



HAL
open science

Hétérogénéité intratumorale et dynamique des populations du carcinome hépatocellulaire : impact de l'intensité de la signalisation Ras/MAPK Erk

Anthony Lozano

► **To cite this version:**

Anthony Lozano. Hétérogénéité intratumorale et dynamique des populations du carcinome hépatocellulaire : impact de l'intensité de la signalisation Ras/MAPK Erk. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT010 . tel-03343934

HAL Id: tel-03343934

<https://theses.hal.science/tel-03343934>

Submitted on 14 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 Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM-UMR5535)

Titre de la thèse

**Hétérogénéité intra-tumorale et dynamiques des
populations du carcinome hépatocellulaire :
Impact de l'intensité de la signalisation RAS/MAPK Erk**

Présentée par Anthony LOZANO

Le 11 Mars 2021

Sous la direction de Urszula HIBNER et Damien GREGOIRE

Devant le jury composé de

Celio Pouponnot, PhD, DR1 Institut Curie Paris

David Santamaria, PhD, Institut Européen de Chimie et Biologie IECB Bordeaux

Damien Grégoire, PhD, CRCN Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier IGMM

Hélène Strick-Marchand PhD, CR1 Institut Pasteur Paris

Jean-Paul Borg PU-PH, Centre de recherche en cancérologie de Marseille

Urszula Hibner, PhD, DR1 Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier IGMM

Examineur

Rapporteur

Co-directeur de thèse

Rapporteuse

Président du Jury

Co-directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Abstract en Français

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le principal cancer primitif du foie, il présente un pronostic vital sombre, notamment du fait du peu d'options thérapeutiques disponibles pour les stades avancés. L'analyse génomique des tumeurs a permis sa classification moléculaire en identifiant les principaux oncogènes et suppresseurs de tumeurs impliqués dans son développement. Ces études ont également défini la diversité des bases génétiques du CHC, et donc une importante hétérogénéité inter-tumorale. Mon travail de thèse aborde la question de l'hétérogénéité tumorale sous un angle différent : en me concentrant sur l'étude de la coopération oncogénique et de l'hétérogénéité intra-tumorale fonctionnelle, j'ai mis en évidence une hétérogénéité quantitative, qui a pour l'origine des variations de l'intensité du signal oncogénique, ce qui influence les interactions de la cellule cancéreuse avec son microenvironnement.

Pour étudier la dynamique des populations cellulaires au cours de la croissance tumorale, nous avons développé un modèle murin de CHC qui combine des injections intra-hépatiques et un suivi du lignage cellulaire. Les allogreffes orthotopiques de cellules marquées génèrent des tumeurs hépatiques dont la croissance est analysée notamment en termes de composition clonale et d'invasion métastatique. Le résultat principal de cette étude est la mise en évidence d'un avantage sélectif octroyé par un niveau d'activation optimal d'une voie de signalisation majeure : la voie des MAPK Erk. L'intensité optimale de cette signalisation est définie aussi bien par des mécanismes intrinsèques de la réponse cellulaire (cell-autonomous) que par des interactions avec le microenvironnement. L'analyse approfondie du stroma tumoral, qui est différent pour la tumeur primaire et les sites métastatiques, m'a permis d'identifier les cellules stromales qui seraient les médiateurs de la sélection clonale et de proposer les bases moléculaires de mécanismes qui en seraient responsables.

Abstract en anglais

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the main primary liver cancer. Its prognosis is poor, notably due to limited therapeutic options for the advanced stages of the disease. Genome-wide analyses of human tumor samples identified the common oncogenic drivers and allowed the molecular classification of HCC. They also highlighted a complex genetic landscape of HCC, that results in extensive inter-tumor heterogeneity. My thesis project was focused on another aspect of tumor heterogeneity: the study of oncogenic cooperation and functional intra-tumor heterogeneity led me to discover quantitative subclonal differences in the growing tumors. This quantitative heterogeneity originates from the variations of an oncogenic signal intensity that modulates the interactions of cancer cells with their microenvironment.

To study population dynamics and intercellular interactions during tumor growth and dissemination, we have developed a murine model of hepatocellular carcinoma that combines intrahepatic injection of cells and lineage tracing. Orthotopic allografts of fluorescently labeled cells generate hepatic tumors, whose growth was analyzed, notably in terms of clonal composition, invasion and metastasis. My results revealed a novel aspect of clonal competition in a growing tumor, namely a selective advantage afforded to tumor cells by an optimal intensity of activation of a major signal transduction pathway: the MAPK pathway. I showed that the optimal activation intensity, compatible with the tumor growth, is defined both by the intrinsic, cell-autonomous mechanisms and by the interactions with the microenvironment. In-depth analysis of the stromal component, which differs between the primary and the metastatic tumor locations, allowed me to identify stromal cell types that appear to modulate the selection and to propose a model of molecular interactions involved in this process.

Résumé grand public :

Français

Le carcinome hépatocellulaire est le cancer du foie le plus fréquent. Son mauvais pronostic est en grande partie dû au faible nombre d'options thérapeutiques disponibles mais également à l'importante hétérogénéité de la maladie. En effet, même une simple tumeur issue d'un seul patient est composée d'une multitude de cellules, qui ne sont pas identiques – c'est l'hétérogénéité intra-tumorale. L'étude des interactions entre cellules au sein de la tumeur est le thème principal de mon sujet de thèse. J'ai développé un modèle de tumeur du foie de souris qui représente l'hétérogénéité intra tumorale. J'utilise différentes combinaisons de mutations génétiques et j'étudie leur impact sur le développement de la tumeur. J'ai montré que la nature des mutations qui cause le cancer est importante mais que la force du signal qu'elle transmet à la cellule l'est également. Initialement nous pensions que le signal le plus important donnerait lieu à des tumeurs plus agressives, toutefois il s'avère que ce n'est pas le cas. J'ai montré que pour une défaillance cellulaire mène au cancer cela doit être activé à la bonne intensité, auquel cas la cellule sera éliminée. C'est un résultat intéressant, puisque cela ouvre la voie à des options thérapeutiques de modulation de l'intensité d'un signal cellulaire pour combattre la progression tumorale.

Résumé grand public anglais:

Hepatocellular carcinoma is the most frequent liver cancer and a major public health problem. Its poor prognosis is largely due to limited therapeutic options but also to the tremendous heterogeneity of the disease. Not only are the tumors from individual patients different, but even a single tumor from any patient is composed of a high number of non-identical cells – this is an intra-tumoral heterogeneity. Studying cell interactions within the tumor is the main topic of my PhD thesis. I developed a mouse model of liver tumorigenesis which recapitulates intra-tumoral heterogeneity. I studied the impact of specific genetic mutations on tumor development and showed that while the nature of the mutation that cause the disease is important, so is the strength of the signal that the mutation generates. Intuitively it may appear that the highest signal intensity would give rise to the most aggressive tumors. This turns out not to be the case. I showed that in order to cause cancer a cellular defect must operate within a narrow range of intensity. If this is not the case the cell at risk of becoming cancerous will be eliminated. This is an interesting result, because it might help to build a novel therapeutic strategy aiming at the modulation of the strength of cellular signal in order to fight tumor progression.

Cette thèse est dédiée à mon père qui a su éveillé ma curiosité et m'a incité à chercher plus loin que ce qui est enseigné dans les classes. J'espère avoir accomplis la promesse qu'on s'était fait avec Aurore et Alice après ton décès : te rendre fier.

Remerciements

Comme vous vous en doutez très certainement, la thèse ci-dessous n'est pas le seul fruit de mon travail. Sa réalisation n'aurait en effet pas été possible sans les nombreuses personnes qui m'ont accompagné au long de cette aventure. Je tiens donc à exprimer mes remerciements envers ces personnes sans qui ces quatre années mémorables auraient certainement été très différentes.

Je voudrais tout d'abord commencer par remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de partager leur expertise. Merci au Dr David Santamaria d'avoir consenti à être rapporteur pour juger et évaluer ce travail, merci également pour les conseils avisés que vous m'avez prodigué lors de notre discussion autour de mon poster au congrès GSO. Merci au Dr Hélène Strick-Marchand d'avoir également accepté de consacrer de son temps à la lecture et à la rédaction du rapport de cette thèse. Je tiens aussi à vous remercier d'avoir activement participé au développement de ce formidable modèle cellulaire que sont les BMEL et qui m'ont accompagné au cours de ces quatre années. Merci au Dr Celio Pouponnot d'avoir accepté d'évaluer mes travaux et pour son intérêt et ses suggestions au cours de la soutenance. Merci au Professeur Jean-Paul Borg pour avoir accepté de présider le jury et pour la bonne humeur et l'enthousiasme qu'il a apporté aux discussions. Enfin je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse Leila Akkari et Claude Sardet qui m'ont tous deux prodigué d'excellents conseils à la fois sur mes travaux scientifiques et la suite de ma carrière.

Avant de m'engager pleinement dans ces remerciements je souhaiterais toutefois rappeler le contexte qui m'a permis de rejoindre l'équipe du Dr Urszula Hibner en Septembre 2016. À cette période, j'effectuais mon stage de Master 2 dans l'équipe du Pr Xin Lu à l'université d'Oxford. Bien décidé à poursuivre mes études par un doctorat, je m'étais présenté comme candidat à une bourse de thèse proposée par l'école doctorale de Montpellier. Ayant été convié aux entretiens finaux pour y défendre ma candidature, je quittais mon domicile d'Oxford à 5h du matin, deux jours avant les épreuves. Je me dirigeais donc vers le bus qui devait me déposer à l'aéroport de Londres-Luton situé à 2h de route de là. C'est alors qu'une heure après le départ, nous nous retrouvons complètement à l'arrêt sur l'autoroute à cause d'un accident important qui bloquait complètement la circulation. Étant plutôt prévenant

j'avais prévu 3h de marge entre mon arrivée à l'aéroport et le départ de mon vol pour Montpellier. Nous sommes toutefois restés immobilisé presque 2h sur l'autoroute, et ceci dans un bus bondé, sans climatisation et avec une température intérieure se rapprochant des 35°C. À un certain moment, j'ai même dû calmer ma voisine de siège qui commençait à suffoquer et à pleurer à cause de la chaleur, cette dernière étant en effet peut habituelle pour les natifs de Grande Bretagne. Je tiens tout de même à remercier le sang-froid de la conductrice du bus qui a fini par me déposer à l'aéroport 20min avant le départ de mon vol. Par chance, et peut être aussi grâce à ma condition physique de l'époque qui m'a permis de faire un sprint monumental, je montais dans mon avion quelques minutes avant la fermeture des portes. Ma journée ne s'arrêtait cependant pas là, car dans l'après-midi je devais rencontrer les équipes dont j'avais présélectionné les sujets afin de décider lequel d'entre eux j'allais présenter au concours. C'est en dernier et quelque peu épuisé par les péripéties de la journée et les entretiens précédents, que je rencontrais Damien et Ula dont le sujet m'a tout de suite séduit. En considérant l'état de fatigue dans lequel j'étais à ce moment-là, j'ai encore du mal aujourd'hui à me rendre compte de comment j'ai pu être assez convainquant auprès d'eux. Je veux donc commencer par les remercier tous les deux de m'avoir fait confiance pour mener ce projet. Merci à eux de m'avoir soutenu et accompagné pendant ces quatre années, vous formez un duo formidable qui se complète merveilleusement bien.

Ula, merci pour ton enthousiasme, ton engagement et ta bienveillance. Ta passion pour la science et la recherche, que même la retraite ne semble pouvoir arrêter, a été pour moi une continuelle source de motivation et d'inspiration. Tu m'as un jour dit que ta carrière professionnelle tu l'avais passée à t'amuser. Tu as su me transmettre cet état d'esprit et je suis ravi d'avoir pu passer ces quatre années sous ta direction. Si je devais choisir un exemple qui illustre bien ton encadrement je choisirai cette journée difficile où les lourdes expériences réalisées s'étaient toutes soldées par un échec cuisant. Alors que je t'en faisais part dans ton bureau, tu m'as fait remarquer à quel point je passais une très mauvaise journée et tu m'as simplement conseillé d'aller prendre un verre avec des amis. Conseil que je me suis empressé de suivre. Tu m'as alors appris à relativiser pour me concentrer sur la résolution des problèmes avec un esprit plus léger. J'ai aussi beaucoup apprécié toutes nos discussions scientifiques ou non qui m'ont enrichies tant sur le plan professionnel que personnel.

Damien, on en aura passé des heures de chirurgie dans cette petite pièce exiguë et sans fenêtres ! Sans ton aide je serai probablement encore en train de recoudre une souris plutôt

que d'écrire ces quelques lignes. Malgré les difficultés que tu as rencontrées ces dernières années, tu t'es toujours rendu disponible pour me prodiguer des conseils et me partager ta science. Je ne t'en remercierai jamais assez. Parmi tes nombreux enseignements je retiendrais particulièrement ton slogan préféré "une manip, un numéro !" que je ne pourrais pas appliquer sans une pensée à ton égard. Ce fut un réel plaisir de travailler à tes côtés, tant sur le plan personnel que professionnel. Je suis fier d'avoir été le premier étudiant en thèse que tu ais eu à encadrer et je suis convaincu que cette relation nous a tous les deux fait évoluer. Merci également d'avoir su animer nos moments passés au laboratoire. C'est sans nul doute à toi que je dois le plus de suggestions musicales, cinématographiques, littéraires et jeux en tout genre. À bientôt je l'espère.

Régis, merci de m'avoir accueilli et encadré lors de tes dernières semaines au laboratoire. Quel luxe d'apprendre la suture et la chirurgie auprès d'un chirurgien expérimenté ! Je souhaite également te remercier pour tout ton travail effectué au cours de ton stage et sur lequel je me suis appuyé pour initier mes travaux de thèse.

Jackie, à mon arrivée au labo tu as été comme une grande sœur pour moi. Toujours prête à me proposer ton aide et à partager tes histoires dégingandées sur ta folle jeunesse à Toulouse et à Manchester. Je ne me lassais jamais de t'entendre clamer "C'est ça la France !" dans un accent mélangeant celui du midi et celui du nord de l'Angleterre. Merci pour tous ces moments à rigoler autour d'un café avec Ella, Yasamine, Jennifer et Lucy que je remercie également pour avoir rendu la vie au laboratoire si agréable.

Katarina, merci pour ton aide et ta gentillesse. Ta persévérance et ton travail ont été pour moi un exemple à suivre. Grâce à toi j'ai également pu rencontrer énormément de personnes qui m'ont permis de partager des moments privilégiés avec les étudiants et les post-docs du campus.

Éric, merci d'avoir pris le temps de participer à nos réunions et pour m'avoir prodigué conseils et suggestions. J'ai eu aussi plaisir à t'écouter nous présenter l'évolution de la prise en charge thérapeutique des patients et les dernières avancées cliniques.

Benjamin, merci d'avoir consenti à partager ton expertise de pathologiste. Lors de tes passages au laboratoire j'ai toujours eu l'impression de participer à une visite guidée. Il est fascinant de te voir te promener sur ces "toiles" histologiques et facilement en percer les secrets.

*Docteur² José, cela a été un plaisir de partager ces années de thèse à tes côtés. Je regrette déjà ta gentillesse et ton calme imperturbable, qui se caractérise parfaitement par ton « Je suis vraiment dans la m*r*e » cocktail à la main. Tu as été pour moi une inépuisable source d'informations, scientifiques mais aussi pour ta connaissance des bonnes adresses culinaires Montpelliéraines. À quand la publication du guide Ursic-Bedoya ?! Quel plaisir également d'avoir pu discuter avec quelqu'un qui appréciait et comprenait ce sport barbare qu'est le football américain. J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir, et pourquoi pas à l'occasion d'un match Bills vs Panthers ? (les Bills n'ont aucune chance hahaha).*

Christiane, Merci d'avoir partagé ton expérience de la recherche et tes nombreux conseils et expertise en matière de clonage. Je regrette que tes dernières années au labo n'aient pas été aussi appréciables pour toi qu'elles l'ont été pour moi.

Carine tu as su partager ton expérience scientifique et ta bonne humeur, bien que cette dernière soit parfois perturbée par toutes ces petites choses qui t'énervent (Non mais sans déconner !). Tu as toujours été prête à me rendre service et à m'aider, surtout quand il s'agissait de dilapider l'argent du labo haha (cf. les commandes miltenyi) et pour tout ça je t'en suis grandement reconnaissant. Tu es une femme en or (comme ça pas de jaloux !) et une chercheur avec bien des casquettes : maman, dame pipi, gossip girl et j'en passe. Au plaisir de recroiser ta route.

Guillaume, notre deuxième rencontre était de bon augure pour ce qui allait être notre relation par la suite. Plus qu'un collègue j'ai aussi rencontré un ami. Je conserverai en mémoire nos débats et discussions scientifique ou philosophiques, nos vannes d'une qualité parfois plus que discutable, nos sessions de collectes bien trop matinales (encore désolé pour ça) et bien d'autres interactions trop nombreuses pour les toutes les mentionner. J'ai su apprécier ton naturel (n'hésites pas à me communiquer tes prochains résultats de coloscopies ou éventuel problèmes intestinaux haha), ta disponibilité, ta curiosité, ta générosité mais aussi tes nombreuses anecdotes (Petit coup de cœur pour l'histoire de la femme nue dans le salon) et références culturelles si proches des miennes. Dans le cadre du travail tu m'as été d'une grande aide à la fois pratique et technique mais aussi grâce à tes nombreux programmes et logiciels d'analyses qui m'ont grandement simplifié la vie (PHILLIPE ?! Je sais où tu te caches...). Merci mille fois pour tout ça. Tu vas me manquer à New-York mais je te réserve évidemment une place dans mon studio si jamais tu veux me rendre visite. D'ailleurs ils vont me détester dans ce labo quand je vais leur imposer les choix musicaux que tu m'as transmis, à savoir « Les vieux » de Jacques Brel ou la musique de Shrek du vendredi. Je te

transmettrais leurs doléances avec quelques requêtes de volcano plot au passage. Bonne chance pour la suite de ta carrière scientifique qui je n'en doute pas sera couronnée de succès.

Marine, tu n'as rejoint le labo que récemment mais j'ai déjà pu apprécier ton dynamisme, ta détermination et ta motivation. Merci d'avoir repris ce projet passionnant mais difficile que j'ai initié avec l'aide d'Allyson et Elsa. Ne lâche rien, la thèse n'est pas un sprint mais une course d'endurance. Je suis sûr que tu t'en sortiras à merveille.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des stagiaires que j'ai encadré au cours de ma thèse et qui ont elles aussi participé au travail que je vous présente. J'ai autant appris d'elles que, qu'elles ont appris de moi. Merci donc à Élise, Delphine, So-Hee, Allyson et Elsa pour leurs contribution et leur bonne humeur.

Coraline, membre officieuse de l'équipe UHL aka la cliente la plus assidue de la pâtisserie Lozano, toujours à passer commande haha. Cela a été un vrai plaisir de partager nos repas et pauses café avec toi. Merci d'avoir su prêter une oreille attentive lors de nos séances de déprimés et psychanalyse mutuelles, et de m'avoir conseillé et informé sur mes choix de post-docs. Je retiendrais aussi tes conseils en terme d'écologie responsable et ta tentative de me « Green washer ». Je suis maintenant conscient que mon utilisation excessive d'Amazon risque de me valoir un séjour en enfer à lustrer le crâne de Jeff bezo. Blague à part, on a quand même passé des bons moments durant ces années de folies avec la mezza. Merci pour ton soutien et ton aide. Nos séances de commentaires pendant les séminaires internes en zoom et les Blind test du vendredi vont me manquer.

Si je mentionne ça je me dois aussi de mentionner les autres zinzins de la mezza.

Marina, la terreur du SCII et jeunes stagiaires. Merci d'avoir partagé ta bonne humeur j'ai été ravi de faire ta connaissance et de partager mon bureau avec toi, sauf quand tu renverse du ketchup sur mes documents de manière totalement fortuite haha (Il nous tombe dessus Coralie). Maintenant, je m'attends quand même à recevoir une tarte tatin par voie postale, j'espère qu'elle sera bonne !

Bertrand alias le broomer fou, tu te souviendras peut-être que c'est toi qui m'as introduit à la vie de laboratoire lors de mon tout premier stage dans l'équipe de Julie Pannequin. Merci pour ta gentillesse et ton sens du partage. Tu nous as régalié de tes excellents chocolats ou

pâtes de coins ou de tes phrases désormais cultes inscrites dans le cahier de marina (Je me suis tapé un sanglier, rien de ...).

Iria, tu es une des personnes les plus serviables que j'ai eu l'occasion de rencontrer. Merci pour tous les conseils et suggestions dont tu m'as fait part. Je te souhaite tout le succès possible pour la suite de ta carrière.

Je tiens aussi à particulièrement remercier les animaliers de la Zefi qui se sont succédé au cours de ma thèse. Ils font un travail difficile, souvent peu valorisé mais essentiel à la réalisation de nombreux projets de recherches dont le mien qui n'aurait pas pu voir le jour sans leur travail et leur investissement. Merci donc à Sarah Couderc, Marina Ferrand, Cédric Orféo, Zoé Lebrere et notamment à Véra Desprat et Eve Lasserre qui ont pris tant soins de mes petites souris.

Merci également à Stéphanie Viala et Myriam Boyer du service MRI cytométrie pour les nombreuses heures de tri passés ensemble et votre patience dans ces moments.

Je souhaite aussi remercier les services communs de l'IGMM, Laurent au magasin, Jennifer et Laura à la laverie, tous les membres du service administratif qui a pris en charge mes commandes et mes soucis de contrats. Je remercie aussi les différents directeurs de l'institut à savoir Marc Piechaczyk, Etienne Schwob et Éric Kremer qui ont participé à mettre en place cet environnement de travail formidable. Je veux également remercier mes collègues étudiants, chercheurs et post doc avec qui j'ai eu la chance d'interagir, Merci à Mathias, Pierre, Zoï, Maria, Lucie, Léo, Fabienne, Adam, Lilliana, Claire(s), Medhi, Anaïs, Ana, Julie, Diwas, Baraah Kévin, Rosy, Ludo, Stéfan, Sandrina, Patricia, David, Florence, Nicolas, Vincent, Marion, Marc Sitbon, Éric Soler, Naomi Taylor, Valérie Dardalhon et Valérie Zimmerman, Guillaume Bossis, Robert Feil et j'en passe.

Merci également à tous mes amis à Montpellier et en dehors qui m'ont permis de rendre les moments de stress et de doutes bien plus supportables.

Enfin, je veux remercier les membres de ma famille toujours présents dans les bons comme les mauvais moments. Sans leur soutien sans failles je ne serais pas là où j'en suis. Merci à ma grand-mère qui m'a harcelé tous les étés avec des séances de devoirs intensifs qui ont sans aucun doute contribué à ma réussite scolaire, merci à elle également pour son extrême gentillesse et son soutien dans tous les moments de ma vie. Merci à ma mère qui a tout donné pour ses enfants. Elle a toujours été ma première supportrice, de mes premiers pas sur les

terrains de foot où elle hurlait « Aller bonhomme » au moindre touché de balle, jusqu'à ma soutenance de thèse où je la voyais discrètement souffler d'un air voulant dire : laisser le tranquille. J'ai beau être maintenant docteur je resterais toujours ton petit. Merci à ma tante et m'ont oncle, grande tante et grands oncles, cousins et cousines, qui m'ont eux aussi supporté et soutenus pendant toutes ces années. Merci à Michel mon beau père et Nicolas mon beau-frère d'être venu assister à ma thèse et de m'avoir supporté au cours de cette journée. Et pour terminer je veux remercier mes sœurs, Roro ton discours pendant ma soutenance m'a laissé les yeux humides. Tu te souviendras sûrement que ce n'est pas la première fois que tu me fais cet effet-là. Tu m'en as fait baver pendant notre jeunesse, je te dois un grand nombre de coups et de cicatrices en tout genre. On va dire que c'est bon pour le caractère, mais je dois reconnaître que tu m'as quand même pas mal défendu, de quoi forger un amour fraternel inconditionnel. Alice, tu as toujours été mon premier public pour mes pitreries et bêtises en tout genre, j'ai toujours senti le besoin de te faire rire et de t'embêter un peu. Ton soutien silencieux m'a toujours accompagné, pas besoin de mots pour qu'on se comprenne, ton regard en dit beaucoup. À mes sœurs que j'adore, merci pour toutes ces années.

Table des matières

Introduction.....	1
I. Le cancer.....	1
1. Histoire et classification de la maladie.....	1
2. Les bases moléculaires du cancer.....	3
a. Les facteurs de risques.....	4
b. Mutations « drivers » ou « passagers ».....	6
c. Les conséquences fonctionnelles.....	8
3. Le Microenvironnement tumoral.....	10
a. La matrice extracellulaire.....	11
b. Les fibroblastes associés au cancer (CAF).....	11
c. Cellules endothéliales et vascularisation.....	13
d. Les cellules immunes.....	14
<i>Les macrophages</i>	16
<i>Les cellules dendritiques</i>	18
<i>Les cellules « natural killer »</i>	19
II. Hétérogénéité intratumorale : La tumeur, un objet écologique.....	21
1. Origines et modèles théoriques.....	21
a. Hétérogénéité génétique.....	21
<i>Évolution linéaire</i>	22
<i>Évolution branchée</i>	22
<i>Évolution neutre</i>	23
<i>Évolution ponctuée</i>	24
b. Hétérogénéité non génétique.....	26
<i>Hétérogénéité épigénétique</i>	27
Hiérarchie cellulaire et cellules souches cancéreuses.....	28
<i>Fluctuations de l'expression génique et hétérogénéité quantitative</i>	29
<i>le micro-environnement tumoral</i>	30
2. Hétérogénéité phénotypique et dynamique des populations.....	31
Les Interaction clonales.....	32
<i>La compétition cellulaire</i>	32
<i>La coopération cellulaire</i>	33
III. La signalisation RAS.....	36
1. Ligands, récepteurs et régulateurs en amont de la voie.....	37
2. Les petites GTPase RAS.....	38
3. Effecteurs de RAS.....	42

<i>La voie PI3K/AKT</i>	42
<i>Voie de signalisation RAL</i>	44
Les kinases effectrices de la voie des MAPK	45
IV. La carcinogénèse hépatique.....	53
1. Le carcinome hépatocellulaire : physiopathologie.....	53
a. Etiologie du CHC	54
<i>Virus de l'hépatite B</i>	55
<i>Virus de l'hépatite C</i>	56
<i>Maladies alcooliques du foie</i>	58
<i>La stéato-hépatite non alcoolique</i>	60
b. Bases moléculaires et hétérogénéité tumorale	62
b.1 Evénements drivers et classification du carcinome hépatocellulaire	63
<i>Eviter la senescence réplivative</i>	63
<i>Maintenance du cycle cellulaire</i>	64
<i>La voie de signalisation Wnt/β-catenine</i>	65
<i>Voies Ras/MAPK et PI3K/AKT</i>	66
<i>Régulation épigénétique</i>	69
Stress oxydatif	69
b.2 Hétérogénéité intra-tumorale.....	70
c. Approches thérapeutiques	72
<i>Stades précoces et intermédiaires</i>	73
<i>Stades avancés</i>	74
2. Modèles expérimentaux pour l'étude du carcinome hépatocellulaire.....	75
a. Les modèles cellulaires	75
b. Les modèles de xéno greffes et allogreffes.....	77
c. Modèles de carcinogénèse chimiques et régimes.....	78
<i>Tétrachlorure de carbone (CCl₄)</i>	78
<i>Diethylnitrosamine (DEN)</i>	79
<i>Modèles de régimes alimentaires</i>	80
d. Les modèles génétiques	81
Travail de thèse et résultats	83
I. Questions biologiques et modèles expérimentaux.....	83
II. Résultats et articles de la thèse.....	85
Article principal de la thèse	85
Ras/MAPK signalling intensity defines subclonal fitness in a mouse model of primary and metastatic hepatocellular carcinoma.....	85

Abstract	85
Introduction.....	86
Results	87
Discussion	95
Materials & Methods	99
Acknowledgments	104
Bibliography.....	104
B. Annexes : Collaborations.....	111
Article 2 “CDK8 and CDK19 kinases have non-redundant oncogenic functions in hepatocellular carcinoma”	111
Article 3 “ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma”	112
Discussion et perspectives	113
I – Sélection d’un niveau optimal de signalisation RAS/MAPK	114
II – Impact de l’environnement sur la sélection sous-clonale	116
Bibliographie	122

Listes abréviations :

CRC : Colorectal cancer

SB : Sleeping beauty

SASP : Senescent associated secretory phenotype

TCGA : Tumor cancer genome atlas

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : Membrane metalloproteinases

LT : Lymphocyte T

LTc : Lymphocytes T cytotoxiques

LB : Lymphocytes B

LPS : Lipopolysaccharides

IFN γ : Interferon gamma

TAM : Tumor associated macrophages

M-CSF : Macrophages- colony stimulating factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophages- colony stimulating factor

DC : Dendritic cells

ITH : Intra tumoral heterogeneity

CSC : Cellules souches cancéreuses

EMT : transition epithelio-mesenchymateuse

JNK : c-Jun N-terminal kinase

Upd : Unpaired

JAK : Janus kinase

MITF : Microphthalmia associated transcription factor

SCLC : Small cell lung carcinoma

NE : Neuroendocrine

NEN : Non-neuroendocrine

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

EGF : Epidermal growth factor

FGF : Fibroblast growth factor

IGF : Insulin-like growth factor

NGF : Nerve growth factor

PDGF : Platelet derived growth factor

RTK : Receptor tyrosine kinase

EGFR : Epidermal growth factor receptor

RBD : Ras binding domain

NES : Nuclear export signal

NTS : Nuclear translocation signal

CHC : Carcinome hepatocellulaire

CCA : Cholangio-carcinome

HBV : Hepatitis B virus

cccDNA : covalently closed circular DNA

HCV : Hepatitis C virus

ALD : Alcoholic liver disease

AH : Alcoholic hepatitis

TLR4 : Toll-like receptor 4

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease

NASH : Non-alcoholic steato hepatitis

IRS-1 : insulin receptor substrate 1

NET : Neutrophil extracellular traps

TACE : Transarterial chemoembolization

OS : Overall survival

BMEL : Bipotential mouse embryonic liver

CCl₄ : Tétrachlorure de carbone

CCl₃ : trichlorométhyle

DEN : Diethylnitrosamine

M-CDD : Methionine-Choline deficient diet

HF-CD : High fat choline deficient diet

WD : Western diet

DAMPs : Damage associated molecular patterns

PAMPs : Pathogen associated molecular patterns

PRR : Pattern recognition receptor

Liste des tableaux

Tableau 1- Classification des principaux types de cancers.....	3
Tableau 2 – Interactions écologiques entre clones tumoraux.....	32

Liste des figures

Figure 1- Nombre de mutations en fonction du site tumoral.....	4
Figure 2 - Hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).....	10
Figure 3 - Phénotype sécrétoire des CAF.....	13
Figure 4 - le microenvironnement immunitaire.....	16
Figure 5 - Modèles théoriques d'évolution des cancers.....	25
Figure 6 - Hétérogénéité intratumorale fonctionnelle.....	27
Figure 7 - La protéine RAS switch binaire et mutation oncogéniques.....	39
Figure 8 - Spectre mutationnel de RAS oncogénique en fonction du type de cancer.....	41
Figure 9 - Effecteurs de RAS-GTP.....	45
Figure 10 - Transduction de signal et régulation spatio-temporelle de la voie MAPK.....	52
Figure 11 - Distribution géographique de l'incidence des CHC en fonction de etiologies.....	54
Figure 12 - Les différentes étiologies hépatiques.....	55
Figure 13 - Les plus fréquentes mutations du carcinome hépatocellulaire.....	62
Figure 14 - Classification moléculaire, histologique et clinique des carcinomes hépatocellulaire.....	64
Figure 15 - Gènes dérégulés dans le CHC.....	68
Figure 16 - Protocole de Barcelone pour la stratification et le traitement des patients.....	73

Introduction

I. Le cancer

1. Histoire et classification de la maladie

Les premières traces écrites de la maladie remontent à l'Égypte antique, où le papyrus Edwin Smith (daté autour 1500 av-JC) donne une description chirurgicale de la maladie en y prêtant des causes divines. On retrouve également des preuves archéologiques de néoplasies osseuses sur plusieurs espèces animales datant de 70 millions d'années (Capasso, 2005). C'est à Hippocrate, père de la médecine, que l'on doit l'appellation « Karkinoma », mal qui lors de sa propagation prend l'apparence de pattes de crabes, et donnera plus tard les mots carcinomes et cancer. L'école Hippocratique va chercher une origine rationnelle à la maladie, notamment Galien (130-210) définira cette dernière comme une accumulation d'humeurs noires liée à un mauvais équilibre des quatre humeurs fondamentales. Ils préconisent également la résection chirurgicale pour les tumeurs qui le permettent (« cacoethes ») ou l'abstinence thérapeutique pour celles qui menacent de ressurgir une fois retirées (« carcinos »). Durant la fin de l'antiquité et jusqu'au début de la renaissance, les préceptes Grecs vont prospérer en Orient et au sein de l'empire Byzantin. De nombreux savants donneront lieu à des classifications anatomiques des tumeurs, désormais reconnues par Paulus Aeginata (625-690) comme pouvant toucher tous les organes. Il suspectera également un possible rôle des nœuds lymphatiques axillaires dans les cancers du sein. Avenzoar (1091-1162), médecin syrien, décrira les symptômes des cancers de l'estomac et de l'œsophage. Ces connaissances seront reprises et enseignées dans les premières universités européennes notamment à Montpellier (1150) et Bologne (1158). Toutefois cette longue période ne voit naître ni nouvelle théorie pouvant expliquer l'origine de la maladie, ni d'amélioration thérapeutique (Papavramidou et al., 2010).

Il faudra attendre la renaissance pour voir Paracelse (1493-1541) remettre en cause les théories de Galien en proposant une nouvelle explication spirituelle de la maladie. Néanmoins à cette même période Gabrielle Fallopius (1523-1562) fera une distinction clinique entre les tumeurs bénignes : masse molle dont la forme bien définie est non adhérente aux structures avoisinantes ; et les tumeurs malignes : masse dure de forme irrégulière, s'étendant aux tissus environnants, et parfois entourée de vaisseaux sanguins. Cette classification est toujours utilisée

de nos jours. Le XVII^{ème} et XVIII^{ème} voient naître les premières théories permettant d'identifier des causes extérieures de la maladie. Bernardino Ramazzini (1633-1714) fait état d'une très faible incidence de cancer de l'utérus chez les nonnes et l'associe à l'absence d'activité sexuelle. En 1761, John Hill souligne le danger que peut représenter le tabac dans la susceptibilité au cancer. En 1775, Percivall Pott décrit le cancer du scrotum comme maladie professionnelle à forte incidence chez les ramoneurs et en suspecte une origine chimique. C'est à cette période que le cancer va également être pensé comme une maladie infectieuse potentiellement transmissible ce qui aura pour conséquence l'isolation des malades, relégués à l'extérieur des villes (Faguet, 2015).

Au début du XIX^{ème} siècle la démocratisation de la microscopie et l'avènement de l'anatomopathologie vont permettre l'apparition des premières théories cellulaires. Robert Remak (1815-1865) et Louis Bard (1829-1894) affirment que chaque cellule naît d'une autre cellule et que le cancer est issu de la transformation dégénérative du tissu normal. Alfred Velpeau, anatomiste français (1795-1867), théorise sur la présence au sein des cellules d'un élément essentiel que la science aura besoin d'identifier pour comprendre le développement du cancer. Il faudra attendre 50 ans et la découverte du matériel génétique pour que Theodor Boveri (1862-1915) démontre que des aberrations chromosomiques chez l'oursin peuvent mener à des néoplasies tissulaires (Wunderlich, 2002). La découverte de la radioactivité et des rayons X par Henri Becquerel, Pierre et Marie Curie à la fin du XIX^{ème} siècle va permettre le traitement des tumeurs non opérables par rayons ionisants. En 1910, Peyton Rous met en évidence un agent infectieux causant des sarcomes chez le poulet qui sera plus tard appelé le virus du sarcome de Rous (Rous, 1910). En 1942, un essai thérapeutique est lancé utilisant un dérivé du gaz moutarde, la moutarde azotée pour traiter un patient atteint d'un lymphosarcome avancé. Une réponse favorable au traitement est observée, mais la tumeur récidive quelques semaines plus tard. C'est le premier essai sur l'homme de drogues de chimiothérapie (Einhorn, 1985).

Durant la 2^{ème} moitié du XX^{ème} siècle et jusqu'à nos jours les progrès techniques et théoriques en biologie cellulaire, moléculaire, en génétique et médecine ont permis des avancées immenses dans la compréhension et la prise en charge du cancer. Toutefois, le cancer reste un problème majeur de santé publique. On dénombrait en effet plus de 18 millions de nouveaux cas en 2018 pour un total de 9,5 millions de morts dans le monde (<https://gco.iarc.fr/>). Mais qu'est-ce que le cancer et quelle compréhension en avons-nous à l'heure actuelle ?

Le déploiement de la vie sur terre a permis il y a au moins 2,1 milliards d'années le passage d'un état unicellulaire, au développement d'organismes multicellulaires complexes (Albani

et al., 2010). Les cellules qui les composent se spécialisent et se hiérarchisent en tissus, organes et systèmes pour participer aux fonctions essentielles de l'organisme. Ainsi, s'établissent une forte relation de coopération (Aktipis, 2016) et le contrôle « social » de l'expansion de populations cellulaires (Raff, 1992). En résumé, on peut considérer que le cancer est une forme de retour à l'état unicellulaire, une cellule devenu cancéreuse se place en marge de la hiérarchie tissulaire et prolifère de manière incontrôlée jusqu'à perturber le fonctionnement normal de l'organisme. Ces cellules vont former des tumeurs, qui constituent en elles même un écosystème complexe, et sont classées en fonction de leurs origines (voir Tableau 1).

Tableau 1- Classification des principaux types de cancers

Cellules d'origine	Classification
Epithéliales	Carcinomes
Mésenchymateuses	Sarcomes
Plasmocytes de la moelle	Myélomes
Sanguines	Leucémies
Ganglionnaires	Lymphomes
Mixtes	Mixtes

2. Les bases moléculaires du cancer

La transformation d'une cellule somatique saine en une cellule cancéreuse est un processus multi-étapes dont la base fondamentale est l'accumulation d'altérations génétiques telles que les amplifications, délétions, translocations et mutations ponctuelles. Ces dernières étant relativement peu fréquentes par rapport aux réarrangements chromosomiques (Chakravarthi et al., 2016). Le nombre d'altérations génétiques est toutefois très différent en fonction du type de cancer. En effet, on retrouve en moyenne une vingtaine de mutations pour les tumeurs de l'endomètre contre plus de 1000 pour un sous-type particulier de cancer colorectal (MSI) (Vogelstein et al., 2013) (voir **Figure 1**). Pour mieux comprendre cette hétérogénéité il faut s'intéresser aux trois principales causes de ses altérations, qui représentent également les facteurs de risques liés au cancer.

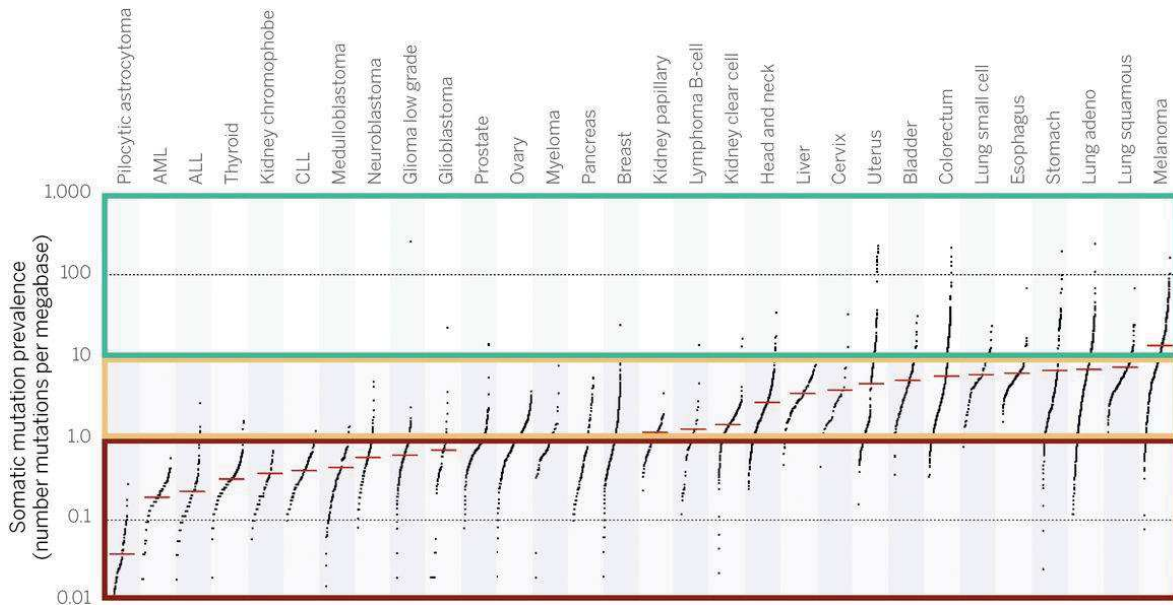


Figure 1- Nombre de mutations en fonction du site tumoral

(A partir de Schreiber and Schumacher, 2015) Le graphique décrit le nombre de mutation somatiques par megabase du génome en fonction du site tumoral. 10 mutations par mégabase correspondent à environ 150 mutation dans des séquences codantes.

a. Les facteurs de risques

Il en existe trois classes principales :

(1) Les erreurs liées à la machinerie de réplication de l'ADN. Les ADN polymérase et les systèmes de réparation du génome ne sont pas toujours fidèles et présentent un taux d'erreur moyen estimé à $1/10^9$ bases, équivalant à environ 3 mutations par division cellulaire (Lynch, 2010). Il est néanmoins important de noter que certaines mutations au niveau de gènes directement impliqués dans la machinerie de réplication vont considérablement augmenter ce taux d'erreur générant ainsi une forte instabilité génétique. Bien qu'étant controversée, une étude réalisée à partir des données génétiques de 423 tumeurs représentant 17 types de cancer en provenance de 69 pays différents a montré qu'il existait une très forte corrélation ($r = 0,8$) entre le risque de développer un cancer dans un tissu donné et le nombre de divisions effectuées par les cellules souches de ce même tissu. Cela sous entend que plus des 2/3 des cas de cancers seraient dus à des mutations aléatoires survenues au cours des divisions cellulaires (Tomasetti et al., 2017).

(2) Les mutations germinales héréditaires ou congénitales de gènes impliqués dans la tumorigenèse, bien que relativement rares, sont un facteur de risque fort pour le développement de cancer. Ces mutations sont présentes, habituellement à l'état de l'hétérozygote, dans l'ensemble des cellules somatiques de l'organisme. On peut citer comme exemple le syndrome de

Li-Fraumeni associé à des mutations germinales du gène TP53 qui prédispose à la formation de nombreux cancers dont les rhabdomyosarcomes, les liposarcomes, et les cancers mammaires précoces. Pour une personne atteinte de ce syndrome le risque de développer un cancer est entre 100 et 1000 fois supérieur à celui de la population normale (Varley, 2003). Le syndrome de Noonan en est un autre exemple. Il fait partie des RASopathies et est donc associé à des mutations dans des gènes de la voie RAS/MAPK. Il se caractérise par des dysmorphies faciales, des problèmes de développement cardiaque et un risque de développer un cancer multiplié par 8 (Tajan et al., 2018).

(3) Enfin, les facteurs environnementaux ont également un rôle important à jouer dans la susceptibilité au cancer, et peuvent être subdivisés en trois catégories :

- L'exposition à des facteurs d'origine biologiques, les agents infectieux sont notamment suspectés d'être responsables d'environ 10% des cas de cancers (Masrouf-Roudsari and Ebrahimpour, 2017). De nombreux virus sont associés à la tumorigenèse, toutefois leurs effets sont le plus souvent indirect via l'interaction avec des protéines endogènes ou le déclenchement de la réponse inflammatoire. On peut citer l'exemple de protéine E6 de certains sous-type du Human Papilloma virus (HPV), qui inactive p53 et la protéine E7 du même virus qui cible le retinoblastome (Rb), empêchant ainsi leurs actions anti-oncogéniques (Münger et al., 2004). Une étude conduite au laboratoire a également montré que l'expression dans des progéniteurs hépatiques de NS5A, protéine virale du virus de l'hépatique C, induisait l'activation du facteur de transcription Twist2 responsable d'une transition épithélio-mésenchymateuse (Akkari et al., 2012). Certaines bactéries peuvent également favoriser le développement de tumeurs. L'équipe de Hans Clever a récemment montré que l'injection répétée d'une souche pathogène d'*Escherichia.Coli* (*pks+*) dans la lumière d'organoides intestinaux induisait chez les cellules en contact avec cette dernière une signature mutationnelle est retrouvée dans plus de 5876 cas de cancers. Cette signature est liée à la production de colibactine par la bactérie, une toxine pouvant provoquer des cassures double brin de l'ADN (Pleguezuelos-Manzano et al., 2020).

- Les agents mutagènes physiques augmentent également fortement le risque de développer un cancer. L'exposition répétée et/ou à forte dose de rayons-X et à la radioactivité induit la formation des radicaux libres provoquant des cassures doubles brins de la molécule d'ADN, qui sont susceptibles de générer des altérations génétiques (Bonura et al., 1975). Les rayonnements UV quant à eux induisent des dimères entre les bases de thymine et sont donc responsables de

nombreuses mutations génétiques. Une forte exposition aux UV est notamment associée à un risque accru de développer des mélanomes (Jhappan et al., 2003).

- Les mutagènes chimiques interagissent directement avec la molécule d'ADN induisant des modifications des bases azotées, des intercalations, de mauvais appariements de bases, et des cassures de l'ADN. Il en existe de nombreuses classes dont les agents alkylants, comme les sels de platine, ou non alkylant, comme les formaldéhydes. Certains sont des toxines produites par des bactéries ou champignons comme l'aflatoxine B1, associé au risque de cancer du foie. D'autres sont simplement retrouvés dans les produits qui nous entourent comme les nitrosamines présents dans la fumée de cigarette, qui augmentent le risque de cancer du poumon (Singer and Kuśmierk, 1982).

En conclusion, le profil mutationnel d'un type de cancer donné est dépendant de sa cellule d'origine, son environnement et ses propriétés intrinsèques mais aussi de ses expositions à des facteurs extrinsèques. Il est important de noter qu'au sein même d'un type de cancer chaque cas à son historique et ses caractéristiques propres, chaque tumeur est donc unique. On parle alors d'hétérogénéité intertumorale ou interpatient.

b. Mutations « drivers » ou « passagers »

Toutes les altérations génétiques retrouvées dans les tumeurs ne sont cependant pas à même d'avoir un impact sur son développement ou son évolution. Elles sont classifiées en fonction des conséquences phénotypiques qu'elles vont engendrer.

Les mutations de gènes dits « driver » sont celles qui vont conférer un avantage sélectif à la cellule qui les exprime, permettant ainsi son expansion (Stratton et al., 2009). Ils sont subdivisés en deux catégories : Les suppresseur de tumeurs, gènes dont la mutation oncogénique induit une perte de fonction de la protéine mutée et les oncogènes, qui sont caractérisés par un phénotype de gain de fonction dans le cancer. En s'appuyant sur l'augmentation graduelle de la mortalité liée au cancer avec l'âge et le temps de latence nécessaire au développement de la maladie suite à l'exposition à des carcinogènes, des modèles mathématiques ont indiqué qu'au moment de la détection clinique, la tumeur était la résultante d'au moins 5 à 7 événements (Armitage and Doll, 1954). En combinant l'études des modèles expérimentaux et les analyses génétiques globales des tumeurs humaines, on estime désormais que le nombre d'événements drivers peut varier entre 2 et 55 mutations, en fonction du type de tumeur, pour un total de 299 gènes drivers identifiés (Bailey et al., 2018). Dans le cas du cancer colorectal (CRC) par exemple, le processus de transformation nécessite dans un premier temps une mutation d'APC, puis KRAS, suivis de

SMAD4 et TP53. Certaines théories suggèrent également que l'ordre dans lequel ces mutations interviennent est important, la mutation d'APC suivie de KRAS n'étant pas équivalent à KRAS puis APC (Levine et al., 2019). En effet, en utilisant le système de transposase « *Sleeping Beauty* » (SB), une équipe a réalisé des mutations insertionnelles aléatoires dans 4 fonds génétiques de souris présentant les mutations suivantes : APC^{min}, KRAS^{G12D}, Smad4^{KO}, p53^{R175H}. Selon la lignée, la mutagenèse aléatoire n'a pas eu le même effet sur la dynamique d'apparition des tumeurs, avec une survie moyenne de 18 semaines pour les souris APC^{min}, 40 semaines pour KRAS^{G12D}, 53 semaines pour Smad4^{KO} et 54 semaines pour p53^{R175H}. Plus le gène initialement muté est précoce dans le CRC, plus la dynamique d'apparition est rapide. De plus, l'analyse des tumeurs KRAS^{G12D} et p53^{R175H} a montré que la séquence SB est le plus souvent insérée au niveau du gène APC induisant une perte de fonction de la protéine. Pour les souris Smad4^{KO} l'insertion a le plus souvent lieu dans des gènes impliqués dans la signalisation APC/ β -caténine. Ces données suggèrent fortement que l'activation de cette voie est nécessaire comme élément initiateur de la tumorigenèse colorectale (Takeda et al., 2015). L'idée qu'une mutation acquière le caractère « driver » en fonction du contexte cellulaire peut également expliquer pourquoi une mutation germinale de ce gène induira préférentiellement l'apparition d'un type spécifique de cancer (Agarwal et al., 2017).

La prolifération incontrôlée et l'instabilité génétique des cellules tumorales génèrent également l'apparition d'un grand nombre de mutations passagères (« passenger »), qui représentent la majorité du profil mutationnel de la tumeur. Ces événements aléatoires ont longtemps été considérés comme neutres pour l'évolution tumorale, toutefois, elles peuvent potentiellement cibler des gènes et mécanismes qui ont un impact sur le « fitness » des cellules. En effet, la modélisation informatique a mis en évidence l'effet délétère d'un taux élevé de ces mutations sur la progression tumorale. L'évolution tumorale serait ainsi constituée de cycles successifs dans lesquels l'apparition d'une mutation driver augmente fortement le potentiel prolifératif des cellules avant d'être ralenti par l'accumulation de mutations passagers (McFarland et al., 2013). Cette théorie a également été validée expérimentalement : des cellules MCF-10 génétiquement stables ont été soumises à des faibles doses d'agents mutagènes, qui après l'arrêt du traitement ont fortement perturbé le temps de doublement de cellules ainsi traitées. De même, *in vivo*, le croisement d'un modèle murin de carcinogénèse mammaire (Her2 positif) avec des souris H2AX^{+/-}, qui sont déficientes pour la réparation efficace des cassures ADN double brin, a fortement retardé l'apparition des tumeurs (McFarland et al., 2017). Ces résultats spectaculaires mettent en exergue le rôle complexe de l'instabilité génétique dans le cancer : jusqu'à un certain niveau de l'instabilité, elle constitue un fort facteur de risque, au-delà

de ce seuil elle diminue la viabilité de cellules cancéreuses. La mise en perspective de cette théorie peut expliquer en partie l'évolution très lente et les longues périodes de dormance de certains cancers. Cependant, les mutations passager constituent également un fantastique réservoir pour permettre l'adaptabilité de la tumeur aux variations environnementales. L'apparition de la mutation T315I de l'hybride protéique BCR-ABL par exemple, n'apporte aucun gain de fitness dans le cas des leucémies myéloïdes. Néanmoins, si le patient est traité à l'imatinib, un inhibiteur spécifique de ce complexe, la mutation va permettre la résistance au traitement et donc l'expansion des cellules qui la porte (Pricl et al., 2005).

c. Les conséquences fonctionnelles.

L'apparition d'une mutation driver mène à des conséquences fonctionnelles pour la cellule, lui permettant de se reproduire de manière plus efficace. L'ensemble des recherches sur ces mécanismes a mis en évidence la dérégulation de nombreuses voies de signalisations et mécanismes cellulaires, qui sont très souvent touchés à plusieurs niveaux. Robert A. Weinberg et Douglas Hanahan ont regroupés ces mécanismes dans leurs célèbres revues « Hallmarks of cancer » définissant ainsi les caractéristiques que doit acquérir une cellule pour devenir tumorale. Elles incluent : l'instabilité génétique, le maintien de l'immortalité réplivative, le maintien de la prolifération cellulaire, l'inhibition des suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'invasion et la formation de métastases, la dérégulation du métabolisme énergétique, l'angiogénèse, la promotion de l'inflammation et la prévention la destruction immune (Voir **Figure 2**) (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Toutefois ces hallmarks (ou « marque de fabrique ») ne doivent pas être assimilés à un ensemble de cases à cocher pour qu'une cellule puisse être définie comme cancéreuse. En effet, nombre de ces mécanismes et leurs conséquences positives ou négatives sur le développement tumoral sont hautement dépendants du contexte cellulaire et environnemental. Nous avons précédemment évoqué les effets négatifs que pouvaient avoir une trop forte instabilité génétique sur le développement tumoral. L'entrée ou non des cellules en sénescence est un autre exemple d'un hallmark pouvant avoir des effets contradictoires. En effet, qu'elle soit réplivative ou liée à la surexpression d'un oncogène, la sénescence est vue comme un mécanisme suppresseur de tumeur, notamment via la sortie du cycle cellulaire et l'arrêt de la prolifération. Les cellules senescentes sécrètent de nombreux facteurs que l'on qualifie de SASP (« Senescence associated secretory phenotype »). Ces facteurs sont essentiellement des cytokines, des facteurs de croissances, des protéases, et des lipides. En accord avec l'effet suppresseur de tumeur de la sénescence, il a été montré que la ré-expression de

p53 dans des progéniteurs hépatiques pré-néoplasiques induisait leur entrée en sénescence et la sécrétion de SASP qui a pour conséquence l'élimination de ces lésions par le système immunitaire inné (Xue et al., 2007). Cependant la présence de cellules sénescents en périphérie de tumeurs hépatiques établies induit l'expression de CCL2 qui va bloquer l'action cytotoxique des cellules NK et favoriser la progression tumorale. Dans ce contexte, la sénescence a un rôle suppresseur de tumeur au moment de l'initiation, mais devient pro-oncogénique lors du développement tumoral (Eggert et al., 2016). D'autres études décrivent également l'effet pro-inflammatoire et pro-tumorigène de la sécrétion d'IL-6, IL1- α , et CXCL8 par les cellules sénescents (Coppé et al., 2008; Ritschka et al., 2017). Cette dichotomie se retrouve également dans d'autres mécanismes du développement tumoral. L'autophagie notamment, va tantôt ralentir la progression de la maladie, tantôt être utilisée comme source de nutriments pour les cellules avoisinantes (White and DiPaola, 2009). La présence au sein de la tumeur de cellules se « sacrifiant » au bénéfice du développement tumoral met en lumière un autre aspect de la biologie du cancer, l'hétérogénéité intra-tumorale. De ce point de vue les hallmarks peuvent être abordées comme un ensemble de caractéristiques indispensables au cancer, mais pas nécessairement présentées par l'ensemble des cellules qui composent la tumeur (Almendo et al., 2013). L'hétérogénéité intra-tumorale et ses aspects fonctionnels occupent une part importante dans mon travail de recherche, ils seront évoqués plus en détails dans la deuxième partie de cette introduction.

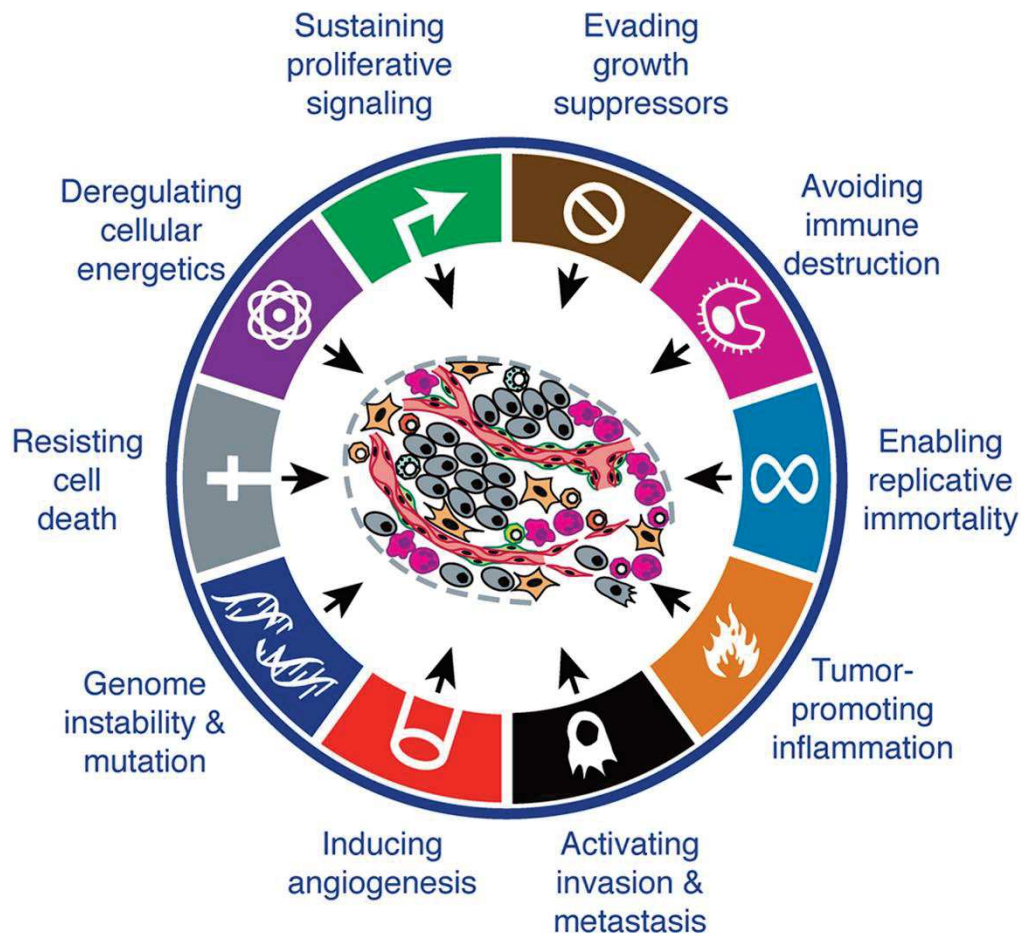


Figure 2 - Hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2011)

3. Le Microenvironnement tumoral

L'adaptation à l'environnement est l'une des caractéristiques essentielles au développement de la vie. Le remaniement du biotope ou l'acclimatation à des conditions extrêmes ont en effet permis à certaines formes de vie de survivre et prospérer. Les cellules tumorales évoluent également dans un environnement complexe et ne font donc pas exception à cette règle. Ce microenvironnement, aussi appelé stroma, est essentiellement constitué de matrice extracellulaire, de cellules infiltrantes et de cellules résidentes du tissu sain. La tumeur est donc le site de nombreuses interactions hétérotypiques qui affectent plusieurs aspects de son développement.

