 4." *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.30951>.
- Chen, Yu-Ling, Yung-Ming Jeng, Chih-Ning Chang, Hsin-Jung Lee, Hey-Chi Hsu, Po-Lin Lai, and Ray-Hwang Yuan. 2014. "TERT Promoter Mutation in Resectable Hepatocellular Carcinomas: A Strong Association with Hepatitis C Infection and Absence of Hepatitis B Infection." *International Journal of Surgery (London, England)* 12 (7): 659–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.05.066>.
- Chiang, Derek Y., Augusto Villanueva, Yujin Hoshida, Judit Peix, Philippa Newell, Beatriz Minguez, Amanda C. LeBlanc, et al. 2008. "Focal Gains of VEGFA and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Research* 68 (16): 6779–88. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0742>.
- Chisari, F V, C A Pinkert, D R Milich, P Filippi, A McLachlan, R D Palmiter, and R L Brinster. 1985. "A Transgenic Mouse Model of the Chronic Hepatitis B Surface Antigen Carrier State." *Science (New York, N.Y.)* 230 (4730): 1157–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3865369>.
- Chow, Edward Kai Hua, Ling Ling Fan, Xin Chen, and J. Michael Bishop. 2012. "Oncogene-Specific Formation of Chemoresistant Murine Hepatic Cancer Stem Cells." *Hepatology* 56 (4): 1331–41. <https://doi.org/10.1002/hep.25776>.

- Chu, Yu-Ju, Hwai-I Yang, Hui-Chen Wu, Mei-Hsuan Lee, Jessica Liu, Li-Yu Wang, Sheng-Nan Lu, et al. 2018. "Aflatoxin B1 Exposure Increases the Risk of Hepatocellular Carcinoma Associated with Hepatitis C Virus Infection or Alcohol Consumption." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 94: 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.010>.
- Citterio, Davide, Antonio Facciorusso, Carlo Sposito, Roberta Rota, Sherrie Bhoori, and Vincenzo Mazzaferro. 2016. "Hierarchic Interaction of Factors Associated With Liver Decompensation After Resection for Hepatocellular Carcinoma." *JAMA Surgery* 151 (9): 846–53. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2016.1121>.
- Colnot, S, T Decaens, M Niwa-Kawakita, C Godard, G Hamard, A Kahn, M Giovannini, and C Perret. 2004. "Liver-Targeted Disruption of Apc in Mice Activates Beta-Catenin Signaling and Leads to Hepatocellular Carcinomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (49): 17216–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404761101>.
- Connor, Frances, Tim F. Rayner, Sarah J. Aitken, Christine Feig, Margus Lukk, Javier Santoyo-Lopez, and Duncan T. Odom. 2018. "Mutational Landscape of a Chemically-Induced Mouse Model of Liver Cancer." *Journal of Hepatology* 69 (4): 840–50. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.009>.
- Conti, Aline De, Kostiantyn Dreval, Volodymyr Tryndyak, Orish E. Orisakwe, Sharon A. Ros, Frederick A. Beland, and Igor P. Pogribny. 2017. "Inhibition of the Cell Death Pathway in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)-Related Hepatocarcinogenesis Is Associated with Histone H4 Lysine 16 Deacetylation." *Molecular Cancer Research* 15 (9): 1163–72. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0109>.
- Dapito, Dianne H., Ali Mencin, Geum Youn Gwak, Jean Philippe Pradere, Myoung Kuk Jang, Ingmar Mederacke, Jorge M. Caviglia, et al. 2012. "Promotion of Hepatocellular Carcinoma by the Intestinal Microbiota and TLR4." *Cancer Cell* 21 (4): 504–16. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.007>.
- Darlington, Gretchen J., Hans Peter Bernhard, Richard A. Miller, and Frank H. Ruddle. 1980. "Expression of Liver Phenotypes in Cultured Mouse Hepatoma Cells." *Journal of the National Cancer Institute* 64 (4): 809–19. <https://doi.org/10.1093/jnci/64.4.809>.
- Dasgupta, Debanjali, Yasuhiko Nakao, Amy S. Mauer, Jill M. Thompson, Tejasav S. Sehrawat, Chieh Yu Liao, Anuradha Krishnan, et al. 2020. "IRE1A Stimulates Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicles That Promote Inflammation in Mice With Steatohepatitis." *Gastroenterology* 159 (4): 1487-1503.e17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.031>.
- Deane, Natasha G., Monica A. Parker, Radhika Aramandla, Lisa Diehl, Woo Jung Lee, M. Kay Washington, Lillian B. Nanne, Yu Shyr, and R. Daniel Beauchamp. 2001. "Hepatocellular Carcinoma Results from Chronic Cyclin D1 Overexpression in Transgenic Mice." *Cancer Research* 61 (14): 5389–95.
- Deng, Qing Gao, Hongyun She, Jason H. Cheng, Samuel W. French, Dennis R. Koop, Shigang Xiong, and Hidekazu Tsukamoto. 2005. "Steatohepatitis Induced by Intra-gastric Overfeeding in Mice." *Hepatology* 42 (4): 905–14. <https://doi.org/10.1002/hep.20877>.
- Dragani, Tommaso A., Giacomo Manenti, and Giuseppe Della Porta. 1986. "Enhancing Effects of Carbon Tetrachloride in Mouse Hepatocarcinogenesis." *Cancer Letters* 31 (2): 171–79. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(86\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0304-3835(86)90008-X).
- Dudka, Anna A., Steve M.M. Sweet, and John K. Heath. 2010. "Signal Transducers and Activators of Transcription-3 Binding to the Fibroblast Growth Factor Receptor Is Activated by Receptor Amplification." *Cancer Research* 70 (8): 3391–3401. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3033>.



- Duvoux, Christophe, Françoise Roudot-Thoraval, Thomas Decaens, Fabienne Pessione, Hanaa Badran, Tullio Piardi, Claire Francoz, et al. 2012. "Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A Model Including  $\alpha$ -Fetoprotein Improves the Performance of Milan Criteria." *Gastroenterology* 143 (4): 986-94.e3; quiz e14-5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.052>.
- El-Serag, Hashem B, and K Lenhard Rudolph. 2007. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis." *Gastroenterology* 132 (7): 2557–76. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>.
- Engelholm, Lars H., Anjum Riaz, Denise Serra, Frederik Dagnæs-Hansen, Jens V. Johansen, Eric Santoni-Rugiu, Steen H. Hansen, Francesco Niola, and Morten Frödin. 2017. "CRISPR/Cas9 Engineering of Adult Mouse Liver Demonstrates That the Dnajb1–Prkaca Gene Fusion Is Sufficient to Induce Tumors Resembling Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 153 (6): 1662-1673.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.008>.
- Eslam, Mohammed, Philip N. Newsome, Shiv K. Sarin, Quentin M. Anstee, Giovanni Targher, Manuel Romero-Gomez, Shira Zelber-Sagi, et al. 2020. "A New Definition for Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: An International Expert Consensus Statement." *Journal of Hepatology* 73 (1): 202–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.039>.
- Eslam, Mohammed, Arun J. Sanyal, Jacob George, Arun Sanyal, Brent Neuschwander-Tetri, Claudio Tiribelli, David E. Kleiner, et al. 2020. "MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 158 (7): 1999-2014.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.312>.
- Estes, Chris, Quentin M Anstee, Maria Teresa Arias-Loste, Heike Bantel, Stefano Bellentani, Joan Caballeria, Massimo Colombo, et al. 2018. "Modeling NAFLD Disease Burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the Period 2016–2030." *Journal of Hepatology* 69 (4): 896–904. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.036>.
- Falletti, Edmondo, Carlo Fabris, Sara Cmet, Annarosa Cussigh, Davide Bitetto, Elisabetta Fontanini, Ezio Fornasiere, et al. 2011. "PNPLA3 Rs738409C/G Polymorphism in Cirrhosis: Relationship with the Aetiology of Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma Occurrence." *Liver International* 31 (8): 1137–43. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02534.x>.
- Fan, Biao, Yann Malato, Diego F. Calvisi, Syed Naqvi, Nataliya Razumilava, Silvia Ribback, Gregory J. Gores, et al. 2012. "Cholangiocarcinomas Can Originate from Hepatocytes in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 122 (8): 2911–15. <https://doi.org/10.1172/JCI63212>.
- Farazi, Paraskevi A., Jonathan Glickman, Shan Jiang, Alice Yu, Karl Lenhard Rudolph, and Ronald A. DePinho. 2003. "Differential Impact of Telomere Dysfunction on Initiation and Progression of Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Research* 63 (16): 5021–27.
- Federico, Alessandro, Floriana Morgillo, Concetta Tuccillo, Fortunato Ciardiello, and Carmela Loguercio. 2007. "Chronic Inflammation and Oxidative Stress in Human Carcinogenesis." *International Journal of Cancer* 121 (11): 2381–86. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>.
- Feldstein, Ariel E. 2010. "Novel Insights into the Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Seminars in Liver Disease* 30 (4): 391–401. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1267539>.
- Finn, Richard S., Shukui Qin, Masafumi Ikeda, Peter R. Galle, Michel Ducreux, Tae You Kim, Masatoshi Kudo, et al. 2020. "Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma." *The New England Journal of Medicine* 382 (20): 1894–1905. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915745>.
- French, Dorothy M., Benjamin C. Lin, Manping Wang, Camellia Adams, Theresa Shek, Kathy Hötzel,



- Brad Bolon, et al. 2012. "Targeting FGFR4 Inhibits Hepatocellular Carcinoma in Preclinical Mouse Models." *PloS One* 7 (5): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036713>.
- Fu, Ling, Linu M. John, Sean H. Adams, Xing Xian Yu, Elizabeth Tomlinson, Mark Renz, P. Mickey Williams, et al. 2004. "Fibroblast Growth Factor 19 Increases Metabolic Rate and Reverses Dietary and Leptin-Deficient Diabetes." *Endocrinology* 145 (6): 2594–2603. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1671>.
- Fujimoto, Akihiro, Yasushi Totoki, Tetsuo Abe, Keith A. Boroevich, Fumie Hosoda, Ha Hai Nguyen, Masayuki Aoki, et al. 2012. "Whole-Genome Sequencing of Liver Cancers Identifies Etiological Influences on Mutation Patterns and Recurrent Mutations in Chromatin Regulators." *Nature Genetics* 44 (7): 760–64. <https://doi.org/10.1038/ng.2291>.
- Gäbele, Erwin, Karin Dostert, Claudia Hofmann, Reiner Wiest, Jürgen Schölmerich, Claus Hellerbrand, and Florian Obermeier. 2011. "DSS Induced Colitis Increases Portal LPS Levels and Enhances Hepatic Inflammation and Fibrogenesis in Experimental NASH." *Journal of Hepatology* 55 (6): 1391–99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.035>.
- Galle, Peter R., Alejandro Forner, Josep M. Llovet, Vincenzo Mazzaferro, Fabio Piscaglia, Jean-Luc Raoul, Peter Schirmacher, and Valérie Vilgrain. 2018. "EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Hepatology* 69 (1): 182–236. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>.
- Ganne-Carrié, Nathalie, Cendrine Chaffaut, Valérie Bourcier, Isabelle Archambeaud, Jean-Marc Perarnau, Frédéric Oberti, Dominique Roulot, et al. 2018. "Estimate of Hepatocellular Carcinoma Incidence in Patients with Alcoholic Cirrhosis." *Journal of Hepatology* 69 (6): 1274–83. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.07.022>.
- Ganne-Carrié, Nathalie, and Pierre Nahon. 2019. "Hepatocellular Carcinoma in the Setting of Alcohol-Related Liver Disease." *Journal of Hepatology* 70 (2): 284–93. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.008>.
- Gao, Daqing, Chiming Wei, Lei Chen, Jiawen Huang, Shiqi Yang, and Anna Mae Diehl. 2004. "Oxidative DNA Damage and DNA Repair Enzyme Expression Are Inversely Related in Murine Models of Fatty Liver Disease." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (5 50-5): 1070–77. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00228.2004>.
- Gaughhofer, Christine, Sandra Sagmeister, Waltraud Schrottmaier, Carina Fischer, Chantal Rodgarkia-Dara, Thomas Mohr, Stefan Stättner, et al. 2011. "Up-Regulation of the Fibroblast Growth Factor 8 Subfamily in Human Hepatocellular Carcinoma for Cell Survival and Neoangiogenesis." *Hepatology* 53 (3): 854–64. <https://doi.org/10.1002/hep.24099>.
- Geller, Stephen A., W. Stephen Nichols, Sungsook Kim, Tanya Tolmachoff, Stephen Lee, Mark J. Dycaico, Katherine Felts, and Joseph A. Sorge. 1994. "Hepatocarcinogenesis Is the Sequel to Hepatitis in Z#2 A1-antitrypsin Transgenic Mice: Histopathological and DNA Ploidy Studies." *Hepatology* 19 (2): 389–97. <https://doi.org/10.1002/hep.1840190218>.
- Gerber, L., M. Otgonsuren, A. Mishra, C. Escheik, A. Biredinc, M. Stepanova, and Z. M. Younossi. 2012. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Is Associated with Low Level of Physical Activity: A Population-Based Study." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 36 (8): 772–81. <https://doi.org/10.1111/apt.12038>.
- Goetz, Regina, and Moosa Mohammadi. 2013. "Exploring Mechanisms of FGF Signalling through the Lens of Structural Biology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (3): 166–80. <https://doi.org/10.1038/nrm3528>.

- Guichard, Cécile, Giuliana Amaddeo, Sandrine Imbeaud, Yannick Ladeiro, Laura Pelletier, Ichrafe Ben Maad, Julien Calderaro, et al. 2012. "Integrated Analysis of Somatic Mutations and Focal Copy-Number Changes Identifies Key Genes and Pathways in Hepatocellular Carcinoma." *Nature Genetics* 44 (6): 694–98. <https://doi.org/10.1038/ng.2256>.
- Hagel, Margit, Chandra Miduturu, Michael Sheets, Nooreen Rubin, Weifan Weng, Nicolas Stransky, Neil Bifulco, et al. 2015. "First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway." *Cancer Discovery* 5 (4): 424–37. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1029>.
- Harada, Naomoto, Hiroyuki Miyoshi, Naomi Murai, Hiroko Oshima, Yoshitaka Tamai, Masanobu Oshima, and Makoto M. Taketo. 2002. "Lack of Tumorigenesis in the Mouse Liver after Adenovirus-Mediated Expression of a Dominant Stable Mutant of  $\beta$ -Catenin." *Cancer Research* 62 (7): 1971–77.
- Harada, Naomoto, Hiroko Oshima, Masahiro Katoh, Yoshitaka Tamai, Masanobu Oshima, and Makoto M Taketo. 2004. "Hepatocarcinogenesis in Mice with Beta-Catenin and Ha-Ras Gene Mutations." *Cancer Research* 64 (1): 48–54. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0361-9>.
- Harrison, Stephen A., Mary E. Rinella, Manal F. Abdelmalek, James F. Trotter, Angelo H. Paredes, Hays L. Arnold, Marcelo Kugelmas, et al. 2018. "NGM282 for Treatment of Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial." *The Lancet* 391 (10126): 1174–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30474-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30474-4).
- Hasegawa, Yasuhiro, Masanobu Kawai, Kazuhiko Bessho, Kie Yasuda, Takehisa Ueno, Yoshinori Satomura, Akiko Konishi, et al. 2019. "CYP7A1 Expression in Hepatocytes Is Retained with Upregulated Fibroblast Growth Factor 19 in Pediatric Biliary Atresia." *Hepatology Research* 49 (3): 314–23. <https://doi.org/10.1111/hepr.13245>.
- Hatlen, Megan A., Oleg Schmidt-Kittler, Cori Ann Sherwin, Emily Rozsahegyi, Nooreen Rubin, Michael P. Sheets, Joseph L. Kim, et al. 2019. "Acquired On-Target Clinical Resistance Validates Fgfr4 as a Driver of Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Discovery* 9 (12): 1686–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0367>.
- Henkel, Janin, Charles Dominic Coleman, Anne Schraplau, Korinna Jöhrens, Daniela Weber, José Pedro Castro, Martin Hugo, et al. 2017. "Induction of Steatohepatitis (NASH) with Insulin Resistance in Wild-Type B6 Mice by a Western-Type Diet Containing Soybean Oil and Cholesterol." *Molecular Medicine* 23: 70–82. <https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00203>.
- Ho, Coral, Chunmei Wang, Sandra Mattu, Giulia Destefanis, Sara Ladu, Salvatore Delogu, Julia Armbruster, et al. 2012. "AKT (v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1) and N-Ras (Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog) Coactivation in the Mouse Liver Promotes Rapid Carcinogenesis by Way of MTOR (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1), FOXM1 (Forkhead Box M1)/SKP2, ." *Hepatology* 55 (3): 833–45. <https://doi.org/10.1002/hep.24736>.
- Hollingshead, M G, M C Alley, R F Camalier, B J Abbott, J G Mayo, L Malspeis, and M R Grever. 1995. "In Vivo Cultivation of Tumor Cells in Hollow Fibers." *Life Sciences* 57 (2): 131–41. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00254-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00254-4).
- Holt, Jason A., Guizhen Luo, Andrew N. Billin, John Bisi, Y. Yvette McNeill, Karen F. Kozarsky, Mary Donahue, et al. 2003. "Definition of a Novel Growth Factor-Dependent Signal Cascade for the Suppression of Bile Acid Biosynthesis." *Genes and Development* 17 (13): 1581–91. <https://doi.org/10.1101/gad.1083503>.
- Horie, Yasuo, Akira Suzuki, Ei Kataoka, Takehiko Sasaki, Koichi Hamada, Junko Sasaki, Katsunori Mizuno, et al. 2004. "Hepatocyte-Specific Pten Deficiency Results in Steatohepatitis and

- Hepatocellular Carcinomas." *Journal of Clinical Investigation* 113 (12): 1774–83. <https://doi.org/10.1172/JCI20513>.
- Hoshida, Yujin, Sebastian M.B. Nijman, Masahiro Kobayashi, Jennifer A. Chan, Jean Philippe Brunet, Derek Y. Chiang, Augusto Villanueva, et al. 2009. "Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Research* 69 (18): 7385–92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1089>.
- Hsu, I C, R. A. Metcalf, T Sun, J. A. Welsh, N J Wang, and C. C. Harris. 1991. "Mutational Hot Spot in the P53 Gene in Human Hepatocellular Carcinomas." *Nature* 350 (6317): 427–28. <https://doi.org/10.1038/350427a0>.
- Hsuchou, Hung, Weihong Pan, and Abba J. Kastin. 2007. "The Fasting Polypeptide FGF21 Can Enter Brain from Blood." *Peptides* 28 (12): 2382–86. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.10.007>.
- . 2013. "Fibroblast Growth Factor 19 Entry into Brain." *Fluids and Barriers of the CNS* 10 (1): 8–15. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-32>.
- Hu, Chaobo, Weiping Li, Feng Tian, Kai Jiang, Xiaoting Liu, Jin Cen, Qiang He, et al. 2018. "Arid1a Regulates Response to Anti-Angiogenic Therapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Hepatology* 68 (3): 465–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.028>.
- Hussain, S P, J Schwank, F Staib, X W Wang, and C C Harris. 2007. "TP53 Mutations and Hepatocellular Carcinoma: Insights into the Etiology and Pathogenesis of Liver Cancer." *Oncogene* 26 (15): 2166–76. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210279>.
- Hyeon, Jiyeon, Soomin Ahn, Jae Jun Lee, Dae Hyun Song, and Cheol Keun Park. 2013. "Expression of Fibroblast Growth Factor 19 Is Associated with Recurrence and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma." *Digestive Diseases and Sciences* 58 (7): 1916–22. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2609-x>.
- Ichimura, Yoshinobu, Satoshi Waguri, Yu shin Sou, Shun Kageyama, Jun Hasegawa, Ryosuke Ishimura, Tetsuya Saito, et al. 2013. "Phosphorylation of P62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy." *Molecular Cell* 51 (5): 618–31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.003>.
- Inagaki, Takeshi, Mihwa Choi, Antonio Moschetta, Li Peng, Carolyn L. Cummins, Jeffrey G. McDonald, Guizhen Luo, et al. 2005. "Fibroblast Growth Factor 15 Functions as an Enterohepatic Signal to Regulate Bile Acid Homeostasis." *Cell Metabolism* 2 (4): 217–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>.
- Inagaki, Takeshi, Paul Dutchak, Guixiang Zhao, Xunshan Ding, Laurent Gautron, Vinay Parameswara, Yong Li, et al. 2007. "Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR $\alpha$ -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21." *Cell Metabolism* 5 (6): 415–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.003>.
- Inami, Yoshihiro, Satoshi Waguri, Ayako Sakamoto, Tsuguka Kouno, Kazuto Nakada, Okio Hino, Sumio Watanabe, et al. 2011. "Persistent Activation of Nrf2 through P62 in Hepatocellular Carcinoma Cells." *Journal of Cell Biology* 193 (2): 275–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102031>.
- Ioannou, George N., Pamela Green, Kathleen F. Kerr, and Kristin Berry. 2019. "Models Estimating Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Alcohol or NAFLD-Related Cirrhosis for Risk Stratification." *Journal of Hepatology* 71 (3): 523–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.05.008>.
- Ito, Makoto, Jun Suzuki, Shigeharu Tsujioka, Minoru Sasaki, Akira Gomori, Takashi Shirakura, Hiroyasu Hirose, et al. 2007. "Longitudinal Analysis of Murine Steatohepatitis Model Induced by Chronic