Dans cette partie les différents composants du stroma des carcinomes et leurs rôles dans la tumorigénèse seront brièvement introduits.

a. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un assemblage de macromolécules qui composent l'environnement extérieur aux cellules. Elle est principalement constituée d'un maillage protéique, comprenant notamment des fibres de collagènes, de l'élastine, des laminines, et des glycoprotéines. La MEC a un rôle structural qui est important pour l'adhésion et la migration des cellules ; elle permet également la capture de molécules de signalisation cellulaire, comme les facteurs de croissances et les cytokines (Walker et al., 2018). Les cellules tumorales ont la capacité de dégrader la matrice via la sécrétion de protéases, par exemple de la famille des métalloprotéases (MMP), facilitant ainsi la progression et la migration (Liotta et al., 1980). Dans certains cas ces protéases influencent indirectement la signalisation cellulaire, par exemple la sécrétion d'ADAM 12-S permet l'activation de facteurs de croissances capturés dans la matrice (e.g. l'IGFBP-3) alors que le relargage d'ADAM 10 induit le clivage de Fas ligand inhibant ainsi son action pro-apoptotique (Kirkin et al., 2007; Loechel et al., 2000). La matrice, en particulier les fibres de collagènes peuvent également être remodelées par les fibroblastes ou d'autres composants du stroma. En conséquence, la rigidité de la MEC est affectée permettant ainsi la formation de « routes » migratoires sur lesquelles les cellules tumorales pourront se déplacer. Ces déformations du milieu mènent également à mise en place de phénomènes de méchanotransduction intracellulaire (e.g. signalisation FAK) qui favorise la motilité et la migration cellulaire (Fang et al., 2014).

b. Les fibroblastes associés au cancer (CAF)

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes d'origine mésenchymateuse retrouvées dans les tissus conjonctifs. En conditions normales, ils sont maintenus dans un état quiescent et interviennent principalement dans la synthèse et la sécrétion de l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire. En cas de stress et particulièrement lors de la réponse à la blessure, l'activation des fibroblastes par des facteurs sécrétés (e.g. TGF- β , FGF) induit leur migration et prolifération. Ces cellules acquièrent alors des propriétés contractiles et inflammatoires qui sont nécessaires dans ces conditions. Ils sont discriminés des fibroblastes quiescents grâce à différents marqueurs

comme l'expression de FAP ou α SMA, on parle alors de myofibroblastes (Kalluri, 2016). Plusieurs études suggèrent que les cellules tumorales sécrètent les facteurs qui activent les fibroblastes (Monteran and Erez, 2019; Stuelten et al., 2005). Les fibroblastes semblent en effet infiltrer la tumeur très tôt au cours de leur développement, leur présence ayant été détectée dans des tumeurs bénignes pulmonaires et colorectales (adénomes). A cette étape, ces cellules présentent des caractéristiques très proches des myofibroblastes dont le rôle lors de la tumorigénèse reste encore mal compris. Quelques études suggèrent cependant que ces cellules présentent une action anti-tumorale via la régulation de la signalisation TGF- β ou l'initiation de la réponse immune (Cheng et al., 2005; Nazareth et al., 2007). Toutefois lors de l'évolution de la maladie les fibroblastes subissent une reprogrammation qui induit un phénotype essentiellement pro-tumoral, on parle alors de « Cancer associated fibroblasts » ou CAF. Cette reprogrammation semble être majoritairement sous le contrôle de mécanismes épigénétiques qui permettent l'auto-activation irréversible des fibroblastes (Li et al., 2015; Mrazek et al., 2014). Les CAF présentent alors un phénotype sécrétoire qui leur permet de modifier la physiologie tumorale à plusieurs niveaux (voir Figure 3). En particulier la sécrétion de facteurs de croissances (HGF, EGF, IGF etc..) favorise la prolifération, la survie et la motilité des cellules tumorales. Un autre aspect important de la biologie des CAF est leur capacité à remodeler le micro-environnement tumoral. Par exemple, l'alignement des fibres de fibronectine par les CAF entraîne les cellules tumorales dans leur sillage permettant ainsi leur migration directionnelle (Erdogan et al., 2017). De plus, une étude a montré que les CAF sont capables de préparer la niche métastatique via la sécrétion du facteur de croissance endothélial (VEGF α) et de Tenascin-C, induisant ainsi néo-angiogenèse et remodelage de la matrice au site à coloniser (O'Connell et al., 2011). Il est toutefois intéressant de noter que les fibroblastes associés aux carcinomes sont composés de plusieurs sous-populations qui diffèrent de par l'expression de certains marqueurs mais également de par leurs fonctions (Pelon et al., 2020). En particulier, une étude a mis en évidence quatre sous-populations de CAF, issues de carcinomes mammaires. Une de ces populations a la capacité d'induire l'infiltration de lymphocytes T (LT) via la sécrétion de CXCL12. Cette action va mener à la différenciation des LT en LT régulateurs (FOXP3+) qui limitent l'action cytotoxique des cellules T effectrices (Costa et al., 2018). En résumé, les CAF sont des fibroblastes maintenues dans un état d'activation permanent, ils stimulent les cellules cancéreuses et remodelent leur environnement régulant ainsi de nombreux aspects du développement tumoral.

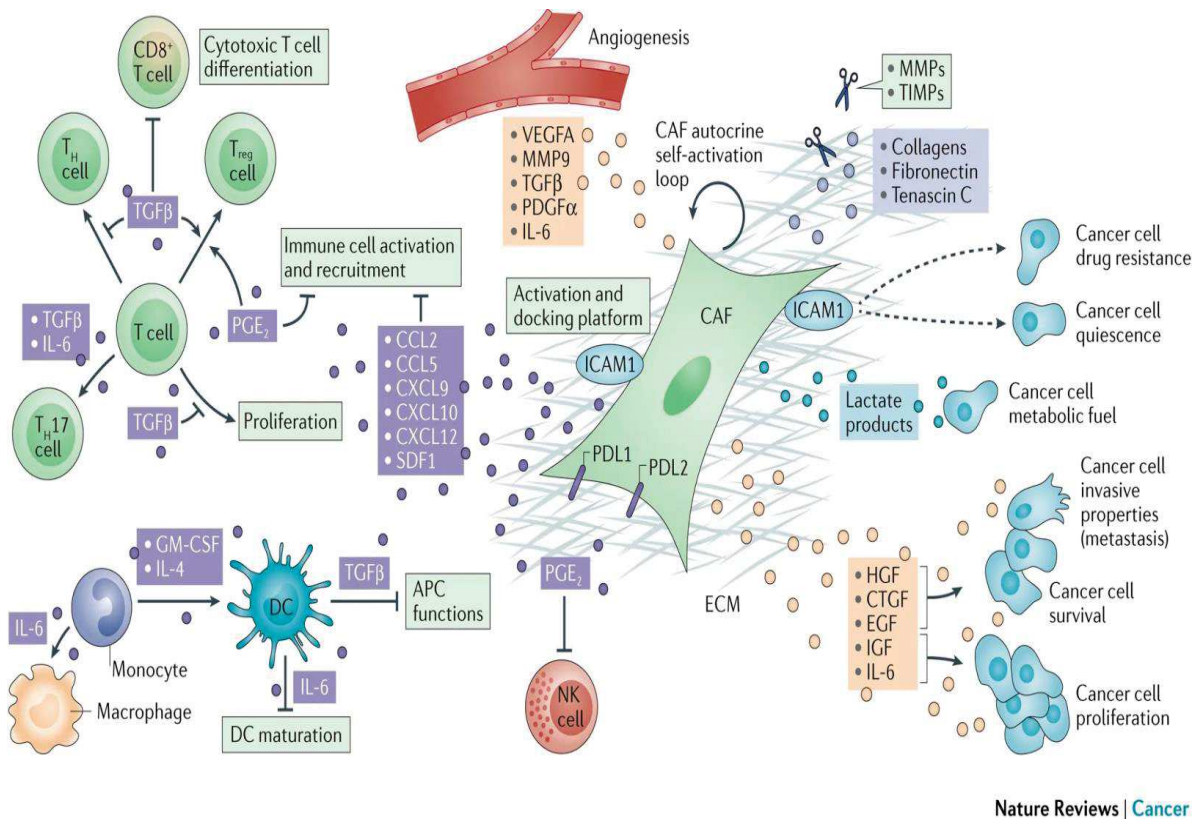


Figure 3 - Phénotype sécrétoire des CAF

Les CAF produisent un grand nombre de protéines qui impactent la survie, la prolifération, le métabolisme des cellules cancéreuses et induisent le remodelage de la matrice extracellulaire (Droite de la figure). En parallèle d'entre elles comme le TGF- β et le VEGF α permet de maintenir l'activation et promouvoient l'angiogénèse. La production de cytokines a également des conséquences sur la régulation de la réponse immunitaire et impacte de nombreuses fonction comme l'activation des cellules T, la présentation d'antigène ou l'action des cellules natural killer (Kalluri et.al, 2016).

c. Cellules endothéliales et vascularisation

Les cellules endothéliales sont l'un des composants principaux des vaisseaux sanguins qui permettent la vascularisation et l'apport en nutriment nécessaires au maintien des tissus. Les tumeurs, en raison de leur développement rapide, exigent un apport important en nutriments et en oxygène. En effet, plusieurs études suggèrent que la croissance tumorale est limitée dans des

conditions ne permettant pas une vascularisation efficace (Muthukkaruppan et al., 1982). En conditions normales, les cellules endothéliales matures ne prolifèrent pas, toutefois la stimulation par le VEGF α et TGF- β induit leur entrée dans le cycle cellulaire. En conséquence, de nouveaux vaisseaux vont se former par bourgeonnements, c'est la néo-angiogenèse (Nishida et al., 2006). En plus des CAF, les cellules tumorales sont elles aussi susceptibles d'induire l'angiogenèse via la sécrétion de VEGF α . En effet il a été montré que le stress lié à l'absence d'oxygène (hypoxie) induisait la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α qui contrôle l'expression de VEGF α (Olenyuk et al., 2004). L'angiogenèse est cependant un mécanisme complexe qui nécessite l'activation et l'inhibition de plusieurs facteurs et de nombreux composants du microenvironnement tumoral sont impliqués dans sa régulation. Les monocytes et les cellules qui en dérivent (macrophages, neutrophiles etc...) produisent notamment un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques et facilitent le bourgeonnement des nouveaux vaisseaux (Palma et al., 2017). Les cellules immunes sont également impliquées dans la régulation de l'angiogenèse, en particulier via la production de cytokines qui peuvent avoir des effets sur la différenciation des monocytes (Andreu et al., 2010). Toutefois, la vasculature nouvellement produite n'est pas complètement fonctionnelle. En effet les péricytes, cellules entourant normalement les vaisseaux et limitant leur perméabilité y sont beaucoup moins nombreux que dans l'endothélium normal. L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux facilite alors l'extravasation des cellules tumorales qui peuvent plus facilement coloniser des sites métastatiques (Morikawa et al., 2002). Les vaisseaux sont également plus fragiles et ont tendance à se rompre ou à fuir ce qui participe au maintien d'un environnement inflammatoire et induit l'activation des plaquettes, également capables de stimuler l'angiogenèse et favoriser la formation des métastases (Bambace and Holmes, 2011). En résumé l'induction de l'angiogenèse a essentiellement un rôle pro-tumorigénique, ce qui a poussé au développement de thérapies visant à cibler ces mécanismes. Malheureusement, ces drogues et en particulier les inhibiteurs de VEGF α , sont relativement peu efficaces en clinique et mènent à l'apparition de mécanismes de résistances. En revanche, leurs associations récentes avec des immunothérapies a donné des résultats encourageants dans des modèles précliniques (Kashyap et al., 2020).

d. Les cellules immunes

La transformation induit un grand nombre de changements pour la cellule, en particulier elle provoque l'expression d'antigènes de surfaces et la modification du sécrétome cellulaire. Ces perturbations induisent l'infiltration et l'activation des cellules du système immunitaire ou

leucocytes, qui sont responsables de la réponse inflammatoire. Ces cellules sont parmi les principaux constituants du microenvironnement tumoral qui dans le cadre d'une réponse efficace permettent la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses. Toutefois les cellules tumorales développent différentes stratégies pour échapper à la réponse immune et vont même jusqu'à la détourner pour favoriser leur progression (Cohen and Cohen, 1978) (Voir **Figure 4**). Ces perturbations passent par une modification drastique de l'homéostasie tissulaire qui affecte l'ensemble des cellules immunes. Ces dernières dérivent des cellules souches hématopoïétiques et se subdivisent en deux lignages principaux : (1) les cellules myéloïdes comprenant les monocytes (macrophages et cellules dendritiques) et les granulocytes (éosinophiles, neutrophiles et basophiles). (2) Les cellules lymphoïdes sont subdivisées en trois grandes classes : les cellules Natural Killer (NK), les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). Ces différents types cellulaires sont interdépendants et chacun produit une réponse spécifique nécessaire à la défense de l'organisme, en conséquence le moindre dérèglement est susceptible de perturber cet équilibre. Pour des raisons pratiques, dans cette partie nous allons principalement nous concentrer sur la description des types cellulaires pertinents dans le cadre de mon projet expérimental. A savoir le rôle des macrophages, des cellules dendritiques et des NK dans la réponse anti-tumorale et certains des moyens par lesquels la tumeur détourne leurs actions à son avantage. Ajouter une illustration qui résume les interactions entre cellules immunes et cellules cancéreuses)

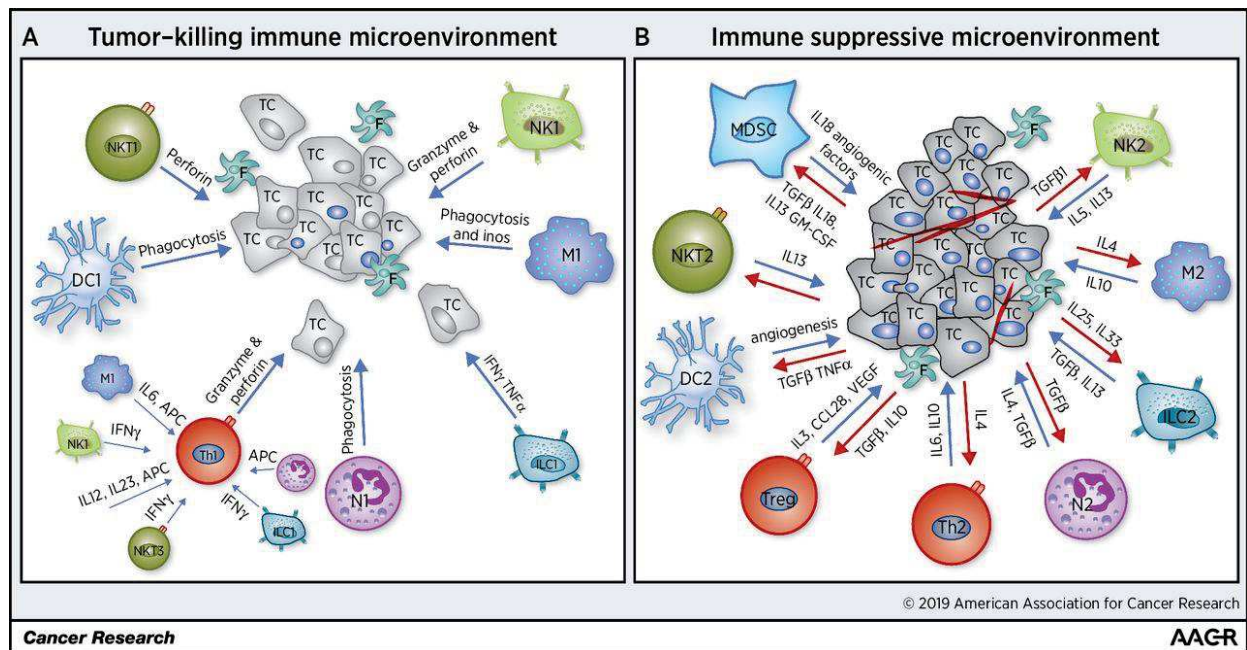


Figure 4 - le microenvironnement immunitaire

(A) Les cellules immunitaire sont activés suite à la croissance tumorale et participent à l'homeostasie tissulaire en éliminant les cellules cancéreuse (TC). **(B)** La réponse inflammatoire chronique et la sécrétion de cytokines (IL-10, TGF-β, IL-β, GM-CSF...) par les cellules tumorales oriente le système immunitaire vers un phénotype pro-tumomurigénique et un environnement immunosupresseur. (Hinshaw and Shevde, 2019)

Les macrophages

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose et sont présents dans tous les tissus de l'organisme où ils participent au maintien de l'homéostasie tissulaire. Les macrophages résidents proviennent de la poche vitelline embryonnaire et sont spécifiques de leurs tissus de résidence (Ly6C⁻ et F4/80^{med/high}). Ils acquièrent alors des caractéristiques spécifiques et on les nomme cellules Kupffer dans le foie, microglia dans le cerveau ou encore « Large peritoneal macrophages » (LPM) dans la cavité péritonéale. On les distingue notamment des macrophages circulants issues de la différenciation des monocytes (Ly6C⁺ et F4/80^{low}) qui infiltrent et « patrouillent » au sein des tissus suite à un stimulus (infection, blessure etc...). Ces deux populations de macrophages sont impliquées dans la réponse immune innée mais elles font aussi le lien avec l'immunité acquise et participent à la régulation de l'angiogenèse, (Wynn et al., 2013). Il est toutefois important de noter que l'ensemble de ces fonctions ne sont pas assurées par tous les macrophages. Il existe en effet un grand nombre de sous populations et ce sont les stimuli environnementaux qui induisent la polarisation des macrophages, déterminant ainsi leur

phénotype. Classiquement les macrophages sont subdivisés en deux catégories : (1) Les M1 sont par exemple activés par les lipopolysaccharides (LPS) bactériens et l'interféron gamma (IFN γ) et arborent un phénotype pro-inflammatoire et pro-immunogénique (2) Les M2 peuvent être activés par l'interleukine 4 (IL4) et l'interleukine 13 (IL13) et sont à l'inverse définis comme anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (Lawrence and Natoli, 2011). Ces deux états sont réversibles et leur distinction se base généralement sur l'expression de plusieurs marqueurs associés au phénotype M1 ou M2. Cependant, certaines études ont révélé l'existence de macrophages ne correspondant à aucune des catégories ou exprimant simultanément des marqueurs M1 et M2 (El Kasmi et al., 2008; Torroella-Kouri et al., 2009). Ces observations suggèrent la présence d'états intermédiaires et d'autres populations, la classification binaire M1 vs M2 ne représente donc pas toute l'hétérogénéité des macrophages. Lors du développement tumoral les différents signaux produits par les cellules cancéreuses et le microenvironnement induit l'infiltration de monocytes circulants et la polarisation des macrophages résidents. Comme la plupart des cellules stromales, les macrophages sont reprogrammés pour favoriser le développement tumoral, on parle alors de « tumor associated macrophages » (TAM). En effet, les TAM possèdent des caractéristiques proches des macrophages M2 et leur polarisation peut être directement induite par les cellules tumorales. En particulier une étude a montré que la production d'acide lactique par les cellules tumorales, conséquence d'un métabolisme glycolytique (effet Warburg), induisait chez les macrophages, l'expression d'arginase1 (ARG1) et de VEGF α ainsi que leur polarisation M2 favorisant le développement tumoral (Colegio et al., 2014). De manière intéressante, l'équipe de Johanna Joyce a montré que le blocage du récepteur CSF1R, important pour la différenciation et la survie des macrophages suite à la stimulation par le « Macrophages-Colony Stimulating Factor » (M-CSF ou Csf1), induisait la régression de glioblastomes suite à la reprogrammation des TAM en macrophages de phénotype M1 (Pyonteck et al., 2013). La polarisation des TAM peut également être contrôlée indirectement par la réponse immune. Par exemple, une étude menée à partir d'un modèle murin de carcinome épidermoïde a montré que la présence de néo-antigènes tumoraux induisait l'infiltration de Lymphocytes B et la production de complexes d'immunoglobulines. En provoquant la déplétion des cellules B et l'inhibition des complexes, les auteurs ont observé la reprogrammation des TAM en macrophages M1 et l'infiltration de lymphocytes T cytotoxiques (LTc) limitant le développement tumoral (Affara et al., 2014). Ces résultats mettent également en évidence l'effet des TAM sur l'inhibition de la réponse T cytotoxique qui est en partie dépendante de l'expression de PD-L1 par les TAM, induisant ainsi la mort par apoptose des LTc exprimant PD-1 (Kuang et al., 2009). En résumé, les macrophages constituent un maillon essentiel à la régulation du microenvironnement et intègrent

un grand nombre de signaux qui vont avoir des conséquences fonctionnelles importantes sur l'évolution de la maladie. Cela en fait donc une cible de choix pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont un ensemble hétérogène de cellules immunes qui dérivent des progéniteurs myéloïdes. Les DC sont composés de 3 classes qui sont définies en fonction de leurs origines et des marqueurs qu'elles expriment : (1) les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC : Ly6C⁺, TLR7/9⁺) dont les fonctions principales sont la production d'interféron de type I (IFN α et β) et le contrôle de l'auto-immunité (Swiecki and Colonna, 2015). (2) Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC : CD11b⁺, CD11c⁺, CD24⁺) sont capables d'internaliser des antigènes issues de cellules mortes et d'éduquer les LT pour induire la réponse immune adaptative. (3) Les cellules dendritiques dérivés de monocytes (moDC : CD11b⁺, CD11c⁺, Fc γ R1⁺) sont difficilement distinguables des macrophages et sont elles aussi capables de présenter l'antigène (Gardner and Ruffell, 2016). L'ensemble de ces sous populations de cellules dendritiques ont été observés dans des tumeurs. Plusieurs études soutiennent que leur infiltration lors des stades précoces est associée à un phénotype suppresseur de tumeur qui est perdu lors des stades de développements tardifs (Scarlett et al., 2012). Ces résultats suggèrent une modulation des fonctions de ces cellules au cours du développement tumoral qui a été particulièrement étudié dans le cas des cellules dendritiques conventionnelles. Les cDC sont eux même subdivisés en deux catégories : (1) Les cDC1 sont présentes en très faibles proportions dans les tumeurs (environ 10% des DC total) et une fois activées ont la capacité de migrer dans les ganglions lymphatiques pour induire la réponse immune des LT CD8⁺. (2) Les cDC2 sont présentes en bien plus grande quantités au site tumoral et sont capables d'induire l'activation des LT CD4⁺. En revanche, leur capacité à migrer dans les ganglions est limitée et certaines études suggèrent qu'elles joueraient plutôt un rôle dans l'éducation du système immunitaire au niveau des structures lymphoïdes tertiaires (Mildner and Jung, 2014). Dans un contexte immunitaire actif la présence de corps apoptotiques tumoraux provoque l'infiltration des DC dans la tumeur et leur phagocytose par ces derniers. La production d'interféron de type 1 et de FLT3 par les pDC va permettre la différenciation des cDC en cellules présentatrices d'antigènes qui expriment alors un grand nombre de molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD137... etc) (Wculek et al., 2020). Les cDC2 sont alors capables de stimuler in-situ la réponse T auxiliaire (Th2, Th17) alors que les cDC1 vont terminer leur maturation et acquérir l'expression de CCR7 pour permettre la migration dans les ganglions et l'éducation des LT CD8⁺ (Roberts et al., 2016). Néanmoins la mise

en place d'un environnement immunosuppresseur au cours du développement tumoral va impacter ces réponses à plusieurs niveaux. En effet, une étude montre que l'activation de la signalisation β -caténine dans un modèle murin de mélanome empêche la production de CCL4 essentielle à la migration des DC au site tumoral. En conséquence, ces tumeurs sont dites « froides » sans infiltrats immunitaires et réponse T active (Spranger et al., 2015). L'expression de VEGF α par les TAM ou les CAF a également des conséquences sur la maturation des DC en inhibant la production de la cytokine FLT3, favorisant également l'évasion immunitaire (Ohm et al., 1999). La mise en place de cet environnement induit aussi l'expression de plusieurs molécules inhibitrices de l'activation des cellules T comme PDL1 renforçant ainsi l'immunotolérance (Rowshanravan et al., 2018).

Les cellules « natural killer »

Les cellules natural killer (NK) sont un autre type des cellules du système immunitaire inné originaire de la moelle osseuse. Elles expriment des antigènes de surfaces notamment CD56 et NKG2D chez l'homme et de NK1.1 et CD49b chez la souris C57BL/6. La principale particularité des cellules NK est leur capacité à induire la mort des cellules ciblées sans reconnaissance antigénique médiée par le récepteur de cellule T (TCR) (Shimasaki et al., 2020). Contrairement aux cellules T, les NK sont éduquées pour reconnaître directement les complexes majeurs d'histocompatibilités de type I (CMHI ou HLA) indépendamment de la présentation d'antigène. Cette reconnaissance est assurée par l'interaction du CMHI avec les récepteurs d'inhibition de la réponse cytotoxique, exprimées en surface des NK (Raulet and Vance, 2006). Cependant, en cas de stress induit par la transformation oncogénique ou une infection virale les CMHI sont internalisés et des molécules HLA spécifiques comme MICA et MICB sont exprimées à la surface des cellules. En conséquences, la suppression des signaux inhibiteurs et l'interaction de MICA ou MICB avec des récepteurs d'activation (par ex : NKG2D) va induire la sécrétion de perforine et la mort par apoptose des cellules cibles (Ghadially et al., 2017). L'activation des NK est donc principalement contrôlée par la balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs de ses récepteurs de surfaces, mais ces cellules nécessitent toutefois un environnement cytokinique favorable à leur développement. En particulier plusieurs études ont montré que les interleukines 2 et 15 étaient indispensables à la survie, la prolifération et l'activité des cellules NK (Kobayashi et al., 2005; Sliz et al., 2019). De plus, l'activation des NK stimule la réponse immune adaptative en induisant la sécrétion de cytokines comme l'IFN γ , CCL4 et le GM-CSF (Chiossone et al., 2018). Les cellules tumorales vont toutefois mettre en place des stratégies pour échapper à la cytotoxicité induite par les cellules NK. En particulier, l'expression

des protéines HLA-E et G qui sont traduits en signaux d'inhibition est augmentée dans les cancer du sein à mauvais pronostic (Kruijf et al., 2010). De la même manière, la sécrétion d'ADAM10 et ADAM17 par des cellules de carcinomes pancréatiques induit le clivage des protéines activatrices MICA/B (Chitadze et al., 2013). Une étude a également mis en évidence une façon étonnante de détourner la réponse cytotoxique des NK. En effet, la sécrétion de lactate déshydrogénase par des cellules de glioblastome induit l'expression des ligands activateurs de NKG2D sur les monocytes. De ce fait, les cellules NK vont préférentiellement cibler les monocytes tout en délaissant les cellules tumorales (Crane et al., 2014). Plusieurs évidences suggèrent également que le microenvironnement peut contrôler l'activation des cellules NK. Notamment la production de TGF- β bloque l'action de l'IL-15 et stimule la prolifération et l'activité cytotoxique des NK. (Viel et al, 2016).

En conclusion, dans cette partie nous avons présenté différentes stratégies adoptés par les cellules tumorales pour échapper à la réponse immune et remodeler leur environnement afin de se développer et coloniser des sites distants. La découverte de certains de ces mécanismes a mené à de grands bouleversements dans la prise en charge des patients. En particulier, les approches thérapeutiques visant à restaurer l'immunité anti tumorale (anti-PDL1/PD1, anti-CTLA4, CAR T etc...) a permis de guérir des milliers de patients jusque-là en échec thérapeutique (Zavala and Kalgis, 2015). La réponse à ces thérapies reste néanmoins limitée à un nombre relativement faible de patients et peu d'indicateurs permettent de stratifier efficacement les patients répondeurs des non répondeurs. Ces échecs peuvent s'expliquer notamment par la diversité des mécanismes de régulation du microenvironnement et la complexité de son réseau d'interactions en partie décrit ici. En conséquences les efforts actuels de ce domaine se concentrent donc sur la découverte de marqueurs pronostics et sur la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant être utilisées en combinaisons avec les molécules déjà disponibles (Sambi et al., 2019).

II. Hétérogénéité intratumorale : La tumeur, un objet écologique.

L'hétérogénéité des cancers est un frein à la prise en charge efficace des patients, nous avons en effet brièvement évoqué dans la partie précédente la variabilité inter-patient. Il existe une autre forme de hétérogénéité liée au cancer : la variabilité qui existe chez le même patient, ou hétérogénéité intratumorale (ITH). En effet, dès les premières observations histologiques des tumeurs, les pathologistes ont identifié des différences notables au sein d'une même lésion. Ces différences sont relatives à la morphologie des cellules, leurs organisations, leur génome et les marqueurs moléculaires qu'elles expriment. Les tumeurs sont donc composées de plusieurs populations de cellules que l'on désigne sous l'appellation « sous-clones tumoraux ». A la source de cette hétérogénéité on retrouve des variations génétiques, non génétiques et environnementales. Il en résulte des différences fonctionnelles importantes, certaines sous-populations faisant par exemple état d'une capacité métastatique accrue ou d'une plus forte résistance aux traitements (Marusyk et al., 2012). L'étude de la dynamique des populations au sein de la tumeur revêt donc une importance majeure pour la compréhension de la biologie des tumeurs et le développement de la prise en charge et du suivi personnalisé des patients. Dans cette partie, je vais détailler les différents aspects génétiques et fonctionnels de l'ITH en énonçant l'état actuel des connaissances et les perspectives thérapeutiques qui en découlent.

1. Origines et modèles théoriques

a. Hétérogénéité génétique

L'analyse des caractéristiques génétiques communes aux cellules tumorales, incluant l'inactivation aléatoire du chromosome X chez la femme, la clonalité des immunoglobulines et de certaines aberrations chromosomiques attribuent une origine monoclonale à la croissance tumorale (Tanooka, 1988). Il est en effet communément admis que l'ensemble des cellules tumorales sont issues d'une seule cellule ayant subi une expansion clonale. Les études récentes décrivent toutefois quelques cas dont l'origine semble multi-clonale, mais dans la majorité des cas l'initiation tumorale est la conséquence d'un seul événement (Garcia et al., 2000; Parsons, 2018). Au cours du développement tumoral chaque division cellulaire ouvre la voie à l'acquisition de nouvelles mutations qui constituent autant d'embranchements possibles pour la diversification génétique de la tumeur (Lynch, 2010). En 1976 Peter C. Nowell propose un modèle d'évolution

clonale basée sur le modèle Darwinien. A chaque nouvelle division les cellules évoluent de manière branchées formant ainsi une phylogénie arborescente qui est le résultat de la sélection de sous populations avec une plus grande capacité à produire des cellules filles (fitness élevé) (Nowell, 1976). Les études basées sur les techniques de séquençages de dernière génération ont permis grâce à l'analyse des fréquences alléliques, de la ploïdie, du séquençage multirégional et en cellule unique, de retracer l'histoire évolutive de nombreuses tumeurs (de Bruin et al., 2014; Gerlinger et al., 2012; Morris et al., 2016). A partir de ces études et de modèles mathématiques, les scientifiques ont essayé d'identifier les modes évolutifs dominants lors de la progression tumorale qui sont similaires à ceux de l'évolution des espèces. Il existe toutefois des différences notables, en particulier le mode de génération par reproduction des cellules somatiques rapproche l'évolution tumorale du modèle bactérien. Elle se distingue donc à la fois par le nombre très importants de cellules produites sur des échelles de temps courtes (plusieurs milliards dans une tumeur) mais également par la présence d'instabilité génétique, générant des cellules avec un phénotype fortement mutateur (Turajlic et al., 2019). Un grand nombre de modèles évolutifs qui partagent des caractéristiques de ceux utilisés dans la génétique des populations ont été observés, des tumeurs pouvant présenter une évolution linéaire, branchée, neutre, ou ponctuée (voir figure...) (Davis et al., 2017). Ces modèles seront présentés dans les paragraphes suivants.

Évolution linéaire

L'idée que les tumeurs suivent une évolution linéaire vient essentiellement des études « pré-génomiques » centrées sur un nombre limité de gènes. Elle est notamment suggérée par le modèle de l'acquisition séquentielle d'événement drivers nécessaires à l'initiation de l'oncogénèse colorectale (Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle linéaire postule que l'acquisition d'une mutation confère un tel avantage sélectif en termes de survie et de prolifération que les autres cellules sont immédiatement contre-sélectionnées jusqu'à disparaître (**Figure 5.A**). On parle alors de « balayage sélectif ». Peu d'évidences suggère la validité de ce modèle d'évolution exclusivement linéaire, toutefois certaines modélisations mathématiques proposent qu'il est possible lors des tout premiers stades d'initiation dans un contexte où la population est fortement limitée en nombre (Foo et al., 2011). Il est donc plus probable que lors de l'acquisition de nouvelles mutations les clones initiaux persistent dans de faibles proportions menant ainsi à une évolution branchée.

Évolution branchée

De nombreuses études de séquençages de nouvelle génération ont reporté une forte polyclonalité et des cas de mutations touchants des mêmes voies dans des sous-populations différentes (évolution parallèle) (Takahashi et al., 2007; Desmedt et al., 2015). Ces résultats supportent l'idée que les tumeurs évoluent de manière branchées (**Figure 6.B**) (Gerlinger et al., 2012; Morris et al., 2016; Szerlip et al., 2012). En particulier, l'analyse des bases de données de plus de 3300 tumeurs de 9 types de tumeurs différentes du consortium « Tumor Cancer Genome Atlas » (TCGA) indique que des mutations « drivers » sont majoritairement clonales, toutefois elles apparaissent fréquemment dans des sous-populations. Notamment, les gènes ARID1A, BRAF, EGFR, KRAS et la voie PI3K-Akt-mTOR sont régulièrement associés à des sous-clones (Morris et al., 2016). Une autre étude du même consortium décrit également une forte ITH dans 12 types de cancers différents. Les tumeurs possèdent entre 46 et 166 clones et la plus forte hétérogénéité est corrélée à un mauvais pronostic. De manière intéressante, les mutations drivers sous-clonales donnant lieux à des clones de taille réduites sont associées à un plus mauvais pronostic que ceux donnant naissance à des clones de grandes tailles (Hazard ratio : 2,15). Ces clones dont le fitness serait sub-optimal ou apparus plus tardivement pourraient représenter une source importante d'ITH ce qui expliquerait en partie ces résultats (Andor et al., 2016). Il est cependant important de noter qu'il existe une forte variabilité inter-patients entre ces tumeurs très probablement influencées par l'histoire évolutive propre à chacune et les différentes pressions de sélections qui entrent en jeu lors de leur développement. L'aspect branché de l'évolution tumorale est particulièrement intéressant car il ouvre la voie à l'étude fonctionnelle des interactions entre les différents sous-clones tumoraux et leur environnement, ce qui sera abordé en détail dans la partie B.2.

Évolution neutre

L'évolution neutre est un phénomène évolutif non darwinien et donc indépendant de toute pression de sélection. Dans ce modèle les mutations acquises n'influent pas directement sur le fitness des cellules et n'induisent donc pas de « balayage sélectif » (**Figure 5.C**). La fixation de mutations dans les différentes sous-populations tumorales est totalement stochastique et mène à la dérive génétique. Bien qu'étant relativement controversé une étude a montré que la modélisation mathématique de l'évolution neutre permet de prédire avec précision le nombre de mutations ainsi que la taille des tumeurs de nombreux cas de cancers, notamment pour les cancers de l'estomac, du colon et des poumons (Williams et al., 2016). Il est donc probable que l'évolution neutre participe significativement à l'établissement et le maintien de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale. Plusieurs cas de tumeurs présentant des patterns d'évolution neutres

ont également été reportés et où aucune évidence d'événement sélectifs tardifs n'ont été détectés (Ling et al., 2015).

Évolution ponctuée

Dans leur théorie écologique de l'équilibre ponctué S.J Gould et N. Eldredge stipulent que l'évolution n'est pas un phénomène continu mais une succession de crises ponctuelles qui mènent à de fortes diversifications (spéciations) suivies de moment d'évolution lentes ou équilibres (**Figure 5.D**)(Gould and Eldredge, 1993). La notion d'évolution ponctuée en cancérologie s'inspire de cette théorie et sous-entends qu'un événement précoce est responsable d'une grande partie de la diversité tumorale. Certaines preuves expérimentales soutiennent cette théorie, notamment dans le cancer du côlon où l'analyse de 15 tumeurs n'a pu mettre en évidence aucune expansion clonale localisée. De plus, l'inférence statistique réalisée à partir des données génomiques supporte que l'ensemble de l'ITH apparaît précocement durant le développement tumoral (Sottoriva et al., 2015). De manière intéressante d'autres études associent ce modèle d'évolution à des altérations affectants la ploïdie ou induisant des réarrangements chromosomiques, et de l'instabilité génétique (Gao et al., 2016; Stephens et al., 2011). Ces catastrophes génomiques affectent un grand nombre de gènes et vont donc avoir des effets multiples sur l'évolution de la tumeur, les auteurs parlent alors d'évolution en « big bang ». Il est par conséquent aisé de faire l'analogie entre ces événements et les grandes crises écologiques responsables d'extinctions d'espèces et de spéciations.

En résumé, il semblerait que l'ensemble des études réalisées sur les tumeurs humaines soutiennent des modèles d'évolution uniques et parfois contradictoires. Il est cependant important de noter que ces approches sont limitées et peuvent être biaisées à plusieurs niveaux. En effet, nombre d'entre elles déduisent la composition clonale des tumeurs en s'appuyant sur l'analyse des fréquences alléliques dans la population totale. La profondeur de séquençage est donc une limite importante à cette approche, en particulier pour la détection de population en faibles proportions. De la même manière, les approches en cellules uniques se basent généralement sur un faible nombre de cellules, pas nécessairement représentatives de la population totale. De surcroit, l'analyse temporelle de l'évolution tumorale est dans la grande majorité des cas extrapolée à partir de la composition clonale de la tumeur au moment du prélèvement. En conséquence, les clones ayant pu jouer un rôle important au cours de développement tumoral et étant non détectables ou disparus, ne sont pas pris en compte dans l'analyse des parcours évolutifs. Quoi qu'il en soit ces études fournissent de nombreuses informations et suggèrent dans leur ensemble une évolution mixte, qui pourrait dépendre de

nombreux facteurs incluant : la cellule d'origine, les différentes altérations génétiques et leur dynamique ainsi que les pressions de sélections (Voir **Figure 6.E**)

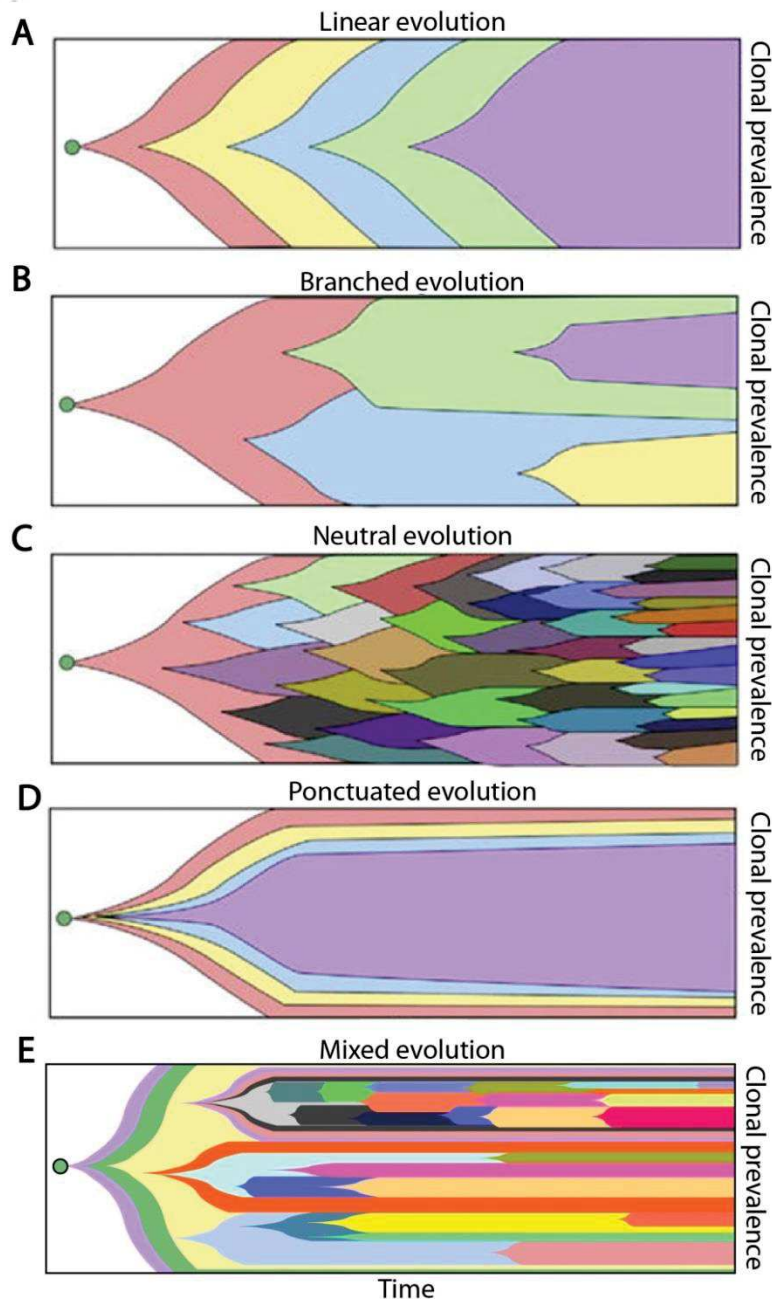


Figure 5 - Modèles théoriques d'évolution des cancers

(A) Modèle d'évolution linéaire où l'apparition d'une mutation induit un avantage sélectif qui élimine rapidement les compétiteurs. **(B)** L'apparition d'une altération génétique permet la diversification clonale de la tumeur qui est alors composée de plusieurs populations distinctes génétiquement. Ces populations vont ensuite évoluer en fonction des pressions de sélections et des interactions entre

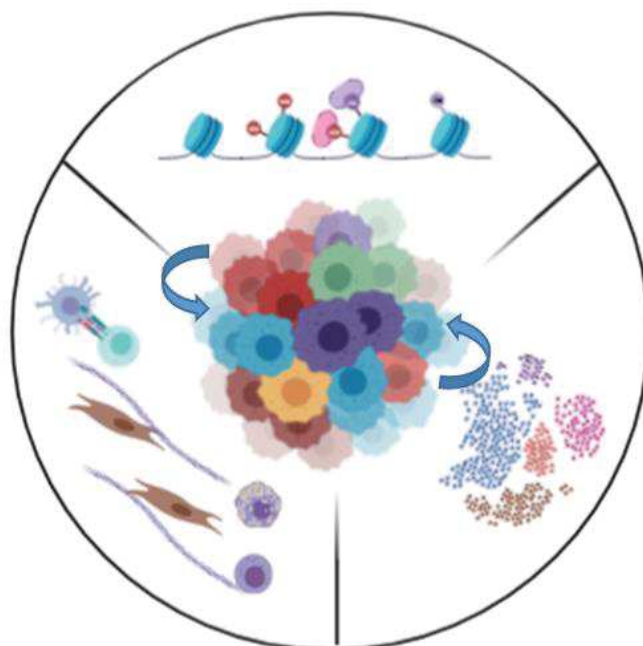
sous-population. **(C)** Evolution neutre, dans ce cas de figure la fixation d'une altération génétique est aléatoire et non soumise aux règles darwiniennes de l'évolution. **(D)** Dans le modèle de l'évolution ponctuée, l'évolution clonale de la tumeur est dépendante d'une crise survenue ponctuellement (e.g. instabilité génétique, traitement thérapeutique). Définissant ainsi la diversité clonale de la tumeur. **(E)** Modèle mixte qui regroupe l'ensemble des stratégies d'évolution énoncés précédemment (Adaptée depuis Davis et al. 2017).

b. Hétérogénéité non génétique

Le « dogme central » de la biologie moléculaire énonce qu'à partir d'un gène codé dans la séquence d'ADN on obtient une molécule d'ARN qui sera ensuite traduite en protéine à laquelle on associe une ou plusieurs fonctions. Cette approche linéaire et incomplète des mécanismes biologiques a mené à une vision « génético-centrée » du cancer et de son évolution, où chaque phénotype cellulaire est directement lié à des variations dans la séquence génique. Dans cette optique, l'hétérogénéité intra-tumorale fonctionnelle n'est que le reflet de l'hétérogénéité génétique. La révision de ce dogme a amené à modifier cette vision tronquée. Il existe en effet plusieurs sources non génétiques d'hétérogénéité intra-tumorale qui ont un impact fonctionnel et qui seront discutés dans cette partie (Voir **Figure 6**)

Functional heterogeneity

Epigenetic status



Microenvironment

Cell to cell variability

L'hétérogénéité intratumorale fonctionnelle dépend du statut épigénétique des cellules, des modifications locales de l'environnement et des pressions de sélections exercées par celui-ci, et des variations individuelles entre les cellules qui composent la tumeur

Hétérogénéité épigénétique

Les modifications épigénétiques se définissent par des changements dans l'expression des gènes sans modifications de la séquence d'ADN. Elles se traduisent notamment par l'ajout de groupements méthyl au niveau des bases de l'ADN ou la modification des histones qui régulent l'architecture du génome (acétylations, méthylations, phosphorylations, ubiquitinations, sumoylations) (Allis and Jenuwein, 2016). L'étude de ces marques épigénétiques dans le contexte de la tumorigénèse fait état de nombreux cas où elles participent au phénotype tumoral. De manière intéressante, il a été montré que l'expression de nombreux gènes drivers n'est pas affectée par des mutations de leur séquence génique mais par hypo- ou hyper-méthylation de leur promoteur ou par la modification des marques d'histones (Youn et al., 2018). Par exemple, l'hyper-méthylation du promoteur du gène *Cdkn2a* codant pour les protéines p16^{INK4A} est

Figure 6 - Hétérogénéité intratumorale fonctionnelle

associée à un mauvais pronostic dans le cancer colorectal (Liang et al., 1999). On observe également une diminution significative de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) dans les cancers du sein, du pancréas, de l'ovaire et du colon, ce qui induit l'ouverture des régions d'hétérochromatine (Chen et al., 2014). Ces modifications, bien que pouvant être transmises et maintenues au cours des divisions cellulaires, sont soumises à de nombreuses variations dues à l'action des enzymes qui contrôlent leur édition. En conséquence, elles constituent une grande source d'ITH et plusieurs études ont mis en évidence une répartition hétérogène des marques épigénétiques dans plusieurs régions d'une même tumeur (Mazor et al., 2016). En se basant sur des approches similaires à celles utilisées avec les données génomiques, plusieurs groupes ont déduit l'histoire évolutive de la tumeur à partir des statuts de méthylation de l'ADN. Il semblerait que dans une grande majorité des cas il existe une forte corrélation entre les trajets évolutifs obtenus à partir des mutations somatiques et ceux issus de l'analyse du méthylome, en particulier dans le cadre du cancer de prostate (Brocks et al., 2014) et du carcinome hépatocellulaire (Ding et al., 2019). Ces données peuvent s'expliquer par le fait que les altérations de l'épigénome sont la conséquence directe des mutations survenues au niveau des enzymes qui les contrôlent (méthylases et déméthylases). En revanche, leurs conséquences sur l'hétérogénéité intra-tumorale fonctionnelle restent assez mal définies;

notamment une étude a montré que l'hyperméthylation de promoteurs dans certaines régions de la tumeur ne modifiait pas nécessairement l'expression des gènes associés (Aryee et al., 2013). Ces résultats suggèrent l'implication d'autres mécanismes de régulation, comme par exemple les modifications d'histones ou de la structure 3D du génome. En particulier, une étude a mis en évidence différents niveaux d'expression d'histone H1.0 au sein de glioblastomes. L'inhibition de son expression, elle-même sous contrôle épigénétique, permet de maintenir les cellules dans un état indifférencié nécessaire à la progression tumorale. Au contraire, sa ré-expression induit la différenciation et ralentit le développement de la tumeur (Torres et al., 2016). En résumé, bien que directement influencées par l'hétérogénéité génétique, l'aspect pléiotropique des modifications épigénétiques constitue une source importante d'hétérogénéité fonctionnelle.

Hiérarchie cellulaire et cellules souches cancéreuses

L'état de différenciation de la cellule constitue également une source d'hétérogénéité intra-tumorale. Ce mécanisme est étroitement régulé par, à la fois des facteurs environnementaux extrinsèques, l'expression des gènes et les divisions asymétriques (Alvarado and Yamanaka, 2014). Dans les années 90, des sous-populations de cellules tumorales (CD34⁺; CD38⁻) ont été isolées à partir de leucémies myéloïdes (AML). Leur analyse a montré qu'elles présentaient des caractéristiques de cellules souches, tout en étant les seules à pouvoir induire des tumeurs une fois injectées dans des souris immunodéprimées (Lapidot et al., 1994; Bonnet and Dick, 1997). Ces cellules sont plus vraisemblablement issues de la dédifférenciation des cellules qui acquièrent des marqueurs de cellules souches et un fort potentiel tumorigénique. Cette découverte, associée à l'identification de cellules avec un phénotype « souche » dans de nombreux types de tumeurs, va mener à reconsidérer le modèle de l'évolution clonale comme source d'hétérogénéité intra-tumorale. Dans sa version la plus extrême, le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) se place en opposition à celui de l'évolution clonale et soutient que seul un faible nombre de cellules souches est responsable de l'ensemble de l'hétérogénéité des tumeurs. Ces cellules sont définies par des marqueurs moléculaires (ALDH1A1, CD133, CD44 etc...) et plusieurs études mettent en lumière leurs implications dans la formation des métastases et les résistances aux traitements (Visvader and Lindeman, 2008). Ce modèle linéaire, similaire à celui de la différenciation des cellules saines, a toutefois été revisité notamment suite aux échecs de la plupart des approches thérapeutiques visant à cibler les CSC (Rahman et al., 2011). Une raison majeure de cet échec vient de la capacité de certaines cellules tumorales à transiter d'un état différencié à un état souche

via un processus de dédifférenciation. Il s'agit ici d'un des aspects de la plasticité tumorale englobant l'ensemble des changements phénotypiques réversibles. Il existe de nombreuses évidences d'une telle plasticité, en particulier les équipes de R.A. Weinberg et d'A. Puisieux ont montré que des cellules différenciées issues de tumeurs mammaires (CD44⁻/CD24⁺) pouvaient suite à l'induction de l'EMT acquérir un phénotype souche (CD44⁺/CD24⁻) ayant la capacité d'induire des tumeurs en xénogreffe (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). D'autres études montrent que cette plasticité est sous le contrôle de mécanismes épigénétiques ou de la niche environnementale (Chaffer et al., 2013; Hamada et al., 2012). En résumé de très nombreuses études s'accordent sur le fait que l'état de différenciation des cellules tumorales impacte grandement les aspects fonctionnels de l'hétérogénéité intra-tumorale. Cependant, la vision actuelle de ce mécanisme est un modèle mixte, dans lequel la plasticité cellulaire, les altérations génétiques et épigénétiques contribuent à créer des populations complexes et hétérogènes.

Fluctuations de l'expression génique et hétérogénéité quantitative

L'analyse des populations cellulaires tumorales a mis en évidence une variabilité transcriptomique et protéomique indépendante des facteurs génétiques. Les causes intrinsèques de ces fluctuations sont en partie liées aux mécanismes d'expression des gènes, par exemple pour un gène donné le nombre d'événements de transcription ou le nombre d'ARNm produit à chaque événement influe sur le paysage transcriptionnel de la cellule. De la même manière la prise en charge ou non de ces ARN par la machinerie traductionnelle va impacter la distribution protéique (Singh and Soltani, 2013). De plus, les variations extrinsèques de l'environnement, comme la concentration locale en ligands ou enzymes, peuvent également impacter cette hétérogénéité de manière « non cell autonomous ». Ces différences quantitatives sont considérées comme étant essentiellement stochastiques, on parle alors de « bruit » lié à l'expression génique ou aux réseaux de signalisation. En conditions normales, ces variations sont limitées et régulées notamment via la présence de boucles de rétrocontrôles négatifs (Nevozhay et al., 2009). Dans certains cas cependant, elles ont des conséquences fonctionnelles. Une étude a, par exemple, mis en évidence la présence de populations « outlier » dans des progéniteurs hématopoïétiques. Ces populations ont été identifiées grâce au niveau d'expression de Sca-1, qui suit une distribution gaussienne. De manière intéressante, en fonction du niveau d'expression de Sca-1 (low, medium ou high) les cellules se différencient plutôt en cellules myéloïdes ou en cellules érythroïdes (Chang et al., 2008). Dans un contexte pathologique et notamment dans le cadre du cancer, ces fluctuations sont exacerbées, particulièrement via les variations de nombres de copies des oncogènes ou l'haploinsuffisance des suppresseurs de tumeurs. Par exemple, la perte d'un allèle de la protéine

NF1, qui contrôle l'hydrolyse du GTP lié à la protéine RAS, augmente le bruit d'expression génique et favorise la formation de structures dendritiques des mélanocytes (Kemkemer et al., 2002). L'analyse « en cellule unique » des tumeurs a également mis en évidence cette variabilité stochastique (Fasterius et al., 2019; Sharma et al., 2019). Par exemple, une équipe a développé un modèle permettant de mesurer l'activité de la voie IGF-1/PI3K/AKT en utilisant le facteur de transcription FOXO1 comme rapporteur. Il a été montré que bien qu'elles soient stables au cours du temps, les réponses individuelles à une ou plusieurs doses d'IGF-1 sont très différentes au sein de la population. De plus, cette hétérogénéité concernant l'activité signalétique a également un effet sur la réponse à un inhibiteur de PI3K (Gross et al., 2019). Il est de ce fait probable que ces différences confèrent des avantages sélectifs liées au « fitness » cellulaire et l'adaptation à l'environnement

le micro-environnement tumoral

De nombreux cas de cancers présentent une distribution spatiale hétérogène du microenvironnement tumoral (Yuan, 2016). Ces différences à la fois quantitatives et qualitatives sont susceptibles d'influer sur le développement tumoral et les pressions de sélection. En particulier, l'accessibilité aux ressources, aux facteurs de croissances et aux cytokines est très différente en fonction de la proximité des cellules tumorales avec les structures environnantes. Par exemple, une faible densité en vaisseaux sanguins ne permet pas une oxygénation efficace de la tumeur et est donc susceptible de favoriser les populations adaptées à ces conditions de stress (Alfarouk et al., 2013). La localisation spatiale des cellules tumorales affecte également les contraintes mécaniques auxquelles elles sont soumises. Notamment une étude a montré qu'une MEC très rigide, en particulier dans les régions péri-tumorales, induit une EMT et la formation de métastases via la translocation nucléaire du facteur de transcription TWIST-1 (Wei et al., 2015). La capacité des cellules immunes à agir directement sur la viabilité des cellules tumorales en fait aussi une source importante d'ITH (Yuan, 2016). En particulier, une étude réalisée sur différentes régions de 415 CRC a montré qu'il existait une corrélation entre le type, la densité et la localisation de l'infiltrat immunitaire et le pronostic clinique des patients (Galon et al., 2006). La réaction immunitaire anti-tumorale (immuno-editing), permet la reconnaissance des néo-antigènes tumoraux par les LTc ce qui participe fortement à l'établissement des pressions de sélections au sein de la tumeur (Matsushita et al., 2012). De manière intéressante, l'équipe de Charles Swanton a montré que les cellules présentant des mutations sous-clonales avaient un plus fort potentiel immunogène que celles avec des mutations clonales (McGranahan et al., 2016). Ces dernières développent le plus souvent des mécanismes d'évasion immunitaire qui corrèlent avec

la perte d'hétérozygotie des molécules HLA et la présence d'instabilité génétique (Angelova et al., 2018; McGranahan et al., 2017). Des études mesurant temporellement l'infiltration immunitaire et son lien avec l'ITM dans les métastases ont également abouti à estimer l'impact de l'immunoediting sur la progression tumorale, qui permet la sélection de clones agressifs associés à risque important de récurrence (Angelova et al., 2018; Jiménez-Sánchez et al., 2017).

En résumé, les causes d'hétérogénéité intra-tumorale sont nombreuses et interconnectées. De plus en plus d'études ont alors commencé à associer l'étude de l'hétérogénéité génétique, épigénétique et environnementale. En raison des limitations techniques et de la disponibilité limitée du matériel biologique ces approches restent la plupart du temps limitées à des observations ponctuelles réalisées sur un faible nombre de patients, ce qui rend les conclusions générales difficiles. Il est donc important de s'appuyer sur les modèles *in-vivo* permettant de s'affranchir de ces contraintes. Ces derniers autorisent notamment l'étude des interactions écologiques au sein de la tumeur, un aspect essentiel pour la compréhension des conséquences fonctionnelles de l'hétérogénéité intra-tumorale que je vais développer plus en détail dans la partie suivante.