- Exposure to High-Fat Diet." *Hepatology Research* 37 (1): 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00008.x>.
- Ivics, Zoltá N, Perry B Hackett, Ronald H Plasterk, and Zsuzsanna Izsvá. 1997. "Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells Its Original Location and Promotes Its Reintegration Else- Where in the Genome (Plasterk, 1996). Autonomous Mem- Bers of a Transposon." *Cell* 91: 501–10.
- Jensen, Thomas, Manal F. Abdelmalek, Shelby Sullivan, Kristen J. Nadeau, Melanie Green, Carlos Roncal, Takahiko Nakagawa, et al. 2018. "Fructose and Sugar: A Major Mediator of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 68 (5): 1063–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.019>.
- Jepsen, Peter, Frederik Kraglund, Joe West, Gerda E. Villadsen, Henrik Toft Sørensen, and Hendrik Vilstrup. 2020. "Risk of Hepatocellular Carcinoma in Danish Outpatients with Alcohol-Related Cirrhosis." *Journal of Hepatology* 73 (5): 1030–36. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.043>.
- Ji, Suyuan, Qingxu Liu, Shihao Zhang, Qinghua Chen, Cong Wang, Weiji Zhang, Chen Xiao, et al. 2019. "FGF15 Activates Hippo Signaling to Suppress Bile Acid Metabolism and Liver Tumorigenesis." *Developmental Cell* 48 (4): 460–474.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.021>.
- Jiang, Hao, Hui Jun Cao, Ning Ma, Wen Dai Bao, Jing Jing Wang, Tian Wei Chen, Er Bin Zhang, et al. 2020. "Chromatin Remodeling Factor ARID2 Suppresses Hepatocellular Carcinoma Metastasis via DNMT1-Snail Axis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (9): 4770–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914937117>.
- Ju, Cynthia, and Frank Tacke. 2016. "Hepatic Macrophages in Homeostasis and Liver Diseases: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Strategies." *Cellular and Molecular Immunology* 13 (3): 316–27. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.104>.
- Ju, Hye Lim, Sang Hoon Ahn, Do Young Kim, Sinhwa Baek, Sook In Chung, Jinsil Seong, Kwang Hyub Han, and Simon Weonsang Ro. 2013. "Investigation of Oncogenic Cooperation in Simple Liver-Specific Transgenic Mouse Models Using Noninvasive In Vivo Imaging." *PLoS ONE* 8 (3): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059869>.
- Kang, Tae-Won, Tetyana Yevsa, Norman Woller, Lisa Hoenicke, Torsten Wuestefeld, Daniel Dauch, Anja Hohmeyer, et al. 2011. "Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development." *Nature* 479 (7374): 547–51. <https://doi.org/10.1038/nature10599>.
- Kaposi-Novak, Pal, Louis Libbrecht, Hyun Goo Woo, Yun Han Lee, Nathaniel C. Sears, Elizabeth A. Conner, Valentina M. Factor, Tania Roskams, and Snorri S. Thorgeirsson. 2009. "Central Role of C-Myc during Malignant Conversion in Human Hepatocarcinogenesis." *Cancer Research* 69 (7): 2775–82. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3357>.
- Katz, Sarah Fee, André Lechel, Anna C. Obenauf, Yvonne Begus-Nahrman, Johann M. Kraus, Eva M. Hoffmann, Johanna Duda, et al. 2012. "Disruption of Trp53 in Livers of Mice Induces Formation of Carcinomas with Bilineal Differentiation." *Gastroenterology* 142 (5): 1229–1239.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.009>.
- Kettner, Nicole M., Horatio Voicu, Milton J. Finegold, Cristian Coarfa, Arun Sreekumar, Nagireddy Putluri, Chinenye A. Katchy, Choogon Lee, David D. Moore, and Loning Fu. 2016. "Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis." *Cancer Cell* 30 (6): 909–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.007>.
- Kew, Michael C. 2003. "Synergistic Interaction between Aflatoxin B1 and Hepatitis B Virus in Hepatocarcinogenesis." *Liver International* 23 (6): 405–9. <https://doi.org/10.1111/j.1478->

3231.2003.00869.x.

- Kim, Joungmok, Mondira Kundu, Benoit Viollet, and Kun-Liang Guan. 2011. "AMPK and MTOR Regulate Autophagy through Direct Phosphorylation of Ulk1." *Nature Cell Biology* 13 (2): 132–41. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>.
- Kim, Richard D., Debashis Sarker, Tim Meyer, Thomas Yau, Teresa Macarulla, Joong Won Park, Su Pin Choo, et al. 2019. "First-in-Human Phase I Study of Fisolitinib (BLU-554) Validates Aberrant FGF19 Signaling as a Driver Event in Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Discovery* 9 (12): 1696–1707. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0555>.
- Kir, Serkan, Sara A. Beddow, Varman T. Samuel, Paul Miller, Stephen F. Previs, Kelly Suino-Powell, H. Eric Xu, Gerald I. Shulman, Steven A. Kliewer, and David J. Mangelsdorf. 2011. "FGF19 as a Postprandial, Insulin-Independent Activator of Hepatic Protein and Glycogen Synthesis." *Science* 331 (6024): 1621–24. <https://doi.org/10.1126/science.1198363>.
- Klocke, Rainer, Thomas Bartels, Gary Jennings, Karsten Brand, Roman Halter, Michael Strauss, and Dieter Paul. 2001. "Lack of P53 Accelerates Hepatocarcinogenesis in Transgenic Mice Constitutively Overexpressing C-Myc in the Liver." *The FASEB Journal* 15 (8): 1404–6. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0487fje>.
- Knowles, B B, C C Howe, and DAVID P. Aden. 1980. "Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen." *Science (New York, N.Y.)* 209 (4455): 497–99. <https://doi.org/10.1126/science.6248960>.
- Kohli, Rohit, Michelle Kirby, Stavra A. Xanthakos, Samir Softic, Ariel E. Feldstein, Vijay Saxena, Peter H. Tang, et al. 2010. "High-Fructose, Medium Chain Trans Fat Diet Induces Liver Fibrosis and Elevates Plasma Coenzyme Q9 in a Novel Murine Model of Obesity and Nonalcoholic Steatohepatitis." *Hepatology* 52 (3): 934–44. <https://doi.org/10.1002/hep.23797>.
- Koike, K, Kyoji Moriya, S Iino, H Yotsuyanagi, Y Endo, T Miyamura, and K Kurokawa. 1994. "High-Level Expression of Hepatitis B Virus HBx Gene and Hepatocarcinogenesis in Transgenic Mice." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 19 (4): 810–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138251>.
- Kortlever, Roderik M., Nicole M. Sodik, Catherine H. Wilson, Deborah L. Burkhart, Luca Pellegrinet, Lamorna Brown Swigart, Trevor D. Littlewood, and Gerard I. Evan. 2017. "Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression." *Cell* 171 (6): 1301-1315.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.013>.
- Krajisnik, Tijana, Peyman Björklund, Richard Marsell, Osten Ljunggren, Göran Akerström, Kenneth B Jonsson, Gunnar Westin, and Tobias E Larsson. 2007. "Fibroblast Growth Factor-23 Regulates Parathyroid Hormone and 1 $\alpha$ -Hydroxylase Expression in Cultured Bovine Parathyroid Cells." *The Journal of Endocrinology* 195 (1): 125–31. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0267>.
- Kubes, Paul, and Wajahat Z. Mehal. 2012. "Sterile Inflammation in the Liver." *Gastroenterology* 143 (5): 1158–72. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.008>.
- Kudo, Masatoshi, Richard S Finn, Shukui Qin, Kwang-Hyub Han, Kenji Ikeda, Fabio Piscaglia, Ari Baron, et al. 2018. "Lenvatinib versus Sorafenib in First-Line Treatment of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial." *Lancet (London, England)* 391 (10126): 1163–73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30207-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30207-1).
- Kurosu, Hiroshi, Mihwa Choi, Yasushi Ogawa, Addie S. Dickson, Regina Goetz, Anna V. Eliseenkova, Moosa Mohammadi, Kevin P. Rosenblatt, Steven A. Kliewer, and Makoto Kuro-O. 2007. "Tissue-Specific Expression of Bklotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21." *Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 26687–95.



<https://doi.org/10.1074/jbc.M704165200>.

- Kwon, Hellan K., Joel K. Greenson, and Hari S. Conjeevaram. 2014. "Effect of Lifetime Alcohol Consumption on the Histological Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Liver International* 34 (1): 129–35. <https://doi.org/10.1111/liv.12230>.
- La Coste, A de, B Romagnolo, P Billuart, C A Renard, M A Buendia, O Soubrane, M Fabre, et al. 1998. "Somatic Mutations of the Beta-Catenin Gene Are Frequent in Mouse and Human Hepatocellular Carcinomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15): 8847–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8847>.
- Lambertz, Jessica, Sabine Weiskirchen, Silvano Landert, and Ralf Weiskirchen. 2017. "Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease." *Frontiers in Immunology* 8 (SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01159>.
- Lang, H, G C Sotiropoulos, M Dömland, N R Frühauf, A Paul, J Hüsing, M Malagó, and C E Broelsch. 2005. "Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma in Non-Cirrhotic Liver without Underlying Viral Hepatitis." *The British Journal of Surgery* 92 (2): 198–202. <https://doi.org/10.1002/bjs.4763>.
- Latasa, Maria U., Fabiana Salis, Raquel Urtasun, Oihane Garcia-Irigoyen, Maria Elizalde, Iker Uriarte, Monica Santamaria, et al. 2012. "Regulation of Amphiregulin Gene Expression by  $\beta$ -Catenin Signaling in Human Hepatocellular Carcinoma Cells: A Novel Crosstalk between FGF19 and the EGFR System." *PLoS ONE* 7 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052711>.
- Lechel, André, Henne Holstege, Yvonne Begus, Andrea Schienke, Kenji Kamino, Ulrich Lehmann, Stefan Kubicka, Peter Schirmacher, Jos Jonkers, and K. Lenhard Rudolph. 2007. "Telomerase Deletion Limits Progression of P53-Mutant Hepatocellular Carcinoma With Short Telomeres in Chronic Liver Disease." *Gastroenterology* 132 (4): 1465–75. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.045>.
- Lee, Dong Ho, Jeong Min Lee, Jae Young Lee, Se Hyung Kim, Jung Hwan Yoon, Yoon Jun Kim, Joon Koo Han, and Byung Ihn Choi. 2014. "Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma as First-Line Treatment: Long-Term Results and Prognostic Factors in 162 Patients with Cirrhosis." *Radiology* 270 (3): 900–909. <https://doi.org/10.1148/radiol.13130940>.
- Lee, Susie A, Coral Ho, Ritu Roy, Cynthia Kosinski, Mohini A Patil, Aaron D Tward, Jane Fridlyand, and Xin Chen. 2007. "Integration of Genomic Analysis and in Vivo Transfection to Identify Sprouty 2 as a Candidate Tumor Suppressor in Liver Cancer." *Hepatology* 47 (4): 1200–1210. <https://doi.org/10.1002/hep.22169>.
- Lee, Susie A, Sara Ladu, Matthias Evert, Frank Dombrowski, Valentina De Murtas, Xin Chen, and Diego F Calvisi. 2010. "Synergistic Role of Sprouty2 Inactivation and C-Met up-Regulation in Mouse and Human Hepatocarcinogenesis." *Hepatology* 52 (2): 506–17. <https://doi.org/10.1002/hep.23681>.
- Lerat, Hervé, Masao Honda, Michael R. Beard, Kim Loesch, Jiaren Sun, Yan Yang, Michiari Okuda, et al. 2002. "Steatosis and Liver Cancer in Transgenic Mice Expressing the Structural and Nonstructural Proteins of Hepatitis C Virus." *Gastroenterology* 122 (2): 352–65. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.31001>.
- Letouzé, Eric, Jayendra Shinde, Victor Renault, Gabrielle Couchy, Jean-Frédéric Blanc, Emmanuel Tubacher, Quentin Bayard, et al. 2017. "Mutational Signatures Reveal the Dynamic Interplay of Risk Factors and Cellular Processes during Liver Tumorigenesis." *Nature Communications* 8 (1): 1315. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01358-x>.
- Levero, Massimo, Teresa Pollicino, Jorg Petersen, Laura Belloni, Giovanni Raimondo, and Maura



- Dandri. 2009. "Control of CccDNA Function in Hepatitis B Virus Infection." *Journal of Hepatology* 51 (3): 581–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022>.
- Levero, Massimo, and Jessica Zucman-Rossi. 2016. "Mechanisms of HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Hepatology* 64 (1 Suppl): S84–101. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.021>.
- Li, Ai Jun, Yutaka Oomura, Tetsuro Hori, Shuji Aou, Kazuo Sasaki, Hiroshi Kimura, and Ikuo Tooyama. 1996. "Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in the Lateral Hypothalamic Area Regulates Food Intake." *Experimental Neurology* 137 (2): 318–23. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0032>.
- Li, Xiao Lei, Jun Yan Liu, Rong Lu, Qiong Xu, Zhi Feng Zhu, Li Wang, Chun Lei Zhou, Jing Jia, Zheng Fu, and Zhi Yao. 2008. "Evaluation of the Therapeutic Efficacy of Tripeptide Tyrosyleutide (YSL) for Human Hepatocarcinoma by in Vivo Hollow Fiber Assay." *Investigational New Drugs* 26 (6): 525–29. <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9121-8>.
- Li, Yuanhao, De Chao Yu, Yu Chen, Pinky Amin, Hong Zhang, Natalie Nguyen, and Daniel R. Henderson. 2001. "A Hepatocellular Carcinoma-Specific Adenovirus Variant, CV890, Eliminates Distant Human Liver Tumors in Combination with Doxorubicin." *Cancer Research* 61 (17): 6428–36.
- Liao, Peng, Shelya X Zeng, Xiang Zhou, Giannino Del Sal, Shiwen Luo, Hua Lu, Peng Liao, et al. 2017. "Mutant P53 Gains Its Function via C-Myc Activation upon CDK4 Phosphorylation at Serine 249 and Article Mutant P53 Gains Its Function via c-Myc Activation upon CDK4 Phosphorylation at Serine 249 and Consequent PIN1 Binding." *Molecular Cell* 68 (6): 1134-1146.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.006>.
- Lin, Su, Jiaofeng Huang, Mingfang Wang, Rahul Kumar, Yuxiu Liu, Shiyang Liu, Yinlian Wu, Xiaozhong Wang, and Yueyong Zhu. 2020. "Comparison of MAFLD and NAFLD Diagnostic Criteria in Real World." *Liver International* 40 (9): 2082–89. <https://doi.org/10.1111/liv.14548>.
- Lin, Zhuo, Shi Hao Xu, Hai Qing Wang, Yi Jing Cai, Li Ying, Mei Song, Yu Qun Wang, Shan Jie Du, Ke Qing Shi, and Meng Tao Zhou. 2016. "Prognostic Value of DNA Repair Based Stratification of Hepatocellular Carcinoma." *Scientific Reports* 6: 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep25999>.
- Liu, F, Y Song, and D Liu. 1999. "Hydrodynamics-Based Transfection in Animals by Systemic Administration of Plasmid DNA." *Gene Therapy* 6 (7): 1258–66. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300947>.
- Liu, Jacey J, Yanjie Li, Wendy S Chen, Yan Liang, Gaowei Wang, Min Zong, Kota Kaneko, Ruiyun Xu, Michael Karin, and Gen Sheng Feng. 2018. "Shp2 Deletion in Hepatocytes Suppresses Hepatocarcinogenesis Driven by Oncogenic  $\beta$ -Catenin, PIK3CA and MET." *Journal of Hepatology* 69 (1): 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.014>.
- Liu, Shunmei, Genevieve Marcelin, Clemence Blouet, Jae Hoon Jeong, Young Hwan Jo, Gary J. Schwartz, and Streamson Chua. 2018. "A Gut–Brain Axis Regulating Glucose Metabolism Mediated by Bile Acids and Competitive Fibroblast Growth Factor Actions at the Hypothalamus." *Molecular Metabolism* 8 (December 2017): 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.003>.
- Liu, Y. L., G. L. Patman, J. B.S. Leathart, A. C. Piguet, A. D. Burt, J. F. Dufour, C. P. Day, A. K. Daly, H. L. Reeves, and Q. M. Anstee. 2014. "Carriage of the PNPLA3 Rs738409 C >g Polymorphism Confers an Increased Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Associated Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Hepatology* 61 (1): 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.02.030>.
- Liu, Yan, and Felicia Wu. 2010. "Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment." *Environmental Health Perspectives* 118 (6): 818–24. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901388>.

- Liu, Yongzhen, Xuewei Qi, Zhenzhen Zeng, Lu Wang, Jie Wang, Ting Zhang, Qiang Xu, et al. 2017. "CRISPR/Cas9-Mediated P53 and Pten Dual Mutation Accelerates Hepatocarcinogenesis in Adult Hepatitis B Virus Transgenic Mice." *Scientific Reports* 7 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03070-8>.
- Llovet, Josep M, Sergio Ricci, Vincenzo Mazzaferro, Philip Hilgard, Edward Gane, Jean-Frédéric Blanc, Andre Cosme de Oliveira, et al. 2008. "Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma." *The New England Journal of Medicine* 359 (4): 378–90. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708857>.
- Ludwig, J, T R Viggiano, D B McGill, and B J Oh. 1980. "Nonalcoholic Steatohepatitis: Mayo Clinic Experiences with a Hitherto Unnamed Disease." *Mayo Clinic Proceedings* 55 (7): 434–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7382552>.
- Lundåsen, T., C. Gälman, B. Angelin, and M. Rudling. 2006. "Circulating Intestinal Fibroblast Growth Factor 19 Has a Pronounced Diurnal Variation and Modulates Hepatic Bile Acid Synthesis in Man." *Journal of Internal Medicine* 260 (6): 530–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01731.x>.
- Luukkonen, Panu K., You Zhou, Tuulia Hyötyläinen, Marja Leivonen, Johanna Arola, Marju Orho-Melander, Matej Orešič, and Hannele Yki-Järvinen. 2016. "The MBOAT7 Variant Rs641738 Alters Hepatic Phosphatidylinositols and Increases Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Humans." *Journal of Hepatology* 65 (6): 1263–65. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.045>.
- Ma, Chi, Aparna H. Kesarwala, Tobias Eggert, José Medina-Echeverz, David E. Kleiner, Ping Jin, David F. Stronck, et al. 2016. "NAFLD Causes Selective CD4+ T Lymphocyte Loss and Promotes Hepatocarcinogenesis." *Nature* 531 (7593): 253–57. <https://doi.org/10.1038/nature16969>.
- Maeda, Takahiro, Hiroaki Kanzaki, Tetsuhiro Chiba, Junjie Ao, Kengo Kanayama, Susumu Maruta, Yuko Kusakabe, et al. 2019. "Serum Fibroblast Growth Factor 19 Serves as a Potential Novel Biomarker for Hepatocellular Carcinoma." *BMC Cancer* 19 (1): 1088. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6322-9>.
- Magee, P.N. 1971. "Toxicity of Nitrosamines: Their Possible Human Health Hazards." *Food and Cosmetics Toxicology* 9 (2): 207–18. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(71\)90306-3](https://doi.org/10.1016/0015-6264(71)90306-3).
- Makishima, M, A Y Okamoto, J J Repa, H Tu, R M Learned, A Luk, M V Hull, K D Lustig, D J Mangelsdorf, and B Shan. 1999. "Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids." *Science (New York, N.Y.)* 284 (5418): 1362–65. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1362>.
- Mancina, Rosellina Margherita, Paola Dongiovanni, Salvatore Petta, Piero Pingitore, Marica Meroni, Raffaella Rametta, Jan Borén, et al. 2016. "The MBOAT7-TMC4 Variant Rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent." *Gastroenterology* 150 (5): 1219-1230.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.032>.
- Marcelin, Geneviève, Young Hwan Jo, Xiaosong Li, Gary J. Schwartz, Ying Zhang, Nae J. Dun, Rong Ming Lyu, Clémence Blouet, Jaw K. Chang, and Streamson Chua. 2014. "Central Action of FGF19 Reduces Hypothalamic AGRP/NPY Neuron Activity and Improves Glucose Metabolism." *Molecular Metabolism* 3 (1): 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.002>.
- Marchesini, Giulio, Christopher P. Day, Jean Francois Dufour, Ali Canbay, Valerio Nobili, Vlad Ratziu, Herbert Tilg, et al. 2016. "EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 64 (6): 1388–1402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>.
- Maronpot, Robert R. 2009. "Biological Basis of Differential Susceptibility to Hepatocarcinogenesis among Mouse Strains." *Journal of Toxicologic Pathology* 22 (1): 11–33. <https://doi.org/10.1293/tox.22.11>.