2. Hétérogénéité phénotypique et dynamique des populations

Dans la partie précédente nous avons discuté le fait qu'une tumeur soit constituée de populations cellulaires distinctes du point de vue génétique et/ou phénotypique. La cellule tumorale est traditionnellement définie par l'acquisition des « Hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2011). Il semble peu probable qu'une cellule donnée présente l'ensemble de ces caractéristiques simultanément. Il est donc intéressant d'appréhender les hallmarks au travers du spectre de l'hétérogénéité clonale. Dans ce contexte, chaque cellule ou population cellulaire prend part au développement tumoral en arborant des caractéristiques propres qui ne sont pas nécessairement partagées par l'ensemble de la tumeur. Dans certains cas, une altération génétique se traduit en un phénotype ayant des conséquences uniquement sur la cellule où elle est présente (cell autonomous). Dans d'autres, l'expression ou la sécrétion d'une protéine donnée peut avoir un impact sur les cellules environnantes ou sur le microenvironnement (non cell autonomous). Cette approche suggère que la tumeur est également un lieu d'interactions biologiques complexes (Tabassum and Polyak, 2015). Ces interactions sont particulièrement intéressantes car elles conduisent à la mise en place des forces sélectives qui préfigurent l'histoire évolutive de la tumeur. Dans cette partie nous allons détailler le type d'interactions qui interviennent au cours du

développement tumoral tout en essayant de comprendre comment cette dynamique populationnelle façonne la composition clonale des tumeurs.

Les Interaction clonales

L'étude des interactions biologiques vise à identifier l'impact qu'une population « A » va avoir sur une population « B », voire sur l'ensemble des populations qui composent son milieu. Les conséquences de ces interactions peuvent être délétères, bénéfiques ou neutres et vont grandement influencer l'histoire évolutive et la dynamique des populations du milieu étudié (voir **Table 2**) (Lidicker, 1979). Dans le contexte qui nous intéresse ces interactions peuvent être regroupées sous les termes de compétition et coopération cellulaire. Ces interactions tumorales complexes sont toutefois restées théoriques pendant de nombreuses années en raison des difficultés techniques empêchant leur mise en évidence. Le développement des suivis du lignage cellulaire combinés aux modèles d'études animaux ont cependant permis l'étude de la dynamique des populations tumorales.

Tableau 2 – Interactions écologiques entre clones tumoraux

<i>Type d'interaction</i>	<i>Population A</i>	<i>Population B</i>
<i>Compétition</i>	Négative	Négative
<i>Amensalisme</i>	Neutre	Négative
<i>Prédation/Parasitisme</i>	Positive	Négative
<i>Neutre</i>	Neutre	Neutre
<i>Commensalisme</i>	Positive	Neutre
<i>Mutualisme</i>	Positive	Positive
<i>Synergisme</i>	Positive (+nouvelle fonction)	Positive (+nouvelle fonction)

La compétition cellulaire

Les interactions négatives ou compétitives sont susceptibles de ralentir et limiter le développement tumoral en impactant les populations cellulaires de différentes manières. En effet, la compétition cellulaire faisant intervenir plusieurs parties est globalement nocive pour l'ensemble des populations impliquées. Cet environnement compétitif s'engage notamment dans un contexte où la quantité de ressources ou d'espace disponible est limitée par rapport à la

demande croissante. Cet environnement a donc tendance à limiter la diversité clonale de par l'élimination des clones inaptés (looser) et la sélection des clones les plus adaptés (winner). Par ailleurs, la sécrétion d'un facteur cytotoxique peut quant à elle impacter négativement les cellules avoisinantes sans toutefois affecter la cellule productrice qui y est insensible. Cette autre classe d'interaction qui est neutre pour un groupe donné mais délétère pour d'autres s'appelle l'amensalisme. C'est notamment ce qui a été décrit dans un article où les auteurs ont montré que les hépatocytes sains entourant le tissu tumoral agissaient directement sur les cellules tumorales pour en limiter la croissance. Cette action passe par l'activation de la voie YAP/TAZ dans les hépatocytes péri-tumoraux qui induisent alors la mort des cellules tumorales par un mécanisme indépendant de l'apoptose. De plus, l'activation de la voie YAP/TAZ dans les cellules tumorales protège contre cette cytotoxicité induite par le tissu environnant, limitant ainsi la diversité clonale de la tumeur (Moya et al., 2019). Il existe également deux autres types d'interactions négatives : le parasitisme où une espèce va se développer aux dépens d'une autre, et la prédation au cours de laquelle l'espèce bénéficiaire consomme la biomasse d'une autre espèce causant directement la mort de l'individu. Bien que ces interactions n'aient pas d'équivalents directs connus dans un contexte tumoral, l'action du système immunitaire que j'ai présenté dans la partie I.3.d peut être considérée comme une forme particulière de prédation.

La coopération cellulaire

Les interactions positives, généralement regroupées sous le terme de coopération, sont également subdivisées en plusieurs catégories. En cas d'interaction mutualiste, une population « A » participe au développement d'une population « B » et réciproquement. L'effet synergique se distingue de la relation de mutualisme par le fait que l'avantage coopératif accordée n'apparaît que lorsque ces populations sont rassemblées, il s'agit de l'apparition d'une nouvelle fonction issue de la coopération des parties. Par exemple, une équipe a mis en évidence l'interaction synergique entre des cellules de mélanome humain ayant des propriétés dépendantes de l'expression du facteur de transcription associé à la microphthalmie (MITF). Les cellules MITF low sont fortement invasives et peu prolifératives alors que les MITF high sont peu invasives et fortement prolifératives. La co-injection de ces deux populations dans des poissons zèbres permet l'acquisition d'un phénotype migratoire de type dissémination collective, qui repose sur la sécrétion de protéases (MMP) et le remodelage de la matrice extracellulaire par les cellules tumorales. Étonnamment, les cellules MITF low migrent selon un mode différent lorsqu'elles sont associées aux MITF high. Ces dernières qui ne sont habituellement pas capables de disséminer lorsqu'elles sont seules, acquièrent un phénotype migratoire grâce à leur interaction

avec les MITF low. Dans ce contexte, la colonisation est indépendante de la matrice extracellulaire et ressemble à une migration de type amiboïde dont la transition semble orchestrée par un facteur sécrété par les cellules MITF high (Chapman et al., 2014). Bien qu'il ne soit pas clair si la dissémination collective constitue un avantage ou non pour les cellules MITF low, elle permet la formation de métastases oligo-clonales avec un plus fort potentiel prolifératif.

Finalement, le commensalisme est un autre type d'interaction où une population cellulaire apporte un avantage sélectif à une ou plusieurs populations sans toutefois en bénéficier elle-même. Ce type d'interaction peut mener à l'émergence de cellules avec un fort potentiel prolifératif qui engendre alors l'effondrement du système coopératif. En effet, ces cellules profitent des ressources mise à leur disposition sans contribuer à l'essor des populations qui les entourent menaçant ainsi la survie des cellules « nourricières ». On parle alors de « cheaters » ou « free-riders ». A titre d'exemple l'utilisation du modèle drosophile a permis d'identifier la coopération entre des cellules exprimant l'oncogène RAS^{G12V} et des cellules ayant subi une délétion de la protéine Scribble, connue pour son rôle dans la mise en place de la polarité apico-basale. En effet, ces altérations seules ne sont pas suffisantes pour induire la croissance tumorale dans les disques imaginaux de la drosophile. Cependant, la combinaison de ces deux événements oncogéniques qu'ils soient exprimés de manière « cell autonomous » ou non, autorise la formation de tumeurs invasives. Plus précisément, les auteurs ont montré que la délétion de Scribble induit un mécanisme de prolifération compensatoire qui passe par l'activation de la c-Jun-NH2 Kinase (JNK) induisant la sécrétion des cytokines Unpaired (Upd). L'expression des gènes Upd active alors la voie JAK/Stat dans les cellules RAS^{G12V} permettant ainsi la croissance tumorale. Les tumeurs une fois développées sont majoritairement composées de cellules RAS^{G12V} qui sont maintenues malgré la très faible proportion voire l'absence des cellules scrib^{-/-}. En effet, les auteurs ont montré qu'une fois leur croissance initiée grâce aux cellules scrib^{-/-}, les cellules RAS^{G12V} se maintenaient via une boucle de rétro-contrôle permettant l'expression autonome de la JNK (Wu et al., 2010). Ce mode de coopération met donc bien en évidence un type d'interaction commensale. De plus, bien qu'induisant effectivement la formation de cellules « cheaters », ces dernières parviennent à se maintenir en produisant elles même les signaux nécessaires à leur survie. Un autre cas de coopération similaire a été observé en utilisant un modèle murin de carcinome pulmonaire à petite cellules (SCLC). En effet, l'analyse des lignées issues de ces tumeurs a souligné l'existence de cellules majoritairement neuroendocrine (NE) tout en maintenant une faible proportion de cellules non neuroendocrine (NEN). Tandis que la greffe sous cutanée de lignées purement NEN ou NE donnent lieu à des tumeurs à croissance lente et non invasive, le mélange des deux lignées induit des tumeurs à croissance rapide qui forment des

métastases dans le foie et les nœuds lymphatiques. Étonnamment, alors que les tumeurs primaires sont composées des deux types cellulaires, suggérant un mode de coopération mutualiste, les métastases sont quant à elles essentiellement constituées de cellules NE. L'acquisition du phénotype migratoire se fait donc par le biais d'une interaction commensale favorisant uniquement les cellules NE (Calbo et al., 2011).

Bien qu'elles nous renseignent sur la nature des interactions pouvant intervenir lors de la tumorigenèse ces études restent limitées à l'étude des interactions entre deux sous-clones tumoraux, ce qui est peu représentatif de la réalité. L'équipe de Kornelia Polyak a cherché à appréhender ces questions de manière plus globale en étudiant les interactions clonales de 18 sous populations issues de la même lignée de cancer mammaire MDA-MB-468 (Marusyk et al., 2014). L'injection dans le tissu graisseux mammaire de chacun de ces 18 clones en combinaison avec la population parentale (1:18) n'induit un avantage de croissance tumorale que pour 2 sous-clones exprimant CCL5 et IL11. De manière intéressante ces clones ne sont pas ceux ayant subis la plus forte expansion clonale dans la tumeur initiale. En particulier, les cellules exprimant IL11 augmentent également fortement la croissance des cellules parentales, ce qui est caractéristique d'un effet « non-cell autonomous ». De plus, les injections poly-clonales des 18 sous-clones induit la formation de tumeurs agressives et fortement métastatiques. Cet effet est perdu lorsque les clones IL11 et FIGF sont retirés de la combinaison ce qui confirme un effet systémique de ces deux clones sur l'ensemble de la tumeur. La présence d'une telle diversité, source de compétition entre les différentes parties, permet la maintenance du clone IL11 et donc empêche l'effondrement de la tumeur. En effet, le clone IL11 est rapidement éliminé lorsqu'il est injecté en combinaison avec un clone qui présente une expansion rapide (LOXL3), empêchant donc une croissance tumorale efficace. Ces résultats mettent en exergue l'existence d'un équilibre subtil des interactions clonales facilitant la tumorigenèse. Plus récemment, les mêmes auteurs ont identifié le mécanisme moléculaire responsable du phénotype pro-migratoire induit par la sécrétion d'IL11. Le traitement avec un anticorps bloquant des neutrophiles empêche la migration métastatique dépendante de l'IL11. A l'inverse, le même traitement en absence d'IL11 augmente significativement la formation des métastases. Ces résultats suggèrent que l'expression d'IL11 induit chez les neutrophiles une transition d'un état anti-tumorigénique à pro-tumorigéniques (Janiszewska et al., 2019).

La vision darwinienne des interactions entre les sous clones tumoraux et leur environnement que j'ai résumé brièvement dans ce chapitre permet d'appréhender des aspects importants de

l'évolution de tumeurs. Il est particulièrement intéressant de souligner que certaines populations cellulaires permettent la mise en place d'un équilibre dynamique autorisant la croissance tumorale tout en maintenant une diversité clonale constante. A l'inverse, l'émergence d'un clone « free-rider » peut mener à une forte réduction de la diversité clonale ou à l'effondrement du système tumoral. La compréhension des mécanismes et des altérations géniques menant alternativement à la diversification ou à l'uniformisation clonale pourrait s'avérer essentielle au développement de stratégies thérapeutiques innovantes. En effet, il pourrait être intéressant de traiter les patients avec une drogue « A » permettant de limiter la diversité clonale et donc favoriser l'émergence de populations dépendantes de leur mécanisme de résistance. Par la suite le traitement avec une drogue « B » ciblant le mécanisme d'addiction de la population émergente devrait permettre l'élimination de la tumeur. Toutefois, ces approches présentent encore plusieurs limitations. Notamment la plasticité tumorale, traduisant la capacité des cellules à s'adapter aux stress environnementaux en modifiant leur profil transcriptomique, risque de permettre une adaptation, qui a de fortes chances de contrecarrer cette stratégie. De la même manière une forte instabilité génétique de certaines populations tumorales favoriserait l'émergence de nouveaux clones tumoraux résistants aux thérapies employées. De plus, l'évaluation de l'hétérogénéité clonale donne généralement une information binaire en désignant la présence ou l'absence d'un marqueur moléculaire qui définit ainsi la population clonale étudiée. Pourtant, comme argumenté plus haut, les différences quantitatives dans l'activation de certaines voies de signalisations sont susceptibles d'avoir des conséquences phénotypiques importantes. Par conséquent, les réponses à la drogue « B » visant à cibler la population émergente risquent d'être différentes au sein de cette population. Ces différences quantitatives d'activation sont particulièrement pertinentes dans le cadre de la voie RAS/MAPK, qui est la cible de nombreuses stratégies thérapeutiques et qui a fait l'objet de mon travail de thèse. Dans la partie suivante je vais développer en détail cette voie de signalisation en me concentrant particulièrement sur la régulation spatio-temporelle de son activité.

III. La signalisation RAS

Les protéines de la famille RAS sont des petites GTPase au centre d'un réseau complexe de signalisation intracellulaire dont la voie la plus connue est celle des « Mitogen-activated protein

kinases » (MAPK). Ces nombreuses voies de signalisation contrôlent plusieurs fonctions essentielles à la cellule et l'organisme comme : la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la résistance à l'apoptose, la mise en place de la polarité cellulaire et du cytosquelette, la migration, le métabolisme, la sénescence et l'inflammation. Ces fonctions sont étroitement liées aux « hallmarks of cancer » ce qui fait de la signalisation RAS l'une des voies les plus souvent altérées lors de l'oncogénèse. RAS est en effet l'un des premiers oncogènes à avoir été identifié et environ 30% des cancers présentent des mutations activatrices de la protéine, de surcroît les principaux acteurs se trouvant en aval ou en amont de la signalisation sont également fréquemment altérés (Dorard et al., 2017a). Dans cette partie je vais décrire les principaux intervenants de cette signalisation et ses mécanismes de régulations en me concentrant principalement sur la voie des MAPK.

1. Ligands, récepteurs et régulateurs en amont de la voie

Les signaux initiaux d'activation de la voie RAS/MAPK sont essentiellement extracellulaires. Les cellules sont en effet capables de sécréter des facteurs de croissance qui en fonction de leur capacité à diffuser ou à être captés vont avoir une action autocrine, paracrine ou endocrine. Ces facteurs sont des hormones peptidiques comprenant les familles des « epidermal growth factors (EGF) », « fibroblast growth factors (FGF) », « hepatocyte growth factors » (HGF), l'insuline et les « insulin-like growth factors (IGF), les « neural growth factors (NGF) et les « Plateled derived growth factors (PDGF). Ces ligands présentent une forte affinité pour les membres spécifiques de la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK) dont le plus étudié est le récepteur à l'EGF (EGFR) (Braicu et al., 2019). La fixation du ligand sur son récepteur induit un changement conformationnel qui permet la dimérisation de ce dernier. Les domaines tyrosines kinases intracellulaires sont alors activés et l'hydrolyse de l'ATP permet l'auto phosphorylation du récepteur et la transduction du signal (Hubbard and Miller, 2007). Cette modification ancre le domaine SH2 de la protéine GRB2 au récepteur. Les domaines SH3 de GRB2 interagissent alors avec SOS, une protéine de la famille des GEF pour « Guanine Exchange Factors ». L'activation de SOS induit son interaction avec RAS qui est alors activé. En effet, SOS libère RAS de son GDP ce qui fixe une molécule de GTP dont la concentration dans le cytoplasme est dix fois supérieure au GDP. Une fois la cascade de signalisation induite, RAS-GTP est normalement inactivé suite à sa liaison avec RASGAP ou NF1 des protéines GAP (GTPase activating protein)

augmentant d'un facteur 1000 la capacité de RAS à hydrolyser le GTP en GDP (Margolis and Skolnik, 1994). Ce mode d'activation de RAS, représenté sous la forme d'un interrupteur binaire, a mené à l'adoption d'une vision simplifiée de la voie des MAPK transitant continuellement d'un état actif à inactif. Toutefois, en 1994, deux études mettant en évidence l'importance de l'intensité et la durée d'activation de la signalisation ont été simultanément publiées (Dikic et al., 1994; Traverse et al., 1994).. En effet, alors que la stimulation de cellules PC12 par le NGF induit une forte activation de la voie MAPK et la différenciation de ces cellules en neurones, la stimulation à l'EGF ou à l'insuline n'induit quant à elle qu'une activation transitoire de la voie tout en maintenant les cellules dans un état prolifératif. La surexpression des récepteurs à l'insuline ou à l'EGF induit également une activité de signalisation importante et la différenciation des PC12 en neurones. Ces résultats sont particulièrement intéressants dans le contexte du cancer car l'amplification des gènes contrôlant l'expression des récepteurs ou des ligands d'activation de la voie MAPK fait également partie la panoplie des processus de transformation. Ces modifications affectent donc l'activation de RAS et des effecteurs situées en aval.

2. Les petites GTPase RAS

Il existe 4 isoformes de la protéine RAS qui sont HRAS, NRAS, KRAS4a et KRAS4b, les deux derniers étant issus de l'épissage alternatif de KRAS. Les parties N-terminales et centrales des différentes isoformes présentent un pourcentage d'homologie d'environ 85%. Ces séquences contiennent les domaines GTPase et les séquences effectrices de RAS. Du fait de cette importante homologie, ils devraient tous les quatre être capables de se lier aux mêmes effecteurs. Il existe cependant des différences quantitatives quant à leur affinité vis-à-vis des différentes cibles situées en aval de la signalisation (Simanshu et al., 2017). Par exemple, une équipe a montré que KRAS était plus efficace que HRAS pour recruter RAF-1 à la membrane plasmique alors que HRas présentait une meilleure affinité pour PI3K (Yan et al., 1998). Toutefois, ces différences sont également dépendantes du contexte cellulaire. En effet, une autre étude, réalisée dans des hépatocytes primaires de rats, a montré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de HRAS induisait la prolifération et la survie via l'activation simultanée de la voie ERK/RSK et PI3K. En revanche, l'expression des mutant de KRAS induit un phénotype similaire exclusivement via l'activation de la voie PI3K (Rosseland et al., 2008). En outre, la région C-terminale, aussi appelé région hypervariable, diffère fortement entre les isoformes. Cette région est essentielle car elle permet l'adressage et l'ancrage de RAS à la membrane via la farnesylation ou palmitoylation d'un résidu cystéine. Chacun des isoformes possède un site de

farnesylation, cependant HRAS possède 2 sites de palmitoylation, NRAS et KRAS4a un seul, tandis que KRAS4b en est dépourvu, mais possède une longue région polybasique. Ces différences impactent notamment le trafic vésiculaire, le recyclage et les interactions membranaires des 4 isoformes et ont des conséquences sur la signalisation et leur potentiel oncogénique (Castellano and Santos, 2011; Wang et al., 2015).

Les altérations oncogéniques de RAS sont des mutations ponctuelles qui se concentrent majoritairement sur 3 codons. Les glycines 12 et 13 sont fréquemment remplacées par un aspartate (D), une arginine (R), une cystéine (C), ou une valine (V) et la glutamine 61 est souvent échangée pour une arginine, une histidine (H), une leucine (L) ou une lysine (K). Ces mutations touchent le domaine GTPase de la protéine, ce qui limite l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine et empêche l'interaction efficace avec les domaines catalytiques des GAP. En conséquence, les mutant de RAS sont maintenus dans une forme active, liée au GTP (Scheffzek et al., 1997) (Voir **Figure 7**).

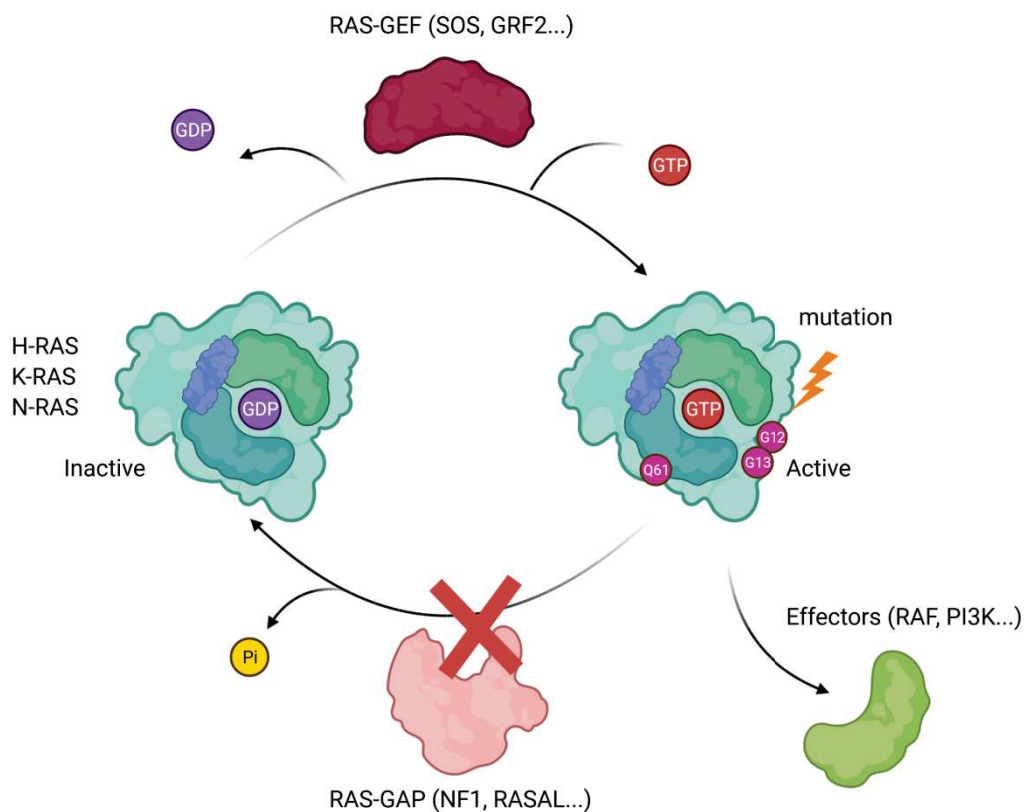


Figure 7 - La protéine RAS switch binaire et mutation oncogéniques

Ces différentes substitutions ne sont cependant pas équivalentes, par exemple une étude récente a montré que le codon G12D était le plus efficace pour initier la tumorigénèse colique et pancréatique dans des modèles génétiques de souris (Zafra et al., 2020). De plus, les auteurs de cette étude ont aussi montré que les organoïdes pancréatiques issus des tumeurs RAS^{G13D} et RAS^{G12C} sont sensibles aux inhibiteurs d'EGFR alors que ceux issus des tumeurs RAS^{G12D} y sont résistants. Dans ce scénario, la signalisation provenant de la RTK amont (ici l'EGFR) contribuerait au maintien de la forme active de deux premiers mutants de Ras. De manière intéressante, le traitement des organoïdes RAS^{G13D} avec un siRNA ciblant la protéine GAP NF1 prévient cette sensibilité. Ces résultats suggèrent donc que certains des mutants maintiennent une faible activité GTPase pouvant avoir des conséquences fonctionnelles sur l'intensité d'activation de la voie. Plusieurs sources suggèrent également que RAS forme des dimères qui sont importants pour son activité signalétique. En effet, il a été montré qu'en cas de mutation hétérozygote de RAS la perte de l'allèle sauvage favorise la progression tumorale. Cela suggère un rôle suppresseur de tumeur de RAS sauvage via sa compétition directe ou indirecte avec la forme mutée (Bremner and Balmain, 1990). Ces résultats ont été corroborés par plusieurs études récentes. Par exemple, des cellules de cancer du poumon possédant deux allèles mutés de KRAS^{G12D} présentent un avantage sélectif, à la fois *ex vivo* et *in vivo*, par rapport aux cellules KRAS^{G12D/WT}. Dans ce contexte, l'avantage conféré par la perte de l'allèle sauvage passe par une transition vers un état métabolique glycolytique (Kerr et al., 2016). Une autre étude a également confirmé que l'expression de l'allèle sauvage de KRAS limite la prolifération et la tumorigénicité des MEF et des cellules épithéliales pulmonaires. De manière intéressante, l'expression d'un mutant RAS^{D154Q}, empêchant la dimérisation de KRAS sans toutefois impacter son activité GTPase, phénotypie la perte de l'allèle sauvage. De plus l'inhibition de la dimérisation de KRAS oncogénique impacte également sa capacité à activer efficacement la voie des MAPK (Ambrogio et al., 2018a). Alors que les mutations de KRAS sont les plus fréquentes dans un grand nombre de tumeurs humaines (**Figure 8**), HRAS est quant à lui très fréquemment associé à l'apparition de carcinome hépatocellulaire murins (Reynolds et al., 1986; Wiseman et al., 1986). De plus, une étude a montré que l'expression *in vivo* de KRAS^{G12D} dans un modèle murin n'avait aucun effet sur la croissance des hépatocytes quiescents alors qu'à l'inverse l'expression de HRAS^{G12V} induisait leur prolifération l'apparition de lésions pré-néoplasiques (Figueiredo et al., 2012)

En résumé, l'ensemble des données présentées dans cette partie suggèrent qu'en fonction de son type d'altération génétique ou du nombre de copies exprimées, l'oncogène RAS est susceptible d'induire des réponses différentes quant à l'activation de ses effecteurs. Cette variabilité fait écho aux différences observées concernant les isoformes et mutations les plus fréquemment retrouvés en fonction du type de cancer (voir **Figure 8**). Cela souligne également que les conditions optimales pour l'initiation tumorale liée à RAS sont très différentes en fonction du contexte.

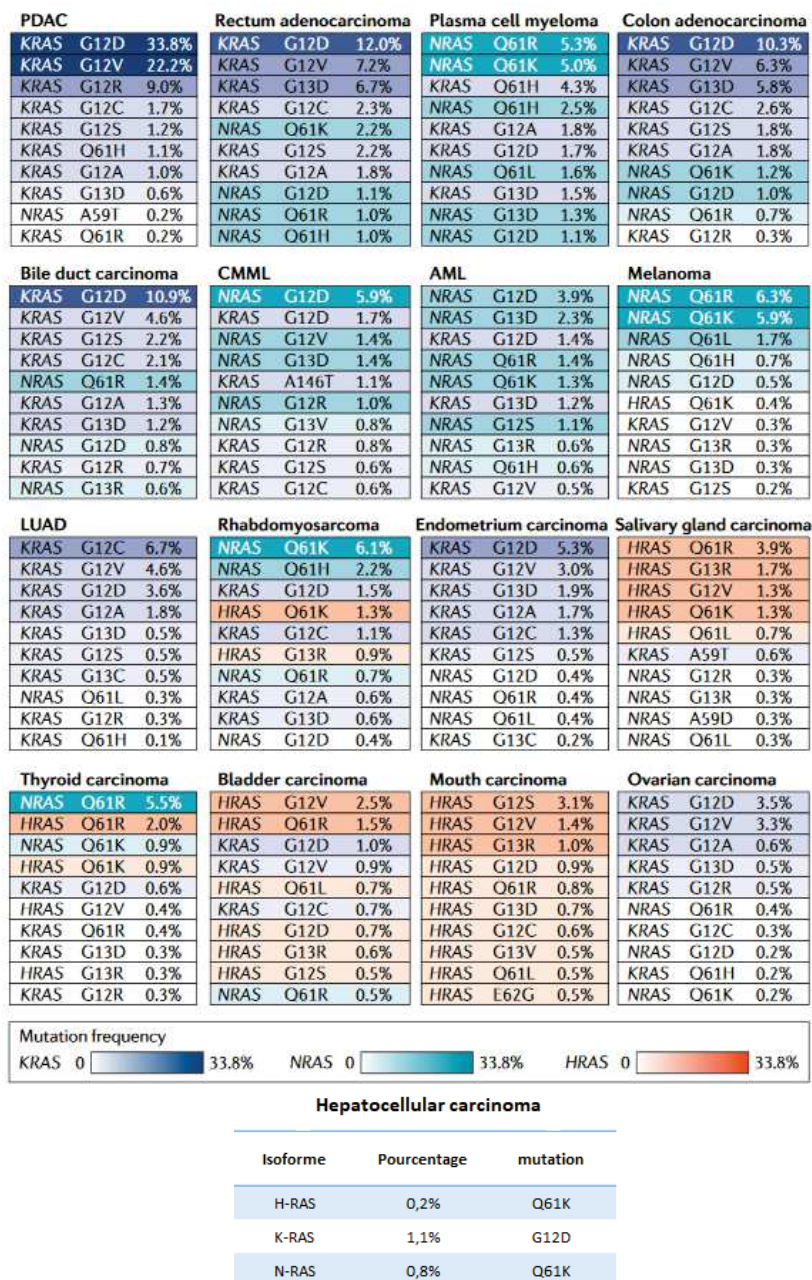


Figure 8 - Spectre mutationnel de RAS oncogénique en fonction du type de cancer
 Représentation des fréquences de mutations de RAS par cancer en fonction de l'isoforme et du codon (Base de données COSMIC) (À partir de Siqi Li et al, 2018)

3. Effecteurs de RAS

RAS se lie à une dizaine d'effecteurs formant ainsi un réseau complexe de signalisation (Voir **Figure 9**). Ces protéines interagissent avec RAS-GTP via leur « Ras binding domain » (RBD). Les partenaires de RAS les mieux caractérisés vis-à-vis de leurs rôles oncogéniques sont RAF et PI3K, situées en amont des voies MAPK et AKT/mTOR. En parallèle, plusieurs effecteurs de RAS contribuent au rôle pro-oncogénique de RAS (Gimple and Wang, 2019). Dans cette partie je vais brièvement présenter quelques une de ces voies en me concentrant essentiellement sur les voies PI3K/AKT et RALGDS. Par la suite une partie entière sera consacrée à la voie des MAPK kinases.

La voie PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K/AKT fait partie des voies les plus dérégulées dans le contexte du cancer, elle est notamment constitutivement active dans plus de 30% des carcinomes hépatocellulaires (Zucman-Rossi et al., 2015). Cette voie contrôle plusieurs mécanismes cellulaires comme la prolifération, la survie, le métabolisme et la migration cellulaire. Elle est particulièrement importante dans le foie où elle est la principale actrice de la réponse à l'insuline, permettant ainsi de stabiliser le taux de glucose sanguin (Huang et al., 2018).

Parmi les effecteurs essentiels de la voie, la famille des phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) joue un rôle essentiel. En particulier, la classe I des enzymes PI3K composée des sous unités catalytiques p110 α , p110 β , p110 γ et p110 δ , est celle dont le rôle oncogénique est largement établi. Ces sous-unités ne sont pas complètement redondantes fonctionnellement. La sous-unité alpha (gène PI3KCA), dont le niveau d'expression est le plus élevé dans la majorité de tissus, notamment dans le foie, est la seule qui est fréquemment muté dans les cancers (Castellano and Downward, 2011). Le contrôle de p110 α repose en partie sur sa sous-unité régulatrice p85, qui limite l'activité kinase de la sous-unité p110. L'activation de p110 α se déroule selon deux mécanismes distincts. Le premier mécanisme fait appel au recrutement par une RTK activée dont la phosphorylation permet la liaison du complexe p110 α /p85. Cela induit un changement conformationnel, qui permet l'activation de PI3K et son association à la membrane plasmique. Alternativement, la liaison de p110 α avec RAS-GTP active la protéine indépendamment de p85 (Martini et al., 2014). Les mécanismes sous-jacents la préférence d'une stratégie d'activation par rapport à l'autre sont mal compris. Il est toutefois possible qu'ils soient dépendants de la mise en place d'échafaudages

protéiques, dont l'organisation est différente en fonction des conditions physiologiques et du contexte cellulaire. Par exemple, les protéines adaptatrice IRS-1 et 2 facilitent l'interaction de p110 α avec le récepteur à l'insuline. La formation de ce complexe permet l'activation (RTK-dépendante) de p110 α et la transmission de signal essentielle au stockage et à la transformation du glucose en glycogène (White, 2002). De manière intéressante, ces stratégies d'activation alternatives facilitent un contournement des effets de certaines thérapies ciblées. En effet, il a été montré que le traitement de lignées de cancer colorectal KRAS mutées avec des anti-EGFR et des anti-MEK induit l'activation de PI3K via les récepteurs tyrosines kinases (HER2, HER3 etc...) (Vitiello et al., 2019). De surcroît, les mutations activatrices les plus fréquentes de p110 α affectent le mode de recrutement de la protéine. La mutation E542K/E545K empêche l'inhibition de l'activité kinase par p85 mais reste dépendante de la liaison avec RAS-GTP. À l'inverse, la mutation du domaine kinase H1047R permet l'activation de la protéine en absence de RAS-GTP, mais cette dernière est affectée par la liaison avec p85 (Zhao and Vogt, 2010).

La PI3K activée convertit le Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate (PI(4,5)P₂) en Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PI(3,4,5)P₃) et le Phosphatidylinositol-(4)-monophosphate (PI(4)P) en Phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphate (PI(3,4)P₂). La formation de PI(3,4,5)P₃ et de PI(3,4)P₂ permet alors la transmission du signal via le recrutement d'effecteurs tel que PDK1. En conditions normales, l'activation de la voie est transitoire. En effet, la phosphatase PTEN hydrolyse le phosphate 3 du PIP₃, inhibant ainsi son activité signalétique. Similairement, d'autres phosphatases limitent l'état de phosphorylation du phosphatidylinositol au niveau des positions 4 et 5 (INPP4 et INPP5). La délétion ou les mutations inactivatrices de ces protéines constituent une stratégie permettant l'activation constitutive de la voie PI3K (Ijuin, 2019). Le PI(3,4,5)P₃ et le PI(3,4)P₂ induisent le recrutement de la protéine kinase PDK1, qui suite à son activation interagit avec de nombreux substrats, le principal étant AKT, qui est phosphorylé au niveau de la thréonine 308. Cette marque ne permet pas l'activation complète d'AKT mais elle est suffisante pour activer le complexe mTORC1 via l'inhibition des complexes TSC1 et TSC2. L'activation de mTORC1 stimule la croissance cellulaire et la synthèse protéique tout en permettant à son tour l'activation de p70S6K, qui produit une boucle de rétrocontrôle négative (Martini et al., 2014). En effet, l'activation de p70S6K induit la dégradation de IRS-1, limitant ainsi l'interaction en PI3K et les RTK (Harrington et al., 2005). Par ailleurs, l'activation complète d'AKT est dépendante de sa phosphorylation au niveau de la serine 473 par le complexe mTORC2. Une fois pleinement activé, AKT induit la phosphorylation de ces substrats, en particulier celle de BAD et FOXO dont les fonctions pro-apoptotiques sont inhibées. Une étude a montré que différents niveaux

d'activation de la voie PI3K/AKT/FOXO1 intervenaient au sein d'une population cellulaire traitée à l'IGF-I (Gross et al., 2019). Les bases signalétiques de ces différences d'activité restent à déterminer. Toutefois, plusieurs hypothèses peuvent être proposées. Ces différences pourraient être dues à (1) des variations locales des niveaux d'expression des récepteurs et protéines effectrices de la voie, (2) aux éléments responsables du transport nucléo-cytoplasmique des protéines cibles d'AKT, ou (3) à la régulation des boucles de rétro-contrôle négatives de la voie, en particulier celle des phosphatases. Concernant ce dernier point, il est intéressant de noter que plusieurs phosphatases impliquées dans la régulation d'AKT, comme PP1 ou PP2A sont aussi impliqués dans la régulation de la voie des MAPK, ce qui souligne une importante connexion entre ces deux voies. (Xiao et al., 2010).

Voie de signalisation RAL

RAS-GTP interagit avec l'ensemble des protéines de la famille RAL-GEF qui sont au nombre de quatre : RalGDS, Rgl1, Rgl2/Rif et Rgl3. Ces protéines sont activées grâce à leur liaison avec RAS-GTP, acquérant ainsi la capacité de catalyser l'échange du GDP en GTP des petites GTPase « Ras-like » : RalA et RalB (Moghadam et al., 2017). RalA et RalB peuvent aussi être activées indépendamment de RAS par les GEF RalGPS1 et RalGPS2, dont l'activation semble être dépendante de la protéine Aurora Kinase A (AKA) (Ceriani et al., 2007; Lim et al., 2010). Suite à leur liaison au GTP, les protéines Ral se lient à de nombreux effecteurs notamment RalBP1, Sec5 et Exo84 (Gentry et al., 2014). RalBP1 possède une activité GTPasique, qui inhibe l'activation de Rac1 et Cdc42, limitant ainsi leurs actions sur le remodelage du cytosquelette et la promotion de l'invasion. De manière générale, RalBP1 interagit également avec un grand nombre de substrats impliqués dans la réponse au stress cellulaire (protéines anti-apoptotiques et chaperones). Il présente lui-même une fonction de pompe d'efflux qui permet d'éliminer des composés toxiques issues des traitements de chimiothérapies ou radiothérapies (Vatsyayan et al., 2010). Sec5 et Exo84 sont surtout connus pour leur rôle dans l'initiation de l'exocytose et de l'endocytose (Moskalenko et al., 2003). En se liant avec RalB, Sec5 permet aussi l'activation de la protéine kinase TBK1, qui favorise la translocation nucléaire de NF- κ B (Chien et al., 2006). De manière intéressante, un cribble réalisé à partir de siRNA a montré que l'expression de TBK1 était essentielle à la survie de plusieurs lignées transformées par RAS (Barbie et al., 2009). Ces résultats semblent être en liens avec l'activité anti-apoptotique et pro-inflammatoire de la signalisation NF- κ B. Une étude a aussi montré que RalA était activé dans une majorité de carcinomes hépatocellulaires et de lignées hépatiques. La forte activité de RalA dans ces cellules est associé à

un phénotype invasif et à l'expression du marqueur de cellule souche CD133 (Ezzeldin et al., 2014).

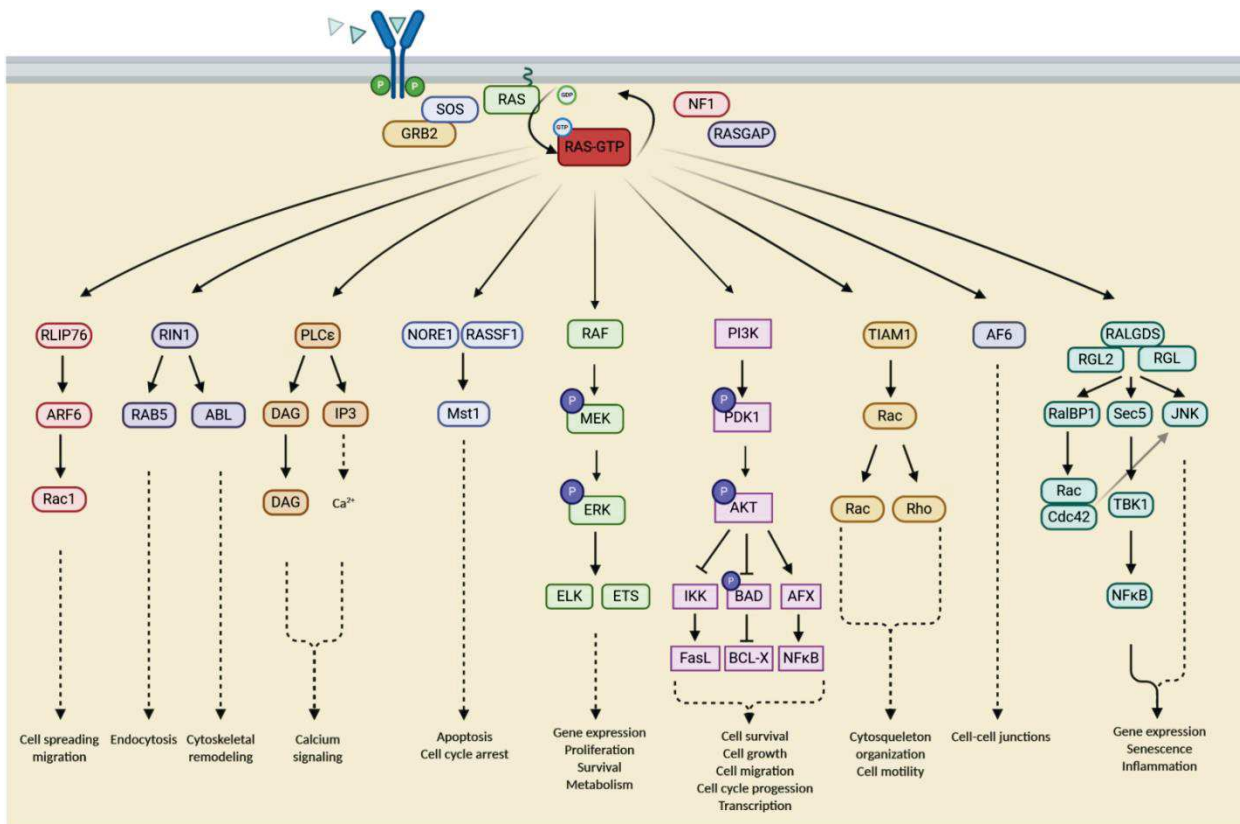


Figure 9 - Effecteurs de RAS-GTP

La fixation du ligand sur le récepteur tyrosine kinase permet son autophosphorylation et le recrutement du complexe GRB2-SOS. SOS induit la libération de RAS de son GDP et permet la fixation d'une molécule de GTP. Les protéines GAP (NF1, RASGAP) contrôlent l'inactivation de RAS en favorisant l'hydrolyse de GTP. RAS activé se lie à ses effecteurs via leur domaine RBD pour activer la transduction de signal de plusieurs voies contrôlant le phénotype cellulaire

Les kinases effectrices de la voie des MAPK

L'activation de RAS mène au recrutement de ses protéines effectrices au niveau de la membrane plasmique. Certaines sources soulignent également que RAS pourrait être actif à partir de la membrane du Golgi et d'autres structures endomembranaires (Quatela and Philips, 2006). Dans le cadre de la voie des MAPK « classique », ses partenaires privilégiés sont les kinases RAF (MAPKKK), qui à la suite de son activation induit une cascade de phosphorylation passant par

L'activation de MEK (MAPKK) puis de ERK (MAPK). Cette réaction en chaîne permet l'activation des substrats cytoplasmiques et nucléaires de ERK qui à leur tour induisent des réponses biologiques ayant un impact sur la prolifération, la survie, la migration cellulaire, l'inflammation, etc... Chez les mammifères, une des particularité de la voie vient de la présence de plusieurs isoformes pour chaque acteur de la transduction du signal. Il existe en effet trois isoformes de RAF (A-RAF, B-RAF et C-RAF), deux isoformes de MEK (MEK1 et MEK2) et 2 isoformes de ERK (ERK1 et ERK2). Bien que chaque isoforme de RAF, MEK ou ERK présente des spécificités fonctionnelles, ils sont individuellement capables d'activer la voie des MAPK. L'hypothèse proposée afin d'expliquer cette diversification est que ces protéines s'engagent dans des interactions complexes facilitant ainsi la régulation spatio-temporelle de la voie (Wimmer and Baccharini, 2010). Dans cette partie je vais détailler les mécanismes d'activation de la cascade MAPK tout en présentant les éléments de régulation qui permettent son contrôle.

RAF

Les kinases RAF sont des sérines thréonines kinases dont la régulation de l'activité est relativement complexe. La portion N-terminale des 3 isoformes de RAF est composée d'un domaine régulateur contenant un RBD et un domaine riche en cystéine. Le domaine régulateur permet de maintenir RAF dans un état inactif dit « fermé », qui masque la portion C-terminale composée du domaine serine/thréonine kinase. La liaison du RBD avec le domaine effecteur de RAS permet l'ouverture de la protéine et la libération du domaine kinase. Pour B-RAF cette interaction avec RAS activé est suffisante pour induire la transduction du signal. Cependant l'activation des isoformes A-RAF et C-RAF (RAF1) nécessitent d'autres modifications notamment la déphosphorylation des serines 259 et 621 qui maintiennent la conformation dans un état fermé via leur liaison avec la protéine chaperonne 14-3-3 (Thorson et al., 1998). De plus, A-RAF et C-RAF nécessitent également la phosphorylation de résidus au niveau de la partie N-terminale du domaine kinase afin de maintenir la conformation ouverte de la protéine. Cette phosphorylation semble être induite par des kinases de la famille de Src et des caseine kinases (Lavoie and Therrien, 2015). Pour B-RAF en revanche certains de ces résidus sont constitutionnellement actifs, ce qui résulte en une plus forte activité de la protéine. L'absence de ces points de contrôle pour l'activation de B-RAF a été proposé d'être une des raisons pour lesquelles cet isoforme présente le plus fort taux de mutations dans les cancers (Emuss et al., 2005). Une étude a en effet montré que l'expression de B-RAF, mais pas celle de C-RAF, était nécessaire pour induire l'initiation des mélanomes NRAS dépendants. Toutefois, la double délétion de B-RAF et C-RAF bien qu'inhibant fortement la prolifération induit l'émergence de

clones résistants et dont l'activation de la voie MAPK devient dépendante de A-RAF (Dorard et al., 2017b). Ces résultats confirment que chaque isoforme possède des caractéristiques propres, tout en conservant la capacité de compenser la perte de fonction d'un ou plusieurs isoforme. Ce constat est particulièrement intéressant si l'on se penche sur le mode classique d'activation de RAF. En effet, l'activation de RAF passe par sa dimérisation (homo- ou hétéro-dimères) qui facilite son auto-phosphorylation (Weber et al., 2001). La dimérisation de B-RAF et C-RAF est la plus fréquente et induit ainsi la formation de complexes protéiques avec MEK. La mise en place de cet échafaudage protéique est orchestrée par la protéine KSR1, qui permet le rapprochement de dimères de RAF à MEK (Voir **Figure 10**). Il est également possible que la mise en place de ces complexes soit facilitée par la dimérisation de RAS. L'activation de ERK induit toutefois la production d'une boucle de rétrocontrôle qui induit son ancrage à KSR1, le désassemblage des complexes protéiques RAF-MEK ainsi que l'inactivation de RAF et MEK par phosphorylation (McKay et al., 2009; Ritt et al., 2016). Cette rétro-inhibition est particulièrement importante pour contrôler la dynamique spatio-temporelle d'activation de la voie. Ce mécanisme explique également des nombreux cas de l'échappement de tumeurs aux thérapies ciblées. Par exemple, le Vemurafénib, un inhibiteur spécifique du mutant B-RAF^{V600E}, fréquent dans le mélanome, peut induire une réactivation contradictoire de la voie MAPK par plusieurs biais. En particulier, il a été montré que l'inhibition de la phosphorylation de ERK suite au traitement empêche l'inhibition de KSR1 qui va donc faciliter la formation de complexes de MEK avec A-RAF, qui devient son partenaire alternatif (McKay et al., 2011a). Une stratégie visant à empêcher la mise en place de ces mécanismes compensatoires est l'utilisation combinatoire de drogues ciblant plusieurs acteurs de la voie simultanément. En particulier des inhibiteur de MEK ont été testés en clinique et ont permis de limiter ces réactivations contradictoires (Eroglu and Ribas, 2016). Dans la partie suivante je vais donc me concentrer sur la biologie et les mécanismes de régulation de MEK.

MEK

Les protéines kinases MEK1 et MEK2 sont activées par RAF via la phosphorylation des sérines 218 et 222 pour MEK1 et 222 et 226 pour MEK2. Il est intéressant de souligner que RAF n'est pas le seul activateur de MEK1/2 ; en effet la protéine kinase PAK1 ainsi que les kinases effectrices à l'origine des voies MAPK atypiques (voie p38, JNK, ERK5) sont également capables d'induire l'activation de MEK et peuvent donc avoir des conséquences sur l'activation de la voie MAPK classique. MEK1 et MEK2 sont tous deux capables d'activer ERK1/2 par phosphorylation. Cette réaction est amplifiée par l'homo- et l'hétéro-dimérisation de MEK. Cependant, contrairement à MEK2, la délétion de MEK1 est létale au cours du développement

embryonnaire (Bélanger et al., 2003). Ce phénotype est toutefois contrebalancé par l'augmentation du nombre de copie de MEK2 (Aoidi et al., 2016). Une nouvelle fois, Cela suggère que le phénotype de souris invalidé pour MEK1 n'est pas dû à son activité spécifique, mais plutôt au dosage de l'intensité du signal, soulignant une nouvelle fois l'importance des différences quantitatives dans le contrôle de l'activation des MAPK. MEK1 se distingue de MEK2 par la présence d'un site de phosphorylation au niveau de la thréonine 292. La phosphorylation de cette thréonine par p-ERK permet l'ancrage des phosphatases PP1 et PP2A, produisant ainsi une nouvelle boucle de rétrocontrôle impactant l'activité de MEK1 et, indirectement, de MEK2 (Voir **Figure 10**). En conséquence, l'inhibition ou la mutation de MEK1 (T292A) induit une activation prolongée de ERK (Kocieniewski and Lipniacki, 2013).

Les mutations de MEK sont relativement rares dans les cancers mais l'inhibition de la protéine prévient le développement de tumeurs dans de nombreux modèles pré-cliniques, qui dépendent de l'activation des MAPK. Ce constat a poussé au développement d'inhibiteurs comme le Tramétinib, qui est aujourd'hui utilisé en clinique. Ces inhibiteurs ont cependant relativement peu d'intérêt s'ils ne sont pas utilisés en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques. En effet, comme pour les inhibiteurs de RAF, leur utilisation induit une réactivation de ERK à la suite de l'inhibition des boucles de rétrocontrôle de MEK. De plus, plusieurs études montrent que l'utilisation des inhibiteurs de MEK induit également l'activation des voies parallèles à la voie des MAPK kinases, comme les voies PI3K, YAP/TAZ ou STAT3/NF- κ B. Bien qu'en théorie ces résultats permettent de proposer des thérapies multi-drogues, leur utilisation se heurte aux problèmes de tolérance car il est difficile d'ajuster la fenêtre thérapeutique (Caunt et al., 2015).

ERK

Les protéines ERK sont la principale cible de MEK. Il existe plusieurs isoformes de ERK, en particulier ERK1 et 2 sont les acteurs de la voie MAPK classique. Tout comme les autres acteurs de la voie MAPK, ERK1 et ERK2 présentent un pourcentage d'homologie élevé (84%), sans toutefois être complètement fonctionnellement redondantes. Ainsi, chez la souris la perte de ERK2 est létale lors du développement embryonnaire alors que la délétion de ERK1 donne naissance à des animaux viables (Hatano et al., 2003; Nekrasova et al., 2005). Cependant, la plupart des études suggèrent que ERK1 et ERK2 sont capables d'interagir avec les mêmes substrats avec des affinités comparables (Buscà et al., 2016). Une telle différence phénotypique peut probablement s'expliquer par le fait que dans une vaste majorité de tissus le niveau d'expression de ERK2 est supérieur à celui de ERK1 (Buscà et al., 2015). La formation de complexes avec p-MEK permet aux protéines ERK d'être phosphorylées au niveau des résidus

Threonine183 et Tyrosine185. La dissociation des complexes autorise alors l'interaction avec ses substrats nucléaires et cytoplasmiques. ERK1/2 interagissent directement avec plus de 600 substrats impliqués dans de nombreux mécanismes comme par exemple la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et l'adhérence cellulaire (Ünal et al., 2017). Ce nombre impressionnant d'interactions protéiques soulève plusieurs questions quant à la régulation de l'activation de ERK et sa capacité à induire autant de réponses biologiques. Nous allons donc essayer d'appréhender ces questions au travers de quelques exemples.

Certains substrats de ERK sont des régulateurs directs de son activité. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, son activation induit systématiquement la production de boucles de rétrocontrôle négatives. P-ERK lui-même inhibe l'action de MEK et de RAF par phosphorylation (Dougherty et al., 2005; Eblen et al., 2004). L'activation de ERK a également des effets indirects sur la régulation de la voie MAPK. Par exemple, son activation de la kinase RSK2 induit la phosphorylation de SOS, dont l'adressage à la membrane devient alors impossible. En conséquence, RAS reste lié au GDP et la voie est éteinte (Douville and Downward, 1997). En parallèle, l'activation transcriptionnelle médiée par ERK induit l'expression de nombreux gènes sources de rétrocontrôles négatifs. Certaines phosphatases de la famille des DUSP par exemple, déphosphorylent ERK dans le noyau (Brondello et al., 1997). Les protéines Sprouty, également des cibles transcriptionnelles de la voie MAPK, interfèrent avec l'interaction GRB2-SOS pour inhiber la signalisation (Casci et al., 1999). Certaines cibles de ERK sont également des acteurs de la mise en place de boucles de rétro-contrôles positives. Par exemple, ERK peut phosphoryler la phosphatase DUSP6 dans le cytoplasme. DUSP6, qui est une cible transcriptionnelle de la voie Erk, mène à l'inactivation de ERK, toutefois sa phosphorylation par ce dernier induit sa dégradation par le protéasome (Marchetti et al., 2005). De la même manière, ERK inhibe l'action de RKIP par phosphorylation. Lorsqu'il est actif, RKIP interfère avec le complexe RAF-MEK et prévient donc la phosphorylation de MEK. Sa phosphorylation par ERK empêche cette action et maintient donc la voie MAPK active (Shin et al., 2009). De plus, ERK1/2 permettent également l'activation de la protéase ADAM17 (Saad et al., 2019). Cette protéine se caractérise par son activité de « Sheddase », c'est-à-dire qu'elle permet le clivage de l'écto-domaine des protéines membranaires. L'activation d'ADAM17 permet donc le relargage de nombreux composés dans l'espace extracellulaire. Parmi ces composés on retrouve notamment le TNF- α , L'IL6 et les ligands liés aux RTK. Ces derniers vont alors avoir une action autocrine ou paracrine et induire une nouvelle activation de la voie MAPK (Gooz, 2010) (Voir **Figure 10**).

En résumé, il apparaît que l'interaction de ERK avec ses substrats permette d'accéder à des devenir contradictoires favorisant tantôt l'inhibition de la voie, tantôt son activation. Afin

d'aboutir à une activité pertinente pour le devenir cellulaire il convient évidemment de les réguler temporellement. Cela soulève des questions concernant les mécanismes moléculaires de la régulation temporelle de l'activité MAPK. Plusieurs évidences suggèrent que cette modulation est sous le contrôle de la distribution spatiale de ERK. En effet, de nombreux complexes et assemblages protéiques permettent de moduler la localisation de ERK ou de faciliter son interaction avec ses différents substrats. Nous avons déjà évoqué KSR1, qui est une protéine d'échafaudage qui facilite l'assemblage de 3 kinases du module MAPK. Il s'ensuit que l'activité de la voie est dépendante du niveau d'expression de KSR. En effet, lorsqu'il est fortement exprimé, KSR augmente la cascade de signalisation via l'assemblage des différents modules MAPK. A l'inverse s'il est faiblement exprimé, l'activité MAPK est plus faible (Nguyen et al., 2002). Les protéines MP-1 et MORG-1 sont également des protéines d'assemblage décrites pour leurs implications dans la régulation de la voie MAPK. MP-1 interagit avec MEK1 et ERK1 et l'associe avec p14, une protéine spécifique des endosomes tardifs. Cette localisation facilite l'interaction de MEK1 avec PAK1, ce qui induit un réarrangement du cytosquelette favorisant la migration cellulaire (Pullikuth et al., 2005). De plus, MP-1 interagit également avec MORG-1, ce qui augmente l'efficacité de la formation de complexes protéiques comprenant B-RAF, C-RAF, MEK1/2 et ERK1/2. La mise en place de ces échafaudages protéiques constitue un exemple de mécanisme par le biais duquel différents agonistes induisent des réponses d'activation distinctes. Notamment, il a été montré que la stimulation des cellules avec du sérum, de l'acide lysophosphatique ou du 12-miristate-13-acetate favorise la formation de ces complexes alors que la stimulation à l'EGF n'a au contraire aucun effet (Vomastek et al., 2004). D'autres protéines d'assemblage permettent de restreindre la localisation de ERK dans un compartiment. C'est le cas de PEA-15, qui, lorsqu'il se lie à ERK, favorise sa rétention dans le cytoplasme via son « Nuclear Export Signal (NES) » (Whitehurst et al., 2004). PEA-15 une fois lié à ERK favorise l'ancrage de ce dernier avec RSK2 afin de médier son activation et ses fonctions cytoplasmiques (Vaidyanathan and Ramos, 2003). La phosphorylation de ERK permet, lorsqu'il est libre de cet assemblage, d'exposer son site de translocation nucléaire (NTS). qui se lie à l'importine7 autorisant son import dans le noyau (Zehorai et al., 2010). Certaines protéines favorisent également la localisation de ERK dans le noyau. Mxi2, par exemple, entre en compétition avec PEA-15 pour se lier à ERK et facilite sa localisation nucléaire. En accord avec ce scénario, la délétion de Mxi2 résulte en une diminution de l'activité nucléaire de ERK sans impacter ses fonctions cytoplasmiques (Casar et al., 2007). Une fois dans le noyau, ERK interagit avec plus de 100 substrats, comprenant des enzymes de modification de l'ADN et des histones, des protéines de l'enveloppe nucléaire, des protéines de structure et un grand nombre de facteurs de

transcription. En particulier, les facteurs de transcription connus pour leur potentiel oncogénique, tels que les membres de la famille ETS/AP-1 (c-FOS, c-JUN, ELK1, FRA1 etc...) ainsi que c-myc sont des cibles de ERK. Le temps de rétention de ERK dans le noyau impacte directement l'activation de ces facteurs de transcription. Par exemple, il a été montré qu'il est nécessaire de maintenir des niveaux nucléaires de ERK activé pour induire l'activation prolongée de c-FOS. La stimulation par l'EGF n'induit ici qu'une activation nucléaire transitoire de ERK dont l'inhibition rapide aboutit à la dégradation de c-FOS. A l'inverse, la stimulation par le PDGF stabilise ERK, ce qui permet la phosphorylation de c-FOS et la mise en place de son activité transcriptionnelle (Murphy et al., 2002).