- Massafra, Vittoria, Alexandra Milona, Harmjan R. Vos, Boudewijn M.T. Burgering, and Saskia W.C. Van Mil. 2017. "Quantitative Liver Proteomics Identifies FGF19 Targets That Couple Metabolism and Proliferation." *PLoS ONE* 12 (2): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171185>.
- Mayo, Marlyn J., Alan J. Wigg, Barbara A. Leggett, Hays Arnold, Alexander J. Thompson, Martin Weltman, Elizabeth J. Carey, et al. 2018. "NGM 282 for Treatment of Patients With Primary Biliary Cholangitis: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ." *Hepatology Communications* 2 (9): 1037–50. <https://doi.org/10.1002/hep4.1209>.
- Mazzaferro, Vincenzo, Carlo Sposito, Jian Zhou, Antonio D. Pinna, Luciano De Carlis, Jia Fan, Matteo Cescon, et al. 2018. "Metroticket 2.0 Model for Analysis of Competing Risks of Death After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 154 (1): 128–39. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.09.025>.
- McGivern, D R, and S M Lemon. 2011. "Virus-Specific Mechanisms of Carcinogenesis in Hepatitis C Virus Associated Liver Cancer." *Oncogene* 30 (17): 1969–83. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.594>.
- McGlynn, Katherine A., Kent Hunter, Thomas LeVoyer, Jessica Roush, Philip Wise, Rita A. Michielli, Fu Min Shen, Alison A. Evans, W. Thomas London, and Kenneth H. Buetow. 2003. "Susceptibility to Aflatoxin B1-Related Primary Hepatocellular Carcinoma in Mice and Humans." *Cancer Research* 63 (15): 4594–4601.
- Miao, Ji, Zhen Xiao, Deepthi Kanamaluru, Gyesik Min, Peter M. Yau, Timothy D. Veenstra, Ewa Ellis, et al. 2009. "Bile Acid Signaling Pathways Increase Stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by Inhibiting Ubiquitin-Proteasomal Degradation." *Genes and Development* 23 (8): 986–96. <https://doi.org/10.1101/gad.1773909>.
- Miura, Seiki, Noboru Mitsuhashi, Hiroaki Shimizu, Fumio Kimura, Hiroyuki Yoshidome, Masayuki Otsuka, Atsushi Kato, Takashi Shida, Daiki Okamura, and Masaru Miyazaki. 2012. "Fibroblast Growth Factor 19 Expression Correlates with Tumor Progression and Poorer Prognosis of Hepatocellular Carcinoma." *BMC Cancer* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-56>.
- Molina-Sánchez, Pedro, Marina Ruiz de Galarreta, Melissa A. Yao, Katherine E. Lindblad, Erin Bresnahan, Elizabeth Bitterman, Tiphaine C. Martin, et al. 2020. "Cooperation Between Distinct Cancer Driver Genes Underlies Intertumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology*, August. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.015>.
- Moreau, Marie, Benjamin Rivièrè, Serena Vegna, Manar Aoun, Christopher Gard, Jeanne Ramos, Eric Assenat, and Urszula Hibner. 2015a. "Hepatitis C Viral Proteins Perturb Metabolic Liver Zonation." *Journal of Hepatology* 62 (2): 278–85. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.09.004>.
- . 2015b. "Hepatitis C Viral Proteins Perturb Metabolic Liver Zonation." *Journal of Hepatology* 62 (2): 278–85. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.09.004>.
- Morton, Christopher L, and Peter J Houghton. 2007. "Establishment of Human Tumor Xenografts in Immunodeficient Mice." *Nature Protocols* 2 (2): 247–50. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.25>.
- Nabi, Oumarou, Karine Lacombe, Jérôme Boursier, Philippe Mathurin, Marie Zins, and Lawrence Serfaty. 2020. "Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: The French Nationwide NASH-CO Study." *Gastroenterology* 159 (2): 791-793.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.048>.
- Nakagawa, Hayato, Atsushi Umemura, Koji Taniguchi, Joan Font-Burgada, Debanjan Dhar, Hisanobu Ogata, Zhenyu Zhong, et al. 2014. "ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development." *Cancer Cell* 26 (3): 331–43.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.001>.

- Naugler, Willscott E., Toshiharu Sakurai, Sunhwa Kim, Shin Maeda, Kyoung Hyun Kim, Ahmed M. Elsharkawy, and Michael Karin. 2007. "Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production." *Science* 317 (5834): 121–24. <https://doi.org/10.1126/science.1140485>.
- Nault, Jean-Charles, Shalini Datta, Sandrine Imbeaud, Andrea Franconi, Maxime Mallet, Gabrielle Couchy, Eric Letouzé, et al. 2015. "Recurrent AAV2-Related Insertional Mutagenesis in Human Hepatocellular Carcinomas." *Nature Genetics* 47 (10): 1187–93. <https://doi.org/10.1038/ng.3389>.
- Nault, Jean Charles, Maxime Mallet, Camilla Pilati, Julien Calderaro, Paulette Bioulac-Sage, Christophe Laurent, Alexis Laurent, et al. 2013. "High Frequency of Telomerase Reverse-Transcriptase Promoter Somatic Mutations in Hepatocellular Carcinoma and Preneoplastic Lesions." *Nature Communications* 4: 2218. <https://doi.org/10.1038/ncomms3218>.
- Nault, Jean Charles, Massih Ningarhari, Sandra Rebouissou, and Jessica Zucman-Rossi. 2019. "The Role of Telomeres and Telomerase in Cirrhosis and Liver Cancer." *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 16 (9): 544–58. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0165-3>.
- Nejak-Bowen, Kari N, Michael D Thompson, Sucha Singh, William C Bowen, Mohd Jamal Dar, Jaspal Khillan, Chunsun Dai, and Satdarshan P S Monga. 2010. "Accelerated Liver Regeneration and Hepatocarcinogenesis in Mice Overexpressing Serine-45 Mutant Beta-Catenin." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (5): 1603–13. <https://doi.org/10.1002/hep.23538>.
- Nevens, Frederik, Pietro Andreone, Giuseppe Mazzella, Simone I Strasser, Christopher Bowlus, Pietro Invernizzi, Joost P H Drenth, et al. 2016. "A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis." *The New England Journal of Medicine* 375 (7): 631–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509840>.
- Nevzorova, Yulia A., Zoe Boyer-Diaz, Francisco Javier Cubero, and Jordi Gracia-Sancho. 2020. "Animal Models for Liver Disease – A Practical Approach for Translational Research." *Journal of Hepatology* 73 (2): 423–40. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.011>.
- Nicholes, Katrina, Susan Guillet, Elizabeth Tomlinson, Kenneth Hillan, Barbara Wright, Gretchen D Frantz, Thinh A Pham, et al. 2002. "A Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma: Ectopic Expression of Fibroblast Growth Factor 19 in Skeletal Muscle of Transgenic Mice." *American Journal of Pathology* 160 (6): 2295–2307. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61177-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61177-7).
- Nishimura, Tetsuya, Yukari Utsunomiya, Masamitsu Hoshikawa, Hideyo Ohuchi, and Nobuyuki Itoh. 1999. "Structure and Expression of a Novel Human FGF, FGF-19, Expressed in the Fetal Brain." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1444 (1): 148–51. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00255-3).
- Ohlfest, John R., Joel L. Frandsen, Sabine Fritz, Paul D. Lobitz, Scott G. Perkinson, Karl J. Clark, Gary Nelsestuen, et al. 2005. "Phenotypic Correction and Long-Term Expression of Factor VIII in Hemophilic Mice by Immunotolerization and Nonviral Gene Transfer Using the Sleeping Beauty Transposon System." *Blood* 105 (7): 2691–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3496>.
- Ornitz, David M., and Nobuyuki Itoh. 2015. "The Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4 (3): 215–66. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>.
- Ouyang, Xiaosen, Pietro Cirillo, Yuri Sautin, Shannon McCall, James L. Bruchette, Anna Mae Diehl, Richard J. Johnson, and Manal F. Abdelmalek. 2008. "Fructose Consumption as a Risk Factor for

- Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 48 (6): 993–99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.02.011>.
- Pai, Rama, Debra Dunlap, Jing Qing, Iman Mohtashemi, Kathy Hotzel, and Dorothy M. French. 2008. "Inhibition of Fibroblast Growth Factor 19 Reduces Tumor Growth by Modulating  $\beta$ -Catenin Signaling." *Cancer Research* 68 (13): 5086–95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2325>.
- Park, Eek Joong, Jun Hee Lee, Guann Yi Yu, Guobin He, Syed Raza Ali, Ryan G. Holzer, Christoph H. Österreicher, Hiroyuki Takahashi, and Michael Karin. 2010. "Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression." *Cell* 140 (2): 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.052>.
- Patil, Mohini A, Susie A Lee, Everardo Macias, Ernest T Lam, Chuanrui Xu, Kirkd Jones, Coral Ho, Marcelo Rodriguez-Puebla, and Xin Chen. 2009. "Role of Cyclin D1 as a Mediator of C-Met- and B-Catenin-Induced Hepatocarcinogenesis." *Cancer Research* 69 (1): 253–61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2514>.
- Perla, Francesco, Maurizia Prelati, Michela Lavorato, Daniele Visicchio, and Caterina Anania. 2017. "The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Children* 4 (6): 46. <https://doi.org/10.3390/children4060046>.
- Perry, Rachel J., Sangwon Lee, Lie Ma, Dongyan Zhang, Joseph Schlessinger, and Gerald I. Shulman. 2015. "FGF1 and FGF19 Reverse Diabetes by Suppression of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis." *Nature Communications* 6: 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7980>.
- Perugorria, Maria J, Paula Olaizola, Ibone Labiano, Aitor Esparza-Baquer, Marco Marzioni, Jose J G Marin, Luis Bujanda, and Jesus M Banales. 2019. "Wnt- $\beta$ -Catenin Signalling in Liver Development, Health and Disease." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (2): 121–36. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0075-9>.
- Petrelli, Annalisa, Andrea Perra, Davide Cora, Pia Sulas, Silvia Menegon, Claudia Manca, Cristina Migliore, et al. 2014. "MicroRNA/Gene Profiling Unveils Early Molecular Changes and Nuclear Factor Erythroid Related Factor 2 (NRF2) Activation in a Rat Model Recapitulating Human Hepatocellular Carcinoma (HCC)." *Hepatology* 59 (1): 228–41. <https://doi.org/10.1002/hep.26616>.
- Peverill, William, Lawrie W. Powell, and Richard Skoien. 2014. "Evolving Concepts in the Pathogenesis of NASH: Beyond Steatosis and Inflammation." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (5): 8591–8638. <https://doi.org/10.3390/ijms15058591>.
- Pols, Thijs W H, Mitsunori Nomura, Taoufiq Harach, Giuseppe Lo Sasso, Maaïke H. Oosterveer, Charles Thomas, Giovanni Rizzo, et al. 2011. "TGR5 Activation Inhibits Atherosclerosis by Reducing Macrophage Inflammation and Lipid Loading." *Cell Metabolism* 14 (6): 747–57. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.006>.
- Pols, Thijs W H, Lilia G. Noriega, Mitsunori Nomura, Johan Auwerx, and Kristina Schoonjans. 2011. "The Bile Acid Membrane Receptor TGR5 as an Emerging Target in Metabolism and Inflammation." *Journal of Hepatology* 54 (6): 1263–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.004>.
- Potthoff, Matthew J., Jamie Boney-Montoya, Mihwa Choi, Tianteng He, Nishanth E. Sunny, Santhosh Satapati, Kelly Suino-Powell, et al. 2011a. "FGF15/19 Regulates Hepatic Glucose Metabolism by Inhibiting the CREB-PGC-1 $\alpha$  Pathway." *Cell Metabolism* 13 (6): 729–38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.019>.
- . 2011b. "FGF15/19 Regulates Hepatic Glucose Metabolism by Inhibiting the CREB-PGC-1 $\alpha$  Pathway." *Cell Metabolism* 13 (6): 729–38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.019>.



- Potthoff, Matthew J., Takeshi Inagaki, Santhosh Satapati, Xunshan Ding, Tianteng He, Regina Goetz, Moosa Mohammadi, et al. 2009. "FGF21 Induces PGC-1 $\alpha$  and Regulates Carbohydrate and Fatty Acid Metabolism during the Adaptive Starvation Response." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (26): 10853–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904187106>.
- Puigvehí, Marc, Carlos Moctezuma-Velázquez, Augusto Villanueva, and Josep M. Llovet. 2019. "The Oncogenic Role of Hepatitis Delta Virus in Hepatocellular Carcinoma." *JHEP Reports* 1 (2): 120–30. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.05.001>.
- Qi, Lu-Nan, Tao Bai, Zu-Shun Chen, Fei-Xiang Wu, Yuan-Yuan Chen, Bang-De Xiang, Tao Peng, Ze-Guang Han, and Le-Qun Li. 2015. "The P53 Mutation Spectrum in Hepatocellular Carcinoma from Guangxi, China: Role of Chronic Hepatitis B Virus Infection and Aflatoxin B1 Exposure." *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 35 (3): 999–1009. <https://doi.org/10.1111/liv.12460>.
- Qi, Yanting, Xiaona Chen, Chu Yan Chan, Dan Li, Chonggang Yuan, Fei Yu, Marie C. Lin, David T. Yew, Hsiang Fu Kung, and Lihui Lai. 2008. "Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis/Analysis of Diethylnitrosamine Induced Rat Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Cancer* 122 (12): 2682–88. <https://doi.org/10.1002/ijc.23464>.
- Qiao, Yu, Jingxiao Wang, Eylul Karagoz, Binyong Liang, Xinhua Song, Runze Shang, Katja Evert, et al. 2019. "Axis Inhibition Protein 1 (Axin1) Deletion-Induced Hepatocarcinogenesis Requires Intact  $\beta$ -Catenin but Not Notch Cascade in Mice." *Hepatology* 70 (6): 2003–17. <https://doi.org/10.1002/hep.30556>.
- Rakhra, Kavya, Pavan Bachireddy, Tahera Zabuawala, Robert Zeiser, Liwen Xu, Andrew Kopelman, Alice C. Fan, et al. 2010. "CD4+ T Cells Contribute to the Remodeling of the Microenvironment Required for Sustained Tumor Regression upon Oncogene Inactivation." *Cancer Cell* 18 (5): 485–98. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.002>.
- Rebouissou, Sandra, and Jean Charles Nault. 2020. "Advances in Molecular Classification and Precision Oncology in Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Hepatology* 72 (2): 215–29. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.017>.
- Reiberger, Thomas, Yunching Chen, Rakesh R. Ramjiawan, Tai Hato, Christopher Fan, Rekha Samuel, Sylvie Roberge, et al. 2015. "An Orthotopic Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma with Underlying Liver Cirrhosis." *Nature Protocols* 10 (8): 1264–74. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.080>.
- Reid, D. T., J. L. Reyes, B. A. McDonald, T. Vo, R. A. Reimer, and B. Eksteen. 2016. "Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation." *PLoS ONE* 11 (7): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159524>.
- Rinella, Mary E., and Richard M. Green. 2004. "The Methionine-Choline Deficient Dietary Model of Steatohepatitis Does Not Exhibit Insulin Resistance." *Journal of Hepatology* 40 (1): 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.09.020>.
- Ruiz de Galarreta, Marina, Erin Bresnahan, Pedro Molina-Sanchez, Katherine E Lindblad, Barbara Maier, Daniela Sia, Marc Puigvehí, et al. 2019. " $\beta$ -Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Discovery*, CD-19-0074. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-19-0074>.
- Rushing, Blake R., and Mustafa I. Selim. 2019. "Aflatoxin B1: A Review on Metabolism, Toxicity, Occurrence in Food, Occupational Exposure, and Detoxification Methods." *Food and Chemical*



*Toxicology* 124: 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>.

- Ryan, Karen K., Rohit Kohli, Ruth Gutierrez-Aguilar, Shrawan G. Gaitonde, Stephen C. Woods, and Randy J. Seeley. 2013. "Fibroblast Growth Factor-19 Action in the Brain Reduces Food Intake and Body Weight and Improves Glucose Tolerance in Male Rats." *Endocrinology* 154 (1): 9–15. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1891>.
- Samuels, Leo T., Richard C. Gilmore, and Roger M. Reinecke. 1948. "The Effect of Previous Diet on the Ability of Animals to Do Work During Subsequent Fasting." *The Journal of Nutrition* 36 (5): 639–51. <https://doi.org/10.1093/jn/36.5.639>.
- Santoni-Rugiu, Eric, Peter Nagy, Michael R. Jensen, Valentina M. Factor, and Snorri S. Thorgeirsson. 1996. "Evolution of Neoplastic Development in the Liver of Transgenic Mice Co- Expressing c-Myc and Transforming Growth Factor- $\alpha$ ." *American Journal of Pathology* 149 (2): 407–28.
- Satoh, S, Y Daigo, Y Furukawa, T Kato, N Miwa, T Nishiwaki, T Kawasoe, et al. 2000. "AXIN1 Mutations in Hepatocellular Carcinomas, and Growth Suppression in Cancer Cells by Virus-Mediated Transfer of AXIN1." *Nature Genetics* 24 (3): 245–50. <https://doi.org/10.1038/73448>.
- Sawey, Eric T., Maia Chanrion, Chunlin Cai, Guanming Wu, Jianping Zhang, Lars Zender, Alice Zhao, et al. 2011a. "Identification of a Therapeutic Strategy Targeting Amplified FGF19 in Liver Cancer by Oncogenomic Screening." *Cancer Cell* 19 (3): 347–58. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.040>.
- Sawey, Eric T, Maia Chanrion, Chunlin Cai, Guanming Wu, Jianping Zhang, Lars Zender, Alice Zhao, et al. 2011b. "Identification of a Therapeutic Strategy Targeting Amplified FGF19 in Liver Cancer by Oncogenomic Screening." *Cancer Cell* 19 (3): 347–58. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.040>.
- . 2011c. "Identification of a Therapeutic Strategy Targeting Amplified FGF19 Supplement." *Cancer Cell* 19 (3): 347–58. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000210>.
- Sayin, Sama I., Annika Wahlström, Jenny Felin, Sirkku Jäntti, Hanns Ulrich Marschall, Krister Bamberg, Bo Angelin, Tuulia Hyötyläinen, Matej Orešič, and Fredrik Bäckhed. 2013. "Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-Beta-Muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist." *Cell Metabolism* 17 (2): 225–35. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.003>.
- Schaap, Frank G., Niels A. van der Gaag, Dirk J. Gouma, and Peter L.M. Jansen. 2009. "High Expression of the Bile Salt-Homeostatic Hormone Fibroblast Growth Factor 19 in the Liver of Patients with Extrahepatic Cholestasis." *Hepatology* 49 (4): 1228–35. <https://doi.org/10.1002/hep.22771>.
- Schaffner, F, and H Thaler. 1986. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Progress in Liver Diseases* 8: 283–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3086934>.
- Schlaeger, Christof, Thomas Longerich, Claudia Schiller, Peter Bewerunge, Arianeb Mehrabi, Grisca Toedt, Jörg Kleeff, et al. 2008. "Etiology-Dependent Molecular Mechanisms in Human Hepatocarcinogenesis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (2): 511–20. <https://doi.org/10.1002/hep.22033>.
- Schmidt, Benjamin, Lan Wei, Danielle K DePeralta, Yujin Hoshida, Poh Seng Tan, Xiaochen Sun, Janelle P Sventek, Michael Lanuti, Kenneth K Tanabe, and Bryan C Fuchs. 2016. "Molecular Subclasses of Hepatocellular Carcinoma Predict Sensitivity to Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibition." *International Journal of Cancer* 138 (6): 1494–1505. <https://doi.org/10.1002/ijc.29893>.
- Schulze, Kornelius, Sandrine Imbeaud, Eric Letouzé, Ludmil B Alexandrov, Julien Calderaro, Sandra Rebouissou, Gabrielle Couchy, et al. 2015. "Exome Sequencing of Hepatocellular Carcinomas Identifies New Mutational Signatures and Potential Therapeutic Targets." *Nature Genetics* 47 (5): 505–11. <https://doi.org/10.1038/ng.3252>.