L'ensemble des données présentées ici suggèrent que les différents types de signaux extracellulaires intégrés par les cellules, ainsi que leur intensité où les éventuelles mutations des acteurs de la transmission du signal, ont un impact spécifique sur la cascade de signalisation. En fonction du contexte cellulaire, la cascade s'organise donc en un ensemble de complexes protéiques favorisant ou non la maintenance de l'activité signalétique par le biais de la régulation spatio-temporelle de ERK (voir **Figure 10**). En conséquence, l'activité des MAPK oscille entre des phases d'activations et d'inhibitions transitoires, on parle alors de « ERK waves ». Ces oscillations ont fait l'objet d'une étude publiée récemment et qui suggère que la modulation de l'intensité et de la fréquence des pulsations contrôle l'état souche ou différenciée des cellules de l'épiderme (Hiratsuka et al., 2020). Ce mécanisme a également été étudié dans le cadre de tumeurs mammaires où une équipe a mis au point un système basé sur du FRET permettant de suivre l'activité de ERK *in vivo*. De manière intéressante les auteurs ont montré que la tumeur était hétérogène au regard de l'activité de ERK et que les cellules présentant une faible activité étaient moins sensibles aux traitements par les inhibiteurs de MEK. En revanche, les cellules présentant un niveau très élevé de ERK se sont révélées moins efficaces quant à la formation de tumorosphères *ex vivo* et de tumeurs *in vivo* (Kumagai et al., 2015).

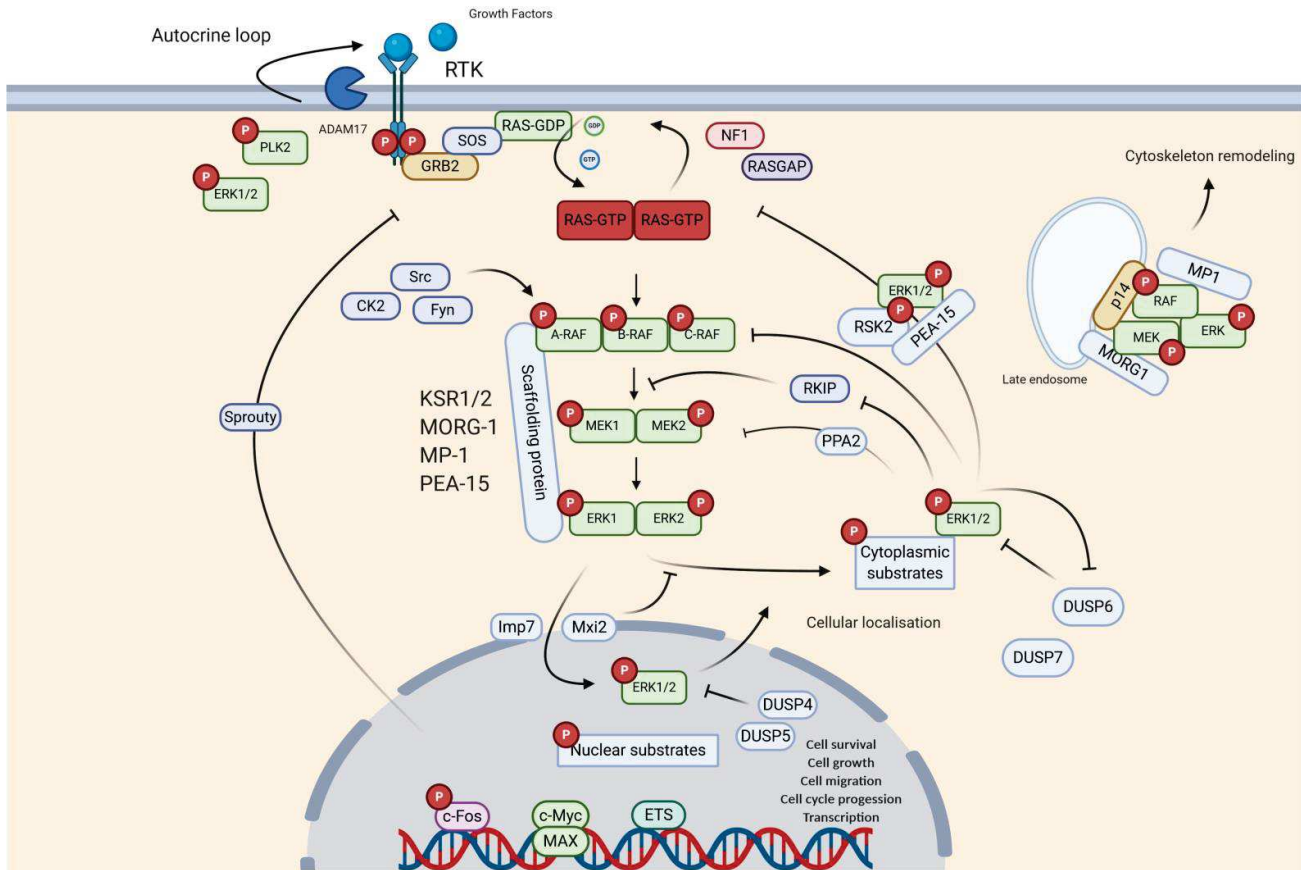


Figure 10 - Transduction de signal et régulation spatio-temporelle de la voie MAPK

La fixation des facteurs de croissance induit l'activation de RAS qui produit la transduction du signal de RAF, MEK et ERK. L'activation de ERK contrôle la maintenance du signal en produisant des boucles de rétrocontrôles négatives ou positives qui dépendent des interactions protéiques (substrats, scaffolds), de la régulation de l'expression des gènes et de sa localisation

IV. La carcinogénèse hépatique

Parmi les types de cancer les plus fréquents dans le monde les cancers primitifs du foie se positionnent à la 6^{ème} place avec 841 080 nouveaux cas en 2018. Cette année-là ils provoquent 781 631 décès ce qui en fait la 4^{ème} cause de mortalité liée aux cancers. Les données épidémiologiques font également état d'une grande disparité géographique avec une forte prévalence en Asie (50,9%) en Europe (23%) et Amérique du Nord (11,9%) (<https://gco.iarc.fr>). Cette maladie touche préférentiellement les hommes pour qui l'incidence moyenne est de 2 à 5 fois supérieure à celle des femmes. Ces différences de sensibilité sont relativement mal comprises mais certaines études suggèrent qu'elles seraient en partie liées aux interactions entre les récepteurs aux hormones sexuelles (androgène et œstrogène) et le facteur de transcription HNF-3A (Keng et al., 2012). Les néoplasies hépatiques se subdivisent en deux classes majoritaires, les carcinomes hépatocellulaires (CHC) et les cancers des voies biliaires intra hépatiques ou cholangiocarcinome (CCA) qui représentent respectivement plus de 70% et 15% des cas (Massarweh and El-Serag, 2017). Il existe également des formes mixtes qui arborent des caractéristiques histologiques propres aux deux maladies. Cette partie se concentrera sur le CHC qui est au centre de mon travail expérimental.

1. Le carcinome hépatocellulaire : physiopathologie

Le carcinome hépatocellulaire est un problème croissant de santé publique. En effet son incidence est en continuelle augmentation dans la plupart des pays avec 8,3 cas pour 100 000 personnes en 2018 contre 6,2 en 2008 (ASR (McGlynn et al.)). En parallèle, le taux de survie à 5 ans après diagnostic est de 14% en moyenne ce qui en fait un cancer de très mauvais pronostic. Ce chiffre descend à 2% pour les stades les plus avancés pour lesquels les traitements efficaces restent très limités (Llovet et al., 2021) (Voir **Figure 11**). La grande majorité des CHC (70-90%) se développent dans un contexte de foie pathologique. Cet environnement particulier stimule la prolifération des cellules hépatiques menant à la formation de nodules dysplasiques pouvant évoluer en CHC précoce (<3cm de diamètre) puis avancés (>3cm, multi-nodulaire et invasion de la veine porte). Les patients développent parfois des métastases extra-hépatiques dans les poumons (53%), les ganglions (53%), les os (23%), les glandes surrénales (11%), le péritoine et l'omentum (11%) et le cerveau (2%) (Becker et al., 2014). Dans cette partie je vais présenter

brèvement différents aspects de la physiopathologie hépatique en passant par les origines de la maladie, ses bases moléculaires, son hétérogénéité et sa prise en charge.

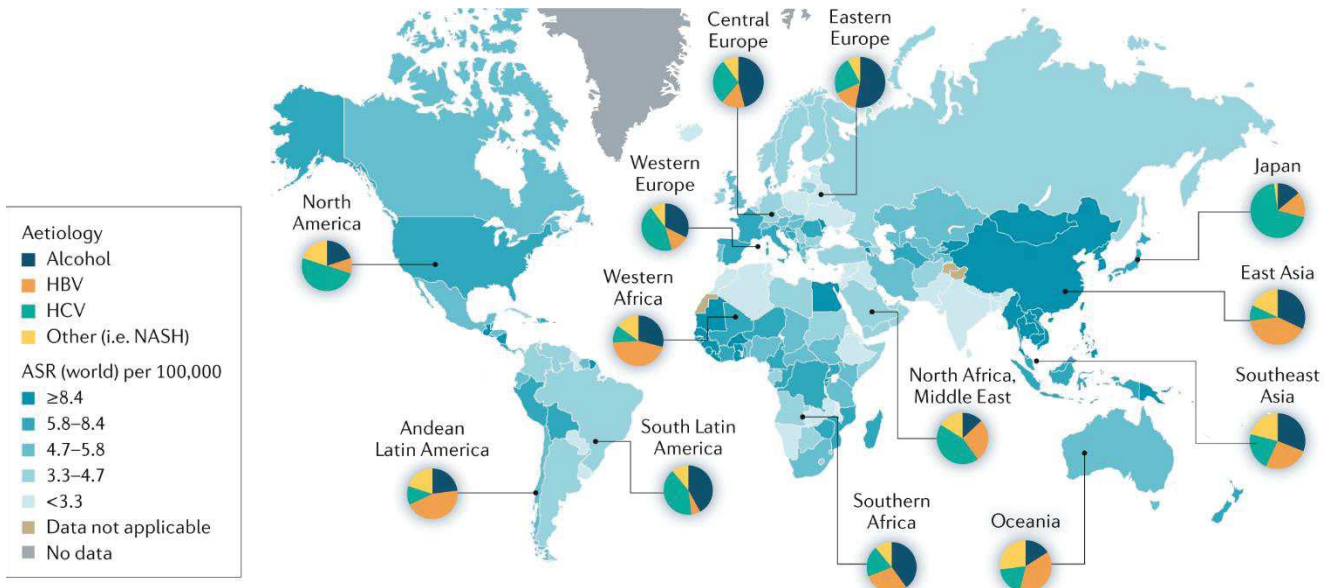


Figure 11 - Distribution géographique de l'incidence des CHC en fonction de etiologies

L'ASR représente le taux d'incidence standard selon l'âge en 2020. Le taux le plus élevé d'incidence se trouve en Asie de l'Est, la Mongolie étant le pays le plus touché où l'infection à HBV prédomine. HCV est le facteur majoritaire en Europe de l'ouest, aux Etats-Unis et au Japon. (Llover et al. 2021)

a. Etiologie du CHC

Les principales causes associées à la maladie sont bien identifiées. Parmi ces causes on retrouve : les hépatites virales, la consommation excessive d'alcool, un régime alimentaire riche en graisses et en sucres et plus rarement l'exposition à des carcinogènes chimiques (Voir **Figure 12**). Ces facteurs de risques ont des effets directs et/ou indirects sur la transformation des cellules hépatiques. Dans le premier cas ils provoquent des mutations de leur séquence génique et/ou l'expression de protéines exogènes qui interfèrent avec la machinerie cellulaire. Dans le deuxième ils induisent un stress hépatique provoquant mort cellulaire, prolifération, inflammation et modification de l'environnement hépatique. Ces dommages facilitent l'accumulation de graisse (stéatose) et la déposition de matrice extracellulaire (fibrose) pouvant mener à un stade avancé et dans lequel l'architecture hépatique est complètement modifiée, la cirrhose. Plus de 70 à 90% des CHC se développent alors dans un contexte de foie pathologique, cela souligne l'importance de l'environnement et du stress hépatique dans le processus de transformation (Sanyal et al., 2010).

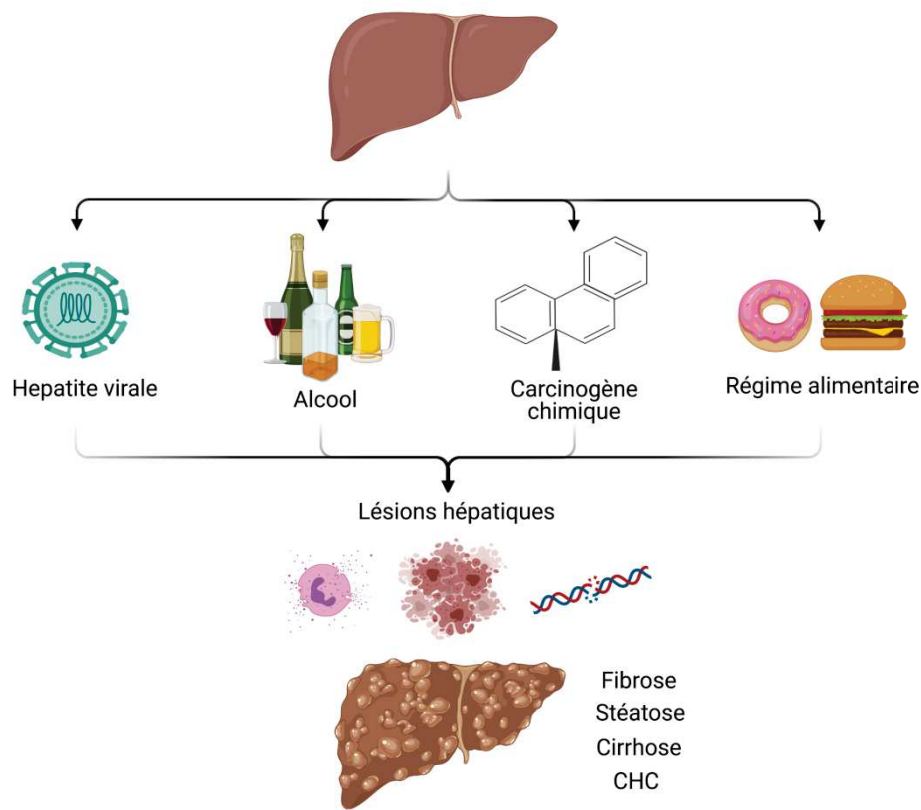


Figure 12 - Les différentes étiologies hépatiques

Virus de l'hépatite B

L'infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) touche plus de 300 millions de personnes avec une forte incidence en Asie et en Afrique. La présence du virus dans ces régions du globe corrèle avec un nombre élevé de cas de CHC (Ott et al., 2012). En effet on estime que l'infection chronique à HBV augmente d'un facteur 100 le risque de développer un CHC (Arbuthnot and Kew, 2001). HBV est un virus à ADN de la famille des hepadnavirus. Il se transmet majoritairement par le sang ou dans une moindre mesure par les fluides corporels comme la salive, le sperme et les sécrétions vaginales. Ces virus ne disposent pas d'intégrase virale. En conséquence le cycle de vie du virus dépend de la persistance, dans le noyau des cellules infectées, d'un ADN circulaire appelé « covalently closed circular DNA » (cccDNA) qui agit comme un mini chromosome (Seeger and Mason, 2015). Néanmoins, le génome d'HBV présente des sites de liaison avec la topoisomérase I qui favorise l'intégration par recombinaison de séquences virales dans le génome de la cellule hôte (Wang and Rogler, 1991). Des événements

d'intégration ont été observés à proximité des régions régulatrices d'oncogènes comme c-myc ou la cycline A (Hsu et al., 1988; Wang et al., 1992). Cependant, ce type d'insertion reste aléatoire et sa participation à la carcinogenèse hépatique reste controversée. La contribution de HBV au développement du CHC est multifactorielle et sous la dépendance de facteurs directs et indirects. Un facteur essentiel du processus de transformation lié au virus semble être associé à l'expression de la protéine virale HBx. Cette protéine est importante pour la réplication virale mais interfère également avec un grand nombre de mécanismes cellulaires. De plus, l'expression d'HBx dans des modèles transgénique de souris favorise le développement de tumeurs hépatiques (Slagle et al., 1996; Terradillos et al., 1997). En particulier, il a été montré que l'expression d'HBx stimulait la prolifération cellulaire en interagissant avec la protéine kinase Src (Klein and Schneider, 1997). Cette interaction permet l'activation de la voie RAS/MAPK via la phosphorylation des RTK et de RAF mais également celle des voies JAK/STAT et PI3K/AKT. De plus, l'expression d'HBx renforce l'activation de la voie MAPK en induisant l'expression des facteurs de transcription AP-1 (c-Fos et c-Jun). La littérature scientifique a aussi décrit le rôle d'HBx dans le contrôle de la mort cellulaire. En particulier, il a été montré que HBx pouvait interagir avec p53 pour limiter son action pro-apoptotique à la suite des dommages à l'ADN (Wang et al., 1995). Toutefois d'autres études montrent que l'expression d'HBx est parfois associée à une induction de l'apoptose indépendante de p53 (Koike et al., 1998; Terradillos et al., 1998). Cette dichotomie pourrait être liée au niveau d'expression de la protéine qui est susceptible de varier au cours du cycle de vie viral. En parallèle, l'environnement inflammatoire lié à l'infection par le virus favorise la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont très mutagènes (Levrero and Zucman-Rossi, 2016). De plus, la production de ROS peut mener indirectement à l'apparition de la fibrose et cirrhose hépatique. Alors, la modification de l'architecture hépatique altère la polarité cellulaire et les interactions avec la matrice, ce qui contribue fortement à la transformation (Davis and Kresina, 1996). De manière intéressante, l'analyse de tumeurs de patients HBV positifs a montré que toutes les cellules tumorales n'étaient pas systématiquement porteuses du virus (Bréchot et al., 1981). Cette observation souligne une nouvelle fois l'importance de la mise en place d'un environnement favorable à la transformation et montre également que l'infection à HBV est une source potentielle d'hétérogénéité intra-tumorale.

Virus de l'hépatite C

On estime que 71 millions de personnes sont porteuses du virus de l'hépatite C (HCV) qui est un virus à ARN simple brin de la famille des *Flaviviridae*. Le mode de transmission est quasi-similaire à celui d'HBV et les personnes présentant une forme chronique de la maladie ont

un risque de développer un CHC 15 à 20 fois supérieur à celui de la population générale (de Oliveria Andrade et al., 2009). Le développement tumoral intervient généralement plus de 20 ans après l'infection ce qui suggère que la carcinogénèse hépatique liée à HCV est un processus de transformation lent et multi-étape. Toutefois, cette dynamique est accélérée en cas de cooccurrence avec d'autres facteurs de risque comme HBV, HIV, l'alcoolisme ou l'obésité (El-Serag, 2012).

Une fois entré dans les hépatocytes à l'aide de différents récepteurs hépatocytaires (CD81, SR-B1, CLDN1, OCLN), HCV utilise la machinerie cellulaire pour effectuer son cycle de vie. Son génome sous la forme d'un ARN simple brin se fixe aux ribosomes cytoplasmiques et à la membrane du réticulum endoplasmique. Cela permet la production d'une poly-protéine qui est clivée par la suite en 10 protéines distinctes. Les 3 protéines structurales : la Core (C), l'enveloppe-1 (E1) et l'enveloppe-2 (E2) permettent de former de nouvelles particules virales. Tandis que les 7 protéines non structurales : p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B assurent le clivage du polypeptide, la réplication virale et l'assemblage des nouveaux virions (Murray and Rice, 2011). De manière intéressante chacune de ces protéines à l'exception de p7 semble avoir un rôle direct ou indirect dans l'acquisition d'un ou plusieurs « hallmarks of cancer » (Hibner and Grégoire, 2015).

Par exemple, plusieurs études montrent que les protéines Core, E2, NS3 et NS5A stimulent la prolifération cellulaire en activant la voie MAPK (Feng et al., 2005; Hayashi et al., 2000). Cette activation semble être sous la dépendance d'interactions avec des éléments situés en aval de la voie, en particulier avec certains récepteurs membranaires et avec RAF. En conséquences, l'activation des MAPK dépendantes des protéines HCV est généralement inhibée suite au traitement avec des inhibiteurs de MEK (Bürckstümmer et al., 2006; Zhao et al., 2005). Cette activation de la voie MAPK, notamment par la protéine Core, stimule également l'angiogénèse via l'up-régulation de HIF-1 α , la production de VEGF et d'angiopoïétine2 (Abe et al., 2012; Li et al., 2010). En parallèle, certaines protéines virales limitent l'expression suppresseur de tumeurs comme la protéine du rétinoblastome (Rb) (Munakata et al., 2007). C'est la protéine virale NS5B qui favorise la dégradation de Rb par le protéasome permettant la maintenance et la progression du cycle cellulaire. NS5B a également un rôle pro-inflammatoire en induisant la sécrétion de Lymphotoxine- β dans des tumeurs générées spontanément chez les souris FL-N/35, qui expriment la polyprotéine HCV (Simonin et al., 2013). Cette sécrétion s'accompagne de l'activation de la signalisation NF- κ B dont l'inhibition limite fortement l'oncogénèse. Les protéines HCV ont aussi un rôle dans la régulation de la mort cellulaire. La protéine Core notamment, semble avoir des effets similaires à HBx quant à la régulation de p53. L'activité

transcriptionnelle de p53 est ici stimulée par de faibles niveaux d'expression de Core, tandis qu'un niveau d'expression élevé inhibe son activité (Kao et al., 2004). D'autres mécanismes permettent de limiter l'induction de la mort cellulaire suite à l'infection. En particulier, l'équipe a montré que hépatocytes HCV⁺ des souris FL-N/35 étaient résistant à la mort cellulaire Fas dépendante induite par les lymphocytes T cytotoxiques (Disson et al., 2004). Ce mécanisme est dépendant de NS5A qui active la calpaïne, une protéase provoquant la dégradation de Bid. Etant donné que l'expression de Bid est essentielle à l'induction de l'apoptose médiée par les récepteurs de mort (FasL/Fas) sa dégradation favorise la survie cellulaire (Simonin et al., 2009). En parallèle, NS5A coopère également avec la signalisation TGF- β afin d'induire l'activation de l'EMT et l'apparition d'un phénotype pro-migratoire via l'expression du facteur de transcription Twist2 (Akkari et al., 2012). Enfin, l'infection à HCV a été décrite comme ayant un effet sur le métabolisme (Syed et al., 2010). Ce mécanisme passe par l'activation de SREBP1c qui provoque l'accumulation intracellulaire de lipides. Un tel déséquilibre de la synthèse lipidique des hépatocytes induit une altération des fonctions mitochondriales et du réticulum endoplasmique induisant la production de ROS. À son tour, ce stress oxydatif stimule la sécrétion de collagène de type I par les cellules étoilées du foie favorisant l'apparition de la fibrose hépatique (Gochee et al., 2003). L'infection par HCV altère également la zonation métabolique en modifiant le pattern d'expression de la « Fatty acid synthétase » ce qui provoque une stéatose hépatique localisée (Moreau et al., 2015). Ces perturbations semblent être dépendantes de l'expression de ligands de Wnt par les cellules HCV⁺, induisant l'activation de la voie β -caténine et l'expression de la glutamine synthétase dans la zone péri-centrale du lobule hépatique.

En conclusion, les protéines HCV ont des effets pléiotropiques sur l'acquisition des « hallmarks of cancer ». Comme pour HBV certaines de ces altérations ont un impact direct sur les cellules infectés mais aussi sur les hépatocytes environnants et sur l'architecture du foie. En conséquence, l'infection chronique à HCV s'accompagne d'une nécro-inflammation hépatique généralisée provoquant stéatose, fibrose et cirrhose qui augmentant le risque de développer un CHC.

Maladies alcooliques du foie

Les maladies alcooliques du foie (ALD) sont subdivisées en plusieurs stades comprenant la stéatose hépatique, l'hépatite alcoolique (AH) et la cirrhose. Le développement de ces pathologies constitue un facteur de risque pour l'initiation du CHC. En effet on estime que la consommation journalière de 30 à 80g d'alcool sur une période de plus de 10ans augmente de 5 fois le risque de développer un CHC (Morgan et al., 2004). L'alcoolisme sévère qui représente

une consommation de 100 à 150g d'alcool par jour touche 7 à 12% de la population en fonction des pays et a donc un coût important pour la société (Grant et al., 2017).

Suite à la consommation d'alcool, l'éthanol est absorbé dans le sang puis transporté vers le foie pour être métabolisé par les hépatocytes. La première réaction a lieu dans le cytoplasme, c'est l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde par l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH). Cette réaction peut également avoir lieu dans le réticulum endoplasmique et les peroxysomes. L'acétaldéhyde est un composé hautement toxique, habituellement il est donc rapidement métabolisé en acétate par les acétaldéhydes déshydrogénase (ALDH1 et 2). L'acétaldéhyde a un effet pro-oncogénique car il permet l'activation de la voie NF- κ B en induisant l'activation de IKK, p38 et JNK (Hsiang et al., 2007). Cette activation provoque la stabilisation des facteurs de transcription c-fos et c-jun stimulant ainsi la prolifération et la migration cellulaire. Ce composé est donc suspecté d'avoir un rôle dans l'oncogénèse lié à l'alcool dans le foie et dans d'autres organes. De plus, après 3 ou 4 verres d'alcool les ADH et ALDH sont rapidement saturées ce qui induit l'accumulation d'éthanol et d'acétaldéhyde menant à l'activation d'autres voies de détoxifications, notamment celle des cytochromes P450. En particulier l'augmentation de l'expression de CYP2E1 augmente le métabolisme de base de la cellule ce qui favorise la formation de ROS et la diminution de l'expression d'antioxydants comme la glutathione et la S-adenosyl methionine (SAME) (Hosseini et al., 2019). Comme nous l'avons mentionné précédemment la production de ROS mène à la β -oxydation des lipides, des dommages à l'ADN, la stéatose et l'inflammation. De plus, il a été montré qu'un taux élevé d'alcool dans le sang affecte la perméabilité intestinale. Cela a pour effet de libérer des lipopolysaccharides (LPS) un composant de la membrane des bactéries gram négatives que l'on retrouve au sein du microbiote intestinal. Les LPS sont captés par les « Toll like receptor-4 » (TLR4) qui déclenche l'activation de l'inflammasome et la production de cytokines pro-inflammatoires (Szabo and Bala, 2010). Cet environnement inflammatoire induit l'activation des macrophages résidents du foie : les cellules de Kupffer et de macrophages et monocytes circulants. Ces cellules immunitaires stimulent alors l'activation des cellules étoilées du foie au niveau des sinusoides hépatiques ce qui induit la déposition de collagène (Louvet and Mathurin, 2015). Ces perturbations ont également un effet sur le statut épigénétique des hépatocytes. En particulier, les métabolites liés à la dégradation de l'alcool et l'activation concomitante de la voie MAPK et JNK induisent l'activation de l'histone acetyl transferase (HAT) responsable de l'acétylation des histones H3 (Park et al., 2005). De plus, le métabolisme de l'alcool semble aussi avoir un impact sur la méthylation de l'ADN. En effet, il a été montré que des rats soumis à une consommation d'alcool d'une durée de 9 semaines subissent une diminution hépatocytaire de la S-adenosyl methionine, une co-enzyme importante

pour le transfert de groupes méthyle. Cette modification est associée à une diminution de 40% de la méthylation de l'ADN, notamment au niveau du promoteur de c-myc dont le niveau d'ARNm est augmenté. Ces changements sont aussi liés à une augmentation du nombre de cassures double brins et une plus forte sensibilité aux dommages à l'ADN médiés par les ROS (Lu et al., 2000). Ces modifications épigénétiques sont particulièrement importantes dans le contexte d'un foie pathologique et contribuent très certainement au développement tumoral (Hardy and Mann, 2016).

En résumé, malgré quelques effets directs sur la prolifération cellulaire la contribution de la consommation d'alcool au développement tumoral est majoritairement liée à la mise en place d'un environnement inflammatoire lié aux dommages hépatiques.

La stéato-hépatite non alcoolique

Une étude réalisée dans 22 pays a montré que les pathologies hépatiques non alcooliques et liées à l'accumulation de graisse hépatique (NAFLD) touchaient environ 25% de la population ce qui en fait la pathologie hépatique la plus fréquente. Ces pathologies sont généralement associées à une alimentation riche en graisses et en sucres, une consommation importante de produits transformés ainsi qu'à une vie sédentaire et l'absence d'activités physiques. Du point de vue histologique, les NAFLD se caractérisent par une augmentation du volume hépatocytaire (hépatocytes ballonnés) qui précède la formation de gouttelettes lipidiques en quantité plus ou moins importante en fonction du stade. Le risque de développer un CHC est alors relativement faible. Il devient toutefois important lorsqu'il est associé à un syndrome métabolique chronique comme l'obésité, les diabètes de type 2 ou hypertension artérielle. La maladie tends alors à évoluer en stéato-hépatite non-alcoolique (NASH) pouvant également progresser en fibrose sévère ou en cirrhose (Dhamija et al., 2019). Comme pour les autres pathologies hépatiques la stéatose dans le contexte des NAFLD induit un stress oxydatif, de la nécro-inflammation, des dommages à l'ADN et une perméabilité intestinale qui contribuent au développement du CHC (Anstee et al., 2019).

Les CHC lié à la NASH se caractérise par un taux élevé de tumeurs se développant sans la présence de cirrhose ou de fibrose sévère (40 à 50%) (Negro, 2020). Dans ce contexte, la présence de syndrome métabolique favorise la mise en place d'un environnement pro-tumorigénique. En particulier, l'obésité et le diabète de type II induisent une résistance à l'insuline associé à une hyper-insulinémie qui favorise la sécrétion d' IGF-1 et d' « insulin receptor substrate » (IRS-1) stimulant la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (Hashimoto

and Tokushige, 2012). Ces pathologies favorisent également la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire spécifique de la NASH qui se caractérise par une augmentation du nombre de lymphocyte T CD8⁺ et CD4⁺, un recrutement des cellules NK et NKT, une diminution du nombre de cellules Kupffer, l'infiltration de monocytes circulants, l'activation des cellules étoilées du foie et la production de cytokines inflammatoire (Koo et al., 2020). Bien que en apparence anti-tumorigénique, cet environnement est susceptible de stimuler la formation tumorale. Notamment il a été montré que la NASH favorise l'accumulation de lymphocytes B (PDL1⁺) produisant des immunoglobulines de type IgA⁺ chez l'homme et la souris. De manière intéressante, la présence de ces cellules corrèle avec une faible activité cytotoxique des LT. L'inhibition pharmacologique ou la délétion génétique de ces LB dans un modèle murin de NASH prévient la formation tumorale suite à la réactivation des LT cytotoxiques (Shalapour et al., 2017). En parallèle, une étude a montré que la NASH favorise l'accumulation de neutrophiles dans le foie, produisant des pièges extracellulaires composés de chromatine décondensée (NET). Ces structures ont récemment été décrites comme ayant un rôle pro-tumorigénique. En effet, l'inhibition des NET dans un modèle murin de NASH limite le développement tumoral. Le désassemblage des NET affecte notamment le recrutement des macrophages et la production de cytokines telle que l'IL6 (van der Windt et al., 2018). Dans l'ensemble ces résultats suggèrent que l'environnement hépatique spécifique qui est mis en place lors de la progression de la NASH contribue au développement du carcinome hépatocellulaire.

En résumé ces différents facteurs de risques contribuent fortement à la transformation tumorale hépatique sous la forme d'un processus complexe et multifactoriel. L'exposition chronique à ces facteurs mène à l'apparition d'un environnement pro-inflammatoire qui stimule développement tumoral lorsqu'il est combiné à des événements pro-oncogénique. De manière intéressante une étude a montré que le type de stress induit suite à des dommages hépatiques (nécroptose vs apoptose) orientait le lignage tumoral vers un devenir cholangiocytaire ou hépatocytaire (Seehawer et al., 2018). Ces résultats soulignent une nouvelle fois l'importance de la niche environnementale lors du développement de la carcinogénèse hépatique. Cette niche met en place un contexte cellulaire qui favorise la prolifération cellulaire et l'accumulation d'altérations génétiques diverses. Dans la partie suivante nous allons justement nous intéresser aux origines moléculaires du carcinome hépatocellulaire qui sont nombreuses et souvent très différentes d'un patient à l'autre.

b. Bases moléculaires et hétérogénéité tumorale

La cellule d'origine du CHC est principalement l'hépatocyte mature. Dans certains cas toutefois la transformation des précurseurs hépatiques ou la trans-différentiation des cholangiocytes peut mener au développement de la maladie (Sia et al., 2017). La grande diversité liée aux événements d'initiation et à l'exposition aux facteurs environnementaux font que le CHC présente une forte hétérogénéité inter-tumorale. En effet, l'histoire évolutive de la maladie est propre à chaque individu ce qui débouche sur un paysage mutationnel très différent d'un patient à l'autre. En général, un CHC arbore entre 30 et 80 mutations, en revanche la vaste majorité d'entre elles sont des mutations « passager », qui n'ont pas d'influence directe sur le développement de la maladie. Les données de séquençages des tumeurs humaines ont alors permis d'identifier une dizaine de gènes très fréquemment mutés dans les CHC (voir **Figure 13**) et qui constituent les « drivers » potentiels de la maladie (Llovet et al., 2016). En fonction de ses altérations génétiques la tumeur est susceptible de présenter des caractéristiques cliniques, phénotypiques et histologiques qui lui sont propres. En particulier ces données ont un impact important sur la réponse aux traitements et le pronostic de la maladie. Il devient donc essentiel de stratifier les patients et leurs tumeurs en fonction de ces différentes caractéristiques (Calderaro et al. 2019). Dans cette partie je vais brièvement décrire les altérations moléculaires les plus fréquentes dans le cadre du carcinome hépatocellulaire en détaillant comment certaines d'entre elles permettent de définir des sous-classes de la maladie

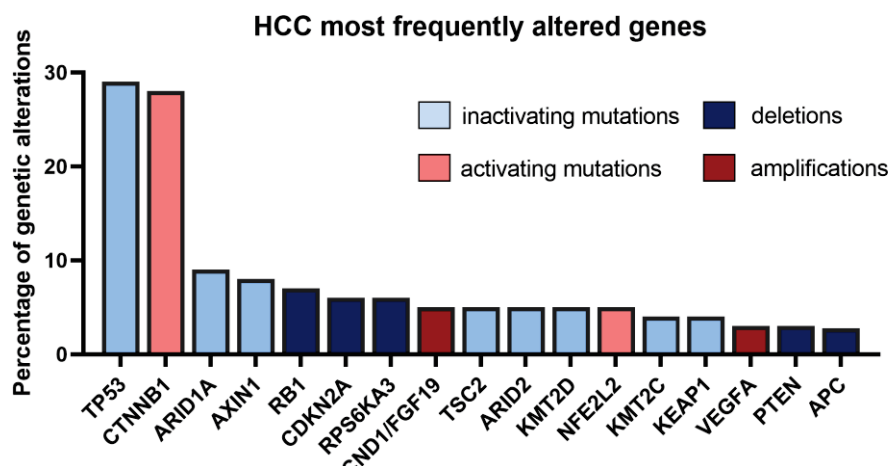


Figure 13 - Les plus fréquentes mutations du carcinome hépatocellulaire

Fréquence des mutations déterminée à partir des données des cohortes INSERM, MSK, TCGA et RIKEN représentant 1065 patients atteints de CHC (cBioportal).

b.1 Événements drivers et classification du carcinome hépatocellulaire

Eviter la senescence réplivative

Une grande majorité des CHC se développent sur fond de foie cirrhotique. Dans ce contexte les hépatocytes prolifèrent et forment des nodules de régénération qui peuvent évoluer en nodules dysplasiques. Les hépatocytes sont toutefois des cellules quiescentes qui habituellement prolifèrent peu. En conséquence, les cellules présentes dans les nodules régénératifs sont soumises à un important raccourcissement de leurs télomères. Cela favorise l'instabilité génétique et pousse les cellules vers la senescence réplivative (Wiemann et al., 2002). Afin d'accomplir la transition du stade de nodule dysplasique à celui de carcinome précoce, la cellule doit échapper à ce mécanisme de sauvegarde. Plus de 90% des CHC ré-expriment alors la télomérase, une enzyme permettant la reconstitution des télomères. Cette réactivation se fait dans la plupart du temps par méthylation du promoteur de TERT, duplication du gène ou insertion virale (Nault et al., 2013). Il s'agit donc du principal événement initiateur de la maladie. De manière intéressante, la taille des télomères des cellules tumorales permet de discriminer entre les deux classes principales de CHC. En effet, les tumeurs hautement prolifératives ont généralement un niveau élevé ou modéré d'expression de TERT ce qui permet la formation de longs télomères. Ces tumeurs sont considérées comme agressives et de mauvais pronostic. A l'inverse, les tumeurs plus différenciées dites « non prolifératives », ont un faible niveau d'expression de TERT et des télomères plus courts (Ningarhari et al., 2020) (Voir **Figure 14**) .

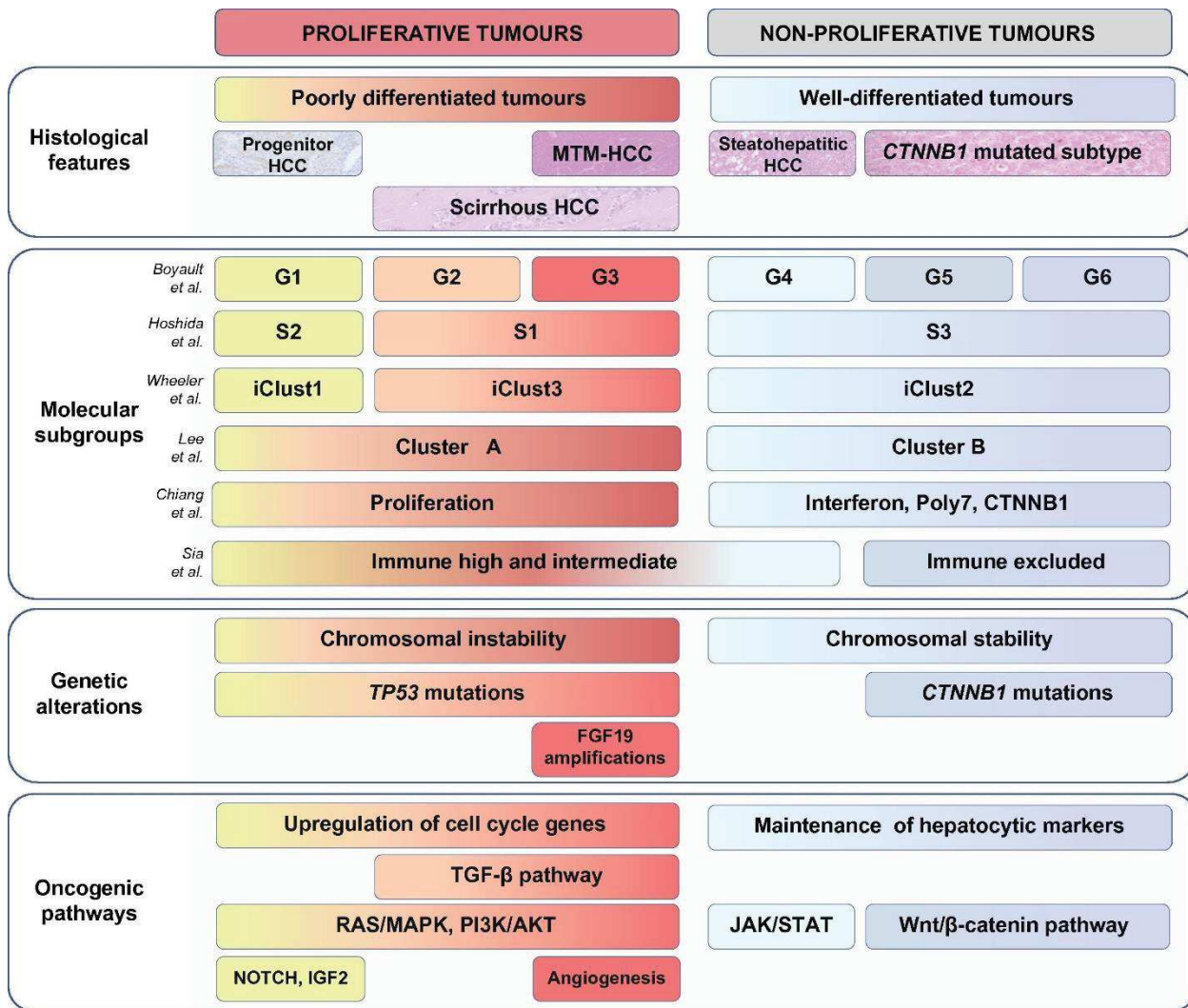


Figure 14 - Classification moléculaire, histologique et clinique des carcinomes hépatocellulaire

Les deux principaux sous-groupes sont les tumeurs prolifératives et non prolifératives. Les tumeurs prolifératives sont peu différenciées et caractérisées par une activation de RAS/MAPK, PI3K/AKT, des mutations de TP53 et un infiltrat immunitaire important. Les tumeurs non prolifératives sont bien différenciées, associées à des mutations de β-caténine et avec un infiltrat immunitaire faible.

Maintenance du cycle cellulaire

Afin d'assurer la progression tumorale il est essentiel de maintenir le cycle cellulaire actif, même dans des conditions de stress. Un des principaux gènes qui contrôle la sortie du cycle cellulaire est le gène TP53, qui est muté dans environ 30% des CHC. Dans le CHC, la plupart des altérations de p53 sont des mutations du domaine de liaison à l'ADN avec une forte

concentration d'événement au niveau de l'arginine 249 (R249S). Cette marque est associée à l'exposition à l'Aflatoxine B1, un composé génotoxique produit par un champignon qui contamine la nourriture et les cultures majoritairement en Asie et en Afrique (Hussain et al., 2007). Ces mutations stabilisent la protéine tout en empêchant l'activation des gènes cibles de p53 sauvage et induisent habituellement l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Finlay et al., 1989). Cependant, plusieurs études suggèrent que les formes mutées de p53 arborent aussi un phénotype gain de fonction favorisé par les interactions avec de nouveaux partenaires (Kim and Lozano, 2018). Il est donc possible que ces interactions contribuent également à la transformation hépatique. Quoi qu'il en soit, les mutations de p53 sont fréquemment associées aux formes agressives et peu différenciées de la maladie (classe proliférative). D'autres altérations ont également un impact sur la régulation du cycle cellulaire. En particulier, on retrouve une dérégulation de la voie de signalisation du Rétinoblastome avec notamment la délétion ou la méthylation du promoteur de CDKN2A (60% des cas) codant pour les protéines p16^{INK4A} et p19^{ARF}, des délétions de Rb (7%) et des amplifications du locus Cycline D1/FGF19 (5%) (Wheeler and Roberts, 2017). Cette dernière altération définit un groupe particulier parmi la classe proliférative qui se caractérise par une angiogenèse importante et des caractéristiques histologiques particulières (Groupe G3) (Calderaro et al., 2019).

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine affecte de nombreux mécanismes essentiels au développement et à la physiologie hépatique. Elle est notamment impliquée dans le développement embryonnaire, la différenciation des hépatocytes, la zonation et le métabolisme (Behari, 2010). Cette voie de signalisation est altérée dans environ 45% des CHC avec notamment des mutations activatrices de la β -caténine (30%), et des mutations inhibitrices d'AXIN1 (8%) et d'APC (3%) (Zucman-Rossi et al., 2015). Les tumeurs présentant des mutations de la β -caténine sont des tumeurs bien différenciées qui prolifèrent peu et avec un profil histologique spécifique souvent caractérisé par une cholestase intra-tumorale. Ces tumeurs sont peu agressives et de bon pronostic, elles sont toutefois dépourvues d'infiltrats immunitaires, ce qui favorise leur résistance aux immunothérapies (Calderaro et al., 2019). Récemment une étude a montré que l'activation de la β -caténine dans des CHC murins empêche le recrutement des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. Ce phénotype prévient l'activation des cellules T cytotoxiques, ce qui rend les tumeurs insensibles aux anti-PDL1 (Galarreta et al., 2019). Ces résultats sont particulièrement

intéressants car ils font le lien entre les caractéristiques moléculaires de la tumeur et son phénotype vis-à-vis des réponses aux thérapies. Il est cependant nécessaire de préciser que les mutations de la β -caténine et d'axin1 ne sont pas associées au même groupe de tumeurs. En effet une étude a montré que les mutations d'axin1 n'induisent pas l'activation de la glutamine synthétase (GS), une cible transcriptionnelle de la voie Wnt canonique dans le foie. Cela suggère que le potentiel oncogénique de cette mutation passe par d'autres voies alternatives à Wnt (Zucman-Rossi et al., 2007). En effet, contrairement aux tumeurs β -caténine activées, les tumeurs présentant des délétions d'axin1 sont peu différenciées et avec un infiltrat immunitaire important (groupe G1, voir **Figure 14**) (Boyault et al., 2007).

Voies Ras/MAPK et PI3K/AKT

Les voies MAPK et AKT/mTOR sont activés dans plus de 50% des cas de CHC et sont associés aux tumeurs agressives de la classe proliférative (Voir **Figure 15**) (Calderaro et al., 2019). En particulier, une étude réalisée sur 46 tumeurs en provenance d'une cohorte asiatique, a montré que toutes les tumeurs analysées présentaient un taux de phosphorylation de MEK dans les tumeurs supérieur à celui du tissu environnant (de 7 fois en moyenne) (Huynh et al., 2003). Ici, le marquage par immunohistochimie montre que le nombre de cellules p-MEK positives au sein de la tumeur est supérieur lors des stades les plus avancés. De plus, les auteurs ont également détecté la surexpression de ERK dans 91% (42/46) des tumeurs et sa phosphorylation dans 69% (32/46). D'après les eux, le marquage de ERK activé dans les tumeurs est majoritairement cytoplasmique. Cela suggère que dans certaines cellules l'activité cytoplasmique de ERK est préférée à son rôle transcriptionnel. Par contre, on ne peut pas exclure que ces résultats soient dus à une régulation dynamique de l'activité de ERK dans ces cellules. La classification des tumeurs utilisées lors de cette étude n'est pas connue toutefois le nombre important de tumeurs présentant une activation de la voie MAPK suggère qu'il existe une surreprésentation des tumeurs de la classe proliférative dans cette cohorte. Similairement, une étude réalisée sur 100 tumeurs en provenance d'une cohorte américaine a mis en évidence la surexpression de p-mTOR dans 15% des cas et de S6K dans 45% des cas (Sahin et al., 2004). De plus, l'inhibition pharmacologique de la voie mTOR dans des lignées tumorales hépatiques réduit leur prolifération et leur survie. Dans ce contexte cette activation n'est toutefois pas associée à des stades plus tardifs ou à des tumeurs de taille importantes. L'activation constitutive de ces voies de signalisation est dépendante de plusieurs altérations géniques et épigénétiques. En effet, on observe des amplifications des ligands d'activation comme c-MET, IGF-1 et 2, FGF19 et le VEGF α chez 5-40% des patients (Lee et al., 2013; Luo and Feng, 2014). L'inhibition des régulateurs négatifs de l'activation de Ras

(RasGAP) ou des protéines impliquées dans les boucles de rétrocontrôle négatifs est fréquemment observée. Par exemple, il a été montré que sur une cohorte de 88 CHC, 12,5% des patients présentaient une diminution de l'expression de NF1, 78% de RASAL1 et 76% de DAB2IP (Calvisi et al., 2011). Ces altérations semblent être dépendantes de la méthylation du promoteur, ou de la perte d'un des allèles de ces gènes. De plus, la réactivation de ces GTPases dans des cellules de CHC inhibe leur prolifération et induit l'apoptose. Les niveaux d'expression protéiques de RKIP, qui inhibe la phosphorylation de MEK par RAF, est diminuée chez 88% des patients (Walker et al., 2011). Cette diminution est alors associée à une forte activation de la voie MAPK dans ces tumeurs. Un faible niveau d'expression de la phosphatase DUSP1 corrèle aussi avec des niveaux élevés de p-ERK et un mauvais pronostic chez les patients atteints de CHC (Calvisi et al., 2008). Les délétions de RSK2 sont également fréquentes (6,3%) et empêchent la régulation négative de SOS (Chan et al., 2021). Cette altération définit un groupe de patients avec des tumeurs agressives et sensibles au Sorafenib, un inhibiteur de tyrosines kinases. La réexpression de RSK2 dans des lignées de CHC, réactive la boucle de rétrocontrôle négative de la voie MAPK et diminue la phosphorylation de ERK. De plus, les mutations des régulateurs négatifs de la voie PI3K/AKT sont communes. On observe notamment 1-3% de délétion de PTEN et 2-5% de délétion de TSC1 et TSC2 qui corrélerent toutes avec une sur-activation de la voie (Zucman-Rossi et al., 2015). Les mutations activatrices de RAS et PI3KCA sont en revanche relativement rares et touchent entre 2 à 4% des patients (Schulze et al., 2016). De manière intéressante, l'ensemble d'altérations présentées ici sont rarement concomitantes et contribuent donc à l'activation de ces voies dans une grande proportion de patients (Delire and Stärkel, 2015). Les conséquences fonctionnelles de cette activation sont nombreuses, les principales étant la prolifération, la survie, l'angiogenèse, l'inflammation et la migration cellulaire.

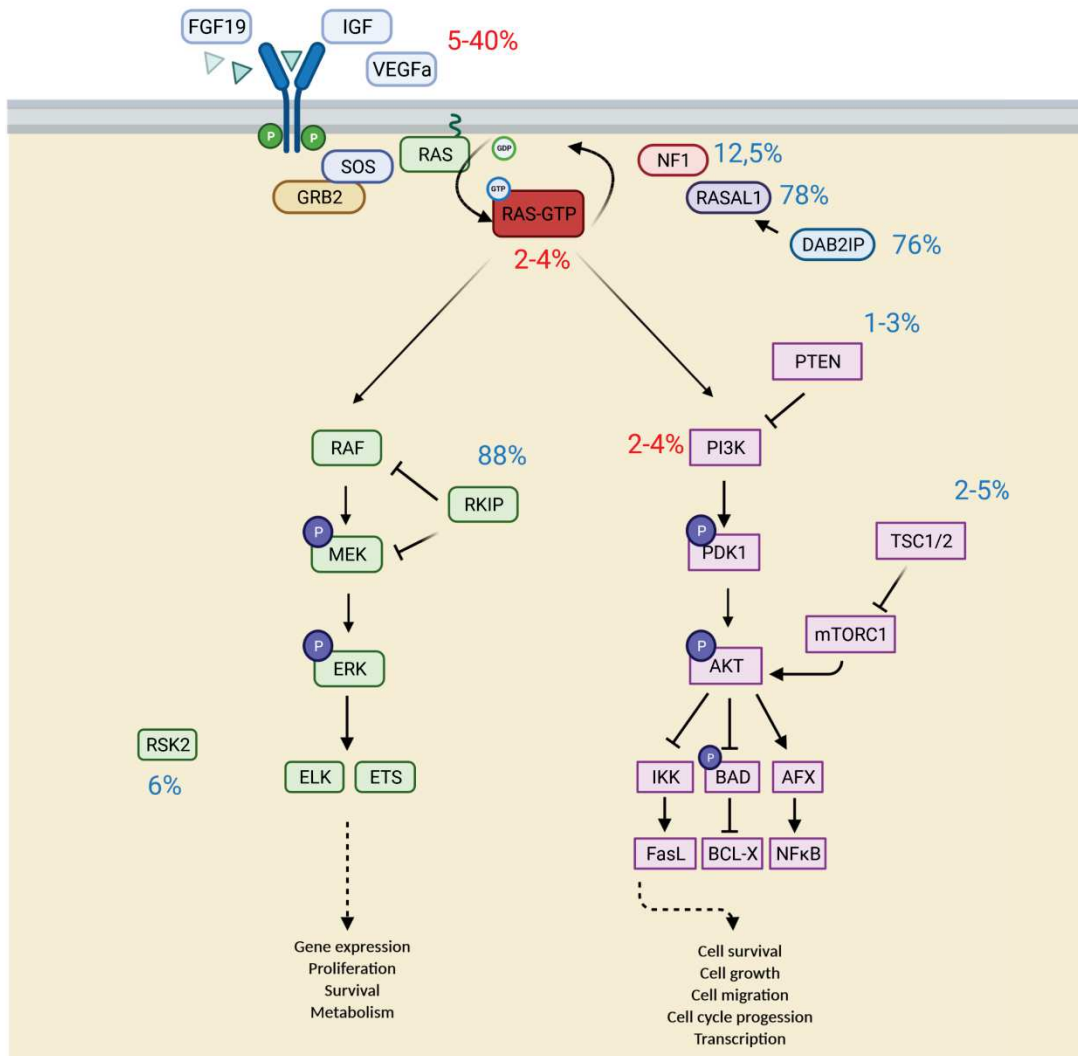


Figure 15 - Gènes dérégulés dans le CHC

Les pourcentages représentent la proportion de patients qui présentent des altérations dans le gène en question. La couleur rouge indique les amplifications et les mutations activatrices alors que la couleur bleue indique les délétions, downrégulation ou mutation inhibitrices.

Régulation épigénétique

Certains gènes impliqués dans la régulation épigénétique sont également fréquemment altérés dans les CHC. En particulier on retrouve des mutations inactivatrices de ARID1A et ARID2 (9 et 5%), qui sont des membres du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF impliqués dans la régulation de la transcription. Des mutations inactivatrices des protéines impliquées dans la méthylation de l'ADN et des histones (MLL) ont également été détectées dans un grand nombre de tumeurs (6 à 10%) (Rao et al., 2017). L'activité de ces gènes a un impact important sur le paysage transcriptionnel de la cellule. De ce fait, les conséquences phénotypiques de ces altérations sont certainement diverses et susceptibles d'être dépendantes du contexte. Par exemple, il a été montré que l'expression de ARID1A était nécessaire à l'initiation de CHC murin via l'activation de la transcription des gènes de la famille des cytochromes P450. Lorsqu'ils sont continuellement activés en conditions de stress importants, ces cytochromes produisent des ROS essentiels à la transformation. Toutefois, les auteurs ont également montré que la délétion de ARID1A une fois la tumeur initiée induisait un phénotype migratoire et l'apparition de métastases extra-hépatiques (Sun et al., 2017). Ces résultats suggèrent que ARID1A a des rôles opposés en fonction du stade de développement tumoral. Les effets très variés des régulateurs épigénétiques sur l'expression des gènes sont certainement une des raisons pour lesquelles ils sont altérés dans plusieurs sous classes de CHC. Il est alors possible que leur perturbation mène à des devenir différents en fonction du contexte cellulaire (Wheeler and Roberts, 2017).

Stress oxydatif

Parmi les gènes fréquemment mutés dans le CHC on retrouve également des délétions de KEAP1 (4%) qui est responsable de la dégradation de Nrf2, qui est lui amplifié chez 5% des patients. (Zucman-Rossi et al., 2015). Nrf2 est un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress oxydatif qui participe aux mécanismes de réparation de l'ADN et permet l'expression de protéines anti-oxydantes (Ma, 2013). Le stress oxydatif et la production de ROS sont essentiels à l'initiation du CHC. Ils peuvent toutefois être un frein à la progression tumorale et causer la mort des cellules tumorales en cas d'accumulation trop importante due à l'hypoxie, la nécro-inflammation ou les traitements anti-cancéreux. Ainsi, une étude réalisée sur 65 patients a montré qu'un haut niveau d'expression de Nrf2 était associé à des tumeurs de stades avancées souvent peu différenciées et métastatiques. Les auteurs ont également montré une corrélation entre l'expression de Nrf2 et de gènes anti-apoptotique (BCL-x) et pro-migratoire (MMP9) (Zhang et al., 2015).

En résumé le type d'altération génétique varie énormément d'un patient à l'autre, ce qui fait du carcinome hépatocellulaire une maladie très hétérogène. Il est notamment possible de modéliser cette hétérogénéité avec des modèles précliniques qui seront décrits plus tard. L'utilisation de ces modèles permet notamment d'étudier l'impact phénotypique de ces altérations sur le développement tumoral et d'identifier les mécanismes de résistances aux traitements. La stratification des patients est donc essentielle afin de fournir des traitements adaptés à la maladie de chacun. Il existe toutefois une limitation non négligeable au développement de cette médecine personnalisée. Il s'agit bien évidemment de l'hétérogénéité intra-tumorale qui est aussi présente dans le cadre du CHC et fait l'objet de la partie suivante.

b.2 Hétérogénéité intra-tumorale

D'une façon semblable à ce qui a été fait pour d'autres types de tumeurs, plusieurs études se sont employées à étudier l'hétérogénéité génétique et la diversité clonale du carcinome hépatocellulaire. Ces études s'accordent sur le fait que dans la vaste majorité des CHC les principales altérations génétiques dites « driver » (TERT, TP53, CTNNB1 etc...) sont clonales et donc présentes dans l'ensemble de la tumeur (Lin et al., 2017; Torrecilla et al., 2017; Zhai et al., 2017). Toutefois, bien qu'ils soient minoritaires certains patients arborent une distribution hétérogène de ces altérations « driver », qui se traduit par des différences morphologiques et phénotypiques importantes à l'intérieur de la tumeur (An et al., 2001; Friemel et al., 2015). Il est néanmoins probable que ces tumeurs soient issues de deux événements de transformation indépendants ayant eu lieu quasi-simultanément. Ces données suggèrent que l'initiation et l'acquisition des premiers événements « driver » de la maladie procède selon un mode linéaire. En effet l'avantage sélectif accordé par ces mutations est si important que les cellules subissent une expansion clonale qui élimine les compétiteurs. La diversification clonale est alors plus tardive et semble prendre de l'ampleur au cours de la progression tumorale (Craig et al., 2020; Ding et al., 2019; Zhai et al., 2017) La progression tardive de la maladie est alors soumise à une forme d'évolution neutre et branchée pouvant potentiellement affecter le phénotype tumoral.