- Schumacher, J D, B Kong, Y Pan, L Zhan, R Sun, J Aa, D Rizzolo, et al. 2017. "The Effect of Fibroblast Growth Factor 15 Deficiency on the Development of High Fat Diet Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Toxicology and Applied Pharmacology* 330: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.023>.
- Seitz, Helmut K, and Felix Stickel. 2007. "Molecular Mechanisms of Alcohol-Mediated Carcinogenesis." *Nature Reviews. Cancer* 7 (8): 599–612. <https://doi.org/10.1038/nrc2191>.
- Seto, Wai Kay, Ying Ru Lo, Jean Michel Pawlotsky, and Man Fung Yuen. 2018. "Chronic Hepatitis B Virus Infection." *The Lancet* 392 (10161): 2313–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31865-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31865-8).
- Shachaf, Catherine M., Andrew M. Kopelman, Constadlna Arvanitis, Åsa Karlsson, Shelly Beer, Stefanie Mandl, Michael H. Bachmann, et al. 2004. "MYC Inactivation Uncovers Pluripotent Differentiation and Tumour Dormancy in Hepatocellular Cancer." *Nature* 431 (7012): 1112–17. <https://doi.org/10.1038/nature03043>.
- Shimosato, Yukio, Toru Kameya, Kanji Nagai, Setsuo Hirohashi, Tsutomu Koide, Hiroatsu Hayashi, and Tatsuji Nomura. 1976. "Transplantation of Human Tumors in Nude Mice<sup>23</sup>." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 56 (6): 1251–60. <https://doi.org/10.1093/jnci/56.6.1251>.
- Simonin, Yannick, Serena Vegna, Leila Akkari, Damien Grégoire, Etienne Antoine, Jacques Piette, Nicolas Floc'h, et al. 2013. "Lymphotoxin Signaling Is Initiated by the Viral Polymerase in HCV-Linked Tumorigenesis." *PLoS Pathogens* 9 (3): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003234>.
- Song, Chun Qing, Yingxiang Li, Haiwei Mou, Jill Moore, Angela Park, Yotsawat Pomyen, Soren Hough, et al. 2017. "Genome-Wide CRISPR Screen Identifies Regulators of Mitogen-Activated Protein Kinase as Suppressors of Liver Tumors in Mice." *Gastroenterology* 152 (5): 1161-1173.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.002>.
- Song, Kwang Hoon, Tiangang Li, Erika Owsley, Stephen Strom, and John Y.L. Chiang. 2009. "Bile Acids Activate Fibroblast Growth Factor 19 Signaling in Human Hepatocytes to Inhibit Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene Expression." *Hepatology* 49 (1): 297–305. <https://doi.org/10.1002/hep.22627>.
- Song, Parkyong, Christoph Zechner, Genaro Hernandez, José Cánovas, Yang Xie, Varun Sondhi, Martin Wagner, et al. 2018. "The Hormone FGF21 Stimulates Water Drinking in Response to Ketogenic Diet and Alcohol." *Cell Metabolism* 27 (6): 1338-1347.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.001>.
- Spearman, C Wendy, Geoffrey M Dusheiko, Margaret Hellard, and Mark Sonderup. 2019. "Hepatitis C." *The Lancet* 394 (10207): 1451–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32320-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32320-7).
- Stauffer, Jimmy K., Anthony J. Scarzello, Jesper B. Andersen, Rachel L. De Kluiver, Timothy C. Back, Jonathan M. Weiss, Snorri S. Thorgeirsson, and Robert H. Wiltrot. 2011. "Coactivation of AKT and  $\beta$ -Catenin in Mice Rapidly Induces Formation of Lipogenic Liver Tumors." *Cancer Research* 71 (7): 2718–27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2705>.
- Sung, Wing-Kin, Hancheng Zheng, Shuyu Li, Ronghua Chen, Xiao Liu, Yingrui Li, Nikki P Lee, et al. 2012. "Genome-Wide Survey of Recurrent HBV Integration in Hepatocellular Carcinoma." *Nature Genetics* 44 (7): 765–69. <https://doi.org/10.1038/ng.2295>.
- Suzuki, Masashi, Yuriko Uehara, Kaori Motomura-Matsuzaka, Junko Oki, Yoshinori Koyama, Miho Kimura, Masahiro Asada, Akiko Komi-Kuramochi, Syuichi Oka, and Toru Imamura. 2008. "Bklotho Is Required for Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 Signaling through FGF Receptor (FGFR) 1c and FGFR3c." *Molecular Endocrinology* 22 (4): 1006–14. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0313>.
- Swann, Jonathan R., Elizabeth J. Want, Florian M. Geier, Konstantina Spagou, Ian D. Wilson, James E.

- Sidaway, Jeremy K. Nicholson, and Elaine Holmes. 2011. "Systemic Gut Microbial Modulation of Bile Acid Metabolism in Host Tissue Compartments." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (SUPPL. 1): 4523–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006734107>.
- Tabibian, James H., Anatoliy I. Masyuk, Tetyana V. Masyuk, Steven P. O'Hara, and Nicholas F. LaRusso. 2013. "Physiology of Cholangiocytes." *Comprehensive Physiology* 3 (1): 541–65. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120019>.
- Taguchi, Keiko, Hozumi Motohashi, and Masayuki Yamamoto. 2011. "Molecular Mechanisms of the Keap1-Nrf2 Pathway in Stress Response and Cancer Evolution." *Genes to Cells* 16 (2): 123–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>.
- Tanaka, Satoshi, Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Ryotaro Sakamori, Yasutoshi Nozaki, Sadatsugu Sakane, Yuto Shiode, et al. 2016. "Rubicon Inhibits Autophagy and Accelerates Hepatocyte Apoptosis and Lipid Accumulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice." *Hepatology* 64 (6): 1994–2014. <https://doi.org/10.1002/hep.28820>.
- Tanaka, Shingo, Koji Miyanishi, Masayoshi Kobune, Yutaka Kawano, Toshifumi Hoki, Tomohiro Kubo, Tsuyoshi Hayashi, et al. 2013. "Increased Hepatic Oxidative DNA Damage in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis Who Develop Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Gastroenterology* 48 (11): 1249–58. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0739-0>.
- Taniguchi, Koji, Shinichiro Yamachika, Feng He, and Michael Karin. 2016. "P62/SQSTM1—Dr. Jekyll and Mr. Hyde That Prevents Oxidative Stress but Promotes Liver Cancer." *FEBS Letters* 590: 2375–97. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12301>.
- Tao, Junyan, Emily Xu, Yifei Zhao, Sucha Singh, Xiaolei Li, Gabrielle Couchy, Xin Chen, Jessica Zucman-Rossi, Maria Chikina, and Satdarshan P.S. Monga. 2016. "Modeling a Human Hepatocellular Carcinoma Subset in Mice through Coexpression of Met and Point-Mutant  $\beta$ -Catenin." *Hepatology* 64 (5): 1587–1605. <https://doi.org/10.1002/hep.28601>.
- Tateishi, Ryosuke, Takeshi Okanoue, Naoto Fujiwara, Kiwamu Okita, Kendo Kiyosawa, Masao Omata, Hiromitsu Kumada, Norio Hayashi, and Kazuhiko Koike. 2015. "Clinical Characteristics, Treatment, and Prognosis of Non-B, Non-C Hepatocellular Carcinoma: A Large Retrospective Multicenter Cohort Study." *Journal of Gastroenterology* 50 (3): 350–60. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0973-8>.
- Terradillos, Olivier, Olivier Billet, Claire Angélique Renard, Rafael Levy, Thierry Molina, Pascale Briand, and Marie Annick Buendia. 1997. "The Hepatitis B Virus X Gene Potentiates C-Myc-Induced Liver Oncogenesis in Transgenic Mice." *Oncogene* 14 (4): 395–404. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200850>.
- Teschke, Rolf. 2018. "Alcoholic Liver Disease: Alcohol Metabolism, Cascade of Molecular Mechanisms, Cellular Targets, and Clinical Aspects." *Biomedicines* 6 (4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines6040106>.
- Teufel, Andreas, Timo Itzel, Wiebke Erhart, Mario Brosch, Xiao Yu Wang, Yong Ook Kim, Witigo von Schönfels, et al. 2016. "Comparison of Gene Expression Patterns Between Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Tissues From Patients." *Gastroenterology* 151 (3): 513–25.e0. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.051>.
- Tilg, Herbert, and Alexander R. Moschen. 2010. "Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis." *Hepatology* 52 (5): 1836–46. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>.

- Tomlinson, Elizabeth, Ling Fu, Linu John, Bruce Hultgren, Xiaojian Huang, Mark Renz, Jean Philippe Stephan, et al. 2002. "Transgenic Mice Expressing Human Fibroblast Growth Factor-19 Display Increased Metabolic Rate and Decreased Adiposity." *Endocrinology* 143 (5): 1741–47. <https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8850>.
- Totoki, Yasushi, Kenji Tatsuno, Kyle R. Covington, Hiroki Ueda, Chad J. Creighton, Mamoru Kato, Shingo Tsuji, et al. 2014. "Trans-Ancestry Mutational Landscape of Hepatocellular Carcinoma Genomes." *Nature Genetics* 46 (12): 1267–73. <https://doi.org/10.1038/ng.3126>.
- Tsuchida, Takuma, Youngmin A Lee, Naoto Fujiwara, Maria Ybanez, Brittany Allen, Sebastiao Martins, M Isabel Fiel, et al. 2018. "A Simple Diet- and Chemical-Induced Murine NASH Model with Rapid Progression of Steatohepatitis, Fibrosis and Liver Cancer." *Journal of Hepatology* 69 (2): 385–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.011>.
- Turner, Tod, Xian Chen, Matthew Zahner, Alan Opsahl, George DeMarco, Magalie Boucher, Bryan Goodwin, and Mylène Perreault. 2018. "FGF21 Increases Water Intake, Urine Output and Blood Pressure in Rats." *PLoS ONE* 13 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202182>.
- Tward, Aaron D., Kirk D. Jones, Stephen Yant, Tim Cheung Siu, Tat Fan Sheung, Xin Chen, Mark A. Kay, Rong Wang, and J. Michael Bishop. 2007. "Distinct Pathways of Genomic Progression to Benign and Malignant Tumors of the Liver." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (37): 14771–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706578104>.
- Ubel, Peter a., Christopher Jepson, Jonathan Baron, Tara Mohr, Stacey McMorrow, and David a. Asch. 2001. "Allocation of Transplantable Organs: Do People Want to Punish Patients for Causing Their Illness?" *Liver Transplantation* 7 (7): 600–607. <https://doi.org/10.1053/jlts.2001.25361>.
- Umemura, Atsushi, Feng He, Koji Taniguchi, Hayato Nakagawa, Shinichiro Yamachika, Joan Font-Burgada, Zhenyu Zhong, et al. 2016. "P62, Upregulated during Preneoplasia, Induces Hepatocellular Carcinogenesis by Maintaining Survival of Stressed HCC-Initiating Cells." *Cancer Cell* 29 (6): 935–48. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.006>.
- Uriarte, Iker, M. Ujue Latasa, Simone Carotti, Maite G. Fernandez-Barrena, Oihane Garcia-Irigoyen, Maria Elizalde, Raquel Urtasun, et al. 2015. "Ileal FGF15 Contributes to Fibrosis-Associated Hepatocellular Carcinoma Development." *International Journal of Cancer* 136 (10): 2469–75. <https://doi.org/10.1002/ijc.29287>.
- Vegna, Serena, Damien Gregoire, Marie Moreau, Patrice Lassus, David Durantel, Eric Assenat, Urszula Hibner, and Yannick Simonin. 2016. "NOD1 Participates in the Innate Immune Response Triggered by Hepatitis C Virus Polymerase." *Journal of Virology* 90 (13): 6022–35. <https://doi.org/10.1128/jvi.03230-15>.
- Viatour, Patrick, Ursula Ehmer, Louis A. Saddic, Craig Dorrell, Jesper B. Andersen, Chenwei Lin, Anne Flore Zmoos, et al. 2011. "Notch Signaling Inhibits Hepatocellular Carcinoma Following Inactivation of the RB Pathway." *Journal of Experimental Medicine* 208 (10): 1963–76. <https://doi.org/10.1084/jem.20110198>.
- Vigdal, Thomas J, Christopher D Kaufman, Zsuzsanna Izsvák, Daniel F Voytas, and Zoltán Ivics. 2002. "Common Physical Properties of DNA Affecting Target Site Selection of Sleeping Beauty and Other Tc1/Mariner Transposable Elements." *Journal of Molecular Biology* 323 (3): 441–52. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00991-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00991-9).
- Vilar-Gomez, Eduardo, Luis Calzadilla-Bertot, Vincent Wai-Sun Wong, Marlen Castellanos, Rocio Aller-de la Fuente, Mayada Metwally, Mohammed Eslam, et al. 2018. "Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study." *Gastroenterology* 155 (2): 443-457.e17.

- <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.034>.
- Villanueva, Augusto. 2019. "Hepatocellular Carcinoma." Edited by Dan L. Longo. *New England Journal of Medicine* 380 (15): 1450–62. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1713263>.
- Wang, C., C. Yang, J.Y.F. Chang, P. You, Y. Li, C. Jin, Y. Luo, X. Li, W.L. McKeegan, and F. Wang. 2014. "Hepatocyte FRS2<sup>945</sup>; Is Essential for the Endocrine Fibroblast Growth Factor to Limit the Amplitude of Bile Acid Production Induced by Prandial Activity." *Current Molecular Medicine* 14 (6): 703–11. <https://doi.org/10.2174/1566524014666140724095112>.
- Wang, Chunmei, Salvatore Delogu, Coral Ho, Susie A. Lee, Bing Gui, Lijie Jiang, Sara Ladu, et al. 2012. "Inactivation of Spry2 Accelerates AKT-Driven Hepatocarcinogenesis via Activation of MAPK and PKM2 Pathways." *Journal of Hepatology* 57 (3): 577–83. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.026>.
- Wang, Fang, Wei Hou, Lennox Chitsike, Yingchen Xu, Carlee Bettler, Aldeb Perera, Thomas Bank, et al. 2020. "ABL1, Overexpressed in Hepatocellular Carcinomas, Regulates Expression of NOTCH1 and Promotes Development of Liver Tumors in Mice." *Gastroenterology* 159 (1): 289-305.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.013>.
- Wang, H B, J Chen, K Hollister, L C Sowers, and B M Forman. 1999. "Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR BAR." *Molecular Cell* 3 (5): 543–53.
- Wang, Huai, Peng Liao, Shelya X Zeng, and Hua Lu. 2019. "It Takes a Team: A Gain-of-Function Story of P53-R249S." *Journal of Molecular Cell Biology* 11 (4): 277–83. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy086>.
- Wang, Kai, Ho Yeong Lim, Stephanie Shi, Jeeyun Lee, Shibing Deng, Tao Xie, Zhou Zhu, et al. 2013. "Genomic Landscape of Copy Number Aberrations Enables the Identification of Oncogenic Drivers in Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology* 58 (2): 706–17. <https://doi.org/10.1002/hep.26402>.
- Wang, Wenhui, Qiuwei Pan, Gwenny M Fuhler, Ron Smits, and Maikel P Peppelenbosch. 2017. "Action and Function of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Progression from Chronic Hepatitis C to Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Gastroenterology* 52 (4): 419–31. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1299-5>.
- Watanabe, Sumio, Yasuo Horie, Ei Kataoka, Wataru Sato, Takahiro Dohmen, Shigetoshi Ohshima, Takashi Goto, and Akira Suzuki. 2007. "Non-Alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma: Lessons from Hepatocyte-Specific Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)-Deficient Mice." *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 22 (SUPPL. 1): 96–100. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04665.x>.
- Watson, Rebecca E., and Jay I. Goodman. 2002. "Effects of Phenobarbital on DNA Methylation in GC-Rich Regions of Hepatic DNA from Mice That Exhibit Different Levels of Susceptibility to Liver Tumorigenesis." *Toxicological Sciences* 68 (1): 51–58. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.1.51>.
- Wei, Guangyan, Ping An, Kahini A. Vaid, Imad Nasser, Pinzhu Huang, Li Tan, Shuangshuang Zhao, Detlef Schuppan, and Yury V. Popov. 2020. "Comparison of Murine Steatohepatitis Models Identifies a Dietary Intervention with Robust Fibrosis, Ductular Reaction, and Rapid Progression to Cirrhosis and Cancer." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 318 (1): G174–88. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00041.2019>.
- Wilson, C. L., D. Jurk, N. Fullard, P. Banks, A. Page, S. Luli, A. M. Elsharkawy, et al. 2015. "NF $\kappa$ B1 Is a Suppressor of Neutrophil-Driven Hepatocellular Carcinoma." *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7818>.



- Wolf, Monika Julia, Arlind Adili, Kira Piotrowitz, Zeinab Abdullah, Yannick Boege, Kerstin Stemmer, Marc Ringelhan, et al. 2014a. "Metabolic Activation of Intrahepatic CD8+ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes." *Cancer Cell* 26 (4): 549–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>.
- . 2014b. "Metabolic Activation of Intrahepatic CD8+ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes." *Cancer Cell* 26 (4): 549–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>.
- Wong, Robert J., Maria Aguilar, Ramsey Cheung, Ryan B. Perumpail, Stephen A. Harrison, Zobair M. Younossi, and Aijaz Ahmed. 2015. "Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States." *Gastroenterology* 148 (3): 547–55. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.039>.
- Wong, Robert J., Ramsey Cheung, and Aijaz Ahmed. 2014. "Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Growing Indication for Liver Transplantation in Patients with Hepatocellular Carcinoma in the U.S." *Hepatology* 59 (6): 2188–95. <https://doi.org/10.1002/hep.26986>.
- World Health Organization. 2017. "Global Hepatitis Report, 2017."
- Wu, Ai Luen, Sally Coulter, Christopher Liddle, Anne Wong, Jeffrey Eastham-Anderson, Dorothy M. French, Andrew S. Peterson, and Junichiro Sonoda. 2011. "FGF19 Regulates Cell Proliferation, Glucose and Bile Acid Metabolism via FGFR4-Dependent and Independent Pathways." *PLoS ONE* 6 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017868>.
- Wu, Juan, Jiaqi Li, Rosalba Salcedo, Nahid F. Mivechi, Giorgio Trinchieri, and Anatolij Horuzsko. 2012. "The Proinflammatory Myeloid Cell Receptor TREM-1 Controls Kupffer Cell Activation and Development of Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Research* 72 (16): 3977–86. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0938>.
- Wu, Xiaoqin, Kyle L. Poulsen, Carlos Sanz-Garcia, Emily Huang, Megan R. McMullen, Sanjoy Roychowdhury, Srinivasan Dasarathy, and Laura E. Nagy. 2020. "MLKL-Dependent Signaling Regulates Autophagic Flux in a Murine Model of Non-Alcohol-Associated Fatty Liver and Steatohepatitis." *Journal of Hepatology* 73 (3): 616–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.023>.
- Wu, Xinle, Hongfei Ge, Bryan Lemon, Steven Vonderfecht, Jennifer Weiszmann, Randy Hecht, Jamila Gupte, et al. 2010a. "FGF19-Induced Hepatocyte Proliferation Is Mediated through FGFR4 Activation." *Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5165–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068783>.
- . 2010b. "FGF19-Induced Hepatocyte Proliferation Is Mediated through FGFR4 Activation." *Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5165–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068783>.
- Wunsch, Ewa, Malgorzata Milkiewicz, Urszula Wasik, Jocelyn Trottier, Agnieszka Kempialska-Podhorodecka, Elwyn Elias, Olivier Barbier, and Piotr Milkiewicz. 2015. "Expression of Hepatic Fibroblast Growth Factor 19 Is Enhanced in Primary Biliary Cirrhosis and Correlates with Severity of the Disease." *Scientific Reports* 5 (March): 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep13462>.
- Xu, Chuan Rui, Susie Lee, Coral Ho, Prashant Bommi, Shi Ang Huang, Siu Tim Cheung, Goberdhan P Dimri, and Xin Chen. 2009. "Bmi1 Functions as an Oncogene Independent of Ink4a/Arf Repression in Hepatic Carcinogenesis." *Molecular Cancer Research* 7 (12): 1937–45. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0333>.
- Xu, Zhong, Junjie Hu, Hui Cao, Maria G. Pilo, Antonio Cigliano, Zixuan Shao, Meng Xu, et al. 2018. "Loss of Pten Synergizes with C-Met to Promote Hepatocellular Carcinoma Development via MTORC2