Cependant nous avons mentionné dans la partie II.1.b de cette introduction que l'ITH ne se résumait pas seulement à l'hétérogénéité génétique des tumeurs. Notamment, l'analyse de l'épigénome de ces tumeurs dans le contexte de l'ITH a mis en évidence une distribution hétérogène du statut de méthylation de l'ADN. De manière intéressante les gènes soumis à cette

régulation différentielle sont impliquées dans plusieurs mécanismes importants pour la tumorigenèse comme la prolifération, la différenciation, la migration et l'activité transcriptionnelle (Lin et al., 2017). En parallèle certaines études se sont intéressées à l'analyse du transcriptome en cellule unique et ont identifiés la présence d'une importante hétérogénéité. Par exemple, il a été montré qu'au sein d'une même tumeur cohabitait des cellules avec des signatures transcriptionnelles caractéristiques de 3 classes de CHC différents (Hoshida S1, S2 et S3). Étonnamment, alors que l'ensemble de la tumeur exprime les facteurs de transcription FOS et JUN certaines régions ont une expression spécifique de facteurs de transcription ETS ou des gènes habituellement exprimées par des cellules non différenciés comme OCT4 ou NANOG (Losic et al., 2020). Potentiellement, ces résultats soulèvent des interrogations quant à l'activation différentielle de la voie des MAPK en fonction du statut de différenciation. La notion de cellule souche cancéreuse hépatique reste débattue du fait de la capacité qu'ont les hépatocytes matures à se dé-différencier pour régénérer le tissu endommagé. Toutefois, certaines études ont identifiés des marqueurs d'un phénotype de cellules souches cancéreuses comme EpCam, CD133, CD24 et CD44. En particulier, une étude a mis en évidence la présence de 5 populations au sein des lignées Huh1 et Huh7, chacune exprimant différemment marqueurs de surfaces associés aux cellules souches. Ces populations présentent des caractéristiques différentes concernant leurs capacités prolifératives en condition d'hypoxie ou normoxie. De plus, l'analyse du transcriptome en cellule unique a lié l'expression de CD133, EpCam et CD24 à trois clusters d'enrichissement pour les voies de signalisation AKT, p38 MAPK et NF- κ B respectivement (Zheng et al., 2018). Dans leur ensemble ces données suggèrent la présence d'une grande hétérogénéité fonctionnelle influencées par les statuts épigénétiques, transcriptionnels et l'état de différenciation de la cellule. Toutefois ces disparités ne sont pas nécessairement stables et sont susceptibles d'être dépendantes des variations de l'environnement dans lequel ils évoluent. Parallèlement elles peuvent également induire des modifications locales de leur microenvironnement. En effet, les analyses combinées de DNaseq, RNAseq, TCRseq, présentation d'antigènes et multiplexage immun a mis en évidence la distribution hétérogène de l'infiltrat immunitaire en fonction de régions. Notamment ces études ont révélé l'existence au sein de la même tumeur de différents mécanismes d'évasions du contrôle immunitaire. Parmi ces mécanismes on retrouve la réduction de l'infiltration immune, l'uprégulation des éléments de checkpoint immunitaire, la perte d'hétérozygotie des molécules HLA, la faible immunogénicité des antigènes de surface ou la réduction de la clonalité des récepteur des cellules T (Dong et al., 2020; Losic et al., 2020).

Dans leur globalité ces études nous renseignent sur le mode d'évolution relativement complexe des tumeurs hépatiques. En dépit d'une hétérogénéité génétique faible par rapport à

d'autres types de tumeurs, les CHC arborent une grande diversité phénotypique. Le microenvironnement tumoral et l'état épigénétique dont dépend le transcriptome et le statut de différenciation est très variable au sein de la tumeur. Cependant, les études fonctionnelles sont encore trop rares. En conséquence, nos connaissances concernant l'impact de ces mécanismes sur le devenir cellulaire, les interactions entre clones, des clones avec leur microenvironnement où la sensibilité aux thérapies, restent limités. Il est donc intéressant de développer des modèles précliniques afin d'étudier ces interactions sans se limiter aux approches descriptives. Quoiqu'il en soit ces aspects semblent grandement impacter le devenir des patients. Notamment, le laboratoire d'Augusto Villanueva a défini une signature transcriptomique composée de 365 gènes associés à la présence d'une forte ITH. Cette signature, présente chez 39% (139/359) des patients de la cohorte TCGA, est associée à un taux élevé de récurrences et un mauvais pronostic (Losic et al., 2020). Il est probable que cette tendance soit liée à la capacité d'adaptation des tumeurs hétérogènes à leur environnement et aux thérapies visant à les éliminer. Dans la partie suivante nous allons justement brièvement présenter l'arsenal thérapeutique dont disposent les cliniciens afin de combattre le CHC.

c. Approches thérapeutiques

Le type de prise en charge thérapeutique des patients est défini par le protocole de la clinique de Barcelone (BCLC) (Voir **Figure 16**) qui évalue les traitements adaptés en fonction du stade d'évolution de la tumeur. Ce stade est défini en fonction de la taille de la tumeur, le nombre de nodules intra-hépatiques, la présence ou non d'invasion au niveau de la veine portale ou en extra-hépatique, le score de sévérité de la pathologie hépatique (Child-Pugh A, B ou C) et l'état général du patient (PS) (Karademir, 2018).

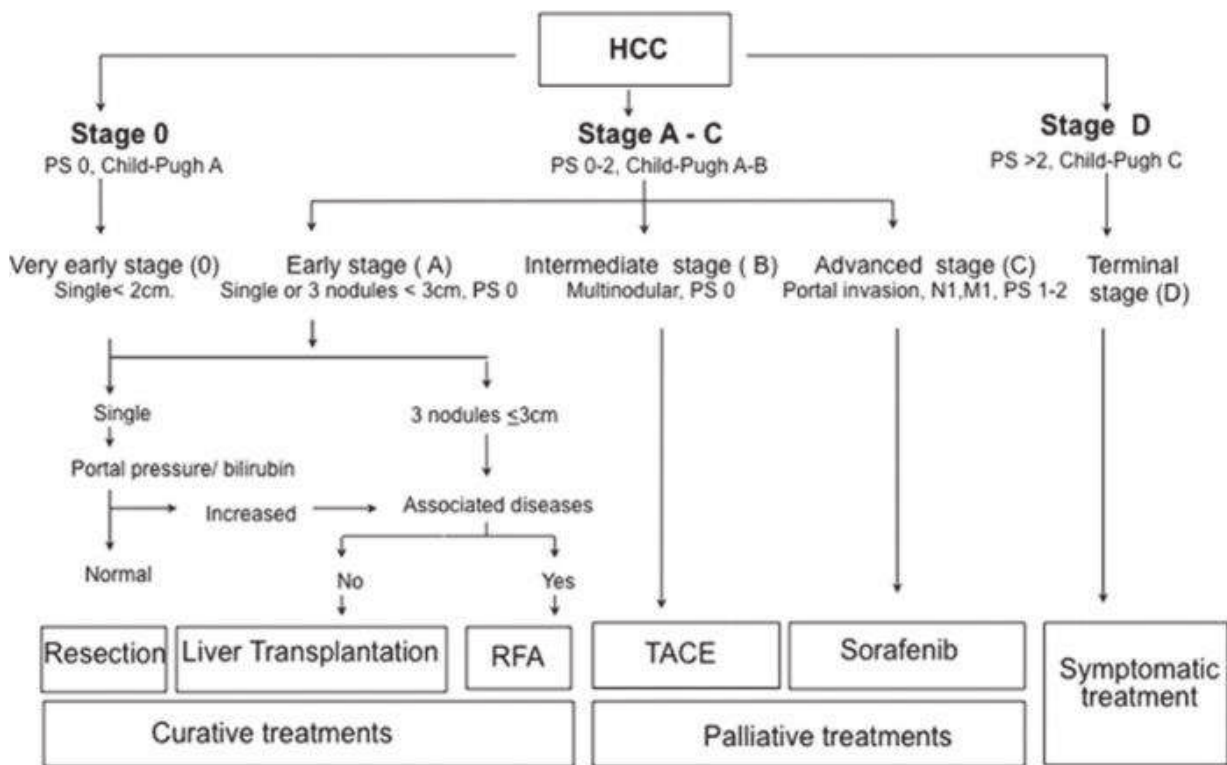


Figure 16 - Protocole de Barcelone pour la stratification et le traitement des patients

Abbreviation: M (Metastasis), N (Node classification), PS (Performance status), RFA (Radio-frequency ablation), TACE (Transarterial chemoembolization)

Stades précoces et intermédiaires

Les patients qui présentent une tumeur de moins de 3cm composée de moins de 3 nodules et avec une atteinte hépatique peu sévère (Score Child Pugh : A) sont au stade précoce (A) ou très précoce (0) et sont éligibles pour les traitements à visée curative dont le taux de survie est excellent (Overall survival (OS) > 5ans). Parmi les traitements disponibles à ce stade il y a la résection chirurgicale de la tumeur ou d'une partie du foie, l'ablation de la tumeur par sonde radiofréquence ou électroporation et le remplacement de l'organe malade par transplantation (Forner et al., 2018). Les patients qui sont catégorisés au stade intermédiaire (B) (tumeur multinodulaire, sévérité de la pathologie hépatique faible ou intermédiaire) sont dirigés vers un traitement par chimio-embolisation trans-artérielle (TACE). Le principe de cette intervention consiste à introduire un cathéter à proximité de l'artère alimentant la tumeur pour y injecter une drogue de chimiothérapie (doxorubicine, cisplatine mitomycine C etc...). Ces drogues sont associées à des microbilles ou des composés hydrophobes afin de bloquer les artères de la tumeur et prolonger le temps d'administration. L'objectif de ce traitement est de réduire la taille des

nodules afin que le patient devienne éligible aux interventions radiologiques et chirurgicales. La survie moyenne des patients (OS) après cette intervention est estimée à 28.6 mois (Raoul et al., 2019).

Stades avancés

Les stades avancés (C) se caractérisent par une invasion de la veine porte hépatique, la présence ou non de métastases extra-hépatiques et un score de Child Pugh faible ou intermédiaire (A ou B). Avant ce stade les patients ne sont pas symptomatiques. Par conséquent, et à moins d'un suivi régulier due à une pathologie hépatique identifiée, les patients sont le plus souvent diagnostiqués à ce stade. L'expression endogène, par les hépatocytes, des pompes d'efflux (ABC) et l'insuffisance hépatique associée à la cirrhose rend les chimiothérapies dangereuses et inefficaces sur ces patients (Neureiter et al., 2019). Pendant longtemps la seule thérapie proposée était donc le Sorafénib, un inhibiteur ciblant plusieurs récepteurs tyrosine kinase notamment le VEGFR, PDGFR, Flt-3 et c-Kit, de même que RAF (Marisi et al., 2018). Cependant, seulement 30% des patients bénéficient du traitement et avec une survie globale qui reste limitée à 13 mois en moyenne. De plus le médicament est très toxique et induit l'apparition de mécanismes de résistances intervenants souvent après 6 mois de traitement. Ces mécanismes sont divers et provoquent fréquemment la réactivation de ERK, ou l'activation de voies alternatives comme PI3K/AKT ou STAT3 (Tang et al., 2020). Plus récemment, d'autres inhibiteurs de RTK ont été autorisés comme le Lenvatinib en première intention et le Régorafinib en deuxième ligne de traitement. Cependant alors que le premier est équivalent au Sorafénib le deuxième n'améliore la survie globale que de deux mois. Les immunothérapies et en particulier les anti-PD1 et PDL1 ont relevé les attentes et les espoirs d'améliorer la prise en charge des patients de CHC. Hélas, plusieurs essais cliniques de phase III ont montré que seul 20% des patients bénéficiaient du traitement et que la survie globale n'était pas supérieure au Sorafénib en première ligne ou au Régorafénib en seconde ligne (Finn et al., 2020a; Yau et al., 2019). Un essai clinique de phase III paru récemment a cependant montré qu'il existe un effet synergique entre l'atezolizumab (anti-PDL1) et le bevacizumab (anti-VEGF). En effet, la survie moyenne à un an a été estimée à 67.2% pour le groupe ayant reçu l'atezolizumab + bevacizumab contre 54.6% pour le groupe ayant reçu le Sorafénib (Finn et al., 2020b). Si ces résultats se confirment ce traitement devrait/sera probablement devenir le standard pour les patients de stade C. En revanche, un groupe de patient (Stade D) n'est éligible à aucune stratégie thérapeutique à cause d'une insuffisance hépatique trop importante (Child Pugh : C). Ce stade de cirrhose avancée ne leur permet pas de supporter un traitement pharmacologique et leur survie globale est alors estimée à 3 mois en moyenne. Ils sont donc inclus dans un protocole de soins palliatifs.

En résumé, bien que l'arsenal thérapeutique ait considérablement augmenté ces dernières années le traitement et la prise en charge du CHC reste difficile. En effet, certains patients restent insensibles à ces thérapies, ce qui laisse la place au développement de nouvelles stratégies et combinaisons. Dans cette optique il est essentiel de développer des modèles pré-cliniques afin de mieux comprendre la maladie et déterminer quels mécanismes peuvent avoir un intérêt thérapeutique. Dans la partie suivante je vais alors développer en détails les différents modèles qui sont à disposition des chercheurs.

2. Modèles expérimentaux pour l'étude du carcinome hépatocellulaire.

L'utilisation de modèles expérimentaux est indispensable à la compréhension et l'analyse des mécanismes biologiques. En théorie, le modèle idéal récapitule avec précision le mécanisme ou la pathologie d'intérêt. Il fournit également suffisamment de matériel biologique pour réaliser des séries d'expérimentations avec reproductibilité. Malheureusement, un modèle idéal n'existe pas, chaque modèle expérimental diffère nécessairement de la réalité biologique. Il convient donc de choisir le modèle le plus adapté à sa question biologique tout en prenant compte des avantages et inconvénients qui y sont associés. Malgré ces limitations, l'utilisation de modèles expérimentaux a permis des avancées conséquentes en termes de développements thérapeutiques et de compréhensions biologiques. Dans cette partie je vais présenter les avantages et les limitations des modèles de CHC les plus utilisées dans la recherche scientifique.

a. Les modèles cellulaires

Le développement des modèles de culture *in vitro* date du milieu du 20^{ème} siècle avec notamment l'établissement de la lignée HeLa, premier modèle de carcinome humain à être propagé en culture. Au cours des décennies suivantes, un grand nombre de lignées ont été préparées à partir de l'immortalisation de cultures primaires ou l'isolation de tumeurs issues de différents tissus. Le foie ne fait bien évidemment pas exception et on dénombre plus d'une cinquantaine de lignées de CHC disponibles. Par exemple la lignée Huh7, une des lignées les plus utilisées, est issue d'un hépatocarcinome bien différencié. En raison de sa forte susceptibilité à l'infection par HCV cette lignée est souvent utilisée pour étudier les interactions avec le virus (Kasai et al., 2018). La manipulation de ces lignées est simple, peu coûteuse et donne accès à une grande quantité de matériel biologique. Elles sont également relativement homogènes, bien que susceptibles de dériver, ce qui en fait un modèle intéressant pour étudier des mécanismes moléculaires avec reproductibilité. Il s'agit en revanche d'un système assez éloigné du contexte tumoral. En effet, les conditions de culture standardisée en 2D modifient la morphologie

cellulaire et utilisent de grandes quantités de nutriments dans le milieu de culture (sucres, facteur de croissances, métabolites, oxygène etc...). De plus, ces lignées ne sont issues que d'une infime partie de la tumeur d'origine et plusieurs cellules, notamment les cellules du microenvironnement, ne survivent pas à l'expansion *in vitro*. Bien qu'il soit possible de se rapprocher du contexte physiologique en modifiant les paramètres de cultures ou en organisant des co-cultures, ces systèmes restent très simplifiés. Ces modèles sont toutefois fort utiles pour identifier les mécanismes moléculaires ou des vulnérabilités thérapeutiques. Par exemple, une équipe a effectué l'analyse de RNAseq, miRNAseq, la quantification de 126 protéines et le screening de 31 drogues sur 32 lignées de CHC (Caruso et al., 2019). Ces lignées sont toutes associées à la classe prolifératives des CHC mais les auteurs ont pu identifier 3 sous-groupes en fonction de leurs caractéristiques moléculaires et leurs statuts de différenciation. De plus, en fonction de leurs caractéristiques ces lignées sont parfois associées à une meilleure sensibilité à certaines drogues. Environ la moitié des lignées arboraient des altérations mutuellement exclusives de la voie MAPK (amplification de FGF19 ou MET, NRAS^{Q61L} ou délétion de RSK2). Ce groupe est caractérisé par une plus forte sensibilité au tramétinib (inhibiteur de MEK) et a permis d'identifier une signature de 5 gènes associé à une bonne réponse à la drogue (HSD17B7, RORC, MRPS14, SERINC2 et LAD1).

Comme alternative à l'utilisation de lignées dérivées de tumeurs il est possible de préparer des hépatocytes primaires à partir de prélèvement de foie sain humain ou murin. Cependant, ces cellules prolifèrent très peu et perdent leurs marqueurs hépatocytaires après quelques jours en culture. Il est possible d'optimiser leur utilisation en modifiant les conditions de culture mais ces procédures sont coûteuses et difficiles à mettre en place (Shulman and Nahmias, 2013). De plus, l'immortalisation avec le SV40TAg ou d'autres protéines virales altère l'état de différenciation et donc les fonctions hépatiques de ces cellules. Une autre alternative propose donc de préparer des lignées à partir de progéniteurs hépatiques. Au stade E14 du développement embryonnaire murin les cellules hépatiques progénitrices se différencient en hépatocytes et cholangiocytes (Fausto et al., 1993). La mise en culture des suspensions cellulaires issues de la dissociation des foies embryonnaires (E14) permet l'émergence de clones épithéliaux (Strick-Marchand and Weiss, 2002, 2003). En conditions de culture classique ces cellules expriment des marqueurs de cellules souches hépatiques (cellules ovales : CD34, c-kit...), hépatocytaires (HF4A, AFP...) et ductulaires (CK7, CK19...) mais n'arborent pas des fonctions de cellules différenciées (ALB, ADH, formation de canaux biliaires etc...). En revanche, ces cellules se différencient en hépatocytes matures et fonctionnels lorsqu'ils sont cultivés en agrégats. Alternativement, elles forment des canaux biliaires lorsqu'elles sontensemencées dans du Matrigel. Ce processus de

différentiation est réversible lorsque les cellules sont à nouveau placées en conditions de culture 2D où elles peuvent être amplifiées indéfiniment sans atteindre la limite de Hayflick. De plus, ces cellules ne forment ni colonies en soft agar, ni tumeurs suite à leur injection sous-cutanées dans des souris immunodéprimées. Elles sont donc non tumorigéniques. Ces caractéristiques étonnantes leur ont valu le nom de « Bipotential mouse embryonic liver » (BMEL). Ces cellules constituent un modèle très intéressant pour étudier la différenciation et la régénération hépatique (Akkari et al., 2010). En effet, leur injection dans des foies endommagés permet la repopulation et la régénération du foie (Strick-Marchand et al., 2004). De plus, ces cellules peuvent être manipulées ex-vivo (expression d'oncogènes, délétion de suppresseurs de tumeurs, suivi du lignage etc...) ce qui en fait également un modèle intéressant pour étudier les événements oncogéniques à partir de cellules non malignes (Akkari et al., 2012; Bacevic et al., 2019).

En résumé l'utilisation des lignées cellulaires hépatiques a permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes moléculaires, oncogéniques et thérapeutiques du CHC. Toutefois comme nous l'avons décrit dans cette partie ces systèmes simplifiés présentent de fortes limitations dues aux conditions même de cultures. En revanche, il reste intéressant de les combiner avec des modèles *in vivo* pour s'affranchir de certaines de ces contraintes. Nous allons développer ces modèles dans la partie suivante.

b. Les modèles de xénogreffes et allogreffes

Ces modèles consistent en l'injection de cellules transformées dans un organisme vivant, majoritairement des souris et des rats. Les premières injections de lignées tumorales remontent aux années 1970 et ont permis d'étudier *in vivo* les mécanismes de prolifération, de migration et de sensibilité aux drogues. Classiquement ces greffes sont réalisées via une injection au niveau du flanc de l'animal qui permet la croissance tumorale sous-cutanée (Rygaard and Poulsen, 1969). La procédure est simple et permet une croissance tumorale facilement mesurable avec un pied à coulisse. Bien que ce système soit plus proche du milieu tumoral que la culture classique il présente quelques limitations notamment vis-à-vis de l'environnement dans lequel les cellules évoluent. Pour pallier à ce problème, des équipes ont développés des modèles de greffes orthotopiques, qui consistent à l'injection des cellules dans leur tissu d'origine. Ces injections nécessitent toutefois une procédure chirurgicale qui est plus difficile à mettre en place. Des modèles orthotopiques hépatiques ont été développés et s'appuient sur l'injection de cellules directement dans un lobe hépatique ou par voie intra-splénique. Ils sont particulièrement pertinents pour étudier la contribution de l'environnement du foie à la progression tumorale (Reiberger et al., 2015). Ces modèles offrent un grand nombre de possibilités vis-à-vis des cellules

à injecter. Il est en effet possible de choisir des lignées en fonction de leurs caractéristiques moléculaires et d'en combiner plusieurs pour étudier l'hétérogénéité intra-tumorale. Ce modèle offre également la possibilité de marquer les cellules pour les suivre et identifier leur devenir (Barcoding, suivi fluorescent, luciférase, etc...) (Cornils et al., 2014; Weber et al., 2011).

Il est aussi possible de produire « patients derived xenografts » (PDX) à partir de CHC (Hu et al., 2020). La procédure nécessite de collecter une pièce opératoire fraîche suite à sa résection chirurgicale, puis la greffer sur une souris immunodéprimée (NSG ou NRG) en sous-cutané ou directement dans le foie. La tumeur peut ensuite être maintenue en la transplantant d'animaux en animaux. L'avantage de cette approche est qu'elle permet de reconstituer les caractéristiques histologiques de la tumeur d'origine et de tester plusieurs drogues dans des modèles *in vivo* qui récapitulent certaines caractéristiques de la tumeur d'origine. Cependant, c'est une procédure lourde avec un taux de succès relativement faible pour les CHC (30-40%) ce qui limite leur utilisation (Xu et al., 2020). En particulier les tumeurs peu avancées et de la classe non proliférative permettent rarement de produire des PDX.

Dans l'ensemble, les modèles de xénogreffes sont particulièrement versatiles et utiles pour étudier un grand nombre de mécanismes biologiques. Toutefois, les rejets de greffes contraignent à l'utilisation d'animaux immunodéprimés (Nudes, SCID etc...). Cela rend donc compliqué, voire impossible, l'étude des mécanismes de la réponse immune adaptative. Les allogreffes, à savoir l'injection de cellules issues de la même espèce et du même fond génétique permettent de s'affranchir de ces limitations mais sont parfois compliqués à mettre en application.

c. Modèles de carcinogénèse chimiques et régimes

Un des principaux rôles du foie est la détoxification des molécules exogènes. L'organe est donc constamment exposé à des composés et des métabolites toxiques qui peuvent favoriser le développement du CHC (Zimmerman and Lewis, 1995). Des agents toxiques ont été testés sur des animaux afin d'en comprendre leurs effets ou de mettre en place des modèles de pathologies hépatiques. Plus récemment, les modèles basées sur des régimes alimentaires ont également été développés afin de mimer les effets de la NASH.

Tétrachlorure de carbone (CCl₄)

Le CCl₄ est un produit chimique qui permet d'induire une fibrose avancée chez la souris et pouvant aboutir au développement de cirrhose chez le rat. Son administration peut se faire par voie orale diluée dans l'eau de boisson, sous forme de gaz ou par injections intra-péritonéale (IP).

Le CCl_4 n'est pas un élément chimique directement génotoxique, toutefois sa métabolisation par la voie du cytochrome P450 induit la production de trichlorométhyl (CCl_3). Le CCl_3 se fixe au niveau de plusieurs lipides cellulaires favorisant leur β -oxydation et la production de ROS. Des acides gras sont alors produits et peuvent mener à la stéatose hépatique (Boll et al., 2001). Dans l'ensemble, le traitement au CCl_4 induit une réaction inflammatoire qui active les cellules de Kupffer et les cellules étoilées du foie provoquant la fibrose hépatique. Utilisé seul et pendant une longue période, le traitement au CCl_4 peut induire l'apparition de CHC mais avec une pénétrance faible qui varie en fonction du sexe et du fond génétique utilisé (Molina-Sánchez and Lujambio, 2019). Cependant, le traitement au CCl_4 est intéressant car il récapitule en partie les changements environnementaux que l'on observe dans la pathologie humaine. Il peut donc être avantageux de le combiner avec des modèles de greffe hépatiques ou d'autres agents chimiques. En particulier, le CCl_4 est souvent administré en combinaison avec des injections de diethylnitrosamine (DEN).

Diethylnitrosamine (DEN)

Le DEN est l'agent génotoxique le plus fréquemment utilisé. Le DEN est métabolisé par les hépatocytes via la voie du cytochrome P450, ce qui induit la production de ROS et de stress hépatique. De plus, les composés produits par la dégradation du DEN sont des agents intercalants de l'ADN, ce qui favorise les erreurs de réplication et les cassures d'ADN double brins, et donc l'apparition des mutations (Verna et al., 1996). Le séquençage des tumeurs induites suite à l'administration de DEN a mis en évidence un taux élevé de mutations avec des altérations fréquentes de Egfr, BRaf, HRas et APC (Connor et al., 2018). Il est préférentiellement administré par voie IP par injections répétées de 1-100mg/kg mais il existe un grand nombre de protocoles et de voie d'inoculations différentes. La dose utilisée, le nombre d'injections, la voie d'administration, le sexe et le fond génétique de l'animal influencent grandement la pénétrance et la cinétique d'apparition des tumeurs. Par exemple, 100% des mâles développent des tumeurs suite à des injections répétées de DEN sur une durée de 36 semaines contre seulement 30% des femelles (Nakatani et al., 2001). Cette différence fait du DEN un modèle intéressant pour étudier les disparités d'incidence du CHC liées au sexe. Toutefois le modèle est relativement peu reproductible et nécessite une longue période de traitement avant l'apparition des tumeurs. De plus les tumeurs induites sont limitées à quelques événements oncogéniques et ne développent pas de métastases ce qui restreint les études à l'analyse des tumeurs primaires. Ces contraintes peuvent toutefois être en partie contournées en combinant le DEN avec d'autres composés génotoxiques comme le phénobarbitol qui accélère l'apparition des tumeurs et mène parfois à la formation de métastases extra-hépatiques (Waxman and Azaroff, 1992).

L'augmentation croissante des cas de CHC liés aux NAFLD et à la NASH a incité la communauté scientifique à développer des modèles qui récapitulent au mieux les particularités de ces pathologies. Ces modèles sont essentiellement basés sur l'utilisation de régimes qui reproduisent certaines perturbations observés dans le contexte des NAFLD. Par exemple, un régime déficient en choline ou en méthionine (M-CDD) perturbe le métabolisme des lipides ce qui induit stress mitochondrial, production de ROS, stéatose hépatique et inflammation (Corbin and Zeisel, 2012). Sur des longues périodes de temps (+/- 12 mois) certains animaux développent des CHC mais la réponse au régime est globalement hétérogène. De plus, les animaux y sont soumis présentent également des cachexies synonymes d'importantes pertes de poids (Rinella and Green, 2004). Cet aspect est en discordance avec la pathologie humaine où les patients sont en surpoids et présentent un syndrome métabolique chronique. Une variante du régime déficient en choline est de l'associer avec un régime riche en graisse (HF-CD). Toutefois bien que la cachexie soit ici évitée les effets métaboliques restent limités et hétérogènes, notamment par rapport à l'aspect inflammatoire de la NASH, et par conséquent, à la maladie fibrotique. Alternativement l'utilisation d'un régime riche en graisse, en cholestérol et avec l'ajout de sucrose dans l'eau de boisson (western diet) semble plus efficace pour induire NAFLD, NASH, fibrose, résistance à l'insuline et obésité chez les animaux. De plus, 89% d'entre eux développent spontanément des CHC après 8 et 13 mois de régime (Asgharpour et al., 2016). On note que les résultats obtenus grâce à ces régimes sont également dépendant du sexe, du fond génétique utilisé mais aussi de l'animalerie dans laquelle les animaux évoluent. Ce dernier point est certainement lié à la composition du microbiote qui influence le développement de la NASH (Bashiardes et al., 2016) Ces modèles restent cependant coûteux et relativement long à mettre en place. Quoi qu'il en soit ces régimes restent très intéressants pour étudier le rôle de l'environnement et de la NASH sur le développement tumoral. Ils peuvent notamment être combinés à des modèles de greffes hépatiques, carcinogénèse chimiques ou génétiques pour s'affranchir de certaines de ces contraintes.

En résumé, les différents modèles de régimes alimentaires sont particulièrement utiles pour simuler les modifications environnementales qui précèdent l'apparition de la maladie. Indépendamment, ils sont toutefois relativement peu efficaces pour induire le développement tumoral et offrent peu de possibilité de contrôle des événements oncogéniques à étudier. Il est donc préférable de les utiliser en combinaisons avec d'autres modèles. Dans la partie suivante je vais aborder les modèles génétiques de CHC qui autorisent plus de libertés.

d. Les modèles génétiques

Contrairement aux modèles présentés dans la partie précédente les modèles transgéniques autorisent l'étude d'altérations génétiques spécifiques. En effet, les techniques de micro-injection d'ADN, infections lentivirales ou d'édition du génome réalisées dans des cellules embryonnaires souches permettent de produire des animaux qui présentent des altérations génétiques pertinentes pour la maladie à étudier (Jaenisch, 1988). De plus, l'expression constitutive d'oncogènes ou la délétion de suppresseur de tumeurs peut être placée sous le contrôle de promoteurs tissus spécifique, inductibles ou non. Par exemple, le promoteur à l'albumine restreint l'expression d'un transgène aux hépatocytes. Tandis que les promoteurs inductibles, comme ceux dont l'activité est régulé par la tétracycline, ou ceux qui utilisent le système de recombinaison Cre-ER-lox, permettent le contrôle temporel de l'expression génique (Lamprecht Tratar et al., 2018). En se basant sur ces approches de nombreux modèles reposant sur des altérations géniques pertinentes aux CHC ont été établis. Par exemple la surexpression hépato-spécifique de MET est suffisante pour générer des CHC chez environ 60% des souris après 1 an (Wang et al., 2001). D'autres modèles dépendant d'altérations fréquemment observées dans la pathologie humaine comme l'expression des protéines du VHB ou VHC, l'amplification de c-myc, l'inactivation de p53, l'activation de la β -caténine etc... sont également disponibles et aptes à induire la tumorigénèse hépatique (Newell et al., 2008). Toutefois la mise en place de ces modèles transgénique est longue, couteuse et introduit des altérations génétiques germinales qui sont exprimées, au pire dans l'ensemble de l'animal, au mieux dans l'ensemble du tissu. Cet aspect est peu représentatif de la réalité dans laquelle la transformation intervient dans une cellule entourée d'un environnement « sauvage ».

Plus récemment, un système permettant d'induire des mutations somatiques restreintes à quelques hépatocytes ont été développés. En particulier, la technique du transfert hydrodynamique de gènes (HGD) permet l'édition du génome ou la transfection stable d'oncogène *in vivo*. Cette technique consiste en l'injection sous haute pression d'un volume important (10% du poids de l'animal en volume) de plasmide dans la veine caudale de l'animal. Cette injection produit une congestion cardiaque et un reflux du liquide vers le foie qui devient ainsi l'organe cible privilégié. L'afflux de liquide dans le foie perméabilise l'endothélium hépatique et transfecte 10 à 40% des hépatocytes qui sont proches des capillaires. De plus, en ajoutant la transposase *sleeping beauty* dans le mélange de plasmide à injecter il est possible d'assurer une transfection stable des transgènes (Chen and Calvisi, 2014). Cette technique est très peu couteuse et autorise l'étude de plusieurs événement oncogéniques en simultané dans un contexte

immunocompétent. Par exemple, une équipe a récemment publié une étude où ils testent 23 paires de combinaisons oncogéniques sur des souris C57BL/6. Parmi ces combinaisons, 9 permettent de générer des tumeurs sur une période de temps de 2 semaines à 6 mois. De manière intéressante l'analyse des données histologiques, transcriptomiques et du micro-environnement de ces tumeurs a permis de définir 3 clusters de CHC murins qui présentent des caractéristiques communes avec les clusters de CHC humains (Hoshida subclass 1,2 et 3) (Molina-Sánchez et al., 2020). Bien qu'elle soit très avantageuse pour étudier l'hétérogénéité inter-tumorale et la contribution des mécanismes oncogéniques à l'initiation, cette technique présente tout de même quelques inconvénients. En effet les contraintes techniques restreignent son utilisation à des animaux jeunes et donc sans pathologies hépatiques. Il serait en effet intéressant de pouvoir réaliser ces injections chez des souris sous régimes ou traitées au CCl₄. Une autre limitation concerne le nombre de tumeurs obtenus suite à une injection. En effet, bien qu'elles soient homogènes génétiquement ces tumeurs sont issues de plusieurs événements insertionnels ayant eu lieu indépendamment dans différents hépatocytes. En conséquence, plusieurs foyers d'initiation tumorale apparaissent simultanément. Idéalement, pour se rapprocher de la pathologie humaine l'initiation devrait avoir lieu dans un, voire un nombre restreint d'hépatocytes. Malgré ces limitations la technique des injections hydrodynamique reste très efficace, rapide et peu coûteuse et constitue certainement un des meilleurs modèles de CHC disponibles actuellement. Cependant l'apparente homogénéité des tumeurs issues de ce modèle rend son utilisation difficile pour l'étude des mécanismes de l'hétérogénéité intratumorale.

Travail de thèse et résultats

I. Questions biologiques et modèles expérimentaux

L'hétérogénéité tumorale, qui englobe des différences observées entre patients ou entre plusieurs régions d'une même tumeur, constitue un défi pour la compréhension et le traitement du carcinome hépatocellulaire. La contribution des événements oncogéniques au phénotype tumoral ou les aspects fonctionnels de l'hétérogénéité intra-tumorale restent encore mal compris. Un des axes de recherche du laboratoire se focalise sur l'étude des oncogènes et suppresseurs de tumeurs caractéristiques des différentes classes de CHC ; avec pour objectif d'identifier leur impact sur l'initiation et la progression tumorale, la dynamique des populations cellulaires et les interactions avec le microenvironnement.

Afin d'aborder ces problématiques, il est nécessaire d'utiliser des modèles expérimentaux qui récapitulent les étapes du développement tumoral. Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a participé à la caractérisation d'un modèle cellulaire de progéniteurs hépatique : les BMEL. Ces cellules primaires peuvent être amplifiées indéfiniment en culture ou différenciées en hépatocytes et cholangiocytes (Akkari et al., 2010; Strick-Marchand and Weiss, 2002). La transduction rétrovirale des BMEL avec des oncogènes, en particulier H-RAS^{G12V}, permet la croissance cellulaire en absence d'adhérence (soft-agar) et la formation de tumeurs en xénogreffes sous cutanée (Akkari et al., 2012). Ce modèle est intéressant dans le contexte de l'initiation du CHC, d'autant plus que ces tumeurs peuvent apparemment être la conséquence de la transformation de progéniteurs hépatiques (Sia et al., 2017). Alternativement, les hépatocytes matures transformés peuvent se dédifférencier générant des tumeurs peu différenciées. Plus récemment, l'équipe a apporté une amélioration de ce modèle du CHC en développant un modèle de greffe orthotopique, ce qui a permis de replacer les cellules dans un contexte proche des conditions physiologiques. L'injection de quelques milliers de BMEL transformée par RAS est alors suffisante pour générer des tumeurs hépatiques peu différenciées (Bacevic et al., 2019). En parallèle, le marquage stable de ces cellules avec des protéines fluorescentes permet d'étudier les interactions clonales et de suivre la dynamique des sous-populations tumorales.

Mon projet de thèse s'appuie sur ces travaux et vise à utiliser ces outils afin d'étudier les aspects fonctionnels de l'hétérogénéité intra-tumorale. Ces dernières années beaucoup d'études ont abordé cette thématique en analysant des populations cellulaires se distinguant de par la présence

ou l'absence d'une protéine ou d'une activité signalétique. Cependant, peu d'entre elles s'intéressent à l'impact du dosage oncogénique et de l'intensité de signalisation sur la composition clonale et la progression tumorale. La signalisation RAS/MAPK qui est active dans plus de 40% des CHC, et dont l'intensité et la durée d'activation a des conséquences sur le phénotype cellulaire, se prête particulièrement bien à cette problématique. Au cours de ma thèse j'ai donc développé un système permettant d'isoler les BMEL en fonction du niveau d'expression de l'oncogène HRAS^{G12V}. L'analyse de ces lignées et des tumeurs qu'elles génèrent suite à leur injection dans le parenchyme hépatique, a fait l'objet de mon travail expérimental. Ces données sont représentées dans l'article principal de ma thèse qui est en cours de préparation :

(1) "Ras/MAPK signaling intensity defines subclonal fitness in primary and metastatic hepatocellular carcinoma"

Les compétences acquises au cours de ma thèse m'ont également permises de participer à des projets, à la fois au sein de l'équipe et en collaboration avec l'extérieur. Une de ces études a été pré-publiée sur BioRxiv (Bacevic et al., 2019) et une autre a récemment été publiée dans « Journal of Hepatology » (Arechederra et al., 2020)

(2) CDK8 and CDK19 kinases have non-redundant oncogenic functions in hepatocellular carcinoma" (Bacevic et al., 2019)

Dans ces travaux, qui montrent que l'expression de la kinase CDK8 est nécessaire à la transformation oncogénique par RAS dans les BMEL ; j'ai participé à la génération de lignées cellulaires, la validation de CRISPR et l'injection orthotopique de cellules transformées.

(3) ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma(Arechederra et al., 2020)

Dans cet article en collaboration avec l'équipe de Flavio Maina à Marseille ; j'ai généré des tumeurs hépatiques par injections orthotopiques, analysé leurs caractéristiques histologiques et quantifié l'expression d'ADAMTSL5 dans des cohortes de tumeurs murines et humaines disponibles au laboratoire.

II. Résultats et articles de la thèse

Article principal de la thèse

Ras/MAPK signalling intensity defines subclonal fitness in a mouse model of primary and metastatic hepatocellular carcinoma

Anthony Lozano¹, François-Régis Souche^{1,2}, Christel Ramirez⁴, Serena Vegna⁴, Guillaume Desandré¹, Anaïs Riviere¹, Valérie Dardalhon¹, Amal Makrini¹, Philippe Fort³, Leila Akkari¹, Urszula Hibner^{1*#}, Damien Grégoire^{1*#}

1. Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France
2. Department of surgery and liver transplantation, Hopital Saint Eloi Hopitaux universitaires de Montpellier
3. Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier (CRBM), University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France
4. Division of Tumor Biology and Immunology, Netherlands Cancer Institute, Oncode Institute. Amsterdam 1066CX, Netherlands.

* co-senior authorship

corresponding authors

Addresses corresponding authors:

IGMM, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: +33 4 34 35 96 56

E-mail address: ula.hibner@igmm.cnrs.fr (U. Hibner) damien.gregoire@igmm.cnrs.fr. (D. Grégoire)

Abstract

Quantitative differences in signal transduction are a so far understudied feature of tumour heterogeneity. The MAPK Erk pathway, which is activated in a large proportion of human tumours, is a prototypic example of distinct cell fates being driven by signal intensity.

We have used primary hepatocyte precursors transformed with different dosage of an oncogenic form of Ras to model subclonal variations in MAPK signalling intensities. Orthotopic allografts of the Ras-transformed cells in immunocompromised mice gave rise to fast-growing aggressive tumours, both at the primary location and in the peritoneal cavity. Fluorescent labelling of cells expressing different oncogene levels, and as a consequence displaying different levels of MAPK Erk activation, highlighted the selection processes operating at the two sites of tumour growth. Indeed, the level of Ras expression was significantly higher in the primary liver tumours than in the peritoneal metastatic ones, despite the evolutionary trade-off of increased apoptotic death that correlated with high Ras dosage. Analysis of the immune tumoral microenvironment in the two locations suggests that efficient antigen presentation by activated dendritic cells abrogates metastatic

growth in immunocompetent animals. Moreover, the high intensity MAPK signalling appears to be required for the resistance of tumour cells to elimination by liver NK cells. Our results demonstrate a quantitative aspect of tumour heterogeneity and highlight a potential vulnerability of the subtype of hepatocellular carcinoma characterized by high intensity MAPK Erk signalling.

Introduction

Tumour subclonal heterogeneity is defined by cancer cells' intrinsic properties and by phenotypic adaptations to extrinsic signals from the microenvironment (Marusyk et al., 2020). Specific tumour environments are shaped by the physiological constraints imposed by the tumour localisation and by the dynamic interactions with the growing tumour (Gerstung et al., 2020). The environment impacts the tumour phenotype, first by triggering adaptive responses from the highly plastic cancer cells (Pastushenko and Blanpain, 2019) and second by exerting selective pressures, leading to expansion of some, and elimination of other, tumoral subclones (Janiszewska et al., 2019). While the notion of inter- and intra-tumour heterogeneities and their consequences for personalized medicine have gained a strong momentum in the last decade (Losic et al., 2020; Molina-Sánchez et al., 2020), quantitative aspects leading to differences in the intensity of oncogenic signal transduction within the selected, clonal tumour cell populations (see e.g. (Gross et al., 2019)) are so far understudied.

Genomic analyses identified major oncogenic pathways for numerous tumour types. (Sanchez-Vega et al., 2018). For example, hepatocellular carcinoma (HCC) has been classified into several classes, defined by their genomic and physiopathological characteristics (Llovet et al., 2021). While some oncogenic driver mutations fall neatly in such defined categories, e.g. mutations that activate the β -catenin pathway or that inactivate the p53 tumour suppressor (Zucman-Rossi et al., 2015); others are frequently present in several different HCC types. An interesting example is the activation of the Ras/MAPK Erk pathway. Although mutations of Ras GTPases are found in only 2-4% of HCC patients, multiple activators and regulators of the pathway, such as FGF19, RSK2, RASAL1, RASSF1 and DUSP's, are more frequently mutated. Altogether, the Ras/MAPK is estimated to be activated in 40 % of HCC (Delire and Stärkel, 2015; Lim et al., 2018).

Activation of Ras/MAPK Erk signalling is an essential feature of proliferating cells (Pagès et al., 1993) and the genetic abrogation of several of the components of the pathway gives rise to embryonic lethality due to a decrease in signal intensity (Dorard et al., 2017). Moreover, variations in signal intensity, duration and tissue-specific context give rise to distinct cellular outcomes (Lenormand et al., 1993; Marshall, 1995; Pouysségur et al., 2002).

In this work we transformed bipotent mouse embryonic liver cells (BMEL, bipotent mouse embryonic liver cells) with different number of copies of an oncogenic mutant Ras (H-Ras^{G12V}), which entailed variable intensity of signalling through the Ras/MAPK Erk pathway. We show that these cells tolerate a wide range of activated Ras dosage *in vitro*. In contrast, *in vivo* tumours display a much narrower range of active Ras levels and the consequent Erk signalling, likely attributable to selective pressures from the microenvironment. Specifically, cells that sustain low levels of Ras/MAPK Erk pathway activation are gradually eliminated from the liver primary tumours. Strikingly, they persist in secondary tumours that develop in the peritoneal cavity. Thus, specific microenvironments present in primary and in metastatic tumour locations, which differ in their macrophage, dendritic and NK cell immune landscape, select distinct tumoral subclones that are characterized by site-specific Ras dosage.

Results

The phenotype of hepatic progenitors is affected by the Ras^{G12V} gene dosage

In order to investigate the consequences of distinct Ras oncogenic dosage on tumour development, we used BMEL, bi-potential precursors of the two epithelial hepatic lineages derived from embryonic mouse liver (Akkari et al., 2010; Strick-Marchand and Weiss, 2002, 2003). BMEL are not transformed and retain major characteristics of primary hepatic progenitors, including the capacity to repopulate a damaged adult liver (Strick-Marchand et al., 2004). We have previously reported that the expression of an oncogenic form of Ras (H-Ras^{G12V}) is sufficient to transform a subset of BMEL clones (Akkari et al., 2012; Bacevic et al., 2019), including the ones used for the current study. These cells express p19ARF and wild-

type p53, but not p16-INK4A (Suppl Fig. 1), which could account for their escape from Ras-induced senescence (Xue et al., 2007).

Because cellular phenotypes are sensitive to the Ras oncogene dosage (Kerr et al., 2016; Mueller et al., 2018) and the signalling intensity of its downstream effector, the MAPK Erk pathway (Dikic et al., 1994; Traverse et al., 1994), we asked whether a specific level of Ras^{G12V} expression was required for hepatic tumour growth *in vivo*. To obtain cellular populations with distinct levels of Ras^{G12V} expression, BMEL cells were transduced with bi-cistronic lentiviral vectors encoding H-Ras^{G12V} and either a Venus or a mCherry fluorescent protein (Fig. 1A upper). Cells were sorted by flow cytometry on the basis of the fluorescence intensity, giving rise to populations that we named "Ras^{LOW}" and "Ras^{HIGH}" (Fig. 1A middle). Since the parental BMEL cells used in this study were clonally derived, the BMEL-Ras populations were isogenic, except for the copy number and insertion sites of the Ras^{G12V} - Venus/mCherry transgene and the consequent level of their expression. As expected, the expression levels of the fluorescent markers faithfully reflected the Ras oncogene mRNA levels (Fig. 1A lower). Importantly, the Ras^{HIGH} and Ras^{LOW} cells, while respectively enriched in strong or weak H-Ras^{G12V} expressors, were still heterogeneous with regard to Ras expression levels, the distribution of which presented an overlap between the two populations (Suppl Fig. 2). Neither the level of Ras expression nor the nature of the co-expressed fluorescent protein altered the *in vitro* proliferation rate of the transformed BMEL cells (Suppl Fig. 3). While the parental BMEL cells did not form colonies when deprived of anchorage, Ras-transformed cells grew in soft agar, with the Ras^{HIGH} cells giving significantly more colonies than their Ras^{LOW} counterparts in this surrogate assay of transformation (Fig. 1B). Several major signal transduction pathways lay downstream of Ras activation. To gain insight into their activation status in H-Ras^{G12V}-transformed BMEL cells, we assayed phosphorylation levels of a set of kinases (Fig. 1C). Oncogenic Ras had no effect on AKT^{S473} and the GSKb^{S9}, two downstream targets of PI(3)K that were strongly phosphorylated in the parental, as well as in Ras-transformed, cells. Similarly, no differences were detected for JNK and p38 pathway components. In contrast, although this assay did not reveal increased MEK or Erk activation, Ras signalling gave rise to a strong increase in the phosphorylation of Rsk 1 and 2, which are downstream targets of MAPK Erk signalling. Moreover, while the proteomic

array assay was not sufficiently sensitive to distinguish between the Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} signalling, the oncogenic dosage did translate into differences of the Ras/MAPK Erk signalling, as evidenced by distinct transcriptional signatures of known Erk delayed early target genes (Brant et al., 2017) (Fig. 1D).

In order to further investigate how the intensity of Ras signalling governs the hepatic transcriptional programmes, we performed RNAseq analysis of control BMEL, Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} cells in culture. Setting the thresholds at fold change $\log_2 = 1.5$ and p-value < 0.01 identified over 1000 genes modulated by Ras^{G12V} signalling in hepatic progenitor cells (Fig. 1E). The expression of one hundred sixty genes was modulated by Ras independently of its mean expression level in the tested population (Fig. 1E left, Suppl Table 1), thus representing a gene signature for the low threshold Ras/MAPK signalling. In a second group of 65 genes, target gene expression was modified only in the Ras^{HIGH} cells (Fig. 1E middle, Suppl Table 2). For these genes, a high intensity of Ras signalling is required for the mRNA accumulation. Finally, the third group contains genes the expression of which correlated with the mean level of Ras expression. We identified 6 genes (*Al467606*, *Aim2*, *Dynap*, *Htra3*, *Itgb7*, *Tspan13*) whose expression was gradually increased in Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} cell populations (Fig. 1E right, Suppl Table 3). Similarly, we found 9 genes (*Ppp2r2b*, *Cbr1*, *Pmp22*, *Ptp4a3*, *Pmaip1*, *Thbs1*, *Akap12*, *Sulf2*, *Crip2*) for which expression was gradually repressed. Thus, our analysis identifies novel sets of quantitatively regulated Ras/MAPK target genes in hepatic cells. In the general framework of questioning the impact of Ras oncogenic dosage on the tumour-stroma interactions, we were particularly interested to find a rather large number of genes belonging to the category of immune response regulation (Fig. 1F).

Specific Ras^{G12V} gene dosage is selected during tumour growth

Orthotopic injections of 10^5 BMEL-Ras cells into immunocompromised recipients systematically gave rise within 3-4 weeks to hepatocellular tumours at the site of injection as well as to frequent extra-hepatic growth in the peritoneal cavity. First, we concentrated on primary tumours arising in the liver. Allografts of Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} cells both produced poorly differentiated and fast growing, aggressive tumours, as witnessed by the overall tumour size, high proliferation index and frequent multi-nodular growth, most easily visible

for small tumours (Fig. 2A). In accordance with their superior capacity for anchorage independent growth (Fig. 1B), the Ras^{HIGH} cells gave rise to significantly larger tumours than their Ras^{LOW} counterparts in orthotopic allograft experiments, indicating that high level of Ras signalling conferred a selective advantage *in vivo*. To validate this observation, we next performed orthotopic injections of a 1:1 mix of Ras^{HIGH}-Venus and Ras^{LOW}-mCherry cells. The *in vivo* seeding efficiencies of Ras^{HIGH} and Ras^{LOW} cells were indistinguishable, since equal numbers of Venus and mCherry labelled cells were detected at early times (5 days) post-injection (Fig. 2B). However, as the tumours grew, a clear imbalance between the two populations became apparent, with Ras^{HIGH} cells becoming the dominant population in tumours already at day 10, which was further confirmed in full-grown tumours 21 days post-injection (Fig. 2B). This was not due to an artefactual effect of the fluorescent markers, as switching the fluorescent labels between the Ras^{HIGH} and Ras^{LOW} cells had no impact on the dominance of Ras^{HIGH} cells. Furthermore, cells labelled with Venus or mCherry that expressed comparable Ras levels contributed equally to orthotopic tumours (Fig. 2B lower).

We next enquired about the selective process within each (i.e Ras^{HIGH} and Ras^{LOW}) subpopulation within the tumours. Of note, and as expected from the gating in the cell sorting (Fig. 1A), while the mean Ras^{G12V} level was significantly different, there was an overlap of the oncogene dosage between the two injected populations (Suppl Fig. 2). Tumours collected at day 21 post-engraftment were dissociated, and Venus⁺ or mCherry⁺ cells were sorted by flow cytometry (Fig. 2C left panel). Interestingly, RTqPCR analysis specific for the Ras^{G12V} revealed that both cellular populations composing the tumour expressed the same level of the oncogene (Fig. 2C right panel). This indicates that selective pressures operating during the *in vivo* tumour growth allow the expansion of a population with a defined level of Ras oncogene expression, independently from which parental population they originate. Since fewer cells in the Ras^{LOW} population fell within the range of this "optimal" oncogene dosage, they were underrepresented in the fully grown tumour at the end of the experiment. Finally, cell lines established from the orthotopic tumours maintained the high level of Ras expression *in vitro* (Fig. 2D), providing further support to the idea of pre-existing clones undergoing selection *in vivo*.

Site specific tumour microenvironment selects distinct levels of oncogene dosage.

Human hepatocellular carcinoma give rise mainly to intrahepatic metastases, but extrahepatic invasion also occurs (Katyal et al., 2000). This is also the case in our animal model of HCC orthotopic allografts. Indeed, in addition to intra-hepatic tumour spread, we consistently observed tumours in the peritoneal cavity, morphologically resembling the paired liver tumors (Fig. 3A). Extrahepatic tumours likely arose from cell leakage during the surgical procedure of intrahepatic injection, since peritoneal lavage performed after surgery contained low but detectable numbers (< 0.5%) of Venus-labelled cells. In this scenario, tumour initiation would be expected to be synchronous at the two locations.

To gain further insight into the characteristics of tumour growth in the primary and metastatic sites, we analyzed hepatic and peritoneal tumours generated following injections of either Ras^{HIGH} or Ras^{LOW} cell populations. Strikingly, whereas Ras^{LOW} cells gave significantly smaller hepatic tumours than Ras^{HIGH} cells, this difference was abolished with regard to peritoneal tumours (Fig. 3B). Altogether, these results confirm that the Ras^{LOW} population contained fewer cells capable of initiating and/or sustaining tumour growth in the liver. In contrast, there appears to be no selective advantage for Ras^{HIGH} cells to establish tumours in the peritoneal cavity.

To further investigate the hypothesis that tumorigenesis at both tissue locations was regulated by the intensity of Ras signalling, we improved the precision of the quantification of the *in vivo* oncogenic dosage. To do so, we used flow cytometry to separate tumoral from stromal cells derived from both liver primary tumours and from the matched peritoneal metastatic ones. RTqPCR analyses confirmed the increased oncogenic dosage in the *in vivo*-grown cells compared to the *in vitro*-grown parental ones. Strikingly, they also revealed a significantly higher mean level of Ras^{G12V} expression in the primary versus the metastatic tumours (Fig. 3C). Overall, these data support the conclusion that tissue-specific selective pressures favour distinct oncogenic Ras levels.

To address the mechanistic basis for this phenomenon, we performed transcriptomic profiling of tumour cells from the primary and the metastatic sites. Transcriptomic profiling of flow cytometry sorted Venus⁺ cells isolated from the liver and peritoneal tumours revealed approximately 160 differentially expressed genes (log₂ fold change >1; p<0.05). Gene ontology analysis using GSEA identified 27 enriched gene sets (25 in liver and 2 in peritoneum; p-value < 0.01 and FDR < 0.1). Importantly, it confirmed the increase of MAPK

signalling in the liver and identified gene sets differentially regulated in the two locations (Fig. 3D), including apoptotic processes and the regulation of the immune response.

Both the hepatic and the peritoneal tumours were highly proliferative (Fig. 3E). Interestingly, while the cultured BMEL cells expressing either high or low levels of the Ras^{G12V} oncogene have comparable, low, apoptotic indexes, hepatic tumours contain a higher proportion of cleaved caspase 3 positive cells than their peritoneal counterparts (Fig. 3E). Moreover, in the liver, and much less so in the peritoneum, caspase-3 positive cells surround large necrotic areas, indicating that the cell death in an expanding liver tumour is in fact substantial, suggesting an evolutionary trade-off for the high oncogene dosage in the liver tumours.

Immune cell contexture differs in primary and metastatic tumours.

We next interrogated the interplay between the tumour cells and their local microenvironments that shape the oncogenic expression profile. The transcriptomic profiling of the stromal component of liver and peritoneal tumours revealed a number of differentially expressed genes, as expected for distinct tumour locations. Cibersortx deconvolution of the immune component of the stroma (Newman et al., 2019) did not show strong differences in the numbers of intra-tumoral macrophages at the two locations (Fig. 4A). However, independent RTqPCR profiling of macrophage polarization markers did suggest a more immunosuppressive, less inflammatory microenvironment in the peritoneum (Fig. 4B, Suppl Fig. 4).

Interestingly, the presence of immunosuppressive tumour-associated macrophages (TAMs) did not deter from other antigen presenting cells activity in the peritoneal tumour microenvironment (TME). Indeed, a significantly larger proportion of mature, activated dendritic cells (DC), as compared to immature ones, was found in this organ (Fig. 4A). Flow cytometry analyses revealed that while the total number of DC (defined as CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII^{high} CD24⁺ F4/80⁺) was not significantly different between the two TME, these cells showed an increase in proliferation in the peritoneum (Fig. 4C). Furthermore, the peritoneal DCs contained lower levels of the Milk-fat globule-EGFVIII (MFG-E8), a factor known to limit DC immunogenic potential (Fig. 4D) (Baghdadi et al., 2012; Peng and Elkon, 2012).

The phenotypes of macrophages in matched liver and peritoneal tumours also showed some interesting differences. The content of peripherally recruited monocyte-derived macrophages presenting low expression of F4/80 defined as CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺F4/80^{low}, was significantly enriched in liver tumours (Fig. 4E). On the other hand, the differentiated, tissue resident-like, F4/80^{high} macrophages, showed a tendency for enrichment in the peritoneal HCC. These results suggest that macrophage subsets are distinct in the liver and peritoneal TME, with tissue-resident, F4/80^{high} cells, which are part of organ homeostasis maintenance (Dou et al., 2020) dominating the peritoneal TME while abundant F4/80^{low} immature TAMs infiltrate the liver. Interestingly, F4/80^{high} peritoneal macrophages displayed a superior proliferative capacity (Ki67⁺) and activation phenotype (MHCII⁺, CD115⁺) compared to liver macrophages (Fig. 4F). Coherent with our findings that more activated and less immature DC are present in peritoneal TME (Fig. 4A, D), these results suggest that the liver TME may represent a more immune tolerant environment for Ras^{HIGH} tumour cell outgrowth compared to the peritoneum, in which the activation levels of the Ras oncogene do not affect the extent of tumorigenesis. Thus, through both flow cytometry and RNAseq deconvolution analyses, our results highlight the differences in stromal composition of the tumours in the two locations, showing the complex interplay of innate immune cells that may participate in shaping the clonal selection in the tumour.

We reasoned that a likely consequence of increased numbers of activated DCs would be an improved efficiency of antigen presentation thereby allowing a more efficient tumour clearance in the peritoneum. While such phenotype is not relevant in immunodeficient mice that are unable to mount a T-cell response, it should be detectable in immunocompetent animals. In order to test this prediction, we compared the outcomes of orthotopic injections of tumour cells in immunocompetent C57BL/6 and immunodeficient nude mice. For these autologous allografts, we took advantage of a C57BL/6 primary cell line that we derived from a tumour established by a hydrodynamic gene transfer of constitutively active Ras and a simultaneous CrispR/Cas9-mediated inactivation of the p53 tumour suppressor (Bacevic et al., 2019). Orthotopic allografts of 5000 cells performed in parallel on immunocompetent and immunodeficient mice gave rise to comparable macroscopic liver tumours within 3

weeks (Fig. 4G). However, in contrast to nude mice, of which 50% developed macroscopic peritoneal tumours, no metastatic growth was detected in immunocompetent recipients. These results are consistent with the hypothesis that a more effective antigen presentation in the peritoneum limits metastatic tumour growth in immunocompetent animals.

Ras signalling modulates tumour cells interactions with stromal cells

We next questioned the mechanistic bases of the tumour and stroma crosstalk that might shape the quantitative differences in the oncogenic pathway activation. To do so, we looked for genes whose expression is specifically induced by high-intensity Ras signalling, both in the parental BMEL Ras^{HIGH} cells and in the liver, as compared to the Ras^{LOW} cells and the peritoneal tumours (Fig. 5A). Out of six genes that corresponded to this criterion, we focused our attention on CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1), a gene widely expressed in many cancer types and whose expression level has been reported to correlate with tumour progression (Dankner et al., 2017). It is also expressed on the surface of several subsets of immune cell subsets, including macrophages, T lymphocytes and NK cells, where homophilic interactions with the CEACAM1⁺ tumour cells abrogate NK-mediated cytotoxicity (Helfrich and Singer, 2019). In order to confirm that the observed Ras-mediated transcriptional activation translates into CEACAM1 expression on the surface of cancer cells, we performed FACS analyses on cells dissociated from the liver and peritoneal tumours. As expected, the majority of the non-hematopoietic (CD45^{neg}) cells in both tumoral locations expressed the Venus fluorescent protein and were therefore the Ras^{G12V} expressing tumoral cells. CEACAM1 expressing cells were highly enriched in this population in the liver as compared to peritoneal tumours, corresponding respectively to 30.1 +/- 2.4 % (mean +/- SEM) and 14.2 +/- 3% (mean +/- SEM) of CD45^{neg} cells (Fig. 5B). Strikingly, the mean fluorescent intensities of the CEACAM1 labelling in the Venus+ populations were indistinguishable between the tumours at the two locations. This is consistent with the transcriptomic data indicating that high level of Ras signalling is needed to activate CEACAM1 gene expression in BMEL cells (Fig. 1E and 1F) and confirms that the cells that have the required Ras dosage are more abundant in the liver as compared to the peritoneal tumours.

Interestingly, while difference in the NK cell content in the primary and metastatic tumours did not reach statistical significance in the deconvolution of stromal cells RNAseq (Fig. 4A), immunofluorescence staining revealed distinct distribution of these cells: whereas NK infiltrate the hepatic tumours, they apparently tend to remain in the periphery of the peritoneal ones (Suppl Fig. 5 lower panels). To pinpoint the suspected involvement of NK cells in the selection of Ras^{HIGH}/CEACAM^{HIGH} cells in liver tumours, we next analyzed tumorigenesis in NOD scid gamma (NSG) mice. These animals are deeply immunosuppressed: in addition to lacking mature B and T cells they are notably devoid of NK cells (Yu et al., 2008). The tumour volumes were comparable in the NSG and in the nude mice. As in the nude mice, the NSG background was permissive for peritoneal metastatic growth, however, the majority of the animals displayed comparable tumour volumes at the two locations (Fig. 5C). Consistently, the number of caspase 3 positive cells was low for both liver and peritoneal tumours in NSG animals (Fig. 5D). These results support the idea that the discrimination against the Ras^{LOW} cells, both in the peritoneum and in the liver is alleviated in the NSG background. In support of this contention, compared to the nude mice, the hepatic tumours in the NSG background tolerated lower levels of CEACAM1 expression, while there was no significant difference for the peritoneal tumours between the two genetic backgrounds. Of note, however, the difference between CEACAM1 expression in the hepatic and peritoneal tumours was diminished, but not abolished in the NSG animals (Fig. 5E). Altogether, these results suggest that CEACAM1-driven NK inhibition participates in the clonal selection, but is not the sole element of the advantage afforded by the high oncogene dosage.

Discussion

Multiple environmental and cell-autonomous mechanisms, organized in negative and positive feedback loops, cooperate to allow an exquisite regulation of the intensity and duration of signalling, the variation of which can give rise to specific and distinct cell fates. The Ras/MAPK pathway is a prototypic example of such complex regulatory circuits (Murphy and Blenis, 2006), whose output is also relevant in context of tumorigenesis. This has been shown for example in response to the loss of anchorage, where strong Erk signal is

protective, while a moderate one is required for anoikis (Zugasti et al., 2001). However, excessive Erk activation can be detrimental to the cell, provoking cell cycle arrest or senescence (Serrano et al., 1997; Woods et al., 1997). More recent single cell functional analyses further support the evidence for cell-autonomous sensitivity to signal intensity, but also reveal the heterogeneity of cellular response, both *in vitro* and *in vivo* (Gross et al., 2019; Kumagai et al., 2015; Molina-Sánchez et al., 2020).

Our understanding of how the availability of extracellular stimuli, or the deregulation of their sensors, translate into cellular responses is still incomplete. For example, although only 5% of the small GTPase Ras needs to be activated to give rise to full activation of Erk (Hallberg et al., 1994), a clear dosage effect has been reported in pancreatic and lung tumours for activating Ras mutations (East et al., 2021; Kerr et al., 2016; Mueller et al., 2018). Moreover, amplifications of the wild type allele of Ras that give rise to an allelic imbalance and the consequent modulation of the activity of the oncogenic Ras mutants result in distinct cellular phenotypes (Ambrogio et al., 2018; Bremner and Balmain, 1990). This further argues for the physiological importance of precise Ras dosage in a growing tumour.

Of note, whereas activating Ras mutations are rare in HCC (Zucman-Rossi et al., 2015), alterations in the intensity of MAPK Erk signalling participate in shaping the tumoral phenotype, as revealed by inactivating mutations of Rsk2, which is both an ERK target and a negative regulator of the pathway (Chan et al., 2021). Moreover, a recent analysis of transcriptional signatures classified HCC among tumours with significant Ras pathway activation phenotype (East et al., 2021). Because the same report highlighted the predictive value of strong versus weak Ras-driven transcriptional signature, it is relevant to model these phenotypes in HCC by controlled dosage of the Ras oncogene, as we have done in this work.

Our exploration of signal intensity that is optimal for tumour growth in the context of its specific microenvironment led to a description of a novel feature of tumour heterogeneity, manifested by quantitative dosage differences of oncogenic signalling in tumours developing at primary and metastatic locations. We note that the peritoneal tumours in our animal model likely do not result from a *bona fide* metastatic process. Nevertheless, they do

represent tumoral growth at an extra-hepatic site and are thus a convenient model to analyse primary and metastatic-like tumour growth within the same animal.

Although several oncogenic signalling pathways lie downstream of Ras (Sanchez-Vega et al., 2018), in our experimental model Ras^{G12V} dosage correlates with the MAP kinase Erk activity, but not with the phosphoinositide 3-kinase. Whether such uncoupling is a general feature of HCC or simply a reflection of a strong PI(3)K/Akt signaling present in the non-transformed BMEL parental cells remains to be established.

Comparing tumours formed by BMEL-Ras cells expressing a wide range of Ras^{G12V} oncogene ("parental Ras" cells), with those initiated by cells with the narrower range of signalling intensities (Ras^{HIGH} and Ras^{LOW} cells) suggests the existence of a trade-off in the tumours' evolutionary history. Indeed, we have shown that cells expressing high oncogene levels are globally favoured in the primary liver tumours, however, their selective advantage is curtailed by a higher probability of undergoing programmed cell death. While the propensity to activate the senescence and/or apoptosis in response to oncogenic Ras signalling is well known (Serrano et al., 1997; Woods et al., 1997), the observation of diminished cell death in the tumours growing in NSG animals points to an additional, non-cell autonomous, mechanism that drives this response.

The immune response to cancer comprises a complex interplay of innate and adaptive components of immunity (Fridman et al., 2012; Hou et al., 2020; Nguyen et al., 2021). Concentrating our study on animals devoid of an adaptive immune response gave us access to interactions between the tumour and its innate immune component. Our results point to key differences in myeloid cell population subsets in the liver and peritoneum of tumour-bearing mice. Notably, the content of tumour-infiltrating, immunosuppressive macrophages, whose functions in promoting liver carcinogenesis is well recognized (Dou et al., 2020; Ringelhan et al., 2018), was enhanced in Ras^{HIGH} liver tumors and correlated with an increased fraction of immature DCs when compared to the peritoneal TME. These results suggest that rather than total numbers of each myeloid populations, it is the phenotype of these cells, driven by the local cues, that regulates their ability to further engage an anti-tumour immunity and control tumour outgrowth. In line with this observation, recent studies have shown that identical oncogenic drivers have strikingly different consequences

on the content and activation of TME cells in lung or pancreatic adenocarcinomas (Kortlever et al., 2017; Sodikin et al., 2020). Hence, in addition to the tumour cells' genetic landscape itself (Wellenstein and de Visser, 2018), the downstream activation of signalling nodes pertaining to dosage of a specific oncogene should be considered as a tumour-intrinsic feature shaping the TME, as recently also reported for pancreatic cancer (Ischenko et al., 2021).

It is of particular interest to consider the role played by natural killer cells as part of the organismal defence against HCC. NK activities are strongly dependent on, as yet incompletely understood, organ-specific features (Shi et al., 2011). Resident NK cells acquire cytolytic functions mediated through TNF α and granzyme B during hepatotropic viral infections, cirrhotic pathology and HCC (Sällberg and Pasetto, 2020). The viral adaptation to the NK-mediated attack includes the suppression of their function through the CEACAM1-mediated blockade of their activity (Suda et al., 2018). Our results are fully consistent with the idea that a similar mechanism of immune escape operates in primary tumours of HCC. In contrast to the liver, the peritoneal resident cells resemble immature splenic NK cells (Gonzaga et al., 2011), which may account for a lesser involvement of these cells in anti-tumour immunity in this location, as suggested by our data.

How can the organ-specific differences in primary and metastatic tumour growth be exploited in designing novel therapeutic approaches remains an open question. The observation that only a narrow range signalling intensity through a signal transduction pathway is compatible with tumour development raises hopes for the therapeutic efficacy of its modulation, as recently reported for stratification of HCC response to chemotherapeutic intervention based on the inactivating *Rsk2* mutations that modulate the strength of the MAPK signalling (Chan et al., 2021). Similarly, only lung adenocarcinoma with a strong Ras activating signature respond to inhibitors of the MAPK Erk pathway (East et al., 2021). It remains to be seen if the Ras pathway activation signature proves to be useful for HCC stratification for defining clinically relevant treatment options.

Materials & Methods

BMEL preparation and cell culture

BMEL cells were isolated from C57BL/6xC3H e14 embryonic mouse livers, as described in (Strick-Marchand and Weiss, 2002). Briefly, livers at 14 dpc were separately dissected, homogenized and plated onto collagen-coated 100-mm petri dishes in hepatocyte attachment medium (Invitrogen, Cergy Pontoise Cedex, France). The day after and thereafter, medium was replaced by RPMI 1640 (Eurobio) containing 10% fetal bovine serum (Eurobio), 50 ng/ml epidermal growth factor, 30 ng/ml insulin-like growthfactor II (PeproTech, Rocky Hill, NJ), 10 mg/ml insulin (Sigma) and antibiotics. Clones were picked after 2–3 months of culture and expanded in the same medium on dishes coated with Collagen I (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) in humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

Isolation of cell populations:

Human H-Ras^{G12V} cDNA sequence was cloned into LeGO-iV2 and LeGO-iC2 bicistronic vectors (addgene #27344 and #27345, respectively). Retroviruses were produced by JetPEI (Polypus-Transfection) transfection of HEK293T cells with HRas^{G12V}-iV2 and HRas^{G12V}-iC2 constructs together with Gag/pol and pCAG-Eco packaging vectors. Culture media containing viruses was filtered (0,45 µm) and used to infect BMEL cells. Based on Venus (530/30nm) and mCherry (610/20nm) fluorescence intensity, Aria IIU and IIIU cell sorters (Becton Dickinson) were used to isolate HRas^{G12V}-LOW and HRas^{G12V}-HIGH populations from HRas^{G12V}-iV2 and HRas^{G12V}-iC2 BMEL cells.

Soft Agar assay

10⁵ cells/well were seeded in 0.5% Agar diluted in RPMI media. 1 mL media was added to the agar layer and was changed every 3 days. After 3 weeks, colonies were stained in 0,005% crystal violet 4% PFA. Colonies were counted automatically in imageJ using the "Analyze particles" function.

Orthotopic xenografts

Athymic nude mice (CrI:NU(NCr)-Foxn1nu), NOD SCID Mouse (NOD.Cg-PrkdcSCID Il2rgtm1Wjl/SzJ) or C57BL/6J mice from Charles River were anesthetized using intraperitoneal injections of Ketamine/Xylazine. A 1,5cm transversal incision of the skin was performed bellow the sternum's

xiphoid process and followed by a transversal incision of the peritoneum, the tip of the liver left lateral lobe was pulled out of the peritoneal cavity. BMEL cells resuspended in PBS – 20% matrigel (Corning) were injected in the liver parenchyma. Stitching of the peritoneum then skin was performed using surgical suture (Monosof 5/0 3/8C 16mm).

Analysis of tumour cellular composition.

Tumors were fixed in 4% PFA for 4 hours and left overnight in 30% sucrose solution. Fixed tissues were placed in OCT cryogenic matrix and frozen in liquid nitrogen. Sections were cut at -20°C and mounted on superFROST slides with ProlonGold mounting media. Whole slide scan were performed with Zeiss Axioscan at 20X magnification and DAPI (405nm), GFP (488nm) and Cy3 (550nm) fluorescent channels. On average 10 sections from different regions of the tumors were analyzed per mouse. Quantification was done by delimiting GFP positive or Cy3 positive regions and measuring their area on ZEN software. Alternatively, tumors were dissociated with mouse tumor dissociation kit (Miltenyi) and analyzed with Novocyte ACEA flow cytometer using FITC (530/30BP) and mCherry (615/20BP) filter cubes.

RNA extraction and quantification

Total RNA was isolated from cells, dissociated and sorted tumors or frozen tissue samples using RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was prepared from 500ng of total RNA using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). SYBR green (see primers list) or Taqman based Quantitative PCR (hprt: Roche universal probe library #95 (AGTCCCAG); Ras: Roche universal probe library #88 (CATCCTCC); Ceacam1: (TCTCACAGAGCACAACCTCAGC) were performed on Roche LightCycler480.

Primers list

Gene name	Forward primer	Reverse primer
Venus	AAGGCTACGTCCAGGAG	CGGTTCAACCAGGGTGTC
mCherry	TCCGAGCGGATGTACCC	GGCCTTGTTAGGTGGTCT
HRas	GAGGATGCCTTCTACACGTT	GCACACACTTGCAGCTC
HRas Taqman primers	GGCATCCCCTACATCGAGA	CTCACGCACCAACGTGTAGA
Hprt	GCAGTACAGCCCCAAAATGG	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
Hprt Taqman primers	CCTCCTCAGACCGCTTTTT	AACCTGGTTCATCATCGCTAA

Phlda1	GGGCTACTGCTCATAACCGC	AAAAGTGCAATTCCTTCAGCTTG
Dusp4	CGTGCGCTGCAATACCATC	CTCATAGCCACCTTTAAGCAGG
Dusp6	GCGTCGGAAATGGCGATCT	ATGTGTGACGACTCGTACAGC
Etv4	CGGAGGATGAAAGGCGGATAC	TCTTGAAGTGACTGAGGTCC
Etv5	TCAGTCTGATAACTTGGTGCTTC	GGCTTCCTATCGTAGGCACAA
Sprty2	TCCAAGAGATGCCCTTACCCA	GCAGACCGTGGAGTCTTTCA
Ceacam1	CACAGGACCCTATGTGTGTGAAA	CACTGGCTCAAGGACTGTA
Ceacam1 Taqman primers	GGGCTGGCATATTTCTCTATT	GTTGTCAGAAGGAGCCAGATT
Csn3	CAGTCTGCTGGAGTACCTTATG	AGGATTGCCACAGTATTTACTAT
Selp	CACTGGCTCAAGGACTGTA	TCCAGTAGCCAGGCATCTTA
Tmem252	GAACAGGACTGGGCTGAT	CTCTTCATAAGCTGGAGGGTAAA
Arg1	CATTGGCTTGCAGAGCG	CCAGCTTGTCTACTTCAGTCAT
IL10	TAATGCAGGACTTTAAGGGTACT	CATCCTGAGGGTCTTCAGC
TGFb1	TGCTAATGGTGGACCGC	CATGTTGCTCCACACTTGATTT
Mrc1 (CD206)	GGTGGCAGTCACCATA	GGTTCCTGTAGCCCAAG
Ltbeta	CCTGCTGCCACCTCATA	CGACGTGGCAGTAGAGGTAATA
IL6	CTAAGGACCAAGACCATCCAAT	GATATGCTTAGGCATAACGCAC
TNFa	TCAGTTCTATGGCCCAGACC	GTCTTTGAGATCCATGCCG
IL1beta	TTCCATTAGACAACCTGCACTAC	TATTCTGTCCATTGAGGTGGAGAG
IL1-rn	AAGCCTTCAGAATCTGGGATAC	GGATGCCCAAGAACACACT
iNOS	GTGGTGACAAGCACATTTGG	GTGGTTGAGTTCTCTAAGCATGA
p16 INK4	GAGCAGCATGGAGTCCG	GGGTACGACCGAAAGAGTT
p19 ARF	TTGGTGAAGTTCGTGCGAT	TGGTCCAGGATTCCGGT
Csf1	AGCGACCACCCAGGAGTA	AGTTAGTGCCAGTGAAGATT

RNAseq analysis

RNAseq bank were prepared from, respectively, 3 and 4 independent biological samples for the cell lines and Venus-positive cells sorted from tumours. We used *Universal Plus mRNAseq* kit from NuGEN and sequenced on Illumina HiSeq 2500. After quality control the sequences were aligned to Mm9 mouse genome using TopHat2. Normalization and differential gene expression between pairs was performed with Deseq. Gene set enrichment analysis was done using pre-ranked method based on fold changed values (GSEAv.6.0) and analysed with C5 ontology gene sets (Subramanian et al., 2005). Immune cell type deconvolution was done with CIBERSORTx (<https://cibersortx.stanford.edu/>) based on RPKM counts that were compared with murine immune signatures from 10 cell types produced by (Chen et al., 2017).

Flow Cytometry analyses

Mouse tumors were dissociated into single-cell suspension using the Mouse tumor Dissociation kit (Miltenyi Biotec) and the gentleMACS™ Octo Dissociator following manufacturer's instructions and as described in (Taranto et al., 2021). The cell suspension was passed through a 70-µm cell strainer (Miltenyi) and then centrifuged at 300g for 10 min at 4°C and washed 3 times in FACS buffer. GFP negative stromal cells were isolated from cell suspensions with a FACS sorter ARIAllu® (Becton Dickinson) and frozen in foetal calf serum with 10% DMSO. Frozen samples were thawed in sterile conditions and single cell preparations were incubated with anti-CD16/CD32 antibody (BD Biosciences) for 15 minutes and then stained with the indicated antibodies following standard procedures. Samples were fixed with eBioscience fixation/permeabilization kit (Invitrogen) and Ki67 antibody was used for intracellular staining (*see Table below*), and analyzed as previously described (Wang et al., 2019). The signal was detected by using a 4 laser Fortessa® flow cytometer (Becton Dickinson). Analyses were carried out using FlowJo® software.

Antibodies Myeloid Panel	Clone	Source	Fluorochrome
anti-Ki67	B56	BD Biosciences	BV786
anti-MHCII	M5/114	BD Biosciences	BV650
anti-Ly6C	HK1.4	BioLegend	BV605
anti-CD11b	M1/70	BD Biosciences	BV412
anti-F4/80	BM8	BioLegend	PE-Cy7
anti-CD11c	N418	Invitrogen	PE-Cy5.5
anti-CD45	30-F11	BioLegend	AF700
anti-Ly6G	1A8	BioLegend	APC
anti-CD24	M1/69	eBioscience	PerCp-eFlour710
anti-CD115	AFS98	Biolegend	PE/Dazzle
anti-Ceacam1	CC1	eBioscience	PE-Cy7

Immunohistochemical analysis

Antibodies used:

Name	Clone	Source	Species	Cat #	Dilution
Ki67	SP6	Spring Bioscience	Rabbit	M3064	1 : 250
Caspase 3	ASP175	Cell signalling	Rabbit	9661S	1 : 4 000
CD31	Polyc	Abcam	Rabbit	Ab28364	1 : 75
MFG-E8	18A2-G10	MBL	Hamster	D199-3	1:1000

Three μm sections of paraffin-embedded samples were analyzed using a Ventana Discovery Ultra automated staining instrument (Ventana Medical Systems), according to the manufacturer's instructions. Briefly, slides were de-paraffinized, the epitope retrieval was performed with the reagents provided by the manufacturer, the endogenous peroxidase was blocked and the samples were incubated with the appropriate antibodies for 60 min at 37°C. Signal enhancement for Caspase 3 and Ki67 antibodies was performed either with the OmniMap anti-rabbit detection kit or by the Discovery HQ conjugated anti-rabbit IgG followed by Discovery amplification anti-HQ HRP Multimer, according to the manufacturer's instructions.

Slides were incubated with DAB chromogen and counterstained with hematoxylin II for 8 min, followed by Bluing reagent for 4 min. Brightfield stained slides were digitalized with a Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HT scanner and images were visualized with the NDP.view 1.2.47 software except for the MFG-E8 staining, for which slides were digitally processed using the Aperio ScanScope (Aperio). Nodule size was drawn by hand in HALO™ image analysis software (Indica Labs) and an algorithm was designed with the Multiplex IHC v1.2 module to quantify the percentage of positive cells per mouse, as indicated in figure legends.

Immunofluorescence :

Frozen sections were equilibrated at room temperature for 10min and rehydrated in PBS. Sections were incubated overnight with anti-mouse NKp46/NRC1 antibody (1:500, AF2225 R&D system) and for 1h with rabbit anti-goat alexa647 conjugated secondary antibody (Invitrogen A21446). Images were acquired using Zeiss axioimager Z1 microscope with DAPI, GFP and Cy5 filter cubes

Softwares

The following open-source code and software were used in this study: R (v.3.5.1), Default settings were used for all GSEA analyses. R package DESeq2 (v.1.22.1), R package pheatmap (v.1.0.10) and R package VennDiagram (v.1.6.20) were also used. Graphpad prism v8 was used to make graphs and for statistical analyses.

Data availability

The RNA-sequencing data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO, NCBI) repository, and will be made accessible through GEO Series accession number upon publication.

Acknowledgments

This work was supported by the grant HTE from ITMO Cancer (to UH) and benefited from support by Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF, to DG) and SIRIC Montpellier Cancer. AL received support from the University of Montpellier and from the Fondation ARC contre le Cancer and SIRIC Montpellier Cancer. LA, SV and CR are supported by the Dutch Cancer Society (KWF 12049/2018-2), Oncode Institute and the Center for Cancer Genomics (CGC.nl). We acknowledge 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 Occitanie region (FEDER-FSE 2014-2020 Languedoc Roussillon), for the histological analyses. We acknowledge the MGX facility for the RNAseq analysis, and the MRI imaging platform. We thank the RAM animal facility and IGMM zootechnicians for care of animals. We are especially grateful to Myriam Boyer and Stéphanie Viala for help with cell sorting. We thank José Ursic-Bedoya for the cell line derived from the hydrodynamic gene transfer experiments and Benjamin Rivière for his expert advice on anatomopathology. We gratefully acknowledge many helpful discussions with Eric Assenat and all other members of the Hibner laboratory. We are especially grateful to the direction of the IGMM institute for ensuring the conditions that allowed us to continue our work in the past year.

Bibliography

Akkari, L., Haouzi, D., Binamé, F., Floc'h, N., Lassus, P., Baghdiguian, S., and Hibner, U. (2010). Cell shape and TGF- β signaling define the choice of lineage during in vitro differentiation of mouse primary hepatic precursors. *J. Cell. Physiol.* 225, 186–195.

Akkari, L., Grégoire, D., Floc'h, N., Moreau, M., Hernandez, C., Simonin, Y., Rosenberg, A.R., Lassus, P., and Hibner, U. (2012). Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors. *J. Hepatol.* 57, 1021–1028.

Ambrogio, C., Köhler, J., Zhou, Z.-W., Wang, H., Paranal, R., Li, J., Capelletti, M., Caffarra, C., Li, S., Lv, Q., et al. (2018). KRAS Dimerization Impacts MEK Inhibitor Sensitivity and Oncogenic Activity of Mutant KRAS. *Cell* 172, 857-868.e15.

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* 789586.

Baghdadi, M., Chiba, S., Yamashina, T., Yoshiyama, H., and Jinushi, M. (2012). MFG-E8 Regulates the Immunogenic Potential of Dendritic Cells Primed with Necrotic Cell-Mediated Inflammatory Signals. *PLOS ONE* 7, e39607.

Brant, R., Sharpe, A., Liptrot, T., Dry, J.R., Harrington, E.A., Barrett, J.C., Whalley, N., Womack, C., Smith, P., and Hodgson, D.R. (2017). Clinically Viable Gene Expression Assays with Potential for Predicting Benefit from MEK Inhibitors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 1471–1480.

Bremner, R., and Balmain, A. (1990). Genetic changes in skin tumor progression: Correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* 61, 407–417.

Chan, L.-K., Ho, D.W.-H., Kam, C.S., Chiu, E.Y.-T., Lo, I.L.-O., Yau, D.T.-W., Cheung, E.T.-Y., Tang, C.-N., Tang, V.W.-L., Lee, T.K.-W., et al. (2021). RSK2-inactivating mutations potentiate MAPK signaling and support cholesterol metabolism in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 74, 360–371.

Chen, Z., Huang, A., Sun, J., Jiang, T., Qin, F.X.-F., and Wu, A. (2017). Inference of immune cell composition on the expression profiles of mouse tissue. *Sci. Rep.* 7, 40508.

Dankner, M., Gray-Owen, S.D., Huang, Y.-H., Blumberg, R.S., and Beauchemin, N. (2017). CEACAM1 as a multi-purpose target for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 6.

Delire, B., and Stärkel, P. (2015). The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur. J. Clin. Invest.* 45, 609–623.

Dikic, I., Schlessinger, J., and Lax, I. (1994). PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr. Biol.* 4, 702–708.

Dorard, C., Vucak, G., and Baccharini, M. (2017). Deciphering the RAS/ERK pathway in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 27–36.

Dou, L., Shi, X., He, X., and Gao, Y. (2020). Macrophage Phenotype and Function in Liver Disorder. *Front. Immunol.* 10.

East, P., Kelly, G.P., Biswas, D., Marani, M., Hancock, D.C., Creasy, T., Sachsenmeier, K., Swanton, C., Consortium, on behalf of the Tracer., Trécesson, S. de C., et al. (2021). Oncogenic RAS activity predicts response to chemotherapy and outcome in lung adenocarcinoma. *BioRxiv* 2021.04.02.437896.

Gerstung, M., Jolly, C., Leshchiner, I., Dentre, S.C., Gonzalez, S., Rosebrock, D., Mitchell, T.J., Rubanova, Y., Anur, P., Yu, K., et al. (2020). The evolutionary history of 2,658 cancers. *Nature* 578, 122–128.

Gonzaga, R., Matzinger, P., and Perez-Diez, A. (2011). Resident Peritoneal NK Cells. *J. Immunol.* 187, 6235–6242.

Gross, S.M., Dane, M.A., Bucher, E., and Heiser, L.M. (2019). Individual Cells Can Resolve Variations in Stimulus Intensity along the IGF-PI3K-AKT Signaling Axis. *Cell Syst.* *9*, 580-588.e4.

Hallberg, B., Rayter, S.I., and Downward, J. (1994). Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J. Biol. Chem.* *269*, 3913–3916.

Helfrich, I., and Singer, B.B. (2019). Size Matters: The Functional Role of the CEACAM1 Isoform Signature and Its Impact for NK Cell-Mediated Killing in Melanoma. *Cancers* *11*.

Ischenko, I., D'Amico, S., Rao, M., Li, J., Hayman, M.J., Powers, S., Petrenko, O., and Reich, N.C. (2021). KRAS drives immune evasion in a genetic model of pancreatic cancer. *Nat. Commun.* *12*, 1482.

Janiszewska, M., Tabassum, D.P., Castaño, Z., Cristea, S., Yamamoto, K.N., Kingston, N.L., Murphy, K.C., Shu, S., Harper, N.W., Del Alcazar, C.G., et al. (2019). Subclonal cooperation drives metastasis by modulating local and systemic immune microenvironments. *Nat. Cell Biol.* *21*, 879–888.

Katyal, S., Oliver, J.H., Peterson, M.S., Ferris, J.V., Carr, B.S., and Baron, R.L. (2000). Extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma. *Radiology* *216*, 698–703.

Kerr, E.M., Gaude, E., Turrell, F.K., Frezza, C., and Martins, C.P. (2016). Mutant Kras copy number defines metabolic reprogramming and therapeutic susceptibilities. *Nature* *531*, 110–113.

Kortlever, R.M., Sodir, N.M., Wilson, C.H., Burkhart, D.L., Pellegrinet, L., Brown Swigart, L., Littlewood, T.D., and Evan, G.I. (2017). Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell* *171*, 1301-1315.e14.

Kumagai, Y., Naoki, H., Nakasyo, E., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. (2015). Heterogeneity in ERK activity as visualized by in vivo FRET imaging of mammary tumor cells developed in MMTV-Neu mice. *Oncogene* *34*, 1051–1057.

Lenormand, P., Sardet, C., Pagès, G., L'Allemain, G., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* *122*, 1079–1088.

Lim, H.Y., Merle, P., Weiss, K.H., Yau, T., Ross, P., Mazzaferro, V., Blanc, J.-F., Ma, Y.T., Yen, C.J., Kocsis, J., et al. (2018). Phase II Studies with Refametinib or Refametinib plus Sorafenib in Patients with RAS-Mutated Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *24*, 4650–4661.

Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., and Finn, R.S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* *7*, 1–28.

Losic, B., Craig, A.J., Villacorta-Martin, C., Martins-Filho, S.N., Akers, N., Chen, X., Ahsen, M.E., von Felden, J., Labgaa, I., D'Avola, D., et al. (2020). Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer. *Nat. Commun.* *11*, 291.

Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* *80*, 179–185.

Marusyk, A., Janiszewska, M., and Polyak, K. (2020). Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. *Cancer Cell* *37*, 471–484.

Molina-Sánchez, P., Ruiz de Galarreta, M., Yao, M.A., Lindblad, K.E., Bresnahan, E., Bitterman, E., Martin, T.C., Rubenstein, T., Nie, K., Golas, J., et al. (2020). Cooperation Between Distinct Cancer Driver Genes Underlies Intertumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* *159*, 2203-2220.e14.

Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewitz, B., Öllinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., et al. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* *554*, 62–68.

Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 268–275.

Newman, A.M., Steen, C.B., Liu, C.L., Gentles, A.J., Chaudhuri, A.A., Scherer, F., Khodadoust, M.S., Esfahani, M.S., Luca, B.A., Steiner, D., et al. (2019). Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat. Biotechnol.* *37*, 773–782.

Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8319–8323.

Pastushenko, I., and Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* *29*, 212–226.

Peng, Y., and Elkon, K.B. (2012). Autoimmunity in MFG-E8-deficient mice is associated with altered trafficking and enhanced cross-presentation of apoptotic cell antigens. *J. Clin. Invest.* *122*, 782–782.

Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem. Pharmacol.* *64*, 755–763.

Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., and Heikenwalder, M. (2018). The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat. Immunol.* *19*, 222–232.

Sällberg, M., and Pasetto, A. (2020). Liver, Tumor and Viral Hepatitis: Key Players in the Complex Balance Between Tolerance and Immune Activation. *Front. Immunol.* *11*.

Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadoy, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghaforia, S., et al. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* *173*, 321-337.e10.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602.

Shi, F.-D., Ljunggren, H.-G., La Cava, A., and Van Kaer, L. (2011). Organ-specific features of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 658–671.

Sodir, N.M., Kortlever, R.M., Barthet, V.J.A., Campos, T., Pellegrinet, L., Kupczak, S., Anastasiou, P., Swigart, L.B., Soucek, L., Arends, M.J., et al. (2020). MYC Instructs and Maintains Pancreatic Adenocarcinoma Phenotype. *Cancer Discov.* **10**, 588–607.

Strick-Marchand, H., and Weiss, M.C. (2002). Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology* **36**, 794–804.

Strick-Marchand, H., and Weiss, M.C. (2003). Embryonic liver cells and permanent lines as models for hepatocyte and bile duct cell differentiation. *Mech. Dev.* **120**, 89–98.

Strick-Marchand, H., Morosan, S., Charneau, P., Kremsdorf, D., and Weiss, M.C. (2004). Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8360–8365.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550.

Suda, T., Tatsumi, T., Nishio, A., Kegasawa, T., Yoshioka, T., Yamada, R., Furuta, K., Kodama, T., Shigekawa, M., Hikita, H., et al. (2018). CEACAM1 Is Associated With the Suppression of Natural Killer Cell Function in Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepatology* **68**, 1247–1258.

Taranto, D., Ramirez, C.F., Vegna, S., de Groot, M.H., de Wit, N., Van Baalen, M., Klarenbeek, S., and Akkari, L. (2021). Multiparametric analyses of hepatocellular carcinoma somatic mouse models and their associated tumor microenvironment. *Curr. Protoc.* e147.

Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C.J., Cohen, P., and Ullrich, A. (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr. Biol.* **4**, 694–701.

Wellenstein, M.D., and de Visser, K.E. (2018). Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity* **48**, 399–416.

Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., and McMahon, M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5598–5611.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660.

Yu, W.-J., Yang, W.-H., Shi, Z.-X., Yang, X.-D., and Wang, H.-J. (2008). [Application of NOD/SCID mice in research of experimental hematology - review]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 16, 964–968.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C., and Llovet, J.M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 149, 1226-1239.e4.

Zugasti, O., Rul, W., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T.F., Fort, P., and Hibner, U. (2001). Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6706–6717.

Figures

Figure 1

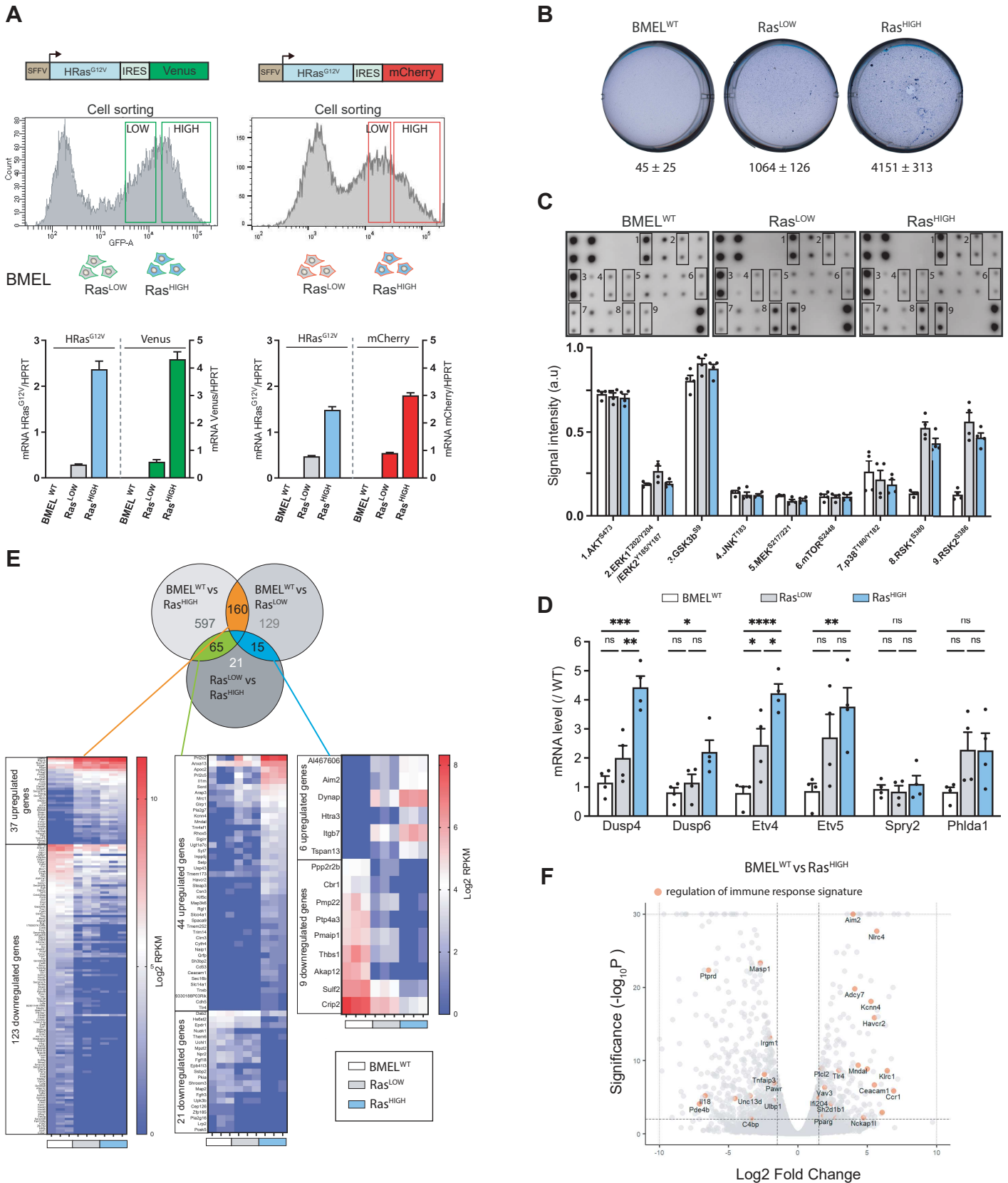


Figure 1: Ras^{G12V} oncogenic dosage controls the phenotype of BMEL cells. **A.** Bicistronic vectors were used to transduce BMEL cells that were sorted by flow cytometry according to fluorescence intensities, giving rise to Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} populations labelled with either Venus or mCherry. Flow cytometry profiles are shown. Ras^{G12V}, Venus and mCherry expression were quantified by RTqPCR (lower panels). **B.** Colonies in soft agar growth condition for parental BMEL («BMEL^{WT}»), Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} cells. Representative wells and mean colony numbers +/- SEM from two independent experiments performed in triplicate are shown. **C.** Phosphoprotein array performed on BMEL^{WT}, Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} cell lines. Bottom panel shows the quantification of duplicates from two independent experiments. a.u.: arbitrary units **D.** qPCR quantification of Ras-MAPK target genes signature in Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} BMEL cells normalized to expression in parental BMEL^{WT} cells. **E.** Venn diagram and heatmaps showing log2 RPKM values of genes regulated by Ras^{G12V} in BMEL cells detected by a RNASeq transcriptomic analysis (Log2FC >1.5, p-value < 0.01). Genes expressed at low levels (all RPKM Log2 values < 1) were removed from the analysis. From left to right: 160 genes were modulated by Ras similarly in Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} populations, 65 genes were altered only in the Ras^{HIGH} cells and the expression of 15 genes was gradually modulated in the Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} populations. **F.** Volcano plot presentation of deregulated genes in Ras^{HIGH} cells vs parental BMEL cells. Genes belonging to regulation of immune response signature (GO:0050776) are highlighted in orange. Ns not significant, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 **** < 0.0001

Figure 2

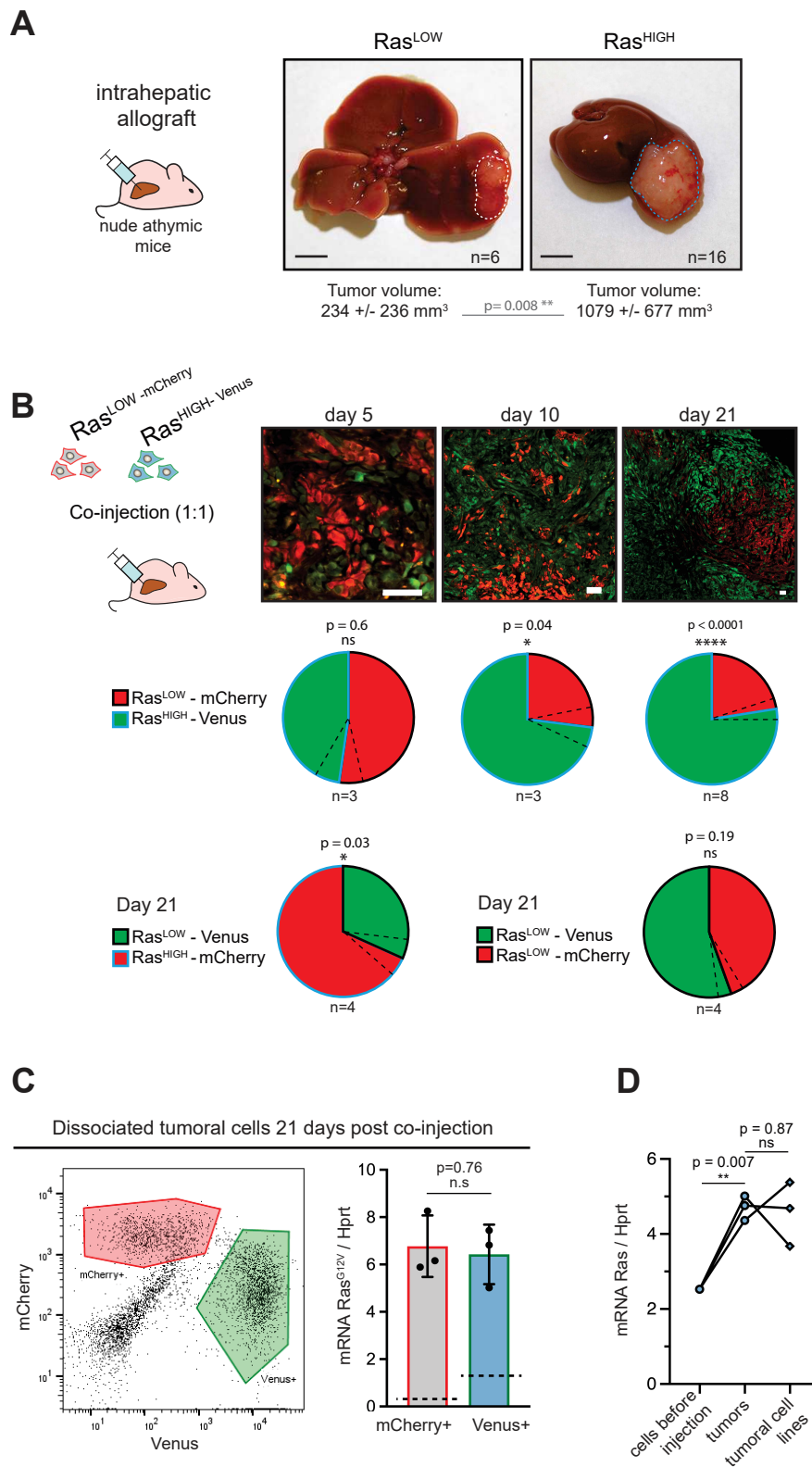


Figure 2: High level of Ras expression confers a selective advantage during *in vivo* tumour growth. **A.** Macroscopic liver tumours three weeks after intrahepatic injection of 10^5 Ras^{LOW} or Ras^{HIGH} BMEL cells, as indicated. Mean +/-S.D volumes are indicated. Scale bars: 5 mm **B.** Mice were injected orthotopically with a 1:1 mix of Ras^{HIGH}-Venus (green) and Ras^{LOW}-mCherry (red) cells and sacrificed at day 5, 10 and 21, as indicated. Representative images of tumour sections are shown in the upper panels. Different magnifications were used to take into account the tumor growth (scale bars: 50 μ m). Contribution of Ras^{HIGH} and Ras^{LOW} cells to the tumour composition was estimated by image analysis and flow cytometry, which gave identical results. Mean +/- SEM (dashed lines) are shown. The significance of deviations from the theoretical value of 50% (i.e no selective advantage) is calculated by the one sample t-test. **C.** Cells from dissociated tumours were sorted by flow cytometry (left panel) and the mean expression of Ras^{G12V} in Venus- and mCherry-labelled populations was quantified by RTqPCR. Mean +/- SEM from three independent tumors are shown. Dashed lines indicate the mean level of expression of Ras in the population of injected cells **D.** Mean Ras^{G12V} expression level quantified by RTqPCR in Ras^{HIGH} cells before injection, cells freshly isolated from the tumours as well as cell lines isolated from tumors kept in culture for 14 days.

Figure 3

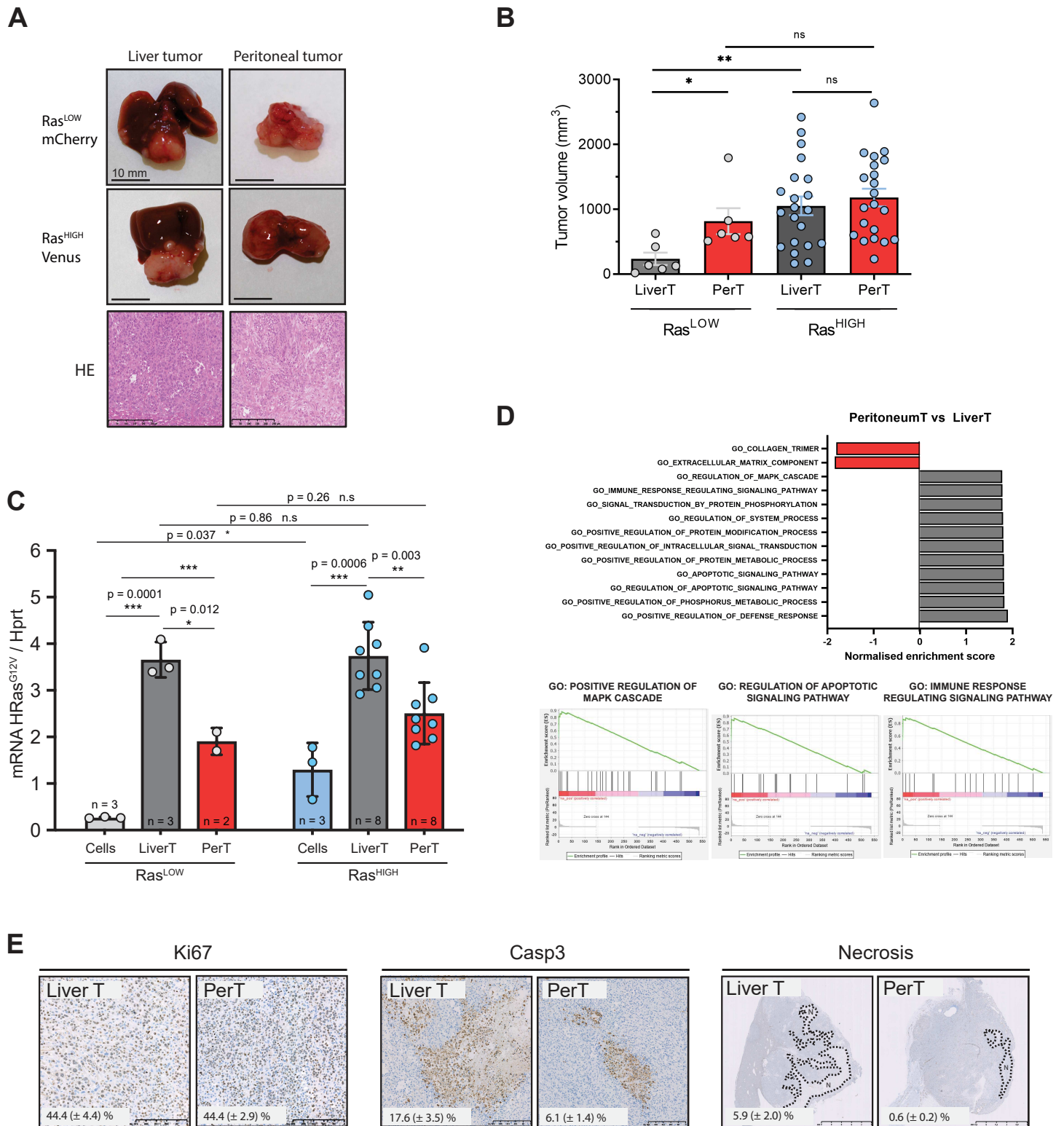


Figure 3: Distinct tumour environments select a site-specific range of optimal Ras signalling intensity. **A.** Representative images of paired liver and peritoneal tumours collected three weeks after injection of BMEL-Ras^{HIGH} and Ras^{LOW} cells, as indicated. Lower panel shows Hematoxylin/Eosin (HE) stainings. **B.** Quantification of liver and peritoneal tumour volumes from three independent experiments (mean +/- SEM). **C.** Liver and peritoneal tumours resulting from injection of Ras^{LOW}-mCherry or Ras^{HIGH}-Venus cells, as indicated, were dissociated and fluorescent cells were sorted by flow cytometry. Ras^{G12V} expression levels in cells prior to injection and in cells purified from the tumours were quantified by Taqman RTqPCR. LiverT: liver tumour, PerT: peritoneal tumour. Mean +/- SD are shown. P-values were calculated by Student t-test: ns not significant, * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 . **D.** Normalized enriched pathways from pre-ranked (Log2FC, Deseq) GSEA (GSEAv6 : C5 Gene Ontology gene sets). Lower panels show the enrichment plot for the indicated GO terms : positive regulation of MAPK cascade, regulation of apoptotic signalling, immune response regulation. **E.** Immunohistochemical analysis of cell proliferation, apoptotic cell death and necrotic areas in Ras^{HIGH} liver and peritoneal tumours. The numbers in each panel represent mean +/- SEM from the analysis of duplicate tumour sections from 7 animals.

Figure 4

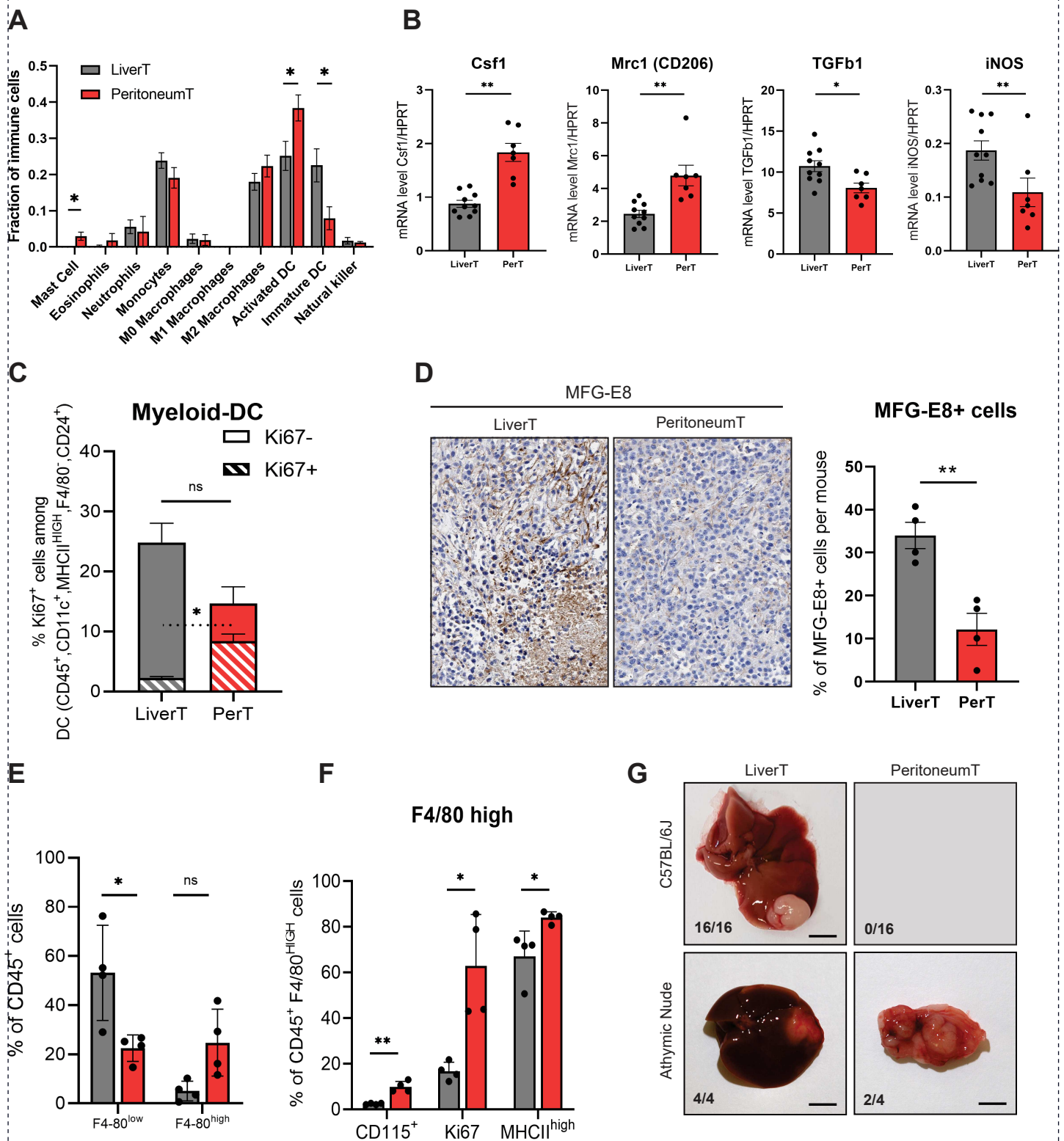


Figure 4: Site-specific immune contexts of primary and metastatic tumour locations. **A.** Cibersortx algorithm was used to perform cell type deconvolution of RNAseq data from stroma of matched liver and peritoneal tumours (n=4). Ten immune cell populations were included in the signature, as indicated. **B.** Macrophage polarization marker expression were analyzed by RT-qPCR performed on RNA isolated from stromal cells sorted from liver and peritoneal tumours. **C.** Dendritic cells (DC) (CD45⁺, CD11c⁺, MHCII^{high}, F4/80⁻, CD24⁺) from liver and peritoneal tumours were analyzed by flow cytometry. The Graph represent the percentage of proliferating (Ki67⁺) and non-proliferating (Ki67⁻) DC among the total DC population. **D.** Immunohistochemistry performed on liver and peritoneal tumour sections using anti MFG-E8 antibody, quantification of positive staining is shown in the right panel. **E.** Flow cytometry analysis of CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻ F4/80^{low} (monocyte-derived macrophages) and CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻ F4/80^{high} (tissue-resident macrophages) from liver (grey) and peritoneal (red) tumours. **F.** Quantification of CD115⁺, Ki67⁺ and MHCII^{high} cells among CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻F4/80^{high} macrophages. Grey bars: liver, red bars: peritoneum. **H.** 5*10³ (NRASG12D p53KO) cells were injected orthotopically in C57/BL/6J mice and athymic nude mice, as indicated. Macroscopic images of representative liver and peritoneal tumours collected 3 weeks after injections (scale bar = 5mm). Numbers indicate the fraction of inoculated animals that developed tumours. All quantitative analyses were subjected to a paired student t-test. P-values: *<0.05, **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001

Figure 5

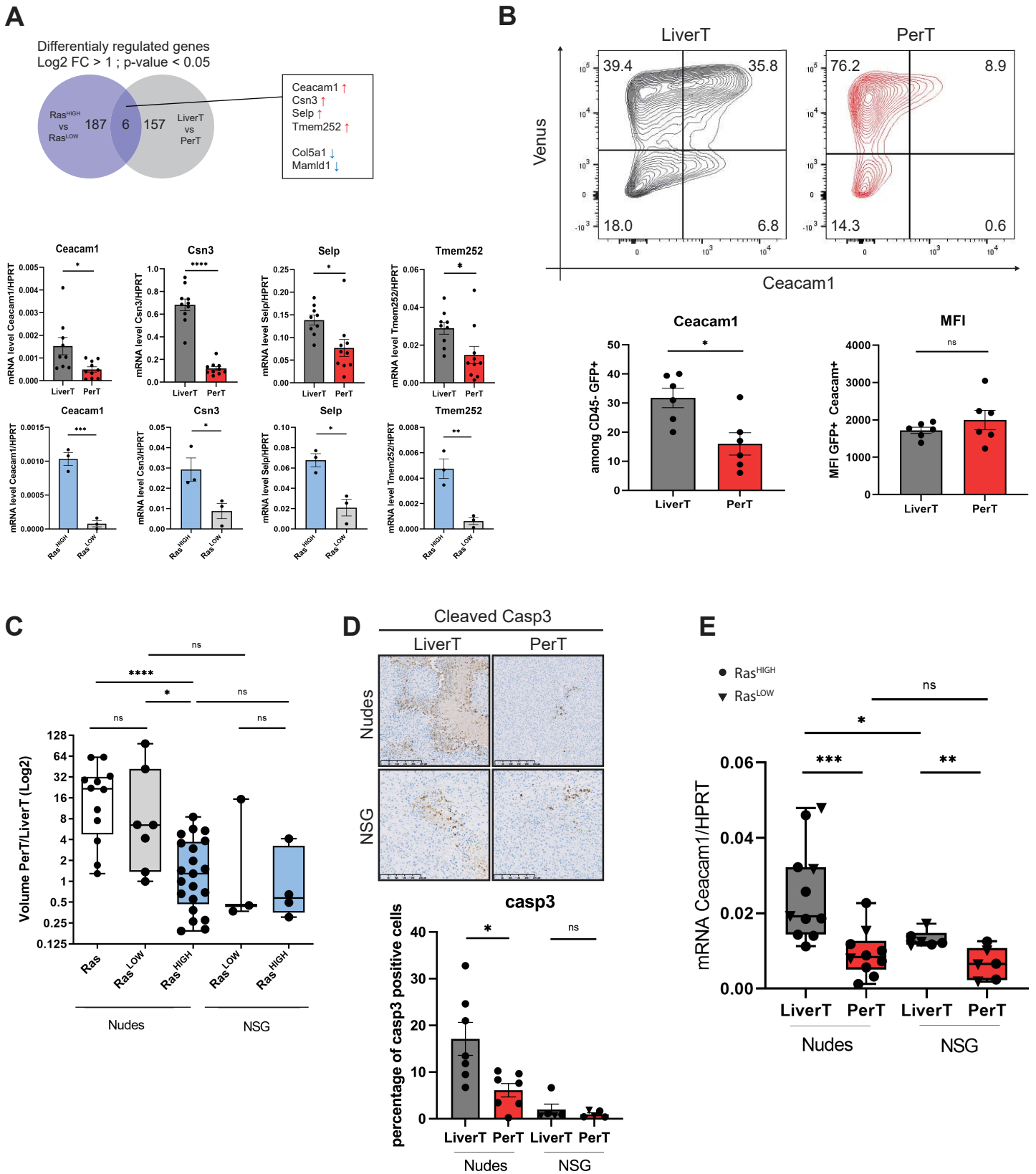
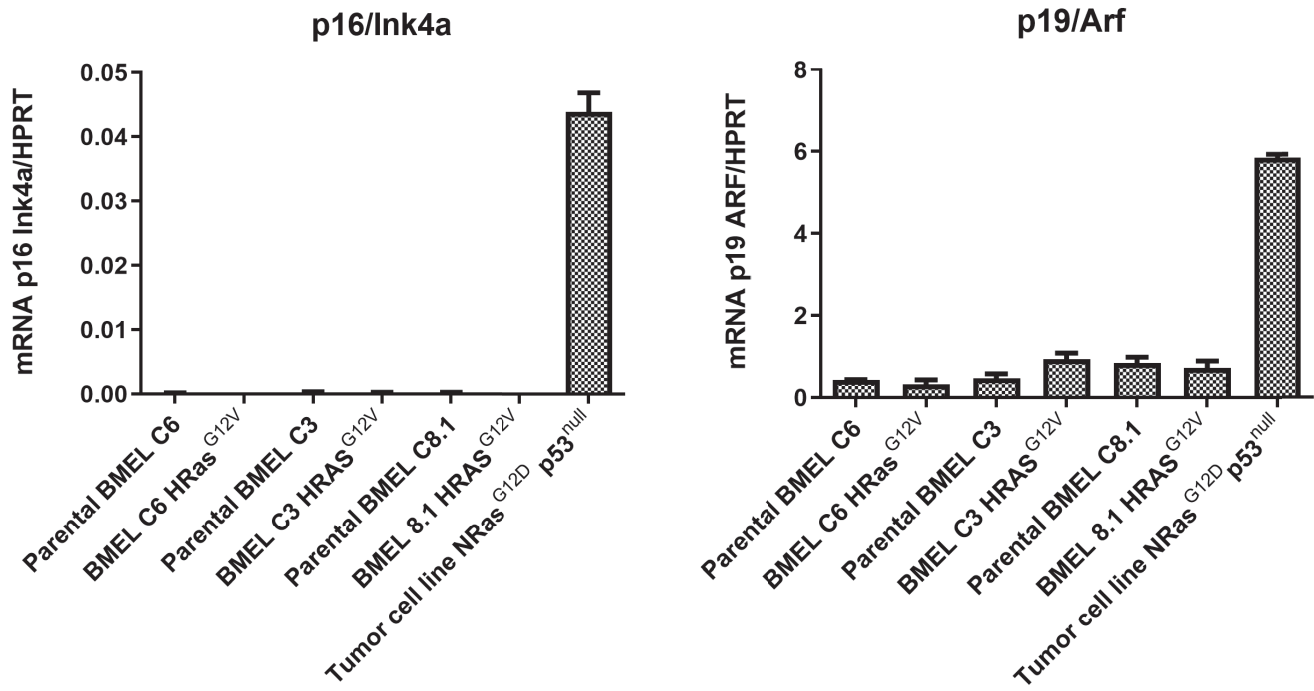


Figure 5: Contribution of natural killer cells to clonal selection in hepatic tumours. **A.** Venn diagram showing numbers of differentially expressed genes (Log₂FC > 1, p-value < 0.05) from RNASeq data of liver vs peritoneal sorted tumoral cells and Ras^{HIGH} vs Ras^{LOW} BMEL parental cells. Bottom panel: RTqPCR quantification of the 4 genes upregulated both in the hepatic vs peritoneal in tumours and the parental BMEL Ras^{HIGH} vs Ras^{LOW} cells. Upper panels: analysis of FACS sorted cells isolated from tumours, lower panels: analysis of in vitro grown cells. **B.** Flow cytometry analysis of CD45- Venus+ Ceacam1+ cells isolated from the liver and the peritoneal tumours. Bottom panels show quantification (left) and mean fluorescent intensity (MFI, right) of the Ceacam1-expressing tumour cells. **C.** Ratios of volumes of the matched peritoneal and liver tumours (PerT/LiverT) originating from injections of different cell populations, as indicated (non-sorted HRas^{G12V}, Ras^{LOW}, Ras^{HIGH}) inoculated into athymic nude or NOD-SCID-gamma (NSG) mice. **D.** Immunohistochemical analysis of activated caspase 3 performed on tumours arising from Ras^{LOW} and Ras^{HIGH} cells injected in nude and NSG mice. The histogram shows the quantification of cleaved casp3 positive cells in randomly chosen fields. **E.** RTqPCR quantification of Ceacam1 expression in sorted tumour cells from athymic nude and NSG mice. Student t-test, ns not significant, * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 and **** < 0.0001 p-values.