- Pathway." *Experimental and Molecular Medicine* 50 (1): e417-10. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.158>.
- Xue, Wen, Sidi Chen, Hao Yin, Tuomas Tammela, Thales Papagiannakopoulos, Nikhil S. Joshi, Wenxin Cai, et al. 2014. "CRISPR-Mediated Direct Mutation of Cancer Genes in the Mouse Liver." *Nature* 514 (7522): 380–84. <https://doi.org/10.1038/nature13589>.
- Yan, Melissa, John Ha, Maria Aguilar, Benny Liu, Catherine T Frenette, Taft Bhuket, and Robert J Wong. 2017. "Older Patients with Hepatocellular Carcinoma Have More Advanced Disease, Lower Rates of Treatment, and Lower Survival." *Journal of Clinical Gastroenterology* 51 (4): 378–83. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000590>.
- Yant, Stephen R., Leonard Meuse, Winnie Chiu, Zoltan Ivics, Zsuzsanna Izsvak, and Mark A. Kay. 2000. "Somatic Integration and Long-Term Transgene Expression in Normal and Haemophilic Mice Using a DNA Transposon System." *Nature Genetics* 25 (1): 35–41. <https://doi.org/10.1038/75568>.
- Yao, Francis Y., Neil Mehta, Jennifer Flemming, Jennifer Dodge, Bilal Hameed, Oren Fix, Ryutaro Hirose, Nicholas Fidelman, Robert K. Kerlan, and John P. Roberts. 2015. "Downstaging of Hepatocellular Cancer before Liver Transplant: Long-Term Outcome Compared to Tumors within Milan Criteria." *Hepatology* 61 (6): 1968–77. <https://doi.org/10.1002/hep.27752>.
- Yao, Z M, and Dennis E Vance. 1988. "The Active Synthesis of Phosphatidylcholine Is Required for Very Low Density Lipoprotein Secretion from Rat Hepatocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 263 (6): 2998–3004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3343237>.
- Yasui, Kohichiroh, Etsuko Hashimoto, Yasuji Komorizono, Kazuhiko Koike, Shigeki Aarii, Yasuharu Imai, Toshihide Shima, et al. 2011. "Characteristics of Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis Who Develop Hepatocellular Carcinoma." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 9 (5): 428–33. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.01.023>.
- Ye, H, C Zhang, B-J Wang, X-H Tan, W-P Zhang, Y Teng, and X. Yang. 2014. "Synergistic Function of Kras Mutation and HBx in Initiation and Progression of Hepatocellular Carcinoma in Mice." *Oncogene* 33 (43): 5133–38. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.468>.
- Younossi, Zobair M., Deirdre Blissett, Robert Blissett, Linda Henry, Maria Stepanova, Youssef Younossi, Andrei Racila, Sharon Hunt, and Rachel Beckerman. 2016. "The Economic and Clinical Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States and Europe." *Hepatology* 64 (5): 1577–86. <https://doi.org/10.1002/hep.28785>.
- Younossi, Zobair M., Aaron B. Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, and Mark Wymer. 2016. "Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes." *Hepatology* 64 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- Yu, Guann Yi, Guobin He, Chia Yang Li, Martin Tang, Sergei Grivennikov, Wan Ting Tsai, Ming Sian Wu, et al. 2012. "Hepatic Expression of HCV RNA-Dependent RNA Polymerase Triggers Innate Immune Signaling and Cytokine Production." *Molecular Cell* 48 (2): 313–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.032>.
- Yuen, Man Fung, Ding Shinn Chen, Geoffrey M. Dusheiko, Harry L.A. Janssen, Daryl T.Y. Lau, Stephen A. Locarnini, Marion G. Peters, and Ching Lung Lai. 2018. "Hepatitis B Virus Infection." *Nature Reviews Disease Primers* 4: 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.35>.
- Zhang, Guofeng, Vladimir Budker, and J A Wolff. 1999. "High Levels of Foreign Gene Expression in Hepatocytes after Tail Vein Injections of Naked Plasmid DNA." *Human Gene Therapy* 10 (10): 1735–37. <https://doi.org/10.1089/10430349950017734>.

- Zhang, Guofeng, Daniel Vargo, Vladimir Budker, Nicholas Armstrong, Stuart Knechtle, and J A Wolff. 1997. "Expression of Naked Plasmid DNA Injected into the Afferent and Efferent Vessels of Rodent and Dog Livers." *Human Gene Therapy* 8 (15): 1763–72. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.15-1763>.
- Zhang, Xiaoyan, Shizheng Huang, Min Gao, Jia Liu, Xiao Jia, Qifei Han, Senfeng Zheng, et al. 2014. "Farnesoid X Receptor (FXR) Gene Deficiency Impairs Urine Concentration in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (6): 2277–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323977111>.
- Zhang, Youcai, Ji Young Hong, Cheryl E. Rockwell, Bryan L. Copple, Hartmut Jaeschke, and Curtis D. Klaassen. 2012. "Effect of Bile Duct Ligation on Bile Acid Composition in Mouse Serum and Liver." *Liver International* 32 (1): 58–69. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02662.x>.
- Zhao, Huakan, Fenglin Lv, Guizhao Liang, Xiaobin Huang, Gang Wu, Wenfa Zhang, Le Yu, Lei Shi, and Yong Teng. 2016. "FGF19 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma Cells by Modulating the GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Signaling Cascade via FGFR4 Activation." *Oncotarget* 7 (12): 13575–86. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6185>.
- Zhao, Ling-Hao, Xiao Liu, He-Xin Yan, Wei-Yang Li, Xi Zeng, Yuan Yang, Jie Zhao, et al. 2016. "Genomic and Oncogenic Preference of HBV Integration in Hepatocellular Carcinoma." *Nature Communications* 7: 12992. <https://doi.org/10.1038/ncomms12992>.
- Zhou, Mei, R. Marc Learned, Stephen J. Rossi, Alex M. DePaoli, Hui Tian, and Lei Ling. 2017. "Engineered FGF19 Eliminates Bile Acid Toxicity and Lipotoxicity Leading to Resolution of Steatohepatitis and Fibrosis in Mice." *Hepatology Communications* 1 (10): 1024–42. <https://doi.org/10.1002/hep4.1108>.
- Zhou, Mei, Jian Luo, Michael Chen, Hong Yang, R. Marc Learned, Alex M. DePaoli, Hui Tian, and Lei Ling. 2017a. "Mouse Species-Specific Control of Hepatocarcinogenesis and Metabolism by FGF19/FGF15." *Journal of Hepatology* 66 (6): 1182–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.027>.
- Zhou, Mei, Jian Luo, Michael Chen, Hong Yang, R. Marc Learned, Alex M. DePaoli, Hui Tian, and Lei Ling. 2017b. "Mouse Species-Specific Control of Hepatocarcinogenesis and Metabolism by FGF19/FGF15." *Journal of Hepatology* 66 (6): 1182–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.027>.
- Zhou, Mei, Xueyan Wang, Van Phung, Darrin A. Lindhout, Kalyani Mondal, Jer Yuan Hsu, Hong Yang, et al. 2014. "Separating Tumorigenicity from Bile Acid Regulatory Activity for Endocrine Hormone FGF19." *Cancer Research* 74 (12): 3306–16. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0208>.
- Zhou, Mei, Hong Yang, R. Marc Learned, Hui Tian, and Lei Ling. 2017. "Non-Cell-Autonomous Activation of IL-6/STAT3 Signaling Mediates FGF19-Driven Hepatocarcinogenesis." *Nature Communications* 8 (May): 1–16. <https://doi.org/10.1038/ncomms15433>.
- Zhu, Andrew X, Yoon-Koo Kang, Chia-Jui Yen, Richard S Finn, Peter R Galle, Josep M Llovet, Eric Assenat, et al. 2019. "Ramucirumab after Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma and Increased  $\alpha$ -Fetoprotein Concentrations (REACH-2): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 20 (2): 282–96. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30937-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30937-9).
- Zhu, Lixin, Susan S. Baker, Chelsea Gill, Wensheng Liu, Razan Alkhouri, Robert D. Baker, and Steven R. Gill. 2013. "Characterization of Gut Microbiomes in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Patients: A Connection between Endogenous Alcohol and NASH." *Hepatology* 57 (2): 601–9. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>.

Zucman-Rossi, Jessica, Augusto Villanueva, Jean Charles Nault, and Josep M. Llovet. 2015. "Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 149 (5): 1226–39. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>.

## VI. Annexes

### A. Papier CDK8

# CDK8 and CDK19 kinases have non-redundant oncogenic functions in hepatocellular carcinoma

Katarina Bacevic <sup>1</sup>, Susana Prieto <sup>2</sup>, Stefano Caruso <sup>3,4</sup>, Alain Camasses <sup>2</sup>, Geronimo Dubra <sup>2</sup>, José Ursic-Bedoya <sup>1,5</sup>, Anthony Lozano <sup>1</sup>, Jacqueline Butterworth <sup>1</sup>, Jessica Zucman-Rossi <sup>3,4,6</sup>, Urszula Hibner <sup>1</sup>, Daniel Fisher <sup>2,\*</sup>✉ and Damien Gregoire <sup>1,\*</sup>✉

1. Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France
2. Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France ; Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer
3. Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Universités, Inserm, UMRS-1138, F-75006 Paris, France
4. Functional Genomics of Solid Tumors, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Labex Immuno-Oncology ; Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, F-75000 Paris, France
5. Department of hepatogastroenterology, Hepatology and Liver Transplantation Unit, Saint Eloi Hospital, University of Montpellier, France
6. European Hospital Georges Pompidou, AP-HP, F-75015, Paris, France

\* Equal contribution

✉ Corresponding authors

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common cancer with high mortality. The limited therapeutic options for advanced disease include treatment with Sorafenib, a multi-kinase inhibitor whose targets include the Mediator kinase CDK8. Since CDK8 has reported oncogenic activity in Wnt-dependent colorectal cancer, we investigated whether it is also involved in HCC. We find that CDK8 and its paralogue CDK19 are significantly overexpressed in HCC patients, where high levels correlate with poor prognosis. Liver-specific genetic deletion of CDK8 in mice is well supported and protects against chemical carcinogenesis. Deletion of either CDK8 or CDK19 in hepatic precursors had little effect on gene expression in exponential cell growth but prevented oncogene-induced transformation. This phenotype was reversed by concomitant deletion of TP53. These data support important and non-redundant roles for mediator kinases in liver carcinogenesis, where they genetically interact with the TP53 tumor suppressor.

## Introduction

The cyclin-dependent kinase CDK8 is the principal catalytic subunit of the Mediator complex kinase module (1). In mice, genetic deletion of CDK8 or its activating subunit, cyclin C, is embryonic lethal (2, 3). Vertebrate genomes encode a second paralogue of CDK8, CDK19, which also binds cyclin C and can replace CDK8 in the kinase module of Mediator (4, 5). CDK8 may act as an oncogene in several tumor types, including melanoma and colorectal cancer (CRC) (6, 7). Amplification of the CDK8 gene was found in 14% of CRC patients, and reversing CDK8 over-expression in CRC cells with amplified CDK8 reduced cell proliferation by interfering with the  $\beta$ -catenin pathway (6, 8). CDK8 was also uncovered in a mouse transposon-mediated mutagenesis screen for genes whose alteration contributes to intestinal cancer (9). However, intestine-specific *Cdk8* deletion in mice failed to confirm an oncogenic role in intestinal tumorigenesis triggered by mutation of the tumor suppressor *Apc* ((10), and our unpublished results).

CDK8 acts as a co-factor of many transcriptional activators and participates in regulating the expression of a large number of genes, including immediate early genes (11–14), targets of  $\beta$ -catenin (6), p53 (15), c-Myc (16), Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) (17, 18), Nuclear-factor kappa B (NF $\kappa$ B) (19) and Notch1 (3, 20). CDK8 expression appears to maintain tumors in an undifferentiated state by regulating c-Myc programmes (16). CDK8 was also identified as a crucial regulator of tumor-promoting activity of senescent cells (21). It is presently unclear how these multiple pathways participate in tumor promotion by CDK8, and whether its paralogue CDK19 has similar roles in tumorigenesis.

Since the oncogenic roles of CDK8 in Wnt-dependent CRC have been well documented in the context of constitutive Wnt signalling, we wondered whether it also has roles in hepatocellular carcinoma (HCC), another tumor type frequently associated with activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling (22). HCC is the main primary liver tumor and one of the most deadly cancers worldwide (23). Mutations in the *CTNNB1* gene, coding for  $\beta$ -catenin, are found in around 30% of patients and are mainly associated with the well differentiated, less aggressive, class of HCC (groups G5 - G6) (22, 24). CDK8 is expressed in the liver, where it may regulate lipogenesis (25). Importantly, lipid accumulation as well as *de novo* lipid biosynthesis and the resulting lipotoxicity lead to hepatic inflammation, constituting major risk factors for liver tumorigenesis (22).



In this study, we show that although CDK8 has a limited role in liver homeostasis both CDK8 and CDK19 paralogues are required for hepatic carcinogenesis in the context of wild-type p53.

## Results

### **CDK8 and CDK19 are highly expressed in p53-mutated hepatocellular carcinoma**

To test whether expression of CDK8 or that of its paralogue CDK19 is altered in hepatic carcinogenesis, we first quantified by qRT-PCR their expression in a large cohort of HCC patients (n=268, [Supplemental Table 1](#)). We found that both CDK8 and CDK19 are significantly overexpressed in HCC tumors compared to non-tumoral counterparts or normal liver ([Figure 1A](#)). Moreover, we detected a correlation between the expression of the two kinases in HCC ([Figure 1B](#)), as previously observed in breast cancer (26). Analysis revealed no correlation with a specific aetiology (alcohol, viral infection, metabolic syndrome). However, there was a highly significant difference in CDK8/19 expression among the HCC subgroups defined by the classification based on clinical and molecular features (24, 27): CDK8 or CDK19 high expressors were enriched in the aggressive G1-G3 subsets as compared to G4-G6 ([Figure 1C](#)). Coherently, high CDK8 or CDK19 expression was correlated with mutant p53 status, molecular prognostic 5-gene score (28) and macroscopic vascular invasion ([Figure 1D, E and F](#)). Finally, high level expression of CDK8 or CDK19 correlated with poor prognosis ([Figure 1G](#)). Thus our data are consistent with an oncogenic role for Mediator kinases in hepatocellular carcinoma.

### **CDK8 is dispensable for liver homeostasis**

To investigate possible roles of the Mediator kinases in liver function and hepatic carcinogenesis, we focused on CDK8. We generated a genetically modified mouse with loxP sites flanking exon 2 of the *Cdk8* gene ([Figure 2A](#)). Crossing these animals with transgenic mice expressing the *Cre* recombinase under the control of the *Albumin* promoter (*Alb-Cre* mice(29)) gives rise to hepatocyte-specific deletion of the essential exon 2, and induces a frameshift that results in a stop codon at position 52, eliminating CDK8 protein in the liver (CDK8<sup>Δhep</sup> animals) ([Figure 2B](#)).

In accordance with the absence of overt phenotype of ubiquitous *Cdk8* deletion in adult animals (10), the liver-specific deletion of CDK8 was compatible with normal liver development and we detected no change in liver physiology at the age of 3 months (Figure 2C). Importantly, the  $\beta$ -catenin-driven metabolic liver zonation was not affected by the CDK8 ablation, as judged by the purely centrilobular expression of glutamine synthetase (Figure 2C). Moreover, we detected no differences in the expression levels of several  $\beta$ -catenin target genes between the control and the CDK8<sup>Δhep</sup> animals (Figure 2C). These results indicate that CDK8 is not required to regulate the  $\beta$ -catenin pathway under normal homeostasis conditions. However, in aging animals (> 6 months) CDK8 deficiency led to increased body weight and higher liver steatosis score (Figure 2D), confirming an involvement of CDK8 in liver lipogenesis (25). Older CDK8<sup>Δhep</sup> animals (12-15 months) did not show any sign of liver tumors (n= 12).

### **CDK8 is required for chemically induced liver carcinogenesis and hepatic cell transformation**

We next used a model of hepatic carcinogenesis in CDK8<sup>Δhep</sup> animals to investigate potential roles of CDK8 in liver cancer. In this model, a single injection of hepatotoxic agent diethylnitrosamine (DEN) to young mice gives rise to liver tumors after 6-8 months (30). We sacrificed DEN-treated animals at 28 weeks, a relatively early time point in the kinetics of tumor formation, to allow detection of both positive and negative changes in tumor burden. As expected, 9 out of 17 (53%) of the control *Cdk8*<sup>F/F</sup> mice had at least one macroscopic liver tumor at sacrifice (Figure 3A). In contrast, only one out of eleven (9%) CDK8<sup>Δhep</sup> animals had developed tumors by this time point. Cell death and regenerative response of the livers shortly after the DEN treatment were both indistinguishable between controls and CDK8<sup>Δhep</sup> mice (Supplemental Figure 1), indicating that CDK8 ablation acted by inhibiting tumorigenesis rather than by interfering with the initial hepatotoxicity of the treatment. Taken together, these data support the hypothesis that CDK8 contributes to chemically-induced liver carcinogenesis in mice.

To investigate whether the effects of CDK8 loss on carcinogenesis were cell autonomous, we next isolated primary hepatic progenitor cells (BMEL) (31) from *Cdk8*<sup>F/F</sup> embryos. Upon stable transfection of Cre, we obtained an efficient deletion of CDK8 from these cells (Figure 3B). CDK8 loss had no effect on BMEL cell morphology

or growth characteristics under standard monolayer culture conditions (Figure 3B). As murine liver tumors triggered by DEN injection are often driven by mutated forms of Ras (30), we used forced expression of an oncogenic form of Ras, H-Ras<sup>G12V</sup>, to investigate effects of CDK8 loss on hepatic cell transformation. Similarly to previous results obtained with independent BMEL cell lines (32), H-Ras<sup>G12V</sup> was sufficient to transform primary *Cdk8*<sup>F/F</sup> BMEL cells, which then efficiently formed colonies in soft agar (Figure 3C). In contrast, CRE-mediated deletion of CDK8 abolished colony formation in this assay (Figure 3C), which is consistent with the protective role of CDK8 deletion in DEN-treated livers. Next, we used a model of tamoxifen-inducible Cre<sup>ERT2</sup> activation. This confirmed the CDK8 requirement for Ras-induced transformation. Strikingly, deletion of CDK8 in cells previously transformed by Ras<sup>G12V</sup> expression reverted their transformed phenotype (Figure 3C). To validate *in vivo* that CDK8 deletion protects hepatic progenitors from Ras-induced transformation, we injected CDK8<sup>F/F</sup> Ras<sup>G12V</sup> or CDK8<sup>-/-</sup> Ras<sup>G12V</sup> BMEL cells into the liver of immunodeficient mice. While the *Cdk8*<sup>F/F</sup> BMEL expressing Ras<sup>G12V</sup> gave rise to orthotopic tumors, their counterparts devoid of CDK8 did not (Figure 3D).

We next disrupted *Cdk8* by CRISPR/Cas9-mediated gene disruption, which confirmed both the absence of apparent phenotype in CDK8-depleted cells and the requirement for CDK8 for cell transformation (Figure 3E). Finally, to exclude that the requirement for CDK8 for transformation is specific for BMEL cells, we disrupted it by CRISPR/Cas9 in a human hepatoblastoma cell line, HepG2. As expected, the cells grew well in the absence of CDK8, but again did not form colonies in soft agar (Figure 3E). Altogether, our results indicate that CDK8 is required for H-Ras<sup>G12V</sup>-driven oncogenic transformation of hepatocytes and of hepatic progenitor cells.

### **CDK8 deletion impairs Ras<sup>G12V</sup>-driven transformation in a p53-dependent manner**

We then investigated possible molecular mechanisms by which CDK8 removal could impair Ras<sup>G12V</sup>-driven transformation. Deletion of CDK8 did not abrogate Ras<sup>G12V</sup>-induced cell shape remodelling or ERK phosphorylation (Supplemental Figure 2A, B), indicating that the kinase is dispensable for Ras pathway activation. Second, constitutive activation of the  $\beta$ -catenin pathway in the BMEL cells did not rescue CDK8 deficiency (Supplemental Figure 2C), indicating that tumor-promoting activity of CDK8 in the liver does not rely on the activation of the  $\beta$ -catenin pathway, which is consistent

with the lack of  $\beta$ -catenin-related phenotype in CDK8<sup>Δhep</sup> livers (Figure 2). Third, CDK8 has been proposed as a regulator of glycolysis (33), and we therefore tested whether CDK8 removal affects the metabolism of BMEL cells. However, analysis of glycolysis (Seahorse Glycolysis stress test) and mitochondrial respiration (Seahorse Mito stress test) did not reveal any effect of CDK8 ablation (Supplemental Figure 3), indicating that this regulation is not present in hepatic progenitor cells and that it does not account for the failure of CDK8-mutant cells to grow in soft agar.