Figure S1. Lozano et al.

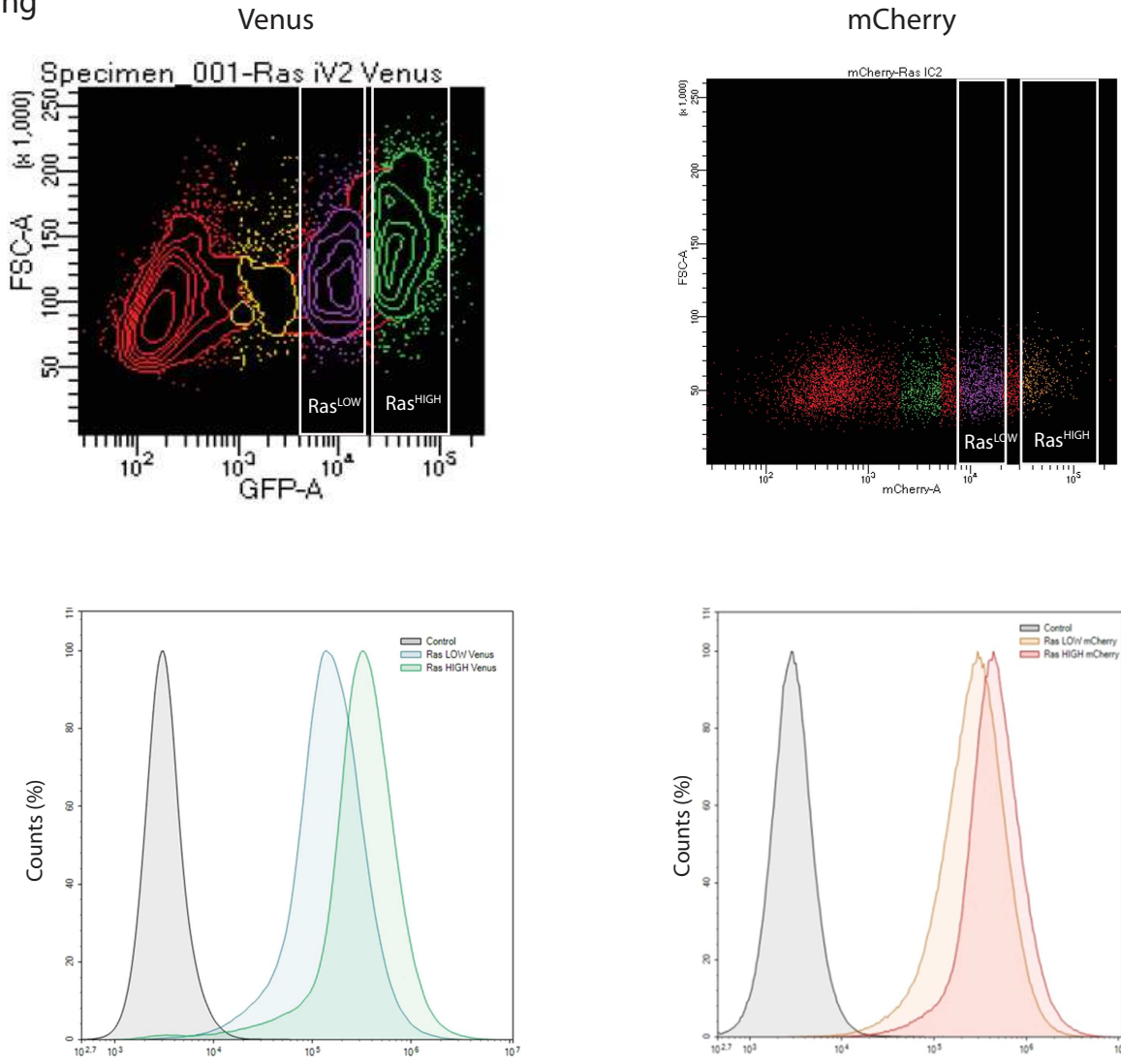


Suppl Fig 1 - BMEC clones do not express the p16 INK4A tumour suppressor.

Quantification of mRNA expression levels of p16/INK4A and p19/ARF using qRT-PCR performed on three independent BMEC clones (C3, C6 and 8.1) with or without oncogenic Ras expression, as indicated. NRASG12D p53null tumor cell line derived from a mouse tumour following a hydrodynamic gene transfer is used as a positive control.

Figure S2 Lozano et al.

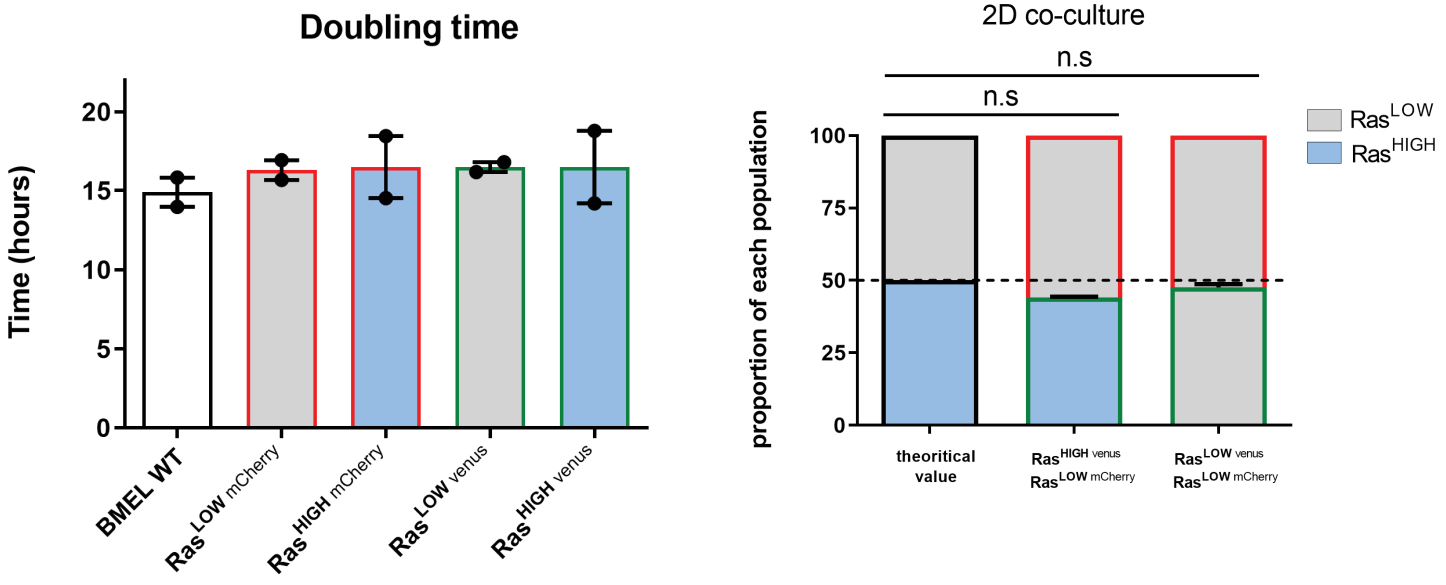
Cell sorting



Suppl Fig 2- Retroviral transduction gives rise to a wide range of transgene expression.

Flow cytometry profile showing Venus and mCherry fluorescent labelling of BMEL cells transduced with bicistronic HRasG12V/Venus and HRasG12V/mCherry vectors. Negative cells were eliminated by antibiotic selection. Selection gates for sorting are indicated as well as fluorescence intensity profiles of sorted cells (lower panels)

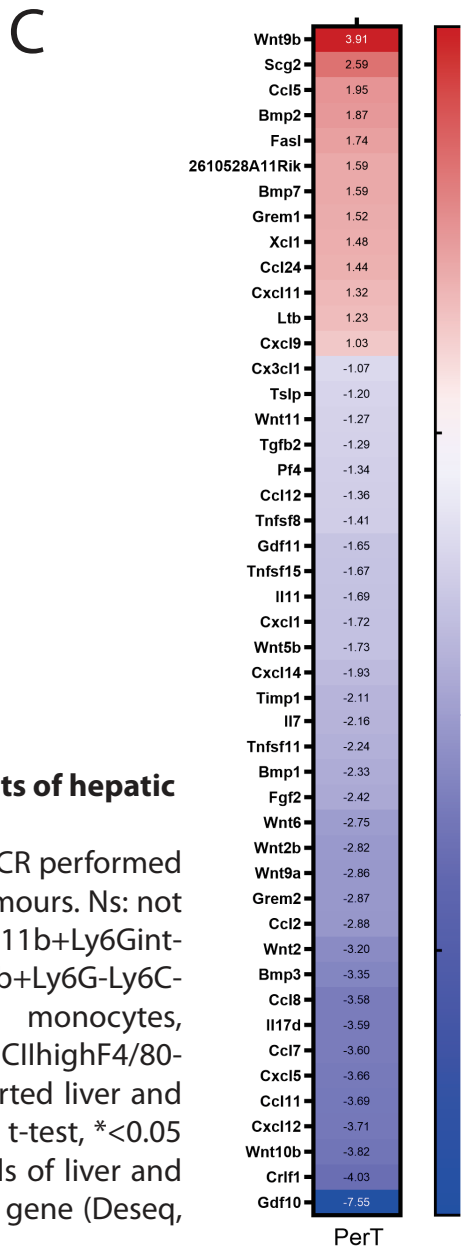
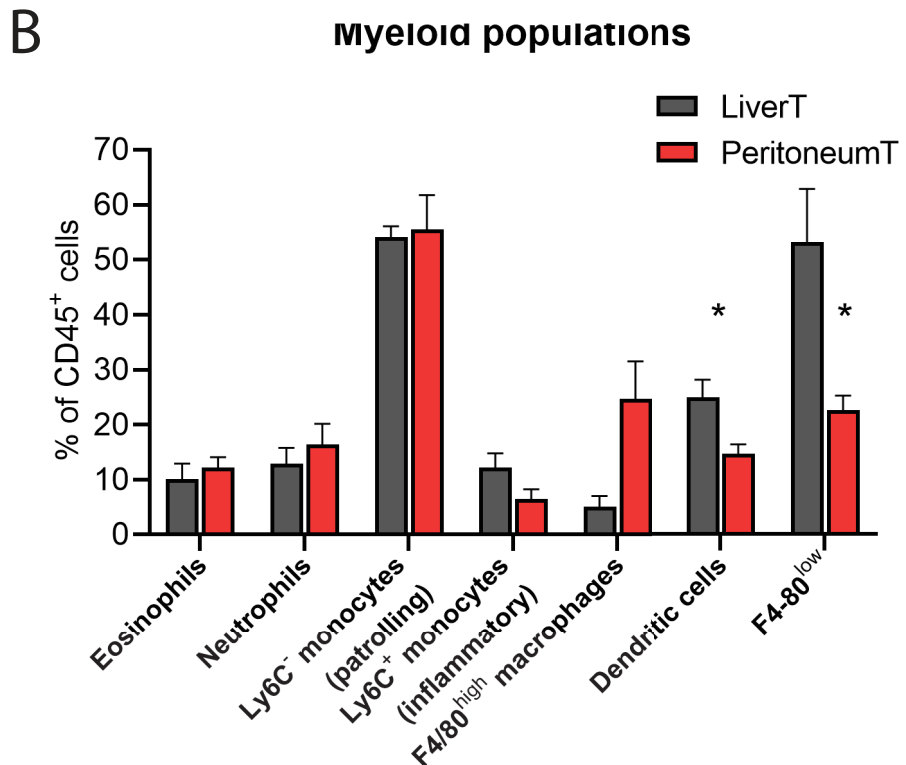
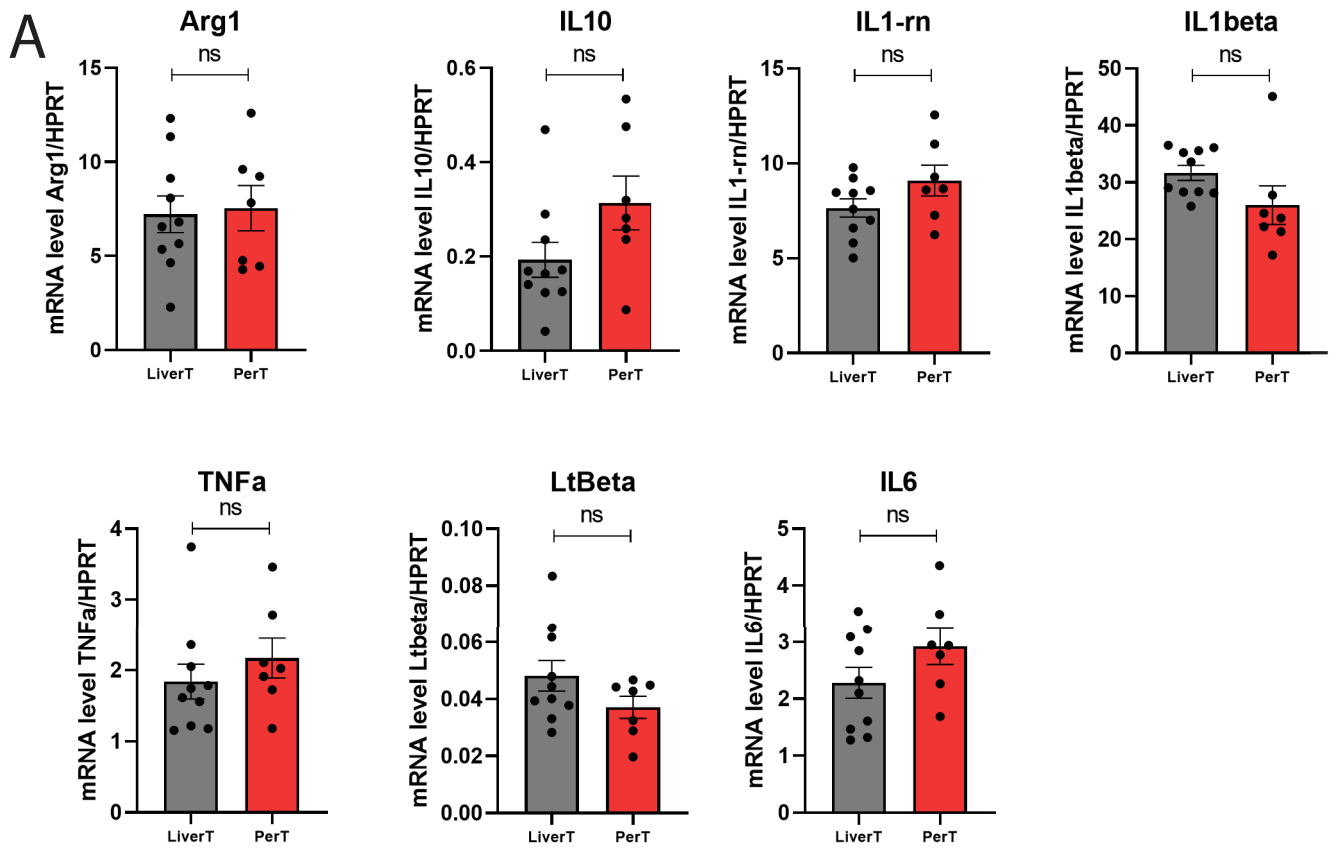
Figure S3. Lozano et. al.



Suppl Fig 3 - RasG12V expression does not change BMEL proliferation rates ex vivo.

Left panel shows doubling times in 2D culture for the indicated cell lines. Mean +/- SD are indicated for two independent experiments. Right panel shows the composition of cellular populations after 5 days of culture of 1:1 mix of Ras^{HIGH}-Venus and Ras^{LOW}-mCherry cells. Deviation from the theoretical value of 50% was calculated using one sample t-test.

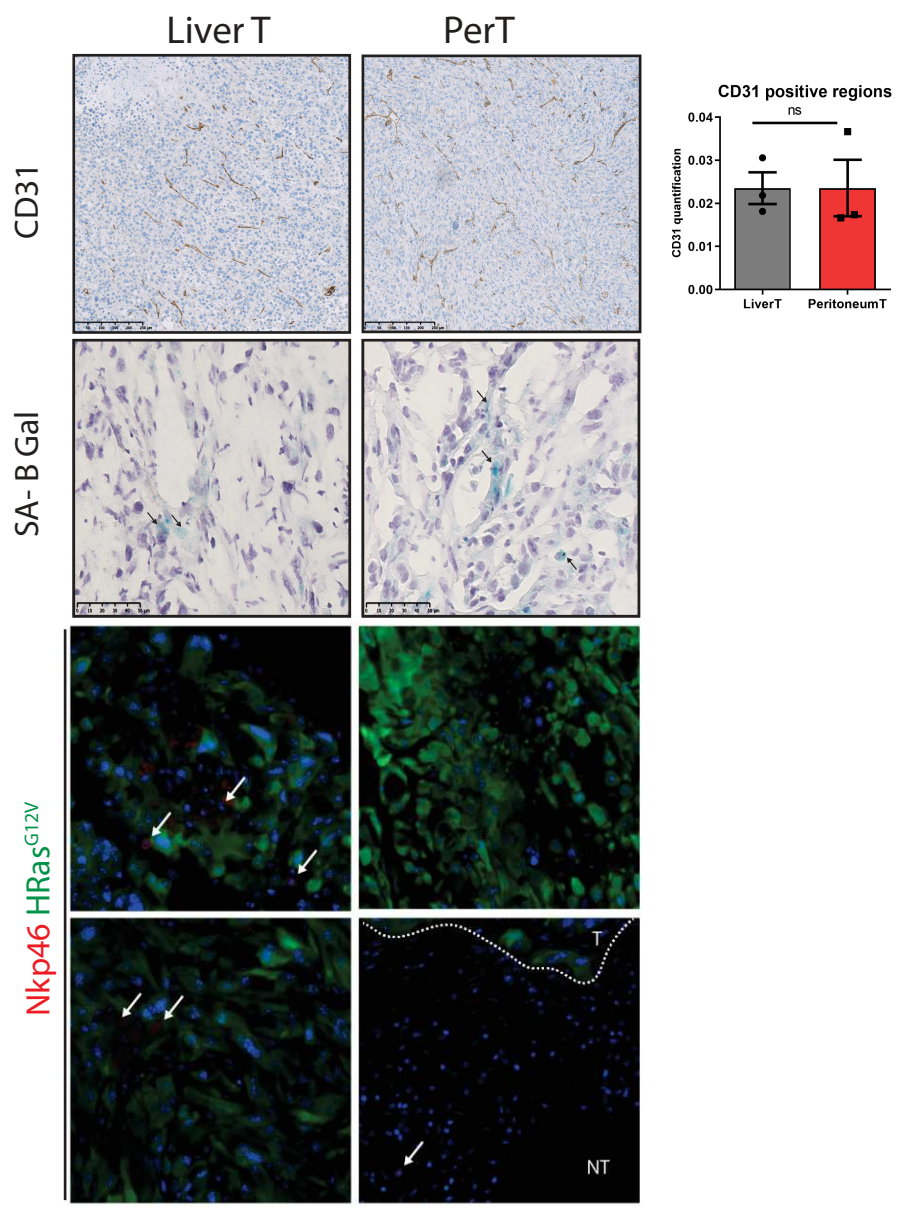
Figure S4. Lozano et al.



Suppl Fig 4- Myeloid infiltrates differ between the microenvironments of hepatic and peritoneal tumours.

A. Additional macrophage polarization markers were analyzed by RT-qPCR performed on RNA isolated from stromal cells isolated from liver and peritoneal tumours. Ns: not significant B Quantification of myeloid populations defined as CD45+CD11b+Ly6Gint-Ly6Cint eosinophils, CD45+CD11b+Ly6G+ neutrophils, CD45+CD11b+Ly6G-Ly6C-patrolling monocytes, CD45+CD11b+Ly6G-Ly6C+inflammatory monocytes, CD45+CD11b+Ly6G-Ly6C-F4/80^{high} macrophages, CD45+CD11c+MHCII^{high}F4/80-CD24+ Dendritic cells and F4/80^{low} by flow cytometry analysis of sorted liver and peritoneal stromal cells from athymic nude mice tumors (n=4). Student t-test, * < 0.05 p-value. C Heatmap of cytokines differentially expressed in stromal cells of liver and peritoneal tumours. Numbers display Log₂ fold change values for each gene (Deseq, Log₂FC > 1.5 pvalue < 0.05).

Figure S5. Lozano et al.



Suppl Fig 5 - Liver tumours have a high number of apoptotic cells and contain large necrotic areas.

Immunohistochemistry performed on athymic nude mice Liver and peritoneal tumours initiated by inoculation of RasHIGH BMEL cells were analyzed in respect to anti-CD31 (upper panels) and senescence-associated beta-galactosidase staining (middle panels). The histogram shows a quantification performed with an algorithm developed on the QuPath software. Lower panels: immuno-fluorescence staining of RasHIGH (Venus-labelled, green) tumours with the NK-specific anti-Nkp46 antibody (red). Arrows show Nkp46 positive cells that infiltrated liver tumours or remained in the periphery of peritoneal tumours.

B. Annexes : Collaborations

Article 2 "CDK8 and CDK19 kinases have non-redundant oncogenic functions in hepatocellular carcinoma"

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

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

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 β -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 β -catenin (6), p53 (15), c-Myc (16), Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) (17, 18), Nuclear-factor kappa B (NF κ 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/ β -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 β -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^{Δhep} 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 β -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 β -catenin target genes between the control and the CDK8 ^{Δ hep} animals (Figure 2C). These results indicate that CDK8 is not required to regulate the β -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 ^{Δ hep} 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 ^{Δ hep} 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*^{*F/F*} mice had at least one macroscopic liver tumor at sacrifice (Figure 3A). In contrast, only one out of eleven (9%) CDK8 ^{Δ hep} 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 ^{Δ hep} 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*^{*F/F*} 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^{G12V}, to investigate effects of CDK8 loss on hepatic cell transformation. Similarly to previous results obtained with independent BMEL cell lines (32), H-Ras^{G12V} was sufficient to transform primary *Cdk8*^{F/F} 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^{ERT2} activation. This confirmed the CDK8 requirement for Ras-induced transformation. Strikingly, deletion of CDK8 in cells previously transformed by Ras^{G12V} expression reverted their transformed phenotype (Figure 3C). To validate *in vivo* that CDK8 deletion protects hepatic progenitors from Ras-induced transformation, we injected CDK8^{F/F} Ras^{G12V} or CDK8^{-/-} Ras^{G12V} BMEL cells into the liver of immunodeficient mice. While the *Cdk8*^{F/F} BMEL expressing Ras^{G12V} 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^{G12V}-driven oncogenic transformation of hepatocytes and of hepatic progenitor cells.

CDK8 deletion impairs Ras^{G12V}-driven transformation in a p53-dependent manner

We then investigated possible molecular mechanisms by which CDK8 removal could impair Ras^{G12V}-driven transformation. Deletion of CDK8 did not abrogate Ras^{G12V}-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 β -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 β -catenin pathway, which is consistent

with the lack of β -catenin-related phenotype in CDK8^{Δhep} 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^{G12D} 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^{Δhep} animals, whose hepatocytes are devoid of CDK8 (Figure 4C). Cell lines derived from CDK8^{F/F} or CDK8^{-/-} 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^{G12V}-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^{G12V}. 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^{G12V} 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^{-/-} nor CDK19^{-/-} cells can be transformed by the oncogenic form of Ras, Ras^{G12V} 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^{G12V}-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 β -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^{G12V}. 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^{G12V} 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^{F/F} 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^{nu}*, Envigo) or CDK8^{F/F} 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 μ L of 25% Matrigel (BD) - PBS, were injected using a 10 μ 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 μ g) and pT3-EF1a-N-RAS^{G12D}-GFP (12.5 μ g) were injected together with sleeping beauty transposase SB100X (2.5 μ 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^{F/F} mouse. Cells were grown on collagen-coated plates in RPMI medium (Gibco/Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (Pan-Biotech), insulin 10 μ 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% CO₂. 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^{G12V} 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 μ 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

10⁵ 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 (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 phosphoribosyltransferase (HPRT). Primer pairs used for qPCR: Cdk8 5'-GAATTTCTATGTCGGCATGCAG-3' and 5'-ATAGTCAAAGAGAAGCCATACTTTCC-3', Glul 5'-TAGCTGTCACAAAGCGGGTGTA-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), 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^{G12V} transformed cells and BMEL Ras^{G12V} 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 χ^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^{F/F}* 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^{G12D}-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 β -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^{Min}* murine tumour model represses EZH2 activity and accelerates tumourigenesis: *Cdk8* knockout promotes tumorigenesis in *Apc^{Min}* 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-Genes 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 β -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.

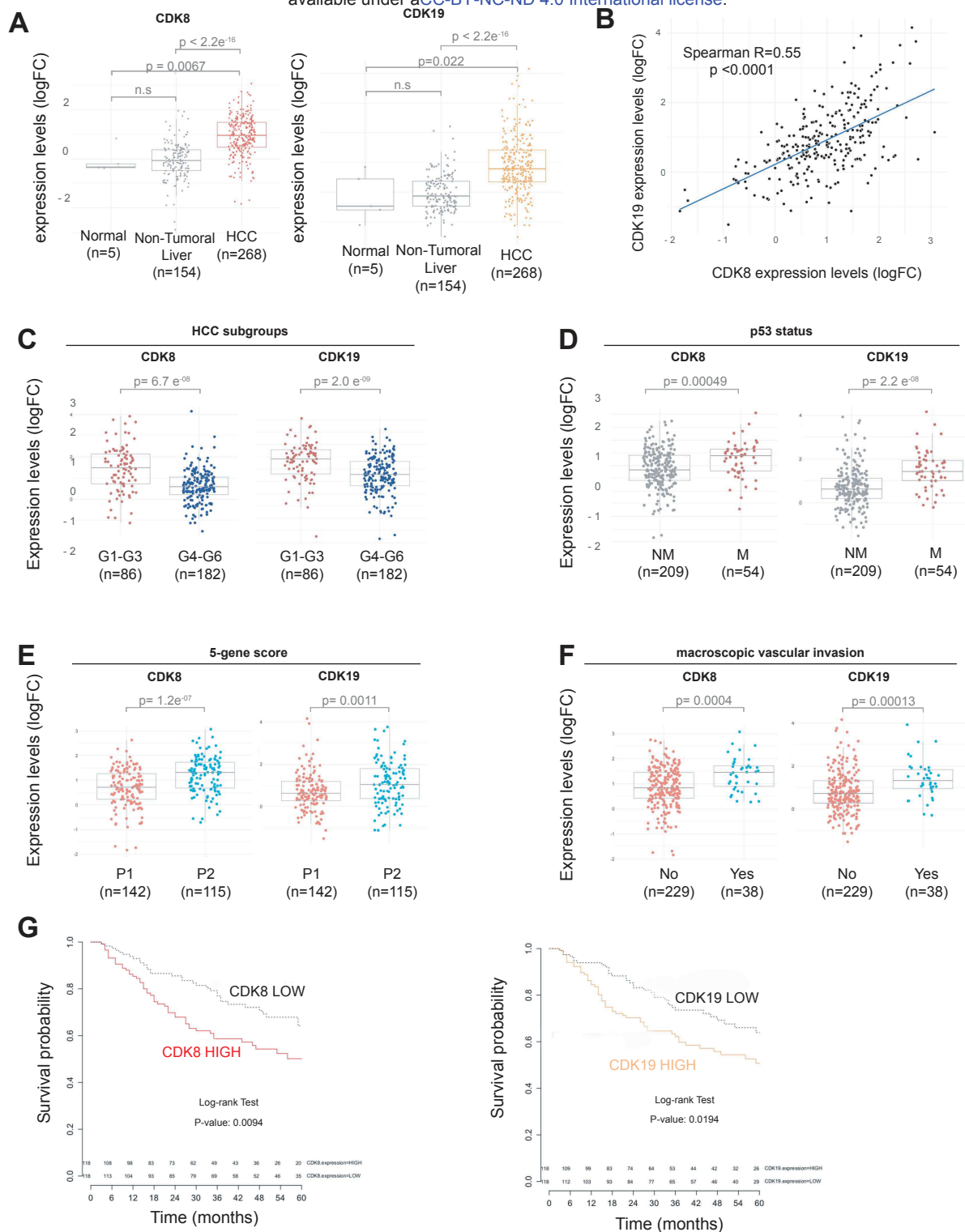


Figure 1: CDK8 and CDK19 are highly expressed in human HCC and associated with mutated p53 status. (A) Levels of CDK8 and CDK19 mRNA quantified by qPCR in control liver, non-tumoral part or malignant (HCC) tumor of patients. The fold change (LogFC) in gene expression is presented relative to mean expression 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.

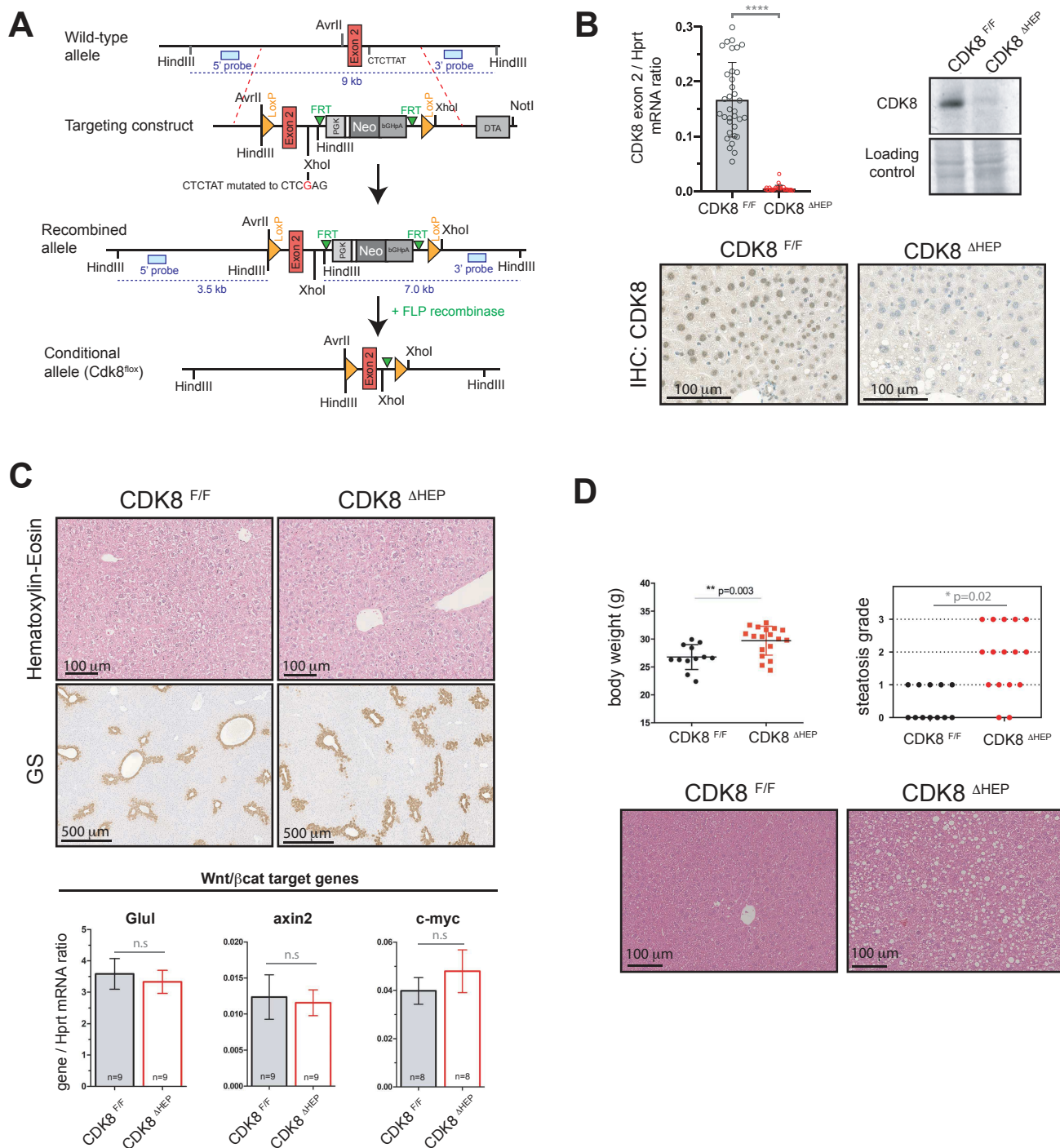


Figure 2: Hepato-specific ablation of CDK8 does not affect liver homeostasis, but induces steatosis. (A) Map of CDK8 genomic locus and strategy used to generate CDK8^{F/F} transgenic mouse. See material & methods section for details. (B) qPCR, Western-blot and immunohistochemical analysis of CDK8 removal in hepatocytes of CDK8^{ΔHEP} mice. For qPCR quantification, males and females mice of different ages were used. CDK8^{F/F} (n=34) or CDK8^{ΔHEP} (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 β -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^{F/F} and CDK8^{ΔHEP} female mice. P value of Fisher's exact test is indicated. Representative liver sections (HES staining) of mice from both genotypes are shown.

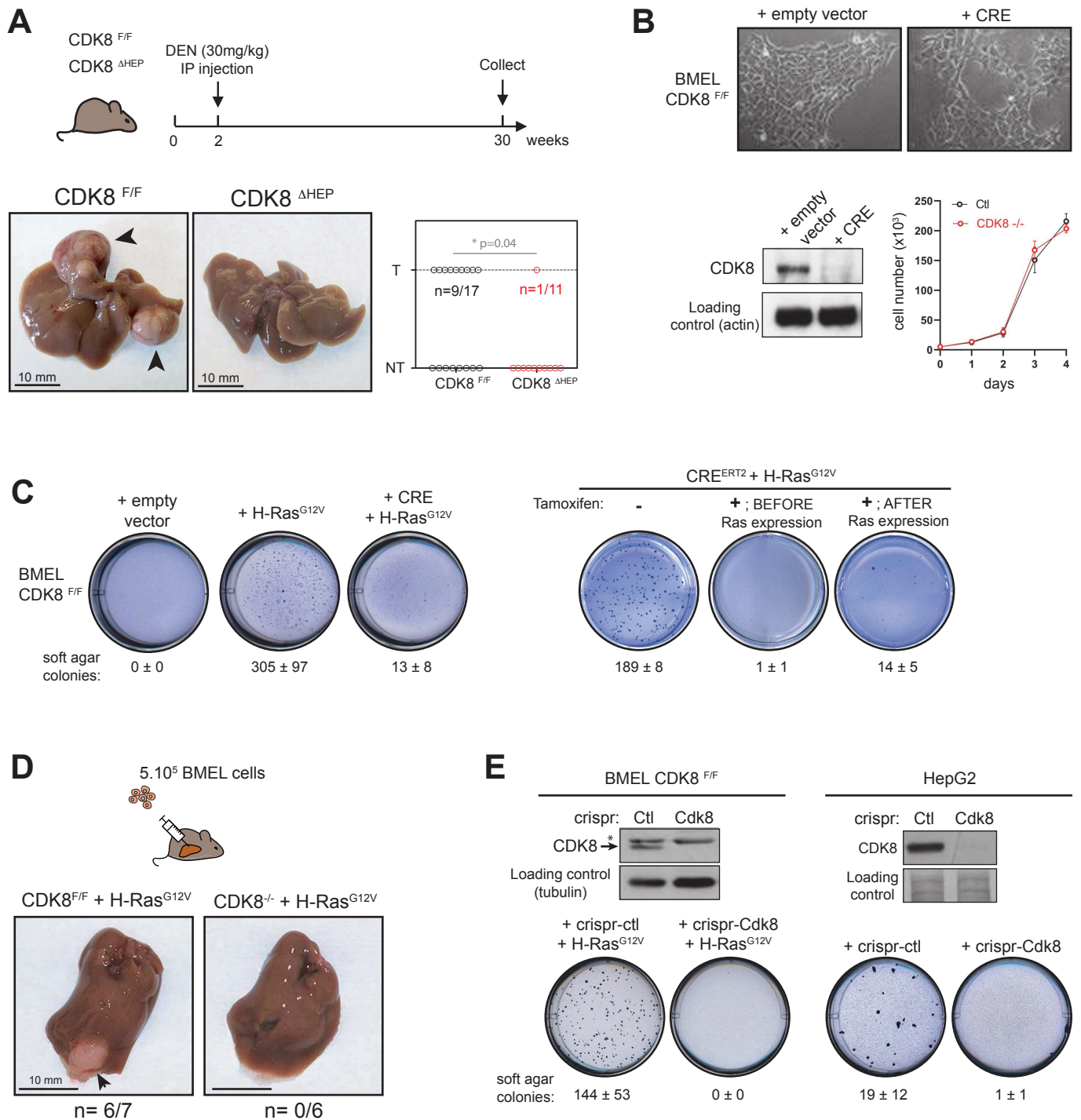


Figure 3: CDK8 is required for hepatic carcinogenesis. (A) Effect of CDK8 depletion on DEN-induced hepatic carcinogenesis. Pictures of representative livers for each genotype are shown. Arrowheads indicate tumors. Graph represents the repartition of the 28 DEN-injected animals, in each genotype depending 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^{F/F} 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^{G12V} 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.

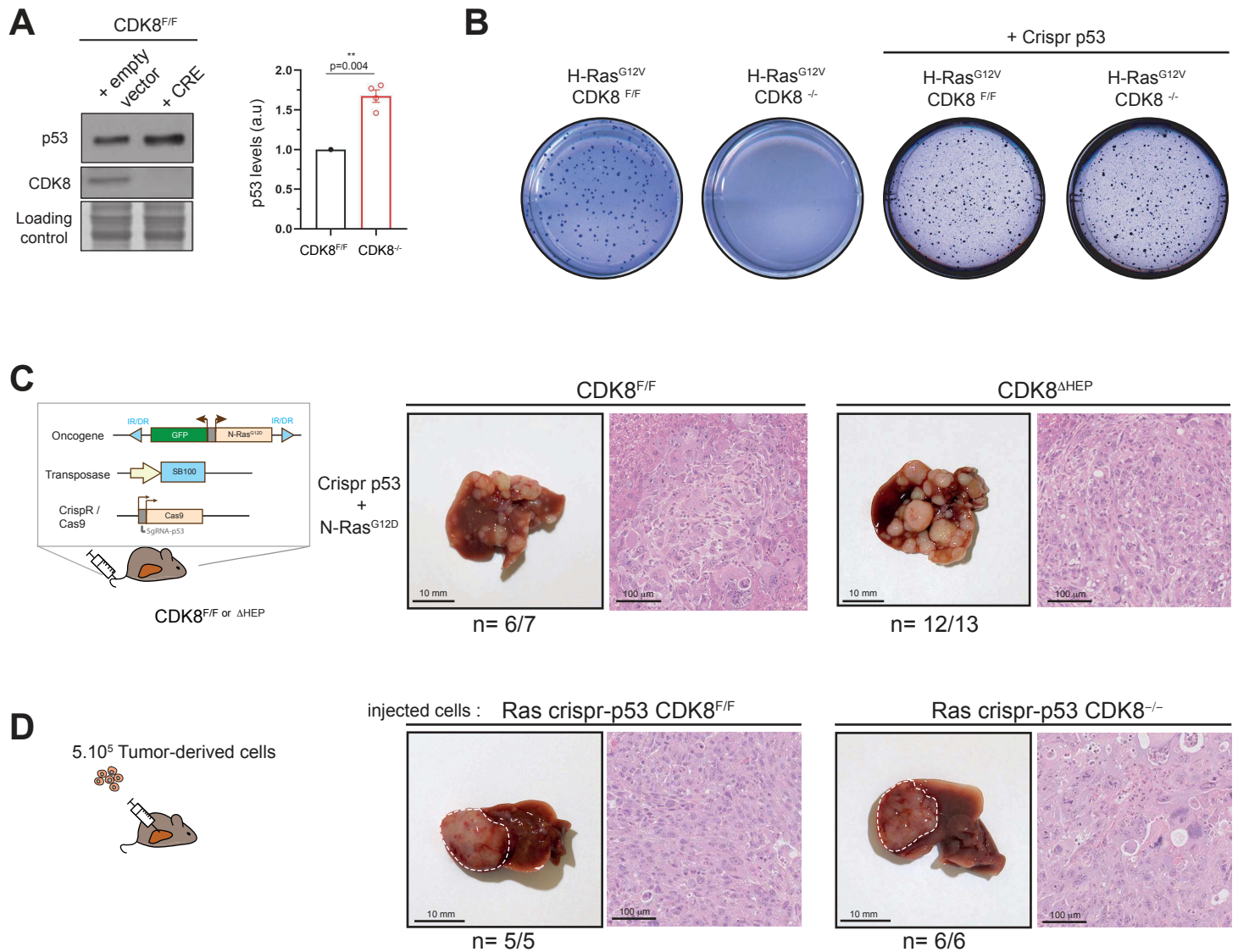


Figure 4: p53 deficiency abrogates CDK8 requirement for hepatic transformation. (A) Western Blot and quantification of p53 protein levels in BMEL cell lines, showing stabilization of p53 in absence of CDK8. A representative western blot and quantification from 4 independent experiments (mean \pm SD) are shown. For each experiment, the band intensity value of the CDK8^{F/F} 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^{G12D} and crispr-p53 vectors into livers of CDK8^{F/F} or CDK8 Δ HEP 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^{F/F} or CDK8 Δ HEP 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.

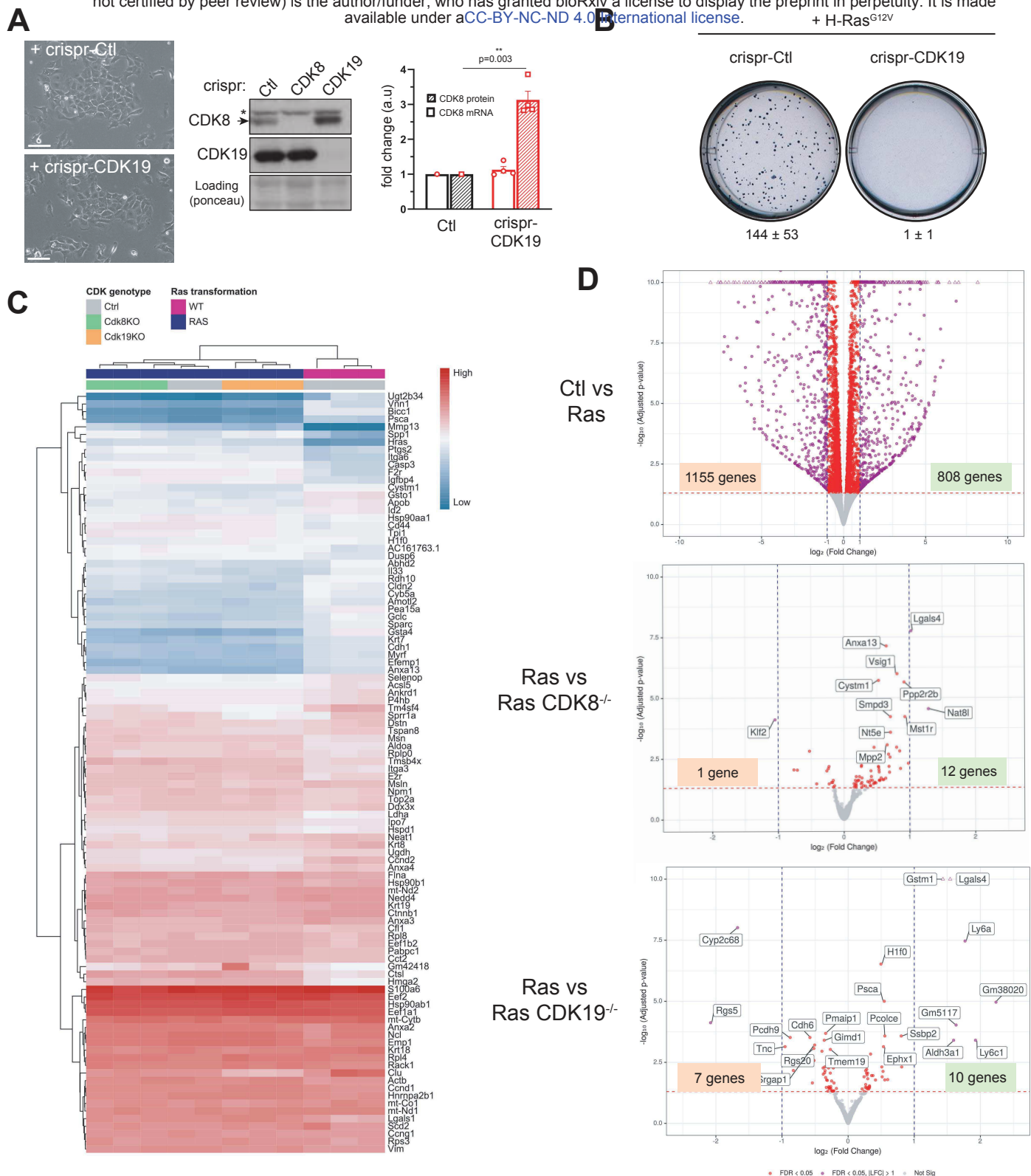


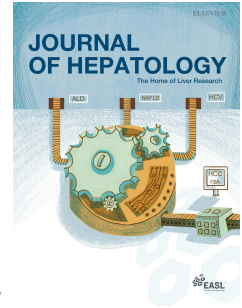
Figure 5: CDK19 and CDK8 are both required for transformation by H-Ras^{G12V}. (A) Pictures, western blot and quantification of BEML cell lines depleted of CDK19 by crispr/Cas9. A representative western blot and quantification from 4 independent experiments (mean \pm SD) are shown. * indicates an aspecific 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 BEML 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^{G12V} 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 log₂ of the fold change greater than one).

Article 3 “ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma”

Journal Pre-proof

ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma

Maria Arechederra, Sehrish K. Bazai, Ahmed Abdouni, Celia Sequera, Timothy J. Mead, Sylvie Richelme, Fabrice Daian, Stéphane Audebert, Rosanna Dono, Anthony Lozano, Damien Gregoire, Urszula Hibner, Daniela S. Allende, Suneel S. Apte, Flavio Maina



PII: S0168-8278(20)33758-2

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.008>

Reference: JHEPAT 8011

To appear in: *Journal of Hepatology*

Received Date: 10 April 2020

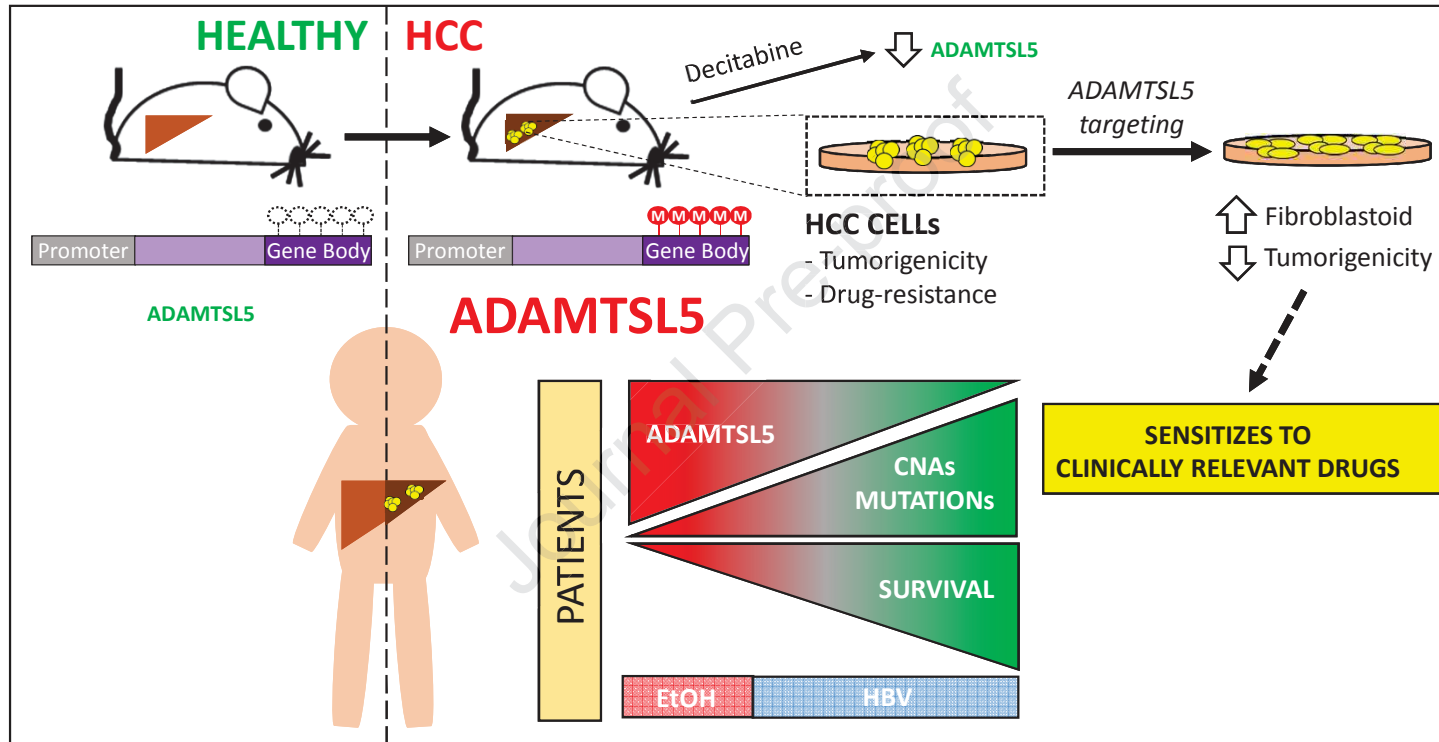
Revised Date: 29 October 2020

Accepted Date: 2 November 2020

Please cite this article as: Arechederra M, Bazai SK, Abdouni A, Sequera C, Mead TJ, Richelme S, Daian F, Audebert S, Dono R, Lozano A, Gregoire D, Hibner U, Allende DS, Apte SS, Maina F, ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma, *Journal of Hepatology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.008>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.



ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma

Maria Arechederra^{1,†}, Sehrish K. Bazai^{1,†}, Ahmed Abdouni^{1,†}, Celia Sequera^{1,†}, Timothy J. Mead², Sylvie Richelme¹, Fabrice Daian¹, Stéphane Audebert³, Rosanna Dono¹, Anthony Lozano⁴, Damien Gregoire⁴, Urszula Hibner⁴, Daniela S. Allende⁵, Suneel S. Apte², and Flavio Maina^{1,*}

¹ Aix Marseille Univ, CNRS, Developmental Biology Institute of Marseille (IBDM), UMR7288, Parc Scientifique de Luminy, Marseille (France).

² Department of Biomedical Engineering, Cleveland Clinic Lerner Research Institute, Cleveland, OH 44195 (USA).

³ Aix-Marseille Univ, CRCM, Marseille Proteomics, INSERM, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France.

⁴ Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France.

⁵ Pathology Department, Pathology and Laboratory Medicine Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, 44195 (USA).

† These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author (flavio.maina@univ-amu.fr)

Contact information of the corresponding author

Flavio Maina, Ph.D.

IBDM (Developmental Biology Institute of Marseille)

163 Avenue de Luminy, case 907 - 13009 Marseille (France)

Phone: +33(0)4 91 26 97 69

flavio.maina@univ-amu.fr

Key words: ADAMTSL5; liver cancer mouse model; hepatocellular carcinoma; epigenetics; oncogene; drug resistance; Receptor Tyrosine Kinase

Electronic word count: abstract, references, tables, and figure legends: 6598

Number of figures and tables: 8 Figures

Conflict of interest. The authors M.A., T.J.M., R.D., S.S.A., and F.M. are inventors of the patent: *“Method and kit for diagnosing and for treatment of a cancer based on the overexpression of the ADAMTSL5 gene”*.

Financial support. This work was funded by FdF (Fondation de France; 2014_00051580 and 2016_00067080), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer; PJA20181208172), GEFLUC – Les Entreprises contre le Cancer, and SATT Sud-Est to F.M. This study was partly supported by research funding from Institut National du Cancer, Région Provence-Alpes-Côte d’Azur, and Canceropôle Provence-Alpes-Côte d’Azur to F.M. S.S.A. received support from the Allen Distinguished Investigator Program, through support made by The Paul G. Allen Frontiers Group and the American Heart Association (17 DIA33820024);

D.S.A. and S.S.A received support from Velosano. M.A. was supported by a FdF fellowship. S.K.B. was supported by the Higher Education Commission (HEC) of Pakistan. A.A. was supported with a grant from SATT Sud-Est. C.S. was supported by a FRM fellowship. A.L. was supported by an ARC fellowship. The contribution of the Region Provence-Alpes-Côte d'Azur and of the Aix-Marseille Univ to the IBDM animal facility is acknowledged. Proteomic analyses were performed at the mass spectrometry facility of Marseille Proteomics supported by IBISA (Infrastructures Biologie Santé et Agronomie), Plateforme Technologique Aix-Marseille, Canceropôle PACA, Région Sud Provence-Alpes-Côte d'Azur, Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) and Plan Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

M.A.: performed the majority of the experiments with mouse HCC, methylation studies, computational work with human HCC databases, RT-qPCR on human cohort #3 samples, data analysis, and interpretation; provided input on studies and contributed to write the manuscript.

S.K.B.: generated lentivirus, contributed to molecular, biochemical, xenograft, and functional studies with mouse and human HCC cells.

A.A.: prepared samples for secretome studies, contributed to molecular, biochemical, and functional validation of outcomes.