Since CDK8 overexpression in patients correlates with mutant p53 status, we next considered the possibility that CDK8 acts by modulating p53 function. Although CDK8 can act as a coactivator of the p53 transcriptional program (34), we observed that removal of CDK8 rather increases the level of p53 protein (Figure 4A), suggesting that CDK8 might restrain the tumor-suppressive functions of p53 in hepatic cells. In agreement with this idea, soft agar tests showed that the requirement for CDK8 in Ras-induced transformation was abrogated by p53 inactivation via CRISPR/Cas9 editing (Figure 4B). Furthermore, depletion of CDK8 did not prevent transformation of the p53-deficient Huh7 cell line (Supplemental Figure 4). To extend these results to an *in vivo* setting, we triggered tumorigenesis via hydrodynamic gene delivery (HGD) (35) of the activated form of Ras together with CRISPR/Cas9-mediated inactivation of endogenous p53. HGD with Ras alone did not generate tumors, as previously described (36), whereas simultaneous transfection with N-Ras<sup>G12D</sup> and CRISPR-p53 gave rise to multiple aggressive tumors within 4 weeks (Figure 4C). Consistent with the results of the cellular models, this combination of oncogenic stimuli was also fully efficient in CDK8<sup>Δhep</sup> animals, whose hepatocytes are devoid of CDK8 (Figure 4C). Cell lines derived from CDK8<sup>F/F</sup> or CDK8<sup>-/-</sup> HGD-tumors were equally capable of giving rise to tumors when injected orthotopically into immunocompetent mice (Figure 4D). Our results suggest that CDK8 is required for initiation of tumorigenesis by counteracting p53 function.

### **Both CDK8 and CDK19 are required for Ras<sup>G12V</sup>-driven transformation**

An interesting inference from the above results is that CDK19, whose expression is preserved in CDK8-deleted cells (Figure 5A), is insufficient to compensate for loss of CDK8, despite its high homology and redundant roles in Mediator. Furthermore, both CDK8 and CDK19 are overexpressed in a significant number of HCC patients. We therefore wondered whether CDK19 is also required for

Ras-induced tumorigenesis. To test this, we deleted CDK19 in BMEL cells by CRISPR-Cas9 editing. The resulting mutant cells had unaltered morphology and proliferation kinetics (Figure 5A). Interestingly, CDK19 removal caused a significant upregulation of CDK8 protein levels, but not of mRNA levels, indicating a posttranscriptional feedback regulation of CDK8 in the absence of CDK19 (Figure 5A).

Similarly to CDK8 deletion, CDK19 ablation prevented the acquisition of the transformed phenotype upon ectopic expression of the oncogenic form of Ras, as judged by the lack of anchorage-independent growth (Figure 5B). Again, we obtained similar results upon CDK19 deletion in human HepG2 cells (Supplemental Figure 4). Thus, both CDK8 and CDK19 are required for Ras-driven transformation of primary hepatic progenitors, neither paralogue being able to compensate for the absence of the other.

As CDK8 and CDK19 constitute the only members of the CDK module regulating transcriptional activity of the mediator complex, one hypothesis to account for the requirement of simultaneous presence of both kinases is that they control different subsets of target genes, both of which are needed for transformation by H-Ras<sup>G12V</sup>. To test this hypothesis, we analyzed gene expression profiles of the Ras-expressing BMEL cells in the presence or absence of CDK8 or CDK19 by RNA-seq (Figure 5C). Surprisingly, disruption of either CDK8 or CDK19 had only minor effects on gene expression, with only around 30 genes reproducibly showing more than 2-fold differences in expression between cells expressing Ras<sup>G12V</sup> with or without deletion of *Cdk8* or *Cdk19*. At this threshold of fold-change, we did not identify common genes deregulated by the absence of either kinase (Figure 5D). However, even though neither CDK8<sup>-/-</sup> nor CDK19<sup>-/-</sup> cells can be transformed by the oncogenic form of Ras, Ras<sup>G12V</sup> caused deregulation of over 1000 genes, irrespective of the status of *Cdk8* and *Cdk19* when growing in exponential culture, explaining their indistinguishable morphology. This result further shows that, despite the importance of Mediator for gene regulation, neither CDK8 nor CDK19 are required for implementing wide-ranging changes to gene expression, suggesting that their effects in carcinogenesis, which involve p53, are not due to major transcriptional changes.

## Discussion

Combining patient data and mouse models, we provide evidence that both Mediator kinases, CDK8 and CDK19, are involved in hepatocellular carcinoma. Our

data indicate that these CDKs are required for initiation of tumorigenesis induced by mutation of a strong oncogene, *Ras*. To our knowledge, this is the first indication that the CDK8 paralogue CDK19 is required for cell transformation, indicating non-redundant functions for both kinases in facilitating tumorigenesis.

We find that removal of CDK8 in hepatocytes has no major consequences for liver functions, as previously indicated by the ubiquitous inactivation of the kinase in adult animals (10). However, we observed that CDK8 depletion induces steatosis in aging animals, in accordance with a role for the kinase as repressor of lipogenesis (25). In contrast to its mild effects on liver physiology, CDK8 disruption has a strong impact on hepatic carcinogenesis. We observed a major reduction of chemically induced tumorigenesis, and a complete protection from *Ras*-induced cell transformation. This requirement is further highlighted by the fact that CDK8 ablation occurring after *Ras*<sup>G12V</sup>-induced transformation is able to restore the non-transformed phenotype.

CDK8 thus apparently has diverse context-specific involvement in various cancers. CDK8 was initially described to have oncogenic properties in Wnt-dependent colorectal cancers, where it controls the beta-catenin pathway (6, 8) and maintains *Myc* functions (37). However, this was not confirmed genetically in mouse models; indeed, if anything, CDK8 knockout marginally increased progression from early lesions to tumors (10). A recent study also found no effect of CDK8 knockdown on growth of colorectal tumors in syngeneic mice, but it prevented liver metastases (38). Furthermore, CDK8 promotes proliferation of melanoma cell lines (7) and is apparently required for efficient Estrogen Receptor (ER)-dependent transcription in ER-positive breast cancer cells (39). However, most reports of anti-tumor activity caused by interfering with CDK8 function have used kinase inhibitors (39–45) that target both CDK8 and CDK19. The most likely explanation for this is that CDK inhibitors are rarely very specific for one kinase subfamily (46) and some “CDK8/19 inhibitors” may inhibit other kinases required for efficient tumor development. This highlights the need for a genetic approach *in vivo*.

Other studies have suggested that as well as possessing oncogenic activity in some contexts, CDK8 may rather have tumor-suppressive activity in others, including endometrial cancers (47), intestinal cancer (10) and T-cell acute lymphoblastic leukemia (3).



One way of reconciling these apparently different roles for Mediator kinases is to invoke possible tissue-specificity of action. We found that CDK8 deletion has no effect on hepatic cell growth, contrary to certain melanoma or gastric cancer cell lines, in which decrease of proliferation has been described (7, 48). Tissue specificity is further demonstrated by the fact that while knockout of either kinase is well tolerated by hepatic precursor cells, germline-deletion of the *Cdk8* gene in mice is lethal at pre-implantation embryonic stages (2). Our results suggest that oncogenic activities of CDK8 and CDK19 in HCC are independent of the  $\beta$ -catenin pathway, and therefore likely operate through different mechanisms in colorectal and hepatic carcinogenesis. One key finding of our study is that both CDK8 and CDK19 are required for cell transformation by H-Ras<sup>G12V</sup>. This is not due to downregulation of one kinase when the other one is removed, as, on the contrary, we found that CDK19 depletion stabilizes CDK8 protein, identifying a post transcriptional regulation of CDK8 levels. Of note, this cross-regulation is not bidirectional, as removal of CDK8 does not seem to stabilize CDK19 protein. A possible explanation for these results might be that CDK8 and CDK19 regulate transcription of specific gene sets that are both required for hepatic cell transformation. The results of our RNA-seq analysis renders this hypothesis unlikely, as very few genes are differentially transcribed in either knockout. However, we cannot exclude this entirely, as 12 genes were differentially regulated in knockouts of both *Cdk8* and *Cdk19* when the threshold for fold-change is removed: *Adora1*, *Nt5e*, *Fgfbp1*, *Spp1*, *Gm5781*, *Lgals4*, *Rpl10-ps3*, *Akap12*, *Gm8349*, *Anxa10*, *Scd1*, *Ly6a*. Yet the magnitude of the gene expression change is likely too low to be biologically meaningful; the regulation of several, including *Anxa10* (encoding Annexin 10A), *Akap12* (encoding A Kinase Anchoring Protein-12) and *Nt5e* (encoding 5' nucleotidase) is in opposite directions in each knockout; and no clear roles in cancer for any of these genes have been reported. A possibility that we cannot exclude at this stage is that both CDK8 and CDK19 are required for transcription or repression of genes whose expression is only activated upon growth in foci. However, the minimal effects of deletion of either gene in shaping the transcriptome induced by expression of oncogenic Ras suggests that neither kinase is required to implement large-scale changes to gene expression, and that non-transcriptome effects should be considered.

We suggest an alternative model, which is compatible with both apparent oncogenic activity of Mediator kinases in some circumstances and lack of effects in others. In this model, CDK8/19 are not in themselves oncogenes and therefore their

overexpression does not transform cells, but rather provides a favorable terrain enabling the initiation of tumorigenesis by additional oncogenic factors, including *bona fide* oncogenes. For example, it is well established that, rather than transforming cells directly, expression of strong oncogenes such as Ras<sup>G12V</sup> promotes premature cell senescence with accumulation of p53 and p16 (49). BMEL cells are immortal, but have a functional wild-type p53 (50). In this context CDK8/19 expression may attenuate the function of p53, thus unleashing the oncogenic potential of mutant Ras. We speculate that loss of p53 by mutation “fixes” the initial advantage conferred by overexpression of CDK8/19. This agrees both with our finding that in the liver, CDK8/19 are only required for cell transformation in the presence, but not the absence, of p53, and with the genetic interaction between *CDK8/19* and *TP53* in patients. If such a scenario was indeed true, it would suggest a therapeutic niche for CDK8/19 kinase inhibitors in cancer: they would be expected to trigger differentiation or death of tumor cells that have not yet acquired p53 mutations. Our results warrant further investigation of CDK8/19 inhibitors as therapeutic agents for p53-positive hepatocellular carcinoma.

## Material and Methods

### Patients

A total of 268 fresh-frozen tissue samples of HCC, associated with various etiologies, were included in this study. Patients and tumor features were already described in previously published studies and summarized in Supplemental Table 1. Written informed consent was obtained from all subjects in accordance with French legislation.

*CDK18* and *CDK19* mRNA expression levels were assessed by quantitative RT-PCR using Fluidigm 96.96 Dynamic Arrays and specific TaqMan predesigned assays (CDK8= Hs00176209\_m1; CDK19= Hs00292369\_m1; Life Technologies, Carlsbad, CA). Data were calibrated with the RNA ribosomal 18S and changes in mRNA expression levels were determined using a comparative CT method using 5 normal tissue samples as control.

### Mice experiments

All reported animal procedures were carried out in accordance with the rules of the French Institutional Animal Care and Use Committee and European Community Council (2010/63/EU). Animal studies were approved by institutional ethical committee (Comité d'éthique en expérimentation animale Languedoc-Roussillon (#36)) and by the Ministère de

l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (D. Gregoire: APAFIS#11196-2018090515538313v2).

Cdk8<sup>F/F</sup> mice were generated as following: An 8076 bp genomic fragment (mouse chromosome 5: 146,254,503 to 146,262,579) enclosing the essential exon 2 (whose deletion results in loss of the essential catalytic lysine residue and causes a frameshift truncating over 90% of the protein) of the CDK8 gene was amplified by PCR from genomic DNA of 129/Sv embryonic stem cells and cloned into pGEM-T-easy. The diphtheria toxin A gene was cloned into the SacII site. 64 bp to the 3' of exon 2, the sequence CTCTAT was mutated to CTCGAG, generating an XhoI site. LoxP sites flanking exon 2 were generated by a combination of conventional cloning and recombineering, using an approach published in Liu et al., Genome Res. 2003 Mar;13(3):476-84. The loxP PGK-Neo cassette was amplified from pL452 plasmid with flanking AvrII/HindIII sites at each end and cloned into the AvrII site upstream of exon 2. Fragment orientation was confirmed by the generation of 3.5 kb HindII and 2.0 kb NheI sites, and the vector was recombined in *E.coli* strain SW106 with inducible Cre recombinase expression followed by HindII digestion, generating a single loxP site upstream of exon 2. Into this recombined vector, the FRT-PGK-Neo-FRT-LoxP cassette (amplified from pL451 with flanking XhoI sites) was cloned in the newly generated XhoI site downstream of exon 2, resulting in the "deletion construct". The orientation was confirmed by the generation of 2.2 kb NheI and 3.4 kb BamHI sites. Functionality of the two recombination sites was tested as follows: the FRT site was confirmed by recombination in *E.coli* strain SW105 with inducible FlpE recombinase expression, deleting the FRT-Neo cassette and generating a 1.4 kb BamHI fragment; and the resulting plasmid was transformed in *E.coli* strain SW106 with inducible Cre recombinase expression, deleting exon 2 and resulting in a 1.1 kb BamHI fragment. The NotI linearized fragment of the deletion construct was transfected by electroporation into 129/Sv embryonic stem cells. 244 Neomycin-resistant colonies were genotyped by PCR and Southern blotting. Two probes were used: one outside the 3' end of the deletion construct, with HindIII digestion giving a single 9kb fragment for the WT and a 7kb fragment for the correctly-integrated deletion cassette, and one to the 5' end of the deletion cassette, again giving the same 9kb fragment for the WT but a 3.5 kb fragment for the deletion cassette. 10 colonies showed a correct integration by homologous recombination. These ES cells were injected into blastocysts obtained from pregnant Balb/c mice, and chimeric mice were crossed with C57/Bl6J mice constitutively expressing FlpE recombinase, removing the FRT-Neo cassette. Agouti mice were genotyped by PCR, showing correct insertion of the loxP sites around exon 2. Alb-Cre mice were described previously (29).

Allografts: Athymic Nude mice (*Hsd:Athymic Nude-Foxn1<sup>nu</sup>*, Envigo) or CDK8<sup>F/F</sup> mice were anesthetized with intra-peritoneal injection of Xylazine-Ketamine mixture. After incision of abdominal wall and peritoneum, the left lateral lobe of the liver was pulled out of the mouse

body. 50000 cells, resuspended in 5  $\mu$ L of 25% Matrigel (BD) - PBS, were injected using a 10 $\mu$ L Hamilton syringe in the left lobe of the liver. After injection, liver was put back in normal position and the abdomen was sutured. Tumors were allowed to grow out for 4 weeks, then collected and fixed following classical procedures.

DEN induced carcinogenesis: Diethylnitrosamine (DEN) (30 mg/kg) was injected intraperitoneally in 14 days old male mice. Mice were sacrificed and livers collected after a period of 8 months.

Hydrodynamic Gene Delivery: Hydrodynamic injections were performed in 6-8 week-old female mice as described previously (35). Briefly, 0.1 mL/g of a solution of sterile saline (0.9% NaCl) containing plasmids of interest were injected into lateral tail vein in 8-10 s. LentiCRISPRv2-sgTp53 (12.5  $\mu$ g) and pT3-EF1a-N-RAS<sup>G12D</sup>-GFP (12.5  $\mu$ g) were injected together with sleeping beauty transposase SB100X (2.5  $\mu$ g, ratio of 5:1). pCMV(CAT)T7-SB100 was a gift from Zsuzsanna Izsvak (Addgene plasmid # 34879).

## Cell lines

BMEL (Bipotential Mouse Embryonic Liver) cell line was isolated from CDK8<sup>F/F</sup> mouse. Cells were grown on collagen-coated plates in RPMI medium (Gibco/Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (Pan-Biotech), insulin 10  $\mu$ g/mL (Sigma), IGFII 30 ng/mL (Peprotech), EGF 50 ng/mL (Peprotech), 100 units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. Other cell lines used, HepG2, Huh7, and HEK293T, were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM–high glucose, pyruvate, GlutaMAX–Gibco® LifeTechnologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Pan-Biotech). Cells were grown under standard conditions at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub>. All cells were routinely tested to confirm absence of mycoplasma contamination.

## Generation of cell lines

pMSCV retroviral vectors (Clontech) encoding CRE recombinase, tamoxifen-inducible CRE-ERT2 (addgene plasmid #22776) or human H-Ras<sup>G12V</sup> were used to generate stable BMEL cell lines. For induction of CRE-ERT2 activity, 4-OH tamoxifen was added to culture medium at a concentration of 2  $\mu$ M for two weeks. CRISPR subgenomic RNA (sgRNA) targeting murine or human Cdk8, Cdk19 or Trp53 (CDK8 Mouse: 5'-ATCCCTGTGCAACACCCAGT-3'. CDK8\_Human 5'-CGAGGACCTGTTTGAATACG-3' CDK19\_Mouse: 5'-AAAGTGGGACGCGGCACCTA-3', CDK19\_Human, 5'-ATTATGCAGAGCATGACTTG-3' Trp53 5'-ATAAGCCTGAAAATGTCTCC-3' ; all sequences from Zhang lab database) were cloned as synthetic dsDNA into lentiCRISPRv2 vector as described (51) (provided by F. Zhang, Addgene plasmid #52961). Generation of lentiviral particles and infection of BMEL,

Huh7 or HepG2 cells were carried out following classical procedures, and described previously (52). Successfully infected cells were selected with puromycin (2 µg/mL) or hygromycin (150 µg/mL) during 48h. Cell lines were further propagated and transgene expression or effects of targeted deletions verified by Western blot. Polyclonal cell lines were used for all subsequent experiments.

### **Soft agar**

10<sup>5</sup> cells for each cell line were mixed with medium supplemented with 0.5% agarose and placed on top of the 1% agarose layer. 1 mL medium was added to the solidified layer and changed every 2-3 days. After 4 to 6 weeks, soft agar was stained with crystal violet 0,005% in 4% PFA for 1h. Colonies visible to the naked eye were counted manually.

### **Immunohistochemistry**

Livers were fixed for 24 h in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4 µm and stained with haematoxylin-eosin safran (HES) or subjected to immunohistochemical staining. Immunohistochemistry staining of GS (BD Transduction Laboratories, 610517, 1:200) and CDK8 (Santa Cruz, sc-1521, 1:400) were performed using classical procedures, with antigen retrieval in citrate buffer, and biotinylated secondary antibody coupled to streptavidin–peroxidase complex (ABC Vectastain kit; Vector Laboratories). Slides were digitally processed using the Nanozoomer scanner (Hamamatsu).

### **Protein isolation and Western blotting**

Protein lysates of cells or tissues were prepared with lysis buffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.5, 0.2% Triton, 1mM EDTA; freshly added 1mM DTT and protease inhibitors cocktail (Roche)) and incubated on ice for 30 min. Samples were centrifuged for 10 min at 13000rpm and supernatant collected. Protein concentrations were determined by BCA protein assay (Pierce Biotechnology). All the samples were mixed 1:1 with Laemmli buffer and heated at 95°C for 5 min. Equal amounts of proteins were separated by SDS–PAGE (Biorad; usually 12% gels). Proteins were transferred onto PVDF membranes (Milipore). Red ponceau or amidoblack staining was done to check transfer efficiency and equal amount of protein loading. Primary antibodies used were: Cdk8 (Santa Cruz #sc1521, dilution 1:1000); Cdk19 (Abcam, dilution 1:1000); p53 (Cell signalling #2524 1:1000), Actin (Sigma A1978, 1:20000), Tubulin (DSHB, 1:400). Antibodies were diluted in 5% BSA in TBS-Tween and incubated overnight at 4°C. Secondary antibodies were either anti-goat IgG-HRP or anti-mouse antibodies IgG-HRP (Jackson immunoresearch). Band intensities were calculated using imageJ Lane Analysis.

## RNA isolation, qPCR and RNA-Seq analysis

The RNA was extracted from either cells or liver tissue and purified using RNeasy mini kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Reverse transcription of total RNA (1 µg) was done with QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen), and cDNA quantified using LC Fast start DNA Master SYBR Green I Mix (Roche) with primers detailed below on LightCycler480 apparatus (Roche). Gene expression levels were normalized with hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT). Primer pairs used for qPCR: Cdk8 5'-GAATTTCTATGTCGGCATGCAG-3' and 5'-ATAGTCAAAGAGAAGCCATACTTTCC-3', Glul 5'-TAGCTGTACAAAGCGGGTGTA-3' and 5'-AGTGGAAATGTCAATCTCAGCC-3', Axin2 5'-ACCGGTCACAGGATGTC-3' and 5'-GACTCCAATGGGTAGCTCTTTC-3', c-myc 5'-CCGAGTGCATTGACCCCTCA-3' and 5'-GAGAAGGCCGTGGAATCGGA-3'. Hprt 5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3' and 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'.

For RNA-Seq analysis, RNA was extracted from exponentially growing subconfluent BMEL cells in three independent experiments for each cell line, using RNeasy mini kit (Qiagen) with DNase treatment. RNA integrity was validated using RNA BioAnalyzer (Agilent), all RIN  $\geq$  9.5. The preparation of the library was done with the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina). The sequencing was performed in an Illumina HiSeq 2500 sequencer by the Sequencing Platform of Montpellier (GenomiX, MGX, France; [www.mgx.cnrs.fr](http://www.mgx.cnrs.fr)), with 50 base pairs (bp) single end reads to an estimated depth of 25 million reads per sample. In order to perform a quality control of the sequencing, FastQC over the fastq files containing the raw reads. All the reads that passed the quality control were aligned to the mouse reference genome (GRCm38.p6) and the counts per gene were quantified using the tool STAR 2.6.0a(2). The Ensembl mouse genome annotations (release 93) were used for establishing the coordinates of each gene and their corresponding transcripts. Differential gene expression analysis was performed in R using the DESeq2 library. After normalization of the read counts per gene, a negative binomial generalized linear model was fitted considering single factor design for assessing the differential expression between CDK8/CDK19 knock-out BMEL Ras<sup>G12V</sup> transformed cells and BMEL Ras<sup>G12V</sup> transformed cells (as the control group). Wald test are performed for assessing statistical significance on the differential expression of each gene, then test are independently filtered and corrected by multiple hypothesis testing (Benjamini–Hochberg).

## Statistical Analysis

Data sets were tested with 2-tailed unpaired Student *t* tests or Mann-Whitney U tests, correlations were analyzed with Pearson's  $\chi^2$  test using Prism Software version 8 (GraphPad). Significant *P* values are shown as: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, and \*\*\*\**P* < 0.0001.



Human samples: Data visualization and statistical analysis were performed using R software version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>) and Bioconductor packages. Comparisons of the mRNA expression levels between groups were assessed using Mann-Whitney U test. Spearman's rank-order correlation was used to test the association between continuous variables. Univariate survival analysis was performed using Kaplan-Meier curve with log-rank test. The median *CDK8* and *CDK19* expression levels on the total number of analyzed samples was used to determine the low- and high- expression groups. P-value < 0.05 was considered as significant.

### **Data availability**

The RNA-sequencing data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO, NCBI) repository.

### **Author contributions**

KB, SP, DG performed and analyzed experiments. SC and JZR acquired and analyzed human patients data. AC generated *CDK8<sup>F/F</sup>* transgenic mouse line. GD analyzed RNA-Seq data. JUB, AL, JB contributed to *in vivo* experiments. DG made the figures. UH, DF and DG designed experiments, analyzed data, supervised the study and wrote the manuscript.

### **Acknowledgments**

We acknowledge Montpellier Biocampus facilities: the imaging facility (MRI), the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” (RHEM) and Montpellier Genomix (MGX). We are grateful to zootechnicians of IGMM animal housing facility for their work. We thank Christina Begon-Pescia (IGMM transgenesis facility) for help in generation of *CDK8* transgenic mouse line. We thank Scott Lowe for the gift of pT3-EF1a-N-RAS<sup>G12D</sup>-GFP plasmid and Leila Akkari for help setting up hydrodynamic injections. We thank members of our labs for helpful discussions and comments.

This work was funded by Institut National du Cancer (INCa; PLBIO 2015-132, DF and UH teams) and EVA-Plan cancer INSERM THE (UH, JZR), and supported by SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa\_Inserm\_DGOS\_12553. DF is funded by the Ligue Nationale contre le Cancer (EL2017-LNCC/DF). DG benefited from support by

Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF). JZR team is supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée), Labex Oncolmunology (Investissement d'Avenir), the Fondation Bettencourt-Schueller (coup d'élan Award), the Ligue Contre le Cancer Comité de Paris (Duquesne award) and the Fondation pour la Recherche Médicale (Raymond Rosen award). SC is supported by a funding from "Labex Oncolmunology", KB by INCa;PLBIO and JB by ANRS. The funders had no role in study design, data collection and analysis or publication process.

## ID ORCID

Susana Prieto <https://orcid.org/000-002-9746-2396>  
José Ursic-Bedoya: <https://orcid.org/0000-0003-0076-2059>  
Stefano Caruso: <https://orcid.org/0000-0002-6319-3642>  
Anthony Lozano : <https://orcid.org/0000-0002-9749-0573>  
Jessica Zucman-Rossi: <https://orcid.org/0000-0002-5687-0334>  
Urszula Hibner: <https://orcid.org/0000-0002-5520-7311>  
Daniel Fisher: <https://orcid.org/0000-0002-0822-3482>  
Damien Gregoire: <https://orcid.org/0000-0002-1105-8115>

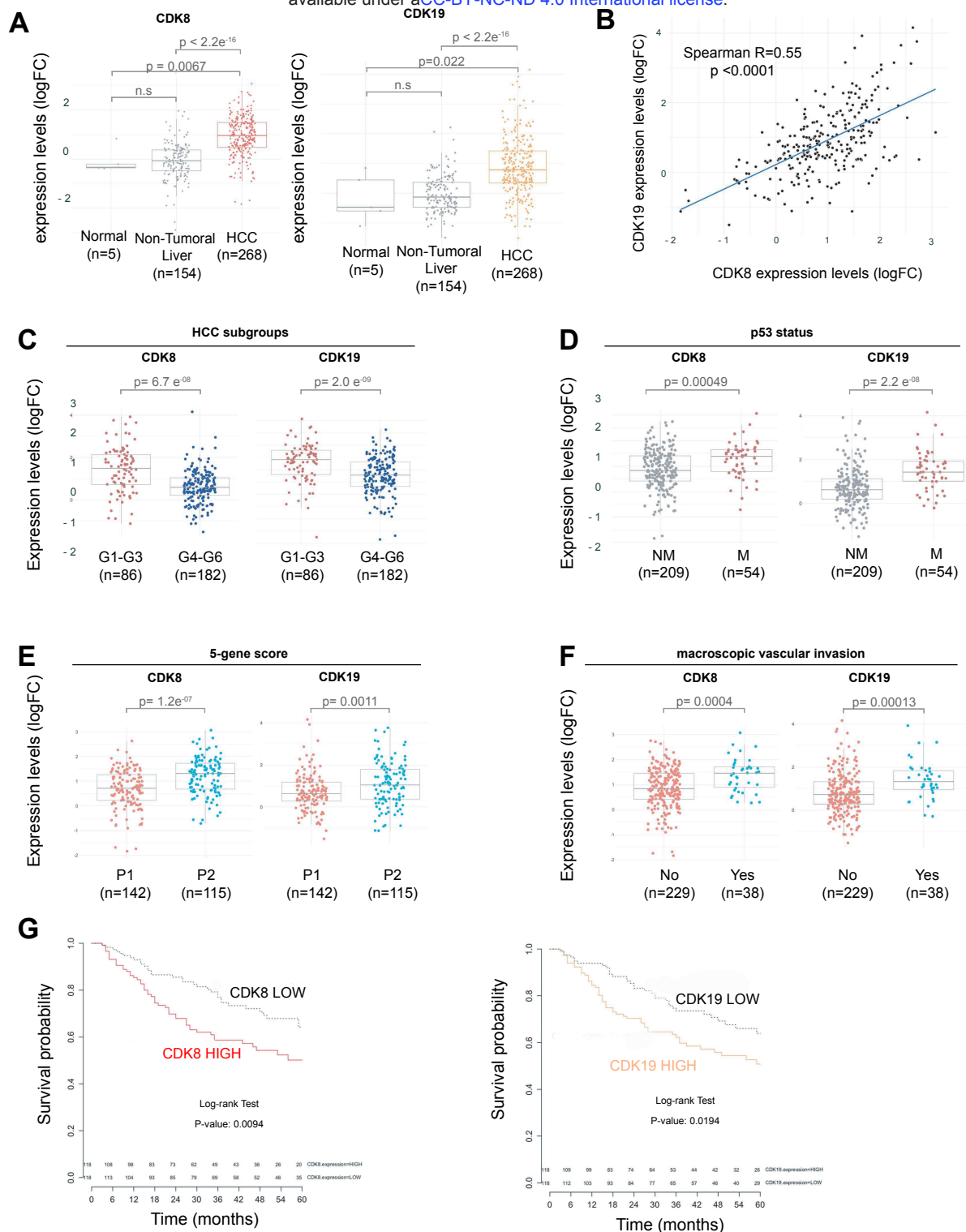
## References

1. Soutourina J. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018;19(4):262–274.
2. Westerling T, Kuuluvainen E, Makela TP. Cdk8 Is Essential for Preimplantation Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(17):6177–6182.
3. Li N et al. Cyclin C is a haploinsufficient tumour suppressor. *Nat. Cell Biol.* 2014;16(11):1080–1091.
4. Galbraith MD, Donner AJ, Espinosa JM. CDK8: A positive regulator of transcription. *Transcription* 2010;1(1):4–12.
5. Malumbres M et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(11):1275–1276.
6. Firestein R et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates  $\beta$ -catenin activity. *Nature* 2008;455(7212):547–551.
7. Kapoor A et al. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature* 2010;468(7327):1105–1109.
8. Morris EJ et al. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 2008;455(7212):552–556.

9. Starr TK et al. A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science* 2009;323(5922):1747–50.
10. McClelland ML et al. *Cdk8* deletion in the *Apc<sup>Min</sup>* murine tumour model represses EZH2 activity and accelerates tumourigenesis: *Cdk8* knockout promotes tumorigenesis in *Apc<sup>Min</sup>* mice. *J. Pathol.* 2015;237(4):508–519.
11. Donner AJ, Ebmeier CC, Taatjes DJ, Espinosa JM. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010;17(2):194–201.
12. Galbraith MD, Espinosa JM. Lessons on transcriptional control from the serum response network. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011;21(2):160–166.
13. Tsutsui T et al. Mediator complex recruits epigenetic regulators via its two cyclin-dependent kinase subunits to repress transcription of immune response genes. *J. Biol. Chem.* 2013;288(29):20955–65.
14. Bahrami S, Drabløs F. Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv. Biol. Regul.* 2016;62:37–49.
15. Donner AJ, Szostek S, Hoover JM, Espinosa JM. CDK8 Is a Stimulus-Specific Positive Coregulator of p53 Target Genes. *Mol. Cell* 2007;27(1):121–133.
16. Adler AS et al. CDK8 Maintains Tumor Dedifferentiation and Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Cancer Res.* 2012;72(8):2129–2139.
17. Galbraith MD et al. HIF1A Employs CDK8-Mediator to Stimulate RNAPII Elongation in Response to Hypoxia. *Cell* 2013;153(6):1327–1339.
18. Perez-Perri JI et al. The TIP60 Complex Is a Conserved Coactivator of HIF1A. *Cell Rep.* 2016;16(1):37–47.
19. Chen M et al. CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by NFκB. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017;114(38):10208–10213.
20. Chiang MY et al. Identification of a conserved negative regulatory sequence that influences the leukemogenic activity of NOTCH1. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(16):6261–71.
21. Porter DC et al. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(34):13799–804.
22. Dhanasekaran R, Nault J-C, Roberts LR, Zucman-Rossi J. Genomic Medicine and Implications for Hepatocellular Carcinoma Prevention and Therapy. *Gastroenterology* 2019;156(2):492–509.
23. Ferlay J et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 2015;136(5):E359-386.
24. Boyault S et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45(1):42–52.
25. Zhao X et al. Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1. *J. Clin. Invest.* 2012;122(7):2417–2427.
26. Broude EV et al. Expression of CDK8 and CDK8-interacting Genes as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2015;15(8):739–749.
27. Calderaro J et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J. Hepatol.* 2017;67(4):727–738.
28. Nault J et al. A Hepatocellular Carcinoma 5-Gene Score Associated With Survival of Patients After Liver Resection. *Gastroenterology* 2013;145(1):176–187.

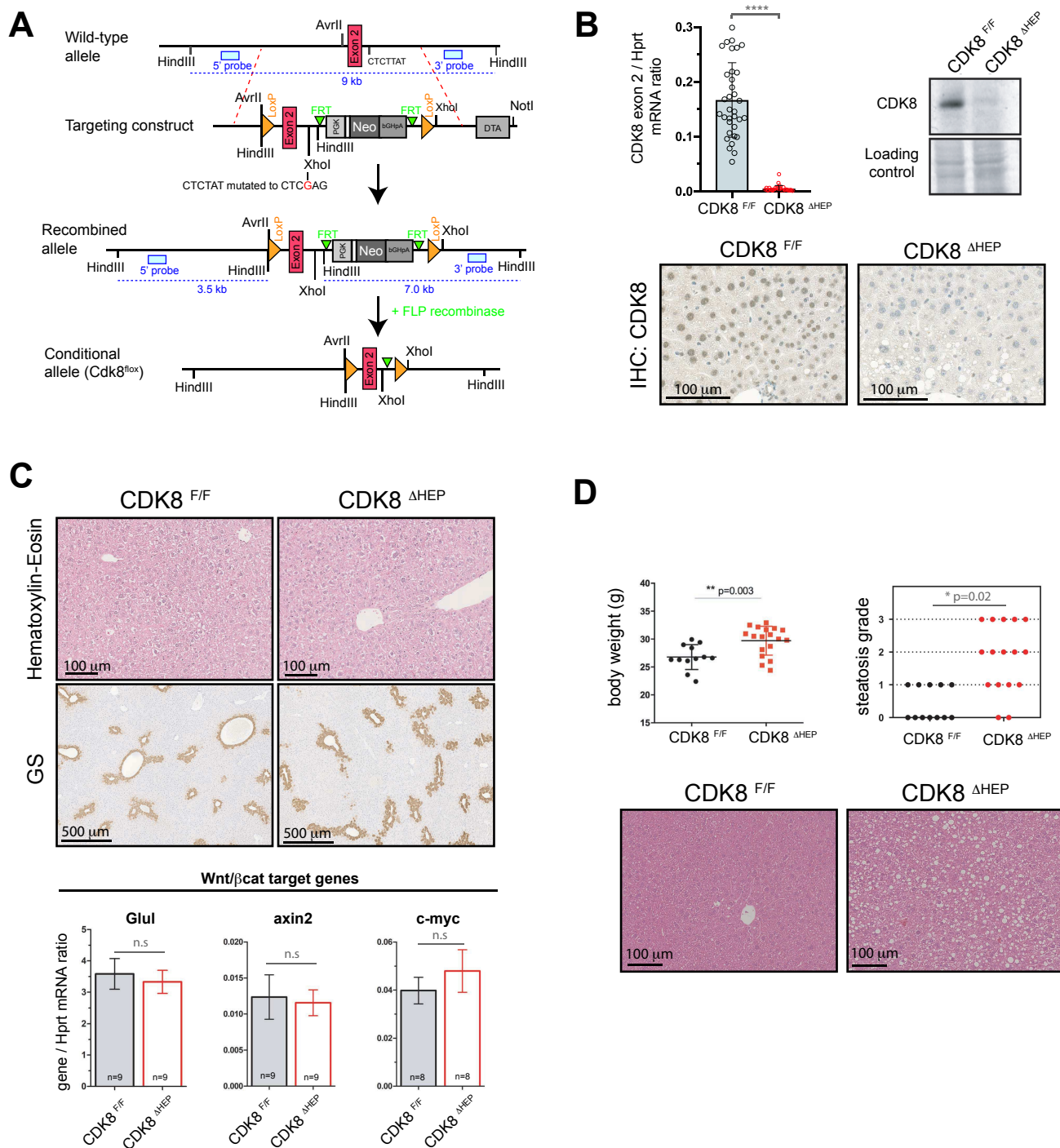
29. Postic C et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* 1999;274(1):305–315.
30. Buchmann A et al. Mutational activation of the c-Ha-ras gene in liver tumors of different rodent strains: correlation with susceptibility to hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88(3):911–915.
31. Strick-Marchand H, Weiss MC. Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology. Baltim. Md* 2002;36(4 Pt 1):794–804.
32. Akkari L et al. Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors. *J. Hepatol.* 2012;57(5):1021–1028.
33. Galbraith MD et al. CDK8 Kinase Activity Promotes Glycolysis. *Cell Rep.* 2017;21(6):1495–1506.
34. Donner AJ, Szostek S, Hoover JM, Espinosa JM. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Mol. Cell* 2007;27(1):121–133.
35. Chen X, Calvisi DF. Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. *Am. J. Pathol.* 2014;184(4):912–923.
36. Kang T-W et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 2011;479(7374):547–551.
37. Adler AS et al. CDK8 Maintains Tumor Dedifferentiation and Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Cancer Res.* 2012;72(8):2129–2139.
38. Liang J et al. CDK8 Selectively Promotes the Growth of Colon Cancer Metastases in the Liver by Regulating Gene Expression of TIMP3 and Matrix Metalloproteinases. *Cancer Res.* 2018;78(23):6594–6606.
39. McDermott MSJ et al. Inhibition of CDK8 mediator kinase suppresses estrogen dependent transcription and the growth of estrogen receptor positive breast cancer [Internet]. *Oncotarget* 2017;8(8). doi:10.18632/oncotarget.14894
40. Clarke PA et al. Assessing the mechanism and therapeutic potential of modulators of the human Mediator complex-associated protein kinases. *eLife* 2016;5:e20722.
41. Czodrowski P et al. Structure-Based Optimization of Potent, Selective, and Orally Bioavailable CDK8 Inhibitors Discovered by High-Throughput Screening. *J. Med. Chem.* 2016;59(20):9337–9349.
42. Dale T et al. A selective chemical probe for exploring the role of CDK8 and CDK19 in human disease. *Nat. Chem. Biol.* 2015;11(12):973–980.
43. Nakamura A et al. CDK8/19 inhibition induces premature G1/S transition and ATR-dependent cell death in prostate cancer cells [Internet]. *Oncotarget* 2018;9(17). doi:10.18632/oncotarget.24414
44. Pelish HE et al. Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature* 2015;526(7572):273–276.
45. Porter DC et al. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109(34):13799–13804.
46. Jorda R et al. How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases?. *J. Med. Chem.* 2018;61(20):9105–9120.
47. Gu W et al. Tumor-suppressive effects of CDK8 in endometrial cancer cells. *Cell Cycle* 2013;12(6):987–999.

48. Kim M-Y, Han SI, Lim S-C. Roles of cyclin-dependent kinase 8 and  $\beta$ -catenin in the oncogenesis and progression of gastric adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 2011;38(5):1375–1383.
49. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88(5):593–602.
50. Akkari L et al. Cell shape and TGF-beta signaling define the choice of lineage during in vitro differentiation of mouse primary hepatic precursors. *J. Cell. Physiol.* 2010;225(1):186–195.
51. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* 2014;11(8):783–784.
52. Vegna S et al. NOD1 Participates in the Innate Immune Response Triggered by Hepatitis C Virus Polymerase. *J. Virol.* 2016;90(13):6022–6035.