C.S.: performed analysis on human HCC cells, contributed to molecular, functional, and methylation studies, performed bioinformatics analysis of human HCC databases, provided input on studies.

T.J.M.: performed analyses on Alb-R26Met and human HCC samples, data analysis, and interpretation; provided input on studies and on the manuscript.

S.R.: generated and characterized immorto-R26Met hepatocytes; performed tumour sphere assays, immunostaining of cells, and Decitabine treatment of *Alb-R26^{Met}* mice; contributed to xenograft and orthotopic studies.

F.D.: contributed to computational work with human databases, data analysis, and interpretation.

S.A.: performed and analysed secretome studies.

R.D.: contributed to establishing the *Alb-R26^{Met}* mouse model, to the generation of lentivirus, to molecular and morphological studies with HCC cells, data analysis and interpretation; provided input on studies.

D.G.: performed and provided input on orthotopic studies, generated *N-Ras^{G12D}:p53null* mouse tumours, prepared human cohort #4 samples, contributed to write the manuscript.

A.L.: performed orthotopic studies, RT-qPCR on *N-RasG12D:p53null* mouse tumours and on human cohort #4 samples.

U.H.: provided input on studies and contributed to write the manuscript.

D.S.A.: contributed to studies with human HCC samples (selection of HCC cases, controls, interpretation of staining).

S.S.A.: designed and supervised studies on human HCC samples; provided input on studies; contributed to interpret data and to write the manuscript.

F.M.: designed the study, contributed to experimental work, analysed and interpreted data, ensured financial support, and wrote the manuscript.

Journal Pre-proof

Abstract

Background & Aims: The tumour microenvironment shapes tumour growth through cellular communications that include both direct interactions and secreted factors. The aim of this study was to characterize the impact of the secreted glycoprotein ADAMTSL5, whose role in cancer has not been previously investigated, on hepatocellular carcinoma (HCC).

Methods: *ADAMTSL5* methylation status was evaluated through bisulfite sequencing, and publicly available data analysis. *ADAMTSL5* RNA and protein expression were assessed in mouse models and HCC patient samples and compared to data from published datasets. Functional studies, including association of *ADAMTSL5* depletion with responsiveness to clinically relevant drugs, were performed in cellular and in vivo models. Molecular alterations associated with *ADAMTSL5* targeting were determined using proteomics, biochemistry, and RT-qPCR.

Results: Methylome analysis revealed hypermethylated gene body CpG islands at the *ADAMTSL5* locus in both mouse and human HCC, correlating with higher *ADAMTSL5* expression. *ADAMTSL5* targeting interfered with tumorigenic properties of HCC cells in vitro and in vivo, whereas *ADAMTSL5* overexpression conferred tumorigenicity to pre-tumoral hepatocytes sensitized to transformation by a modest level of MET receptor expression. Mechanistically, *ADAMTSL5* abrogation led to reduction of several oncogenic inputs relevant to HCC, including reduced expression and/or phosphorylation levels of receptor tyrosine kinases MET, EGFR, PDGFR β , IGF1R β , or FGFR4. This phenotype was associated with significantly increased sensitivity of HCC cells to clinically relevant drugs, namely Sorafenib, Lenvatinib, Regorafenib. Moreover, *ADAMTSL5* depletion drastically increased expression of AXL, accompanied by a sensitization to Bemcentinib.

Conclusions: Our results point to a role for ADAMTSL5 in maintaining the function of key oncogenic signalling pathways, suggesting that it may act as a master regulator of tumorigenicity and drug resistance in HCC.

Lay Summary

The environment of cancer cells has profound effects on establishment, progression, and response of a tumour to treatment. Herein, we show that ADAMTSL5, a protein secreted by liver cancer cells and overlooked in cancer so far, is increased in this tumour type, is necessary for tumour formation and supports drug resistance. *Adamtsl5* removal conferred sensitivity of liver cancer cells to drugs used in current treatment. This suggests ADAMTSL5 as a potential marker in liver cancer as well as a possible drug target.

Highlights

- *ADAMTSL5* overexpression in HCC is associated with gene body CGI hypermethylation
- ADAMTSL5 is strongly expressed in a large fraction of human HCC
- Targeting ADAMTSL5 diminishes RTK inputs and interferes with tumorigenicity
- ADAMTSL5 confers tumorigenicity to sensitized, non-transformed liver cells
- Targeting ADAMTSL5 sensitizes HCC cells to drugs currently used in the clinic

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth-most common cause of cancer-related mortality worldwide and is growing in incidence.[1-3] It is characterized by a remarkable molecular heterogeneity among patients, with distinct (epi)genetic modifications and gene expression profile alterations.[4-6] Globally, 78 percent of liver cancer cases are secondary to chronic hepatitis B or C infections, most frequently associated with cirrhosis, a chronic disease in which fibrosis distorts liver architecture and predisposes to HCC.[6] In addition, HCC can be a sequel of alcoholic liver disease or non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which are predisposing conditions whose incidence is also growing. While the knowledge of risk factors will improve likelihood of early diagnosis, current diagnostic methods show limited sensitivity and specificity, and most patients diagnosed with HCC are already at an advanced stage.[7] The perils of late diagnosis are compounded by the limited efficacy of current HCC therapies in patients with advanced-stage disease.[4, 8, 9] Sorafenib and Lenvatinib, which are first-line drugs, and second-line drugs Regorafenib, Cabozantinib, and Ramucirumab are the only approved drugs,[10] and they only marginally improve median survival. Moreover, there exist no a priori indicators of expected patient response to these treatments. Thus, there is a clear unmet need for identification of new pathways that could be targeted for therapy and for reliable biomarkers that might enable detection of early stage HCC. As in most cancers, the tumour microenvironment has a key role in HCC establishment, progression, and response to therapy.[6] Several microenvironment components affect composition and assembly of extracellular matrix (ECM), cancer cell interactions with ECM, components of the immune system, and activity of tumour-associated fibroblasts. Among these are secreted and cell-surface proteases, and several secreted molecules that associate with and modify the ECM, called matricellular proteins.[11]

A variety of systems (-omics) approaches have been employed for identifying new disease-causing pathways and biomarkers. For example, -omics outcomes were used to stratify patients for their potential response to the available therapeutic options.[8] We recently applied a systems strategy to identify new regulators of tumorigenesis using a clinically relevant HCC model, the *Alb-R26^{Met}* mouse,[12, 13] where we also used in vivo longitudinal imaging to follow tumour evolution.[14] Among highly-ranked genes emerging from methylome analysis, we were intrigued by *Adamts15*, a gene not previously linked to cancer. It encodes a secreted glycoprotein having a bipartite structure, with an N-terminal domain similar to members of the ADAMTS (A disintegrin-like and metalloprotease domain containing thrombospondin type 1 motif) protease family, and a C-terminal netrin domain. Since it lacks the metalloprotease and disintegrin-like domains of ADAMTS proteases, it lacks catalytic activity.[15] In this regard, it is a unique component of the proteome and could be regarded as a variant netrin, since like the members of that family, its netrin domain is located C-terminally. Little is known about ADAMTSL5, other than that it associates with fibrillin microfibrils formed in cell culture and binds heparin through the netrin domain.[15] Hence, it could participate in matrix assembly, tissue mechanics, and regulation of fibrillin-bound growth factors, as well as bind to proteoglycans located at the cell surface or in the matrix.

Here, we identify a major disease and mechanistic context for this unique molecule, showing that it is an epigenetically regulated oncogene in HCC, strongly associated with a subset of human HCC, and more importantly, affecting the efficacy of drugs used to treat HCC. Thus, the outcomes of this study have potential therapeutic value in HCC and highlight ADAMTSL5 as both a potential HCC biomarker and target.

Materials and Methods

Data and materials availability. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (www.proteomexchange.org) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD016634.

***Alb-R26^{Met}* mice.** The generation of the *R26^{stopMet}* mice (international nomenclature *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(Actb-Met)Fmai}*) carrying a conditional mouse-human chimeric *Met* transgene into the *Rosa26* locus, and the genotyping procedures were previously reported.[16-18]

Human samples. After Institutional Review Board approval, a search in a clinical database was performed for human HCC cases from 2002 to 2007 (Cleveland Clinic, USA; human cohort #5). A total of 43 HCC cases were included. Haematoxylin and eosin stained slides from 10% formalin-fixed paraffin-embedded blocks of these cases were reviewed by a liver pathologist (D.S.A.). A representative block from the tumour was identified and unstained slides on positively charged glass slides were generated for additional stains and RNAscope in situ hybridization. For RT-qPCR analyses, 18 HCC samples from Navarra University (Spain; human cohort #3) and 16 from Montpellier University (France; human cohort #4) were used.

Detailed methods can be found in the **Supplementary Information**

Results

***Adamts15* is hypermethylated in its gene body CGI and overexpressed in clinically relevant HCC mouse models.**

Mouse *Adamts15* has two CpG islands (CGIs), one in the promoter and the other in the gene body region (Fig. 1A). DNA methylation analyses revealed that *Adamts15* was consistently hypermethylated in the gene body CGI in *Alb-R26^{Met}* HCC compared to control livers, without a change in the DNA methylation content of the promoter CGI (Fig. 1B). This alteration was accompanied by an upregulation of *Adamts15* mRNA, as shown by RNA-seq analyses (Fig. 1C). Remarkably, treatment of *Alb-R26^{Met}* mice with a DNA-demethylating agent (Decitabine) significantly decreased *Adamts15* expression in tumours, accompanied by a consistent reduction in the methylation levels of most CpGs within its gene body (Fig. 1D, S3A, Table S1). *Adamts15* expression was upregulated in *Alb-R26^{Met}* tumours both at early stages of liver tumorigenesis and in advanced HCC compared to controls (wild-type or *Alb-R26^{Met}* healthy livers), correlating with increased expression of *Afp* and *Gpc3* (two well-characterized HCC markers), and *Mki67* (a proliferation marker; Fig. 1E). The low levels of *Adamts15* we found in the healthy mouse livers was supported by single cell RNA-seq data from the <https://tabula-muris.ds.czbiohub.org/> website,[19] in which *Adamts15* mRNA expression was virtually absent in liver cells, similar to *Afp* and *Gpc3*, whereas *Met* was expressed in a high proportion of hepatocytes (Fig. S1). Low *ADAMTSL5* levels in human liver were also observed (Fig. S2).

We analysed *ADAMTSL5* mRNA and protein levels in *Alb-R26^{Met}* tumours compared with control livers. In situ hybridization analysis by RNAScope revealed a consistent *Adamts15* mRNA upregulation in *Alb-R26^{Met}* HCC in contrast with adjacent liver tissue, where *Adamts15* mRNA was not detected (Fig. 1F). Furthermore, immunohistochemical analysis of proximate

sections showed strong ADAMTSL5 staining in all analysed *Alb-R26^{Met}* HCC, whereas ADAMTSL5 was not detected in non-tumoral tissue (Fig. 1F). Upregulation of *Adamts15* mRNA levels was also found in another mouse model of liver tumorigenesis, in which tumours are generated by hydrodynamic gene transfer of *N-Ras^{G12D}* and Crispr/Cas9 targeting of *p53* (*N-Ras^{G12D}:p53^{null}*; Fig. 1G). These results indicate that *Adamts15* overexpression is not solely a characteristic of the *Alb-R26^{Met}* HCC model. However, *Adamts15* gene body CGI was not hypermethylated in the *Ras^{G12D}:p53^{null}* model (Fig. S3B), suggesting the existence of alternative mechanisms of *Adamts15* upregulation, which are presently unknown. Thus, upregulation of *Adamts15* mRNA and subsequent protein production consistently discriminates HCC from adjacent liver tissue by the early tumorigenic state in at least these two mouse HCC models.

***ADAMTSL5* is hypermethylated in the gene body CGI and overexpressed in a large proportion of HCC patients.**

Whereas mouse *Adamts15* has two CGIs (Fig. 1A), human *ADAMTSL5* has four CGIs: one in the promoter and three in the gene body (Fig. 2A). Analyses using HCC expression data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database (human cohort #1) revealed that *ADAMTSL5* mRNA levels were upregulated in 52% of HCC cases (193/371; Log₂ fold change >1; Fig. 2B). We also examined the methylation status of *ADAMTSL5* in the subgroup of HCC patients for which both methylation and expression data were available (41/371 patients). Strikingly, 86% (18/21) of patients with *ADAMTSL5* overexpression displayed hypermethylation in one of the gene body CGIs (Fig. 2C, Table S2). The incidence of *ADAMTSL5* CGI gene body methylation in HCC patients was further explored in a second cohort of 214 human samples (human cohort #2: GSE56588[20]). 55% (112/204) of these patients shared hypermethylated *ADAMTSL5* gene body CGIs (Fig. S4A, Table S3).

Importantly, HCC patients with high *ADAMTSL5* levels were characterised by a shorter overall survival and of disease-free interval (Fig. 2D-E).

We found that upregulation of *ADAMTSL5* mRNA levels correlated with alcohol intake rather than with other risk factors such as hepatitis C, hepatitis B, or NAFLD (Fig. 2F, S4B). Intriguingly, we found *Adamts15* upregulation also in mice following alcohol consumption (Fig. S4C), strengthening a possible correlation between *ADAMTSL5* expression and alcohol intake observed in human patients. Interestingly, by searching correlations between *ADAMTSL5* expression levels and genetic alterations in HCC patients, we observed an inverse correlation between *ADAMTSL5* expression and the number of mutated genes or deletions/amplifications (Fig. 2G-H). Additionally, we found a significant difference in altered genes in the group of patients with *ADAMTSL5* overexpression compared to the other two groups (Fig. 2I-J, S5, Table S4-5). Intriguingly, *Dchs1* is a gene predominantly mutated in *ADAMTSL5* overexpressing patients (Fig. 2I, S5). No correlations were found with a series of clinical parameters that were analysed (Fig. S6-8). We also examined whether high *ADAMTSL5* expression correlated with changes of specific markers generally used to classify HCC patients[5], which were previously used to characterise the *Alb-R26^{Met}* HCC model.[12] No significant differences were found among the three HCC subgroups (Fig. S9A, Table S6). Although *Adamts15* mRNA was upregulated in the *Alb-R26^{Met}* HCC model, which is characterized by slightly enhanced MET levels, we did not find a correlation between *ADAMTSL5* and *MET* levels in the cohort of HCC patients (Fig. S9B). Collectively, these results indicate that high *ADAMTSL5* levels distinguish patients with specific mutations and with a predominant genetic stability, and may thus independently identify a distinct HCC patient subgroup not already classified by other HCC markers.

Next, we experimentally assessed *ADAMTSL5* mRNA levels in human HCC and control specimens using samples from two independent cohorts (human cohort #3 and #4). RT-qPCR

analysis revealed upregulation of *ADAMTSL5* mRNA in 50% (9/18) and 44% (7/16) HCCs compared to adjacent non-tumorous livers (Fig. 3A-B, Table S7), similar to the HCC cohort from TCGA. Collectively, these findings show that *ADAMTSL5* is overexpressed in a large proportion of HCC patients from independent human cohorts. Immunohistochemical analysis revealed ADAMTSL5 protein staining at moderate to high levels in sections from 30/43 analysed HCC patients, compared to adjacent non-tumour tissue (human cohort #5; Fig. 3C, Table S8). In HCC and adjacent livers, staining for ADAMTSL5 and fibrillin-1 (Fig. S10A-C), a protein previously associated with liver fibrosis, were mutually exclusive.[21] Although non-tumour regions of the liver were consistently ADAMTSL5-negative (Fig. 3C), weak staining was observed in some cirrhotic areas. The diverse staining patterns observed in ADAMTSL5-positive tumours included weak, moderate, or intense staining of tumour cells, intense staining of macrophages bordering necrotic areas and of capillary plexuses in some tumours, and weak staining in vascular smooth muscle cells (Fig. 3D, S10D). RNAscope in situ hybridization revealed *ADAMTSL5* mRNA expression by tumour cells but not by macrophages, contrasting with the immunostaining data (Fig. 3D). These observations suggest that ADAMTSL5 protein is secreted by tumour cells in a significant proportion of analysed HCC tumours, and undergoes subsequent uptake by macrophages.

ADAMTSL5 is required for tumorigenic properties of HCC cells.

We generated *Alb-R26^{Met}* HCC cell lines from distinct tumours[12] (Fig. 4A), which reproducibly showed high mRNA and protein levels of ADAMTSL5 (Fig. 4B, S11A). Consistent with reported secretion by cells,[15] ADAMTSL5 was detected in the conditioned medium of *Alb-R26^{Met}* HCC cells (Fig. 4B). The consistent expression in *Alb-R26^{Met}* HCC cells prompted us to explore whether ADAMTSL5 influences HCC cell tumorigenic properties. *Adamts15* expression was reduced by shRNA targeting sequences in *Alb-R26^{Met}* HCC cells (Fig. 4C, S11B-E), which led to a striking switch in cell morphology from

epithelial-like to fibroblast-like, and loss of ZO-1 and E-Cadherin expression (Fig. 4D; S11F-H).

We assessed whether the fibroblast-like shape acquired by HCC cells following *Adamts15* targeting corresponded to an epithelial-mesenchymal transition (EMT) or to the acquisition of a “fibroblast-like” identity, by following the expression levels of specific markers through RT-qPCR. HCC^{shAdamts15} cells, while losing *Cdh1* (E-cadherin) expression, gained only the expression of one mesenchymal marker, *Snail*, but not of *Cdh2* (N-Cadherin), *Vim* (Vimentin), *Slug*, *Zeb1*, *Zeb2*, and *Twist1* (Fig. 5A, S12A-S13). Concerning the TGFβ pathway, beside a slight increase in the expression of *Tgfb1* and *Tgif2* (and *Snail*), we observed similar levels of *Smad2* and *Mtss1* (beside *Twist1*, *Vim*, *CD44*; Fig. 5B, S12B-S13) and a similar response to TGFβ1 stimulation in HCC^{shAdamts15} and control cells (Fig. S12G). Interestingly, HCC^{shAdamts15} cells acquired expression of fibroblast markers, such as *α-Sma*, *Fsp1* and *Fbn1* (Fibrillin-1; Fig. 5C, S12C-S13). We further explored the fibroblast-like identity and found that HCC^{shAdamts15} cells acquired expression of *Col3a1*, *Colla1*, *Pcolce*, which are markers of scar-associated mesenchymal cells (SAMES), while losing *Krt19* expression (Fig. 5E, S12E-S13). Furthermore, HCC^{shAdamts15} cells lost expression of *Afp* (HCC marker) as well as of *Prom1*, *Epcam*, and *Cdh1* (considered as cancer stem cell markers; Fig. 5D-F, S12D-F-S13). Collectively, these results indicate that loss of *Adamts15* expression in HCC cells confers molecular/morphological fibroblast-like characteristics rather than triggering a bona fide EMT.

Functionally, we found that *Adamts15* downregulation interfered with the ability of *Alb-R26^{Met}* HCC cells to form colonies in anchorage-independent assays (Fig. 6A-B, S14A) and tumour spheroids upon growth in self-renewal conditions (Fig. 6C), yet without major changes in cell viability (Fig. S14B). HCC^{shAdamts15} cells migrated to a greater degree (Fig. S14C-E), consistent with the acquired fibroblast-like morphology (Fig. 4D), although they were not as

invasive as controls (Fig. S14F-G). Interestingly, the ability of HCC^{shAdamtsl5} cells to form colonies and tumour spheroids, but not their morphological change, was significantly restored when they were exposed to conditioned medium from HCC cells overexpressing human *ADAMTSL5* (Fig. 6D, S15).

Next, we assessed *ADAMTSL5* expression and requirement in human HCC cell lines. Analysis of RNA-seq data from a panel of human HCC cells[22] revealed consistently high *ADAMTSL5* levels in all cell lines (Fig. 6E). RT-qPCR and western blot studies performed on a subset of these human HCC cells showed consistent *ADAMTSL5* expression, although at variable levels (Fig. 6F, S16A). We assessed the *ADAMTSL5* requirement of human HCC cells by silencing it by shRNA in three HCC cell lines, SNU449, MHCC97H, and HLF. *ADAMTSL5* downregulation hampered the ability of these cell lines to form colonies in anchorage-dependent or -independent growth assays (Fig. 6G-I, S16B-E). Collectively, these findings demonstrate that *ADAMTSL5* expression is necessary for HCC cells to achieve their full tumorigenic properties in vitro.

***ADAMTSL5* is required for tumorigenic properties of HCC cells in vivo and its overexpression is sufficient to transform sensitized hepatocytes.**

Next, we investigated whether *ADAMTSL5* expression is a requirement for HCC cells tumorigenicity in vivo using xenografts. *Alb-R26^{Met}* HCC and *Alb-R26^{Met}* HCC^{shAdamtsl5} cells were injected subcutaneously into the flank of nude mice and tumour formation was followed over time. Compared to controls, HCC^{shAdamtsl5} cells showed a striking reduction in tumour size and the percentage of animals that developed tumours (Fig. 7A-C). Additionally, we assessed the requirement for *ADAMTSL5* in an experimental setting that recapitulated the liver tumour environment by performing orthotopic injections of *Alb-R26^{Met}* HCC^{shControl} and HCC^{shAdamtsl5} cells intra-hepatically in mice. Remarkably, in contrast to controls, HCC^{shAdamtsl5}

cells did not form tumours (Fig. 7D, E), consistent with reduced in vitro tumorigenicity, loss of *Afp* and cancer stem cell marker expression (Fig. 5-6).

Next, we asked whether *ADAMTSL5* overexpression would confer tumorigenicity to cells otherwise incapable of forming tumours. For this purpose, we chose a cellular context in which enhanced wild-type MET RTK levels, although not sufficient on their own, provide a sensitized genetic background for testing cooperativity with another pro-tumorigenic hit (Fig. 7F).[23] Whereas *immorto-R26^{Met}* hepatocytes did not form tumours in immunocompromised mice, human *ADAMTSL5* overexpression conferred in vivo tumorigenicity to these cells (Fig. 7G-I). Collectively, these in vivo studies underline the oncogenic properties of ADAMTSL5 in HCC.

ADAMTSL5 expression correlates with high dosage of several oncogenes relevant to HCC.

We performed mass spectrometry for unbiased comparison of the secretome of HCC^{shControl} and HCC^{shAdamtsl5} cells. Excluding ribosome-related proteins frequently detected in such analyses, we found 614 proteins with differential abundance in the two secretomes: 348 upregulated and 266 downregulated in HCC^{shAdamtsl5} cells compared to controls (Fig. 8A-B, Table S9). According to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database, several cancer-related pathways were significantly enriched, such as axon guidance (frequently overrepresented in cancer), ECM-receptor interaction and adhesion components, proteoglycans and glycans (Fig. 8C, Table S9). These pathways appear to be consistent with ADAMTSL5 effects on cell morphology and tumorigenicity, and indicated that loss of tumorigenicity following *Adamtsl5* knock-down was accompanied by depletion of several oncogenic signals. We selected some proteins for biochemical assessment in the secretomes and cell lysates of HCC^{shControl} and HCC^{shAdamtsl5} cells (Fig. 8D, S17A). We found a striking reduction of the RTK MET extracellular domain in the medium and of full-length MET in

HCC^{shAdamts15} cell lysates (Fig. 7D-E, S17E). Protein levels of EPHA2 and EPHA4, two other RTKs also implicated in HCC,[24, 25] were reduced (although levels of a smaller band detected with an EPHA4 antibody in cell lysates were increased; Fig. 8D-E, S17E). Additionally, UNC5B (a netrin-receptor, which is a prognostic marker of HCC; Fig. S17B) and LPHN3 (Latrophilin3, which interacts with UNC5B and regulates cell adhesion[26]), each a trans-membrane protein, were less abundant in the secretome of HCC^{shAdamts15} cells, but remained unchanged in cell lysates (Fig. 8D-E). Furthermore, we found a reduction of cleaved products of FAT1 (which acts as an oncogene in HCC[27]) in the medium, likely resulting from extracellular shedding [28] (Fig. S17C-D). We also detected an upregulation of biglycan (a small leucine-rich repeat proteoglycan) and Sulf-2 (an extracellular modulator of heparan sulfate that modifies binding sites for signalling molecules) in HCC^{shAdamts15} cells (Fig. 8D-E, S17E). Remarkably, in HCC^{shAdamts15} cells we found a striking upregulation of AXL (Fig. 8D-E, S17E), a RTK whose upregulation is frequently associated with drug resistance in several tumour types,[29] including HCC response to Sorafenib.[30] Next, we asked whether the changes in protein levels observed occurred at a transcriptional level. RT-qPCR analyses revealed no transcriptional alteration in *Met*, *EphA2*, *Unc5B*, and *Lphn*., whereas *Bgn*, *Sulf2*, and *Axl* were upregulated and *EphA4* was downregulated (Fig. 8F). Intrigued by the remarkable reduction of levels of RTKs relevant to HCC, we analysed the expression and phosphorylation levels of other RTKs with essential roles in HCC tumorigenicity and resistance to treatment. Besides a strong downregulation of MET expression and phosphorylation in HCC^{shAdamts15} cells, we found reduced phosphorylation of EGFR, PDGFR β , and IGF1R β (Fig. 8G, Fig. S17E). Moreover, while the protein levels of EGFR and IGF1R β were unchanged, PDGFR β protein levels were increased (Fig. 8G, Fig. S17E), similarly to its mRNA (Fig. 8H). Consistent with the loss of MET and EGFR phosphorylation, two main upstream regulators of GAB1, we observed downregulation of

GAB1 phosphorylation (Fig. 8G, Fig. S17E). Additionally, we found depletion of FGFR4 (Fig. 8G-H), another key RTK in HCC.[31] Collectively, these findings suggest that ADAMTSL5 may act as a master regulator of tumorigenicity by affecting oncogenic signalling.

ADAMTSL5 depletion sensitizes HCC cells to drugs used for HCC treatment in the clinic.

The severe depletion of several RTKs relevant to tumorigenicity and resistance of HCC cells to drugs used for HCC treatment in the clinic prompted us to explore whether ADAMTSL5 downregulation influenced HCC cell sensitivity to these drugs. The *Alb-R26^{Met}* HCC cellular system was particularly appropriate for addressing this question because of its resistance to Sorafenib, which was previously reported.[12] We compared the sensitivity of HCC^{shAdamtsl5} and control cells to several multi-kinase inhibitors: Crizotinib, Lenvatinib, Regorafenib, and Sorafenib. Because of the striking upregulation of AXL observed in *Adamtsl5*-downregulated cells, we also assessed the effects of Bemcentinib, an inhibitor of AXL (Table S10). HCC^{shControl} cells were either totally resistant (Lenvatinib) or displayed limited sensitivity when drugs were used at high dosage (Fig. 8I). In contrast, HCC^{shAdamtsl5} cell viability was significantly decreased when cells were exposed to Crizotinib, Lenvatinib, Regorafenib, and to a lesser extent, to Sorafenib (Fig. 8I). Remarkably, Bemcentinib treatment drastically interfered with HCC^{shAdamtsl5} cell viability whereas no effect was observed in control cells (Fig. 8I). Overall, our results illustrate that ADAMTSL5 targeting in HCC cells leads to a profound alteration of several oncogenic inputs such as those linked to RTKs, and confers sensitivity to clinically relevant drugs.

Discussion

Lack of efficient therapies for HCC provides a strong incentive for seeking new disease pathways and more reliable biomarkers, notably those that can be used for diagnosis of early stages of HCC. Biomarkers for early detection and patient stratification will be even more important in the future, when additional first- and second-line therapies for liver cancer may become available. Here, we identified *ADAMTSL5* upregulation in a large percentage of HCC patients from several independent cohorts: according to RNA-seq data or our RT-qPCR analyses, ranging from 44 to 52% of human HCC patients; according to immunohistochemistry analysis, 70% of HCC patients. *Adamts15* upregulation was reproduced in the *Alb-R26^{Met}* HCC model and importantly, its increased expression was already evident during early liver tumorigenesis. *Adamts15* upregulation was similarly detected in *N-Ras^{G12D}:p53^{null}* mouse liver tumours, indicating that its overexpression is not restricted to a single genetic trigger during mouse tumorigenesis. We have shown, both in mouse and human tumours, that augmented *ADAMTSL5* expression correlates with hypermethylation of its gene body CGI, an epigenetic mechanism that we recently reported to be involved in the regulation of oncogene expression.[13] Thus, our data suggest that hypermethylation of gene body CGI is predictive, although not exclusively, of high *ADAMTSL5* expression in HCC. While these data require further validation in large patient cohorts, they imply a potential clinical significance of *ADAMTSL5* upregulation in a subgroup of patients and might qualify *ADAMTSL5* as a potential HCC biomarker. Interestingly, in situ analysis indicated that *ADAMTSL5* was produced by HCC cells in the *Alb-R26^{Met}* HCC model, as well as in roughly half of human HCC cases. In agreement with the described heterogeneity of HCCs and with mRNA expression observed in about half of the cases annotated by TCGA, we found that a significant proportion of human HCC samples stained negative for *ADAMTSL5*. However, one caveat of analysing biopsies, either for RNA content

or by staining, is that of sampling variability, i.e. samples may come from ADAMTSL5-negative areas of heterogeneous, often multifocal tumours that may contain expressing cells elsewhere. Therefore, it is noteworthy that as a secreted protein, ADAMTSL5 is a potential candidate biomarker that is accessible through liquid biopsy. Indeed, liquid biopsy can overcome limitations of tissue biopsy, since it is expected to represent the entire molecular picture of a patient's malignancy. Future studies will determine if measuring plasma ADAMTSL5 levels and/or hypermethylation of the gene body *ADAMTSL5* CGI in circulating cell-free DNA could be useful as a HCC biomarker. It will also be important to ascertain if human HCC can be stratified by ADAMTSL5 status to uncover histological, precancerous or risk associations, which may contribute to a better-informed choice of therapeutic options.

We illustrated by a series of in vitro and in vivo assays that increased levels of ADAMTSL5 are associated with tumorigenic properties of HCC cells. Indeed, ADAMTSL5 targeting interfered with HCC cell anchorage-dependent and -independent growth, tumour spheroid formation and with orthotopic and subcutaneous xenograft growth. The oncogenic function of ADAMTSL5 is further supported by our data showing that its overexpression conferred tumorigenicity to sensitized, non-transformed liver cells. Collectively, these results indicate that ADAMTSL5, which is produced by HCC cells, may be a key factor determining their tumorigenicity. Of note, the secreted ADAMTSL5 acts in a non-cell autonomous fashion, as demonstrated by the partial restoration of the phenotype of HCC^{shAdamtsl5} cells by the conditioned medium of cells over-expressing ADAMTSL5. Importantly, since the secretome of ADAMTSL5-expressing cells is profoundly altered, it is thus possible that some of its oncogenic effects are indirect.

Interestingly, increased *ADAMTSL5* methylation was recently reported in chemotherapy-resistant acute lymphoblastic leukaemia patients.[32] However, neither the genomic location of such hypermethylation nor the consequences for *ADAMTSL5* expression in acute

lymphoblastic leukaemia patients have been investigated. In addition, recent studies implicated *ADAMTSL5* in pathologies other than cancer.[33]

In summary, we have shown that *ADAMTSL5*, which is overexpressed in a significant proportion of HCC patients, has an essential role in HCC pathogenesis. Our results suggest that *ADAMTSL5* is a potential master regulator of HCC, acting upstream of several key oncogenic pathways, including RTKs, such as MET, EGFR, GAB1, PDGFR β , IGF1R β , and FGFR4. Intriguingly, *ADAMTSL5* targeting results in decreased activation of several RTK signals, irrespectively on changes of their protein levels. Strikingly, *ADAMTSL5* depletion gives rise to a dramatic increase of AXL. It is tempting to speculate that upregulation of AXL may occur in response to loss of several other RTK inputs. This interpretation is supported by the acquired vulnerability of HCC^{sh*ADAMTSL5*} to AXL inhibition, suggesting a novel therapeutic strategy for a defined subset of HCCs. From a general perspective, a number of RTK-targeting drugs are now available and our results suggest that some could be repurposed for treating *ADAMTSL5*-overexpressing HCC, especially when used in combination with agents targeting *ADAMTSL5*, which remain to be developed.

Acknowledgments

These results are in part based upon public data generated by TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>. We thank: all members of our labs for helpful discussions and comments; A. Porras and F. Helmbacher for extremely valuable feedback on the study; B. Habermann and A. Yim for assisting us on evaluation of human TCGA datasets; Á.M. Martínez-Valverde for providing us the SV40 Large T Antigen to immortalize the embryonic hepatocytes; S. Lev for advises to produce lentivirus particles carrying shRNA and for extremely valuable feedback; C. Berasain, M. Elizalde, and I. Uriarte for providing us samples from human cohort #3 and from mice following alcohol consumption; people at the IBDM mouse facility for excellent help with mouse husbandry; A. Dobric and C. Giaccherini for their contributions to studies on molecular and functional characterizations of *Adamts15* shRNA-targeted HCC cells; D. Reinhardt for anti-fibrillin-1 antibody.

References

- [1] McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2020.
- [2] Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:589-604.
- [3] Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2019;380:1450-1462.
- [4] Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A, Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:408-424.
- [5] Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149:1226-1239 e1224.
- [6] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018.
- [7] Sherman M, Bruix J, Porayko M, Tran T, Committee APG. Screening for hepatocellular carcinoma: the rationale for the American Association for the Study of Liver Diseases recommendations. *Hepatology* 2012;56:793-796.
- [8] Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular Carcinoma: Reasons for Phase III Failure and Novel Perspectives on Trial Design. *Clinical Cancer Research* 2014;20:2072-2079.
- [9] Sprinzl MF, Galle PR. Current progress in immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2017;66:482-484.
- [10] Montironi C, Montal R, Llovet JM. New Drugs Effective in the Systemic Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 2019;14:56-61.

- [11] Gerarduzzi C, Hartmann U, Leask A, Drobetsky E. The Matrix Revolution: Matricellular Proteins and Restructuring of the Cancer Microenvironment. *Cancer Res* 2020;80:2705-2717.
- [12] Fan YN, Arechederra M, Richelme S, Daian F, Novello C, Calderaro J, et al. A Phosphokinome-Based Screen Uncovers New Drug Synergies for Cancer Driven by Liver-Specific Gain of Nononcogenic Receptor Tyrosine Kinases. *Hepatology* 2017;66:1644-1661.
- [13] Arechederra M, Daian F, Yim A, Bazai SK, Richelme S, Dono R, et al. Hypermethylation of gene body CpG islands predicts high dosage of functional oncogenes in liver cancer. *Nat Commun* 2018;9:3164.
- [14] Cassol F, Portal L, Richelme S, Dupont M, Boursier Y, Arechederra M, et al. Tracking Dynamics of Spontaneous Tumors in Mice Using Photon-Counting Computed Tomography. *iScience* 2019;21:68-83.
- [15] Bader HL, Wang LW, Ho JC, Tran T, Holden P, Fitzgerald J, et al. A disintegrin-like and metalloprotease domain containing thrombospondin type 1 motif-like 5 (ADAMTSL5) is a novel fibrillin-1-, fibrillin-2-, and heparin-binding member of the ADAMTS superfamily containing a netrin-like module. *Matrix Biol* 2012;31:398-411.
- [16] Tonges L, Ostendorf T, Lamballe F, Genestine M, Dono R, Koch JC, et al. Hepatocyte growth factor protects retinal ganglion cells by increasing neuronal survival and axonal regeneration in vitro and in vivo. *J Neurochem* 2011;117:892-903.
- [17] Genestine M, Caricati E, Fico A, Richelme S, Hassani H, Sunyach C, et al. Enhanced neuronal Met signalling levels in ALS mice delay disease onset. *Cell Death Dis* 2011;2:e130.
- [18] Fan Y, Richelme S, Avazeri E, Audebert S, Helmbacher F, Dono R, et al. Tissue-Specific Gain of RTK Signalling Uncovers Selective Cell Vulnerability during Embryogenesis. *PLoS genetics* 2015;11:e1005533.

- [19] Tabula Muris C, Overall c, Logistical c, Organ c, processing, Library p, et al. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature* 2018;562:367-372.
- [20] Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Mendez-Gonzalez J, et al. DNA methylation-based prognosis and epdrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61:1945-1956.
- [21] Lorena D, Darby IA, Reinhardt DP, Sapin V, Rosenbaum J, Desmouliere A. Fibrillin-1 expression in normal and fibrotic rat liver and in cultured hepatic fibroblastic cells: modulation by mechanical stress and role in cell adhesion. *Lab Invest* 2004;84:203-212.
- [22] Caruso S, Calatayud AL, Pilet J, La Bella T, Rekik S, Imbeaud S, et al. Analysis of Liver Cancer Cell Lines Identifies Agents With Likely Efficacy Against Hepatocellular Carcinoma and Markers of Response. *Gastroenterology* 2019;157:760-776.
- [23] Fan YN, Bazai SK, Daian F, Arechederra M, Richelme S, Temiz NA, et al. Evaluating the landscape of gene cooperativity with receptor tyrosine kinases in liver tumorigenesis using transposon-mediated mutagenesis. *Journal of Hepatology* 2019;70:470-482.
- [24] Yan Y, Luo YC, Wan HY, Wang J, Zhang PP, Liu M, et al. MicroRNA-10a Is Involved in the Metastatic Process by Regulating Eph Tyrosine Kinase Receptor A4-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Adhesion in Hepatoma Cells. *Hepatology* 2013;57:667-677.
- [25] Jin RA, Lin H, Li GH, Xu JJ, Shi L, Chang C, et al. TR4 nuclear receptor suppresses HCC cell invasion via downregulating the EphA2 expression. *Cell Death & Disease* 2018;9.
- [26] Lu YC, Nazarko OV, Sando R, 3rd, Salzman GS, Li NS, Sudhof TC, et al. Structural Basis of Latrophilin-FLRT-UNC5 Interaction in Cell Adhesion. *Structure* 2015;23:1678-1691.

- [27] Valletta D, Czech B, Spruss T, Ikenberg K, Wild P, Hartmann A, et al. Regulation and function of the atypical cadherin FAT1 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2014;35:1407-1415.
- [28] Caruso N, Herberth B, Bartoli M, Puppo F, Dumonceaux J, Zimmermann A, et al. Deregulation of the protocadherin gene FAT1 alters muscle shapes: implications for the pathogenesis of facioscapulohumeral dystrophy. *PLoS genetics* 2013;9:e1003550.
- [29] Niu ZS, Niu XJ, Wang WH. Role of the receptor tyrosine kinase Axl in hepatocellular carcinoma and its clinical relevance. *Future Oncol* 2019;15:653-662.
- [30] Pinato DJ, Brown MW, Trousil S, Aboagye EO, Beaumont J, Zhang H, et al. Integrated analysis of multiple receptor tyrosine kinases identifies Axl as a therapeutic target and mediator of resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Brit J Cancer* 2019;120:512-521.
- [31] Raja A, Park I, Haq F, Ahn SM. FGF19-FGFR4 Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cells* 2019;8.
- [32] Abdullah M, Choo CW, Alias H, Abdul Rahman EJ, Mohd Ibrahim H, Jamal R, et al. ADAMTSL5 and CDH11: putative epigenetic markers for therapeutic resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2017;22:386-391.
- [33] Bonifacio KM, Kunjraiva N, Krueger JG, Fuentes-Duculan J. Cutaneous Expression of A Disintegrin-like and Metalloprotease domain containing Thrombospondin Type 1 motif-like 5 (ADAMTSL5) in Psoriasis goes beyond Melanocytes. *J Pigment Disord* 2016;3.

Figure Legends

Fig. 1. *Adamtsl5* is hypermethylated in the gene body CGI and overexpressed in *Alb-R26^{Met}* tumours compared with control livers. (A) Schematic representation of the mouse *Adamtsl5* locus (blue: exons; CGIs: green). (B) Methylation levels of the *Adamtsl5* gene body and promoter CGIs in control livers and *Alb-R26^{Met}* tumours. Note significantly higher *Adamtsl5* methylation levels in gene body CGI in *Alb-R26^{Met}* tumours, with no change in the promoter CGI. (C) *Adamtsl5* mRNA levels in *Alb-R26^{Met}* tumours versus controls. (D) Methylation levels of CpGs within the *Adamtsl5* gene body CGI (left) and *Adamtsl5* expression levels (right) in tumours dissected from *Alb-R26^{Met}* mice untreated (red) or treated with decitabine (green). (E) mRNA expression levels of *Adamtsl5*, *Afp*, *Gpc3* (two HCC markers), and *Mki67* (proliferative marker). Note *Adamtsl5* upregulation in *Alb-R26^{Met}* early tumours (smaller than 3mm) and HCC. (F) *Adamtsl5* mRNA (left) and protein (right) in *Alb-R26^{Met}* tumours versus adjacent control livers. (G) Increased *Adamtsl5* mRNA levels in *N-Ras^{G12D}:p53^{null}* mouse tumours versus adjacent livers. n.s.:not significant; *:P<0.05; **:P<0.01; ***:P<0.001 (Mann-Whitney: B,C,E,G,H; Kruskal-Wallis: D).

Fig. 2. *ADAMTSL5* expression correlates with hypermethylated gene body CGIs and with a worse prognosis in human HCC. (A) Scheme of the human *ADAMTSL5* locus (blue: exons; CGIs: green). (B) *ADAMTSL5* mRNA levels in HCC patients (cohort #1). (C) *ADAMTSL5* mRNA (middle) and methylation (bottom) levels in HCC patients. Bottom: Hypermethylated CGI (black line) in the *ADAMTSL5* promoter and gene body in the corresponding patients. Note hypermethylated gene body CGIs in most HCC patients with *ADAMTSL5* overexpression (86%, 18/21). (D-E) Kaplan-Meier curves reporting the probability of the overall survival (D) and disease-free interval (E) according to *ADAMTSL5* levels. (F) Diagram reporting the presence (blue line) of major HCC risk factors. HCC patients with higher *ADAMTSL5* mRNA levels showed a significant, although not exclusive,

association with alcohol consumption. (G-H) Number of mutated genes (G) or deletions/amplifications (H) according to *ADAMTSL5* levels (cohort #1). (I) Heatmap reporting genes mutated only in one or two groups corresponding to *ADAMTSL5* levels, taking into consideration the top 10 ranked positions determined by the percentage of patients carrying mutations in the indicated genes. Red and green: upper and lower gene ranking (corresponding to high and low percentage of patients), respectively. White: absence of mutations in patients. On the right, *TP53* and *CTNNB1* (among the most frequently mutated genes) are also reported. (J) Heatmap reporting genes with copy number alterations in the HCC patient subgroups corresponding to *ADAMTSL5* levels, taking into consideration the top 10 ranked positions determined by the percentage of patients carrying genetic alterations of the indicated genes. Detailed information about altered genes in the three groups are reported in Figure S5 and Table S4-5. Two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison: statistical significance between UP versus DOWN groups, DOWN versus NO CHANGE (I); between UP versus DOWN groups, UP versus NO CHANGE, DOWN versus NO CHANGE (J). $P < 0.0001$.

Fig. 3. *ADAMTSL5* upregulation and *ADAMTSL5* localization in human HCC patient cohorts. (A-B) *ADAMTSL5* mRNA upregulation in HCC samples versus adjacent non-tumorous liver (cohort #3: 50%; cohort #4: 44%). (C) Immunohistochemical analysis revealed strong *ADAMTSL5* levels in HCC regions, but not adjacent non-tumorous liver. *ADAMTSL5* staining was localized to HCC cells and to macrophages in necrotic areas. (D) *ADAMTSL5* protein and mRNA in proximate HCC sections. Note *ADAMTSL5* RNA expression in HCC cells (arrowheads), but not in macrophages (arrows). *ADAMTSL5* protein in macrophages indicates its possible uptake by these cells during clearance of necrotic areas.

Fig. 4. ADAMTSL5 is expressed in *Alb-R26^{Met}* HCC cells and its downregulation leads to a switch from epithelial- to fibroblast-like characteristics. (A) Scheme of *Alb-R26^{Met}* HCC^{shAdamtsl5} cell generation. (B) ADAMTSL5 protein levels in cell lysates and in conditioned medium (CM) of HCC3, HCC13, and HCC14. CM from untransfected HEK cells or HEK cells transfected with a human *ADAMTSL5* (hA) was used as the control. (C) Downregulation of ADAMTSL5 protein levels in *Alb-R26^{Met}* HCC13^{shControl} (cntr) and HCC13^{shAdamtsl5} cells (four clones). Two different *Adamtsl5* shRNAs were used (sh3 and sh1). Equal loading is shown (Ponceau). (D) Immunofluorescence showing loss of ADAMTSL5, ZO1, and E-Cadherin in *Alb-R26^{Met}* HCC13^{shAdamtsl5} cells versus controls. HCC13^{shAdamtsl5} cells acquired a fibroblast-like phenotype.

Fig. 5. ADAMTSL5 downregulation in HCC cells leads to a switch in the expression of several cellular markers. mRNA levels of the indicated genes in *Alb-R26^{Met}* HCC^{shControl} (cntr) and HCC^{shAdamtsl5_clone3.7} (sh3.7) cells. Genes correspond to markers of epithelial/mesenchymal cells (A), TGF β pathway (B), fibroblasts (C), HCC (D), fibroblast subtypes (E), cancer stem cells (F). *:P<0.05; **:P<0.01; ***:P<0.001 (Student t-test). Heatmaps report downregulated (green), upregulated (red) and unchanged (black) mRNAs, or no expression (grey). Values are reported as Log₂ fold change of expression levels in HCC^{shAdamtsl5_clone3.7} compared to controls (complementary data: Figure S12-S13).

Fig. 6. ADAMTSL5 is required for in vitro tumorigenic properties of mouse and human HCC cells. (A-B) Reduced colony formation by *Alb-R26^{Met}* HCC^{shAdamtsl5} cells in anchorage-independent growth assays. Note significant restoration of tumorigenic properties after exposing HCC^{shAdamtsl5} cells to the HCC secretome with overexpressed hADAMTSL5 (CM+hA). (C) Numbers of tumour spheroids formed by HCC13^{shAdamtsl5} cells and controls. (D) Rescue of tumour spheroid formation upon exposing HCC13^{shAdamtsl5} cells to a HCC

secretome with hADAMTSL5 overexpression (CM+hA). (E) *ADAMTSL5* mRNA levels in a panel of human HCC cells, based on data from [22]. (F) ADAMTSL5 protein levels in conditioned medium and cell lysates (HCC13 cells used as controls). (G-I) *ADAMTSL5* downregulation in SNU449 cells and its effects on cell tumorigenicity. (G) Protein levels in conditioned medium of SNU449 cells carrying a shRNA targeting sequence (sh1 or sh2) versus controls. Equal loading is shown (Ponceau). (H) Numbers of colonies formed by SNU449^{shAdamtsl5} cells in anchorage-dependent growth assays. (I) Photographs and graphs reporting colony numbers and colony size formed by SNU449^{shAdamtsl5} cells in anchorage-independent growth assays. *:P<0.05; **:P<0.01; ***:P<0.001 (Student-t test: A; one-way ANOVA: B,C,D; Mann-Whitney: H,I).

Fig. 7. *ADAMTSL5* expression confers tumorigenic properties to cells in vivo. (A-C) Images of dissected tumours (A) and quantification of mean tumour volume over time (B) and at 8 weeks (C) in mice injected subcutaneously with *Alb-R26^{Met}* HCC13 and HCC^{shAdamtsl5} cells. In (C), grey dots correspond to tumours dissected earlier than 8 weeks for ethical reasons. (D-E) Images of dissected livers (arrows indicate tumours) and quantification of tumour volume at 5 weeks following orthotopic injection with *Alb-R26^{Met}* HCC13^{shControl} and HCC^{shAdamtsl5} cells. (F) Scheme reporting the establishment of *immorto-R26^{Met}* sensitized hepatocytes without and with human ADAMTSL5 (h-ADAMTSL5) expression (*immorto-R26^{Met}* hepa^{overADAMTSL5}). (G-I) Images of mice (G), quantification of mean tumour volume over time (H) and at 11 weeks (I) in mice injected subcutaneously with *immorto-R26^{Met}* control hepatocytes (hepa) and *immorto-R26^{Met}* hepatocytes^{overADAMTSL5} (hepa^{overADAMTSL5}). Arrows indicate tumours. *:P<0.05; **:P<0.01; ***:P<0.001 (Mann-Whitney test).

Fig. 8. ADAMTSL5 downregulation leads to suppression of several oncogenic signals in HCC cells. (A-B) Volcano plot (A) and heatmap (B), reporting proteins found significantly

downregulated or upregulated in the secretome of *Alb-R26^{Met}* HCC^{shAdamts15_clone3.7} compared with HCC^{shControl} cells. Orange dots in (A) correspond to proteins biochemically validated by western blots. (C) Enrichment KEGG pathway for differentially abundant proteins in the secretome of HCC^{shAdamts15_clone3.7} and HCC^{shControl} cells. (D) Graphs reporting the values from mass spectrometry analysis for the biochemically validated proteins (shown in E). 5 independent biological replicates each with 3 experimental replicates were used. Some of the proteins were undetectable because of low levels. (E) Protein levels in the secretome and cell lysates of HCC^{shControl} (ctr) and HCC^{shAdamts15_clone3.7} (sh3.7) cells. For secretome analysis, samples were normalized to protein in cell lysates. (F) mRNA levels of the indicated genes. (G) Protein expression and phosphorylation levels. E and G: quantifications in Table S10D. (H) mRNA levels of the indicated genes. (I) Cell viability in the absence (NT) or in the presence of the indicated drugs. ns.: not significant; *:P<0.05; **:P<0.01; ***:P<0.001 (student t-test: D,F,H; two-way ANOVA: I).

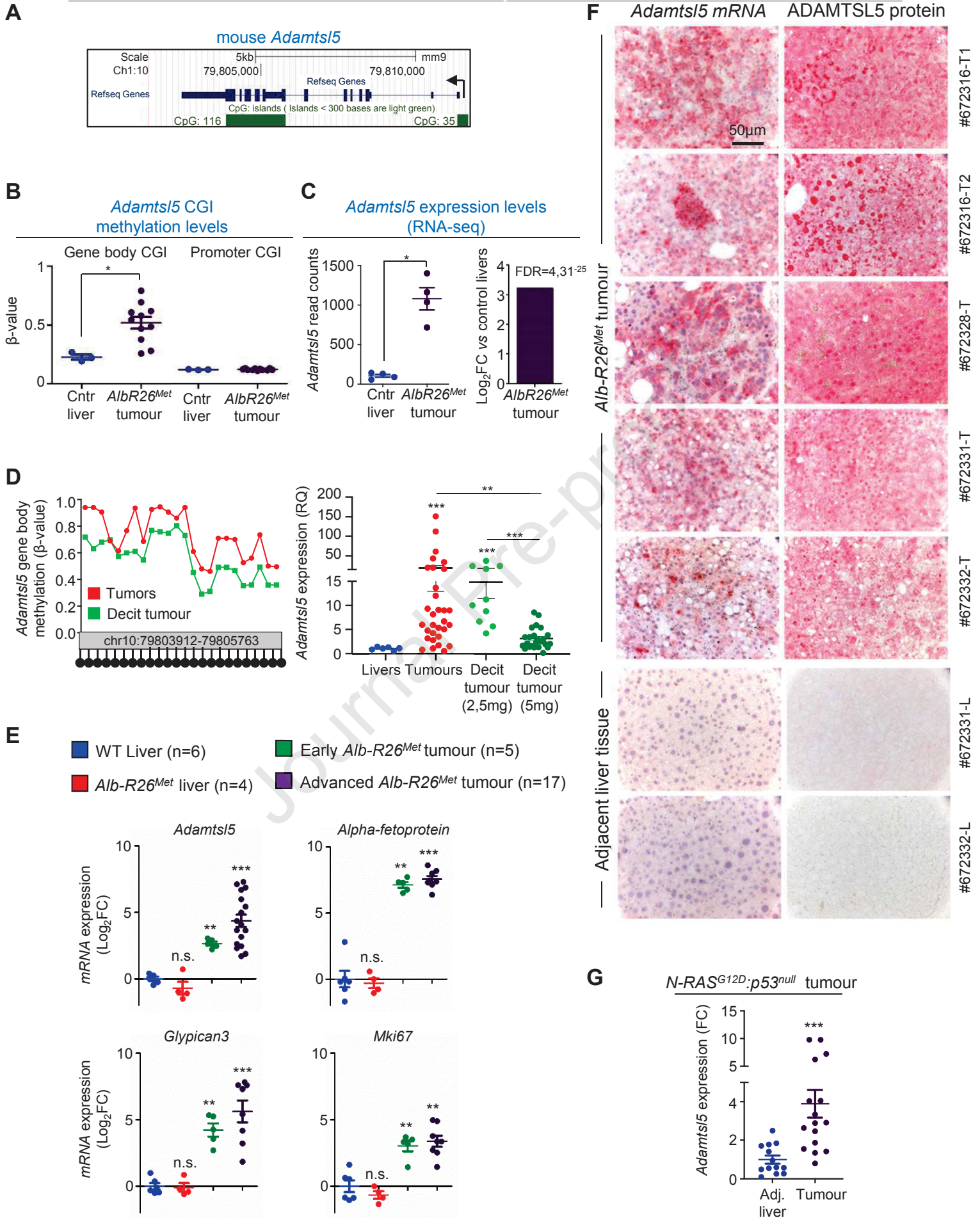


Figure 1

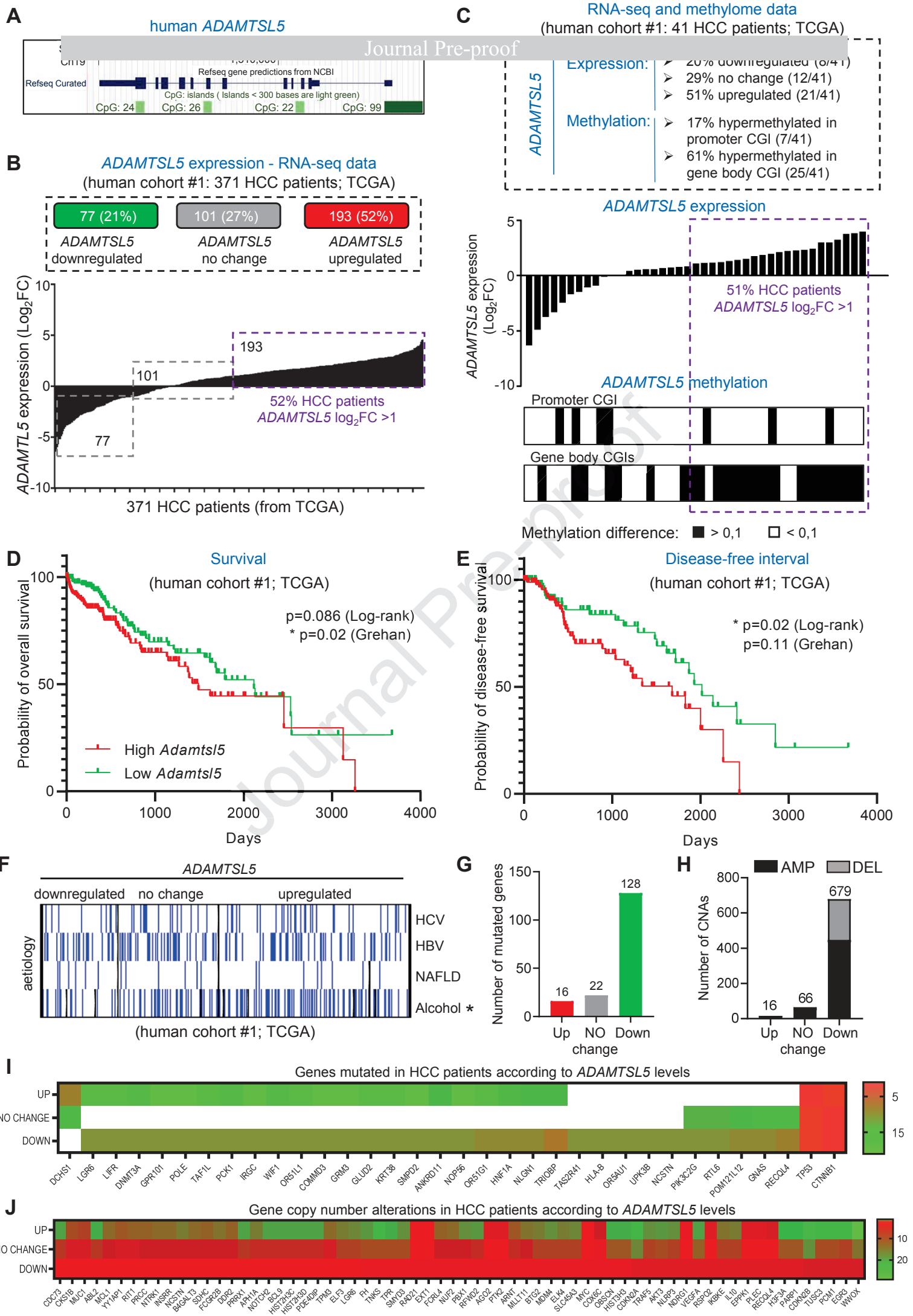
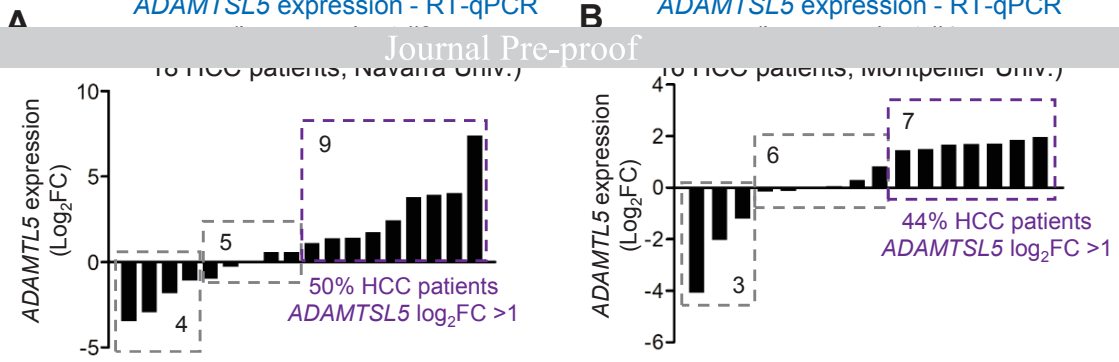