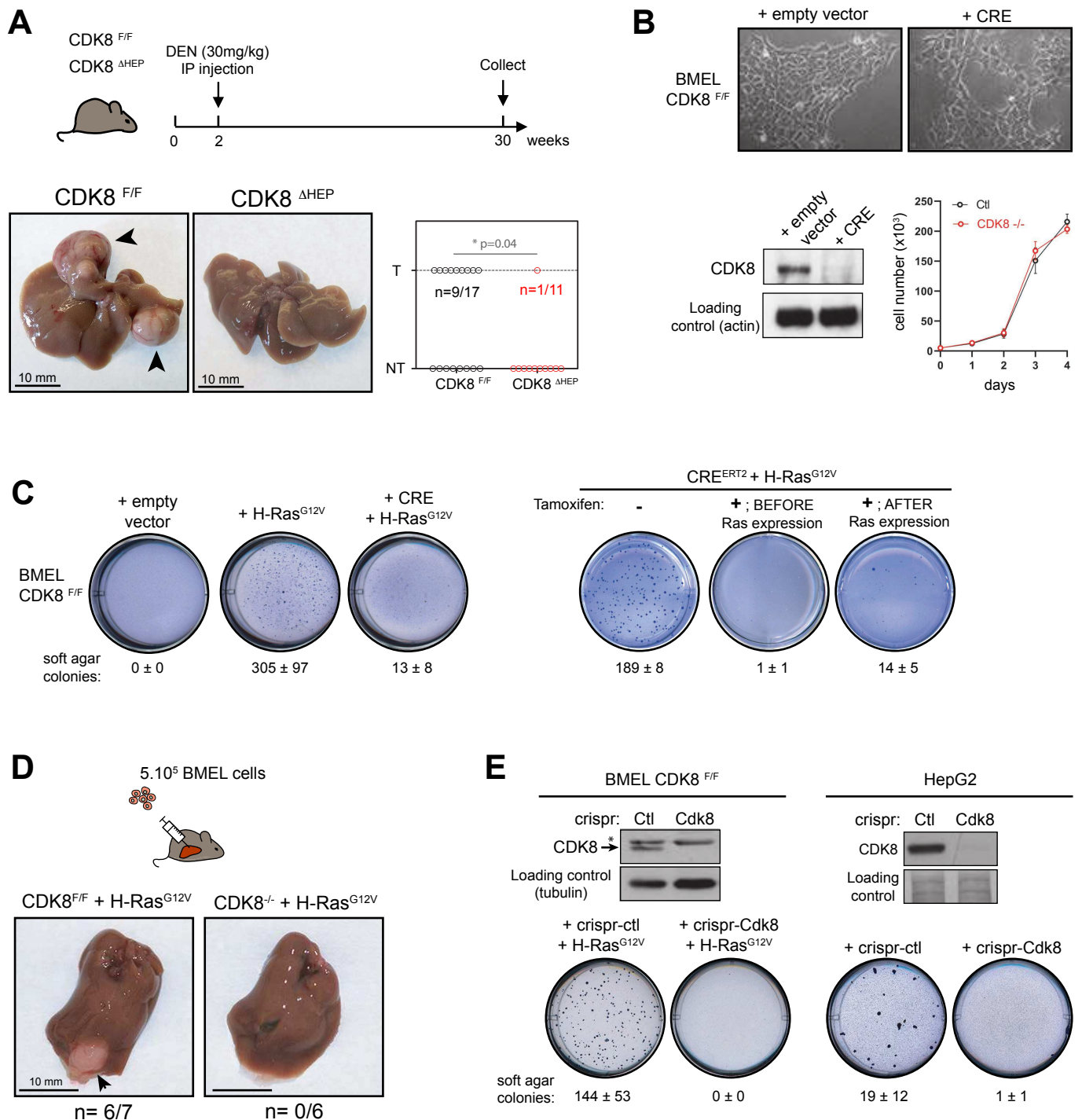


**Figure 1: CDK8 and CDK19 are highly expressed in human HCC and associated with mutated p53 status. (A)** Levels of CDK8 and CDK19 mRNA quantified by qPCR in control liver, non-tumoral part or malignant (HCC) tumor of patients. The fold change (LogFC) in gene expression is presented relative to mean expression level of the corresponding gene in five normal liver samples. Data are represented as Tukey's boxplots where box indicates the first and third quartiles, bar indicates median, whiskers indicate 1.5 interquartile range (IQR). P-values obtained with the Wilcoxon rank-sum test are indicated. **(B)** Correlation between the expression of CDK8 and CDK19 mRNA levels in human HCC samples (n=268) using Spearman's rank-order correlation **(C-F)** Levels of CDK8 and CDK19 mRNA in HCC classified according to molecular classification of HCC (Boyault et al., 2007), mutated status of p53, 5 gene score (Nault et al., 2013), or presence of macroscopic vascular invasion (histological identification), respectively. The number of patients in each class is indicated. The fold change (LogFC) in gene expression is presented relative to mean expression level of the corresponding gene in five normal liver samples. Data are represented as Tukey's boxplots where box indicates the first and third quartiles, bar indicates median, whiskers indicate 1.5 interquartile range (IQR). P-values obtained with the Wilcoxon rank-sum test are indicated. **(G)** Kaplan-Meier plots of overall survival in HCC patients (from(Nault et al., 2013)) with high or low expression of CDK8 or CDK19 mRNA. High/low expression groups were defined by the median expression levels of the total number of analyzed samples. Statistical differences were assessed by Log-rank Test. P-value obtained are indicated.

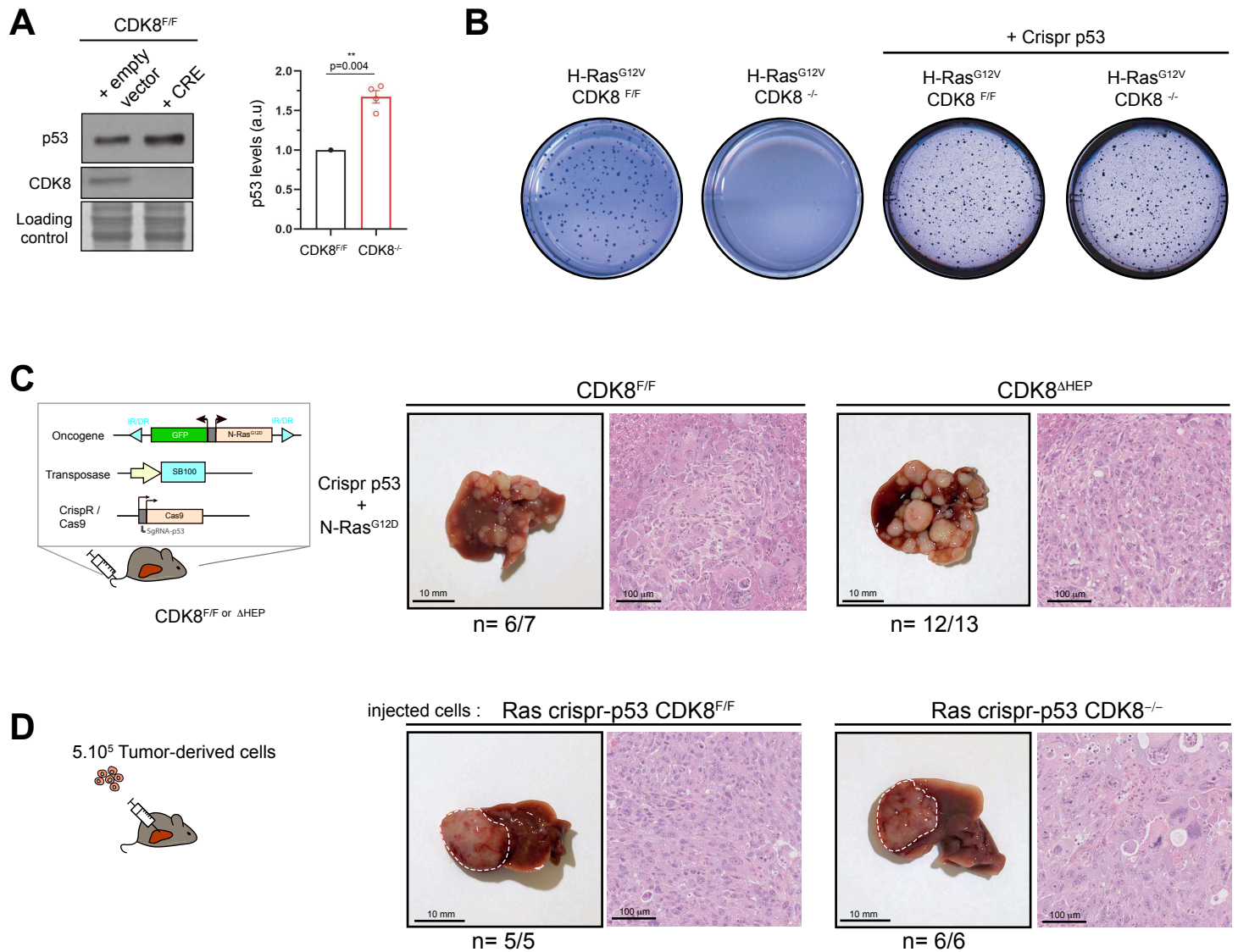




**Figure 2: Hepato-specific ablation of CDK8 does not affect liver homeostasis, but induces steatosis.** (A) Map of CDK8 genomic locus and strategy used to generate CDK8<sup>F/F</sup> transgenic mouse. See material & methods section for details. (B) qPCR, Western-blot and immunohistochemical analysis of CDK8 removal in hepatocytes of CDK8<sup>ΔHEP</sup> mice. For qPCR quantification, males and females mice of different ages were used. CDK8<sup>F/F</sup> (n=34) or CDK8<sup>ΔHEP</sup> (n=30). WB and IHC show results for 3 month old female mice. No differences were observed depending on sex or age of the animal. (C) HE staining of, GS staining, and qPCR analysis of  $\beta$ -catenin target genes (*Glul*, *axin2*, *c-myc*) in wild-type and CDK8 depleted 3 months old mice. n.s: not significant (t-test). (D) Body weight and steatosis grade score of 6 months old CDK8<sup>F/F</sup> and CDK8<sup>ΔHEP</sup> female mice. P value of Fisher's exact test is indicated. Representative liver sections (HES staining) of mice from both genotypes are shown.

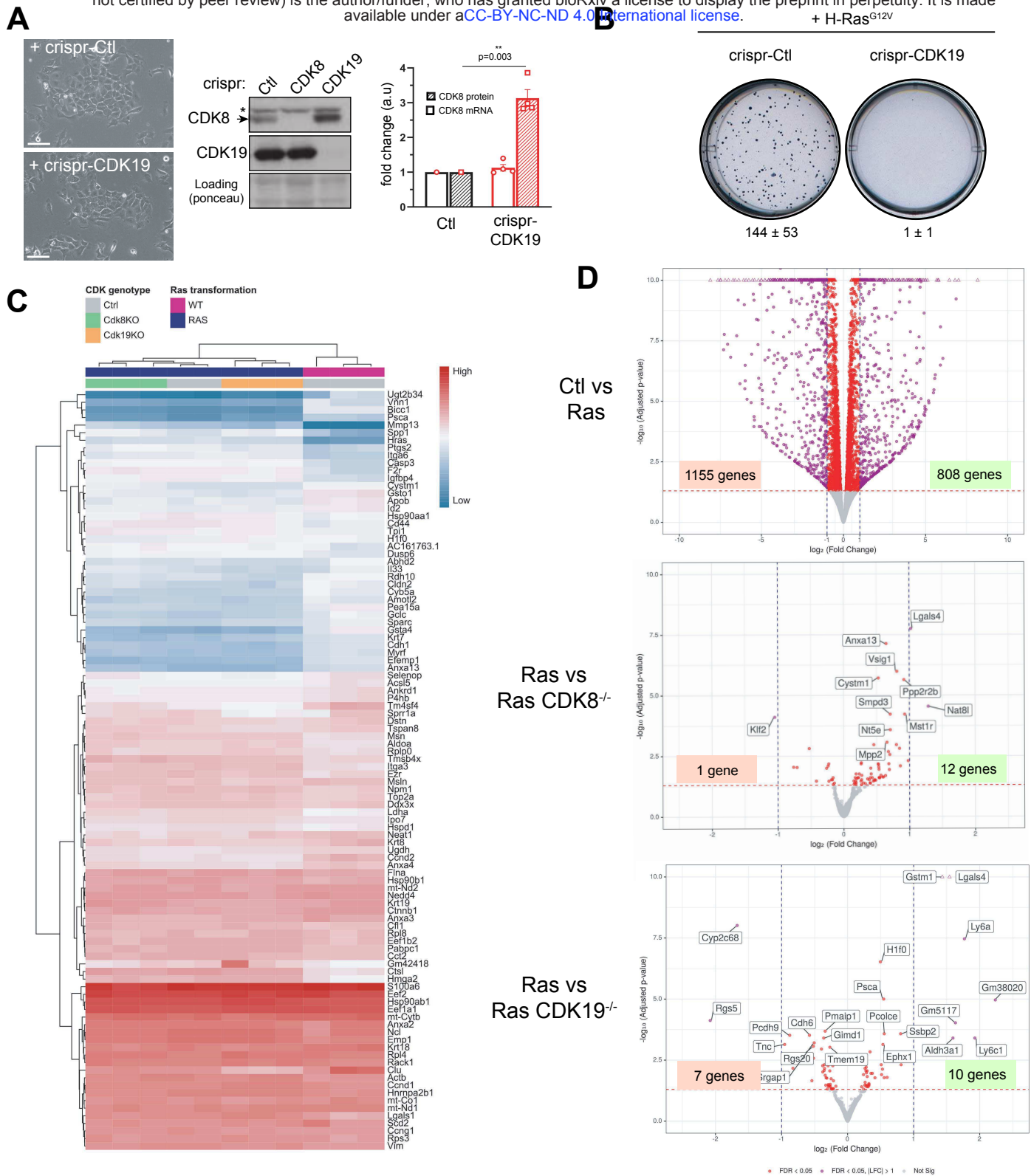


**Figure 3: CDK8 is required for hepatic carcinogenesis.** (A) Effect of CDK8 depletion on DEN-induced hepatic carcinogenesis. Pictures of representative livers for each genotype are shown. Arrowheads indicate tumors. Graph represents the repartition of the 28 DEN-injected animals, in each genotype depending if the liver presents a visible tumor (T) or not (NT). P-value of Fisher's exact test is indicated. (B) Pictures and growth curve of CDK8<sup>F/F</sup> hepatic progenitors (BMEL) WT or depleted of CDK8 by CRE recombination. (C) Soft agar growth of different BMEL cell lines. A representative well for each cell line is shown. Mean number of colonies per well ± SD from at least three independent experiments are indicated. Tamoxifen treatment (+Tam) was realized before or after transformation induced by H-Ras<sup>G12V</sup> expression. (D) Result of orthotopic allografts of Ras expressing BMEL depleted or not of CDK8. A representative liver is shown, and the number of livers carrying a tumor out of total liver injected is indicated. Arrowhead points out to the tumor. (E) Western-blot characterization of CDK8 removal by crispr/cas9 gene editing and consequences on growth in soft agar for BMEL (left panel) and HepG2 (right panel) cells. Asterisk indicates an aspecific band sometimes detected in BMEL cells. Mean ± SD number of colonies per well from at least three independent experiments are indicated.



**Figure 4: p53 deficiency abrogates CDK8 requirement for hepatic transformation.** (A) Western Blot and quantification of p53 protein levels in BMEL cell lines, showing stabilization of p53 in absence of CDK8. A representative western blot and quantification from 4 independent experiments (mean  $\pm$  SD) are shown. For each experiment, the band intensity value of the CDK8<sup>F/F</sup> sample was normalized to 1. P-value from one-sample t test is indicated. (B) Soft agar test for indicated BMEL cell lines. (C) Hydrodynamic gene delivery of N-Ras<sup>G12D</sup> and crispr-p53 vectors into livers of CDK8<sup>F/F</sup> or CDK8 <sup>$\Delta$ HEP</sup> female mice. Representative HES staining of tumors are shown. For each genotype, number or mice presenting liver tumors out of number of mice injected is indicated. (D) orthotopic allografts of tumor cell lines derived from CDK8<sup>F/F</sup> or CDK8 <sup>$\Delta$ HEP</sup> Ras crispr-p53. White dashed lines indicated tumor periphery. Representative HES staining of tumors are shown. For each genotype, number or mice presenting liver tumors out of number of mice injected is indicated.





**Figure 5: CDK19 and CDK8 are both required for transformation by H-Ras<sup>G12V</sup>.** (A) Pictures, western blot and quantification of BMEL cell lines depleted of CDK19 by crispr/Cas9. A representative western blot and quantification from 4 independent experiments (mean  $\pm$  SD) are shown. \* indicates an aspecific band sometimes detected with CDK8 antibody. For each experiment, the band intensity value or cDNA content of the crispr-Ctl sample was normalized to 1. P-value from one-sample t test is indicated. (B) Soft agar test for indicated BMEL cell lines. A representative well for each cell line is shown. Mean number of colonies per well  $\pm$  SD from at least three independent experiments are indicated. (C) Heatmap for the RNASeq experiments. The raw counts were transform using the regularized log and the variance was calculated between all the samples for all the genes. We selected the 100 genes with the higher variance. Distance between genes and samples were computed using the euclidean measure and the hierarchical cluster analysis was performed in order to set the distance trees. Two level of colors were set to describe the sample genotypes for RAS transformation (Violet: wild type; Blue: RAS<sup>G12V</sup> mutation) and for Cdk8 or Cdk19 knock-outs (Gray: Control; Green: Cdk8 KO; Orange: Cdk19 KO). (D) Volcano plots for the differential gene expression. The values of the minus logarithm in base ten versus the logarithm in base two of the counts are plotted for each gene and two levels of significance are showed in red (genes with adjusted p-value less than 0.05) and in purple (genes with adjusted p-value less than 0.05 and with absolute values of the log<sub>2</sub> of the fold change greater than one).

## **Oncogenic Cooperation and Metabolic Effects of FGF19 in Hepatocellular Carcinoma**

### **Abstract:**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary hepatic malignancy and ranks 6th and 3rd in terms of frequency and cancer mortality, respectively. Overexpression of FGF19 is a common event in human HCC and compounds targeting FGF19 or its receptor tyrosine kinase in the liver (Fibroblast Growth Factor Receptor 4 FGFR4) are being investigated. Studies in mice have shown that long term exposure to high levels of FGF19 causes hepatic tumorigenesis. In addition, FGF19 exerts numerous metabolic effects resulting in protection against insulin resistance. Thus, FGF19 analogs are under evaluation for treatment of metabolic diseases, such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH). The aim of our study was to further characterize the oncogenic and metabolic effects of FGF19 in an immunocompetent mouse model.

Using the technique of hydrodynamic gene transfer, we obtained C57Bl6/J mice with persistent hepatic expression of FGF19, displaying supra-physiological circulating concentrations of the hormone, associated with inhibition of the bile acid synthesis pathway. We discovered that these mice display a phenotype of diabetes insipidus, characterized by polydipsia and urine dilution persisting over time. This effect resembles that already described for FGF21, a molecule belonging to the same family as FGF19. However, the effect of FGF19 is independent of FGF21 and is also present when a tumor overexpressing FGF19 is injected orthotopically.

Furthermore, FGF19 expression, alone or with simultaneous invalidation of p53 by CRISPR-Cas9 technology, gives rise to well-differentiated HCC after 9-12 months. The combination of FGF19 with C-Myc overexpression, with or without the invalidation of p53, induces the development of large, moderately differentiated tumors appearing after only 2-3 weeks. Comparison with tumorigenesis triggered by C-Myc alone or by C-Myc/ CRISPR-p53, reveals oncogenic cooperation between Myc and FGF19, resulting in a very significant acceleration of oncogenesis by FGF19. Transcriptomic and histological analyses of these tumors show that FGF19 stimulates neoangiogenesis. Finally, in a NASH-inducing diet model, tumor expression of FGF19 exerts a paradoxical effect: while accelerating tumor growth, it is accompanied by histological improvement of NASH.

**Keywords:** FGF19, hepatocellular carcinoma, non-alcoholic steatohepatitis, oncogenic cooperation.

## **Coopération oncogénique et effets métaboliques de FGF19 dans le carcinome hépatocellulaire**

### **Résumé :**

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur maligne primitive hépatique la plus fréquente et se situe au 6<sup>e</sup> et 3<sup>ème</sup> rang en termes de fréquence et de mortalité liées au cancer, respectivement. La surexpression de FGF19 est un événement fréquent dans les CHC humains et des molécules ciblant FGF19 ou son récepteur tyrosine kinase dans le foie (*Fibroblast Growth Factor Receptor 4* FGFR4) sont en cours d'étude. Chez la souris l'exposition à des concentrations élevées de FGF19 au long cours provoque une tumorigénèse hépatique. Par ailleurs, FGF19 exerce de nombreux effets métaboliques ayant pour conséquence une protection contre l'insulinorésistance. Ainsi, des molécules analogues à FGF19 sont également en cours d'étude pour traitement de maladies métaboliques, comme la stéatohépatite non alcoolique (ou NASH pour *Non alcoholic steatohepatitis*). Dans ce contexte, notre projet avait pour but de mieux caractériser les effets oncogéniques et métaboliques de FGF19 dans un modèle de souris immunocompétentes.

En utilisant la technique de transfection hydrodynamique des hépatocytes, nous avons obtenu des souris C57Bl6/J ayant une expression de FGF19 persistante, avec des concentrations circulantes supra-physiologiques, associée à l'inhibition de la voie de synthèse des acides biliaires. Nous avons découvert chez ces souris un phénotype de diabète insipide, caractérisé par une polydipsie et une dilution des urines persistant dans le temps. Cet effet est similaire à celui qui a déjà été décrit pour FGF21, une molécule appartenant à la même famille que FGF19. Cependant, l'effet de FGF19 est indépendant de FGF21 et est retrouvé également lorsqu'une tumeur surexprimant FGF19 est injectée par voie orthotopique.

Par ailleurs, l'expression de FGF19, seule ou avec l'inactivation simultanée de p53 par la technique de CRISPR-Cas9, donne des CHC bien différenciés après 9-12 mois. La combinaison FGF19 avec une surexpression de C-Myc, avec ou sans l'inactivation de p53, induit le développement de volumineuses tumeurs moyennement différenciées apparaissant après 2-3 semaines seulement. La comparaison avec la tumorigénèse déclenchée par C-Myc seul ou par C-Myc/CRISPR-p53, fait apparaître une coopération entre Myc et FGF19 donnant lieu à l'accélération très significative de l'oncogénèse par FGF19. L'analyse transcriptomique et histologique de ces tumeurs met en évidence une stimulation de la néoangiogénèse par FGF19. Enfin, dans un modèle de régime pourvoyeur de NASH, l'expression tumorale de FGF19 exerce un effet paradoxal : tout en accélérant la croissance tumorale, elle s'accompagne d'une amélioration histologique de la NASH.

**Mots-clés :** FGF19, carcinome hépatocellulaire, stéatohépatite non-alcoolique, coopération oncogénique.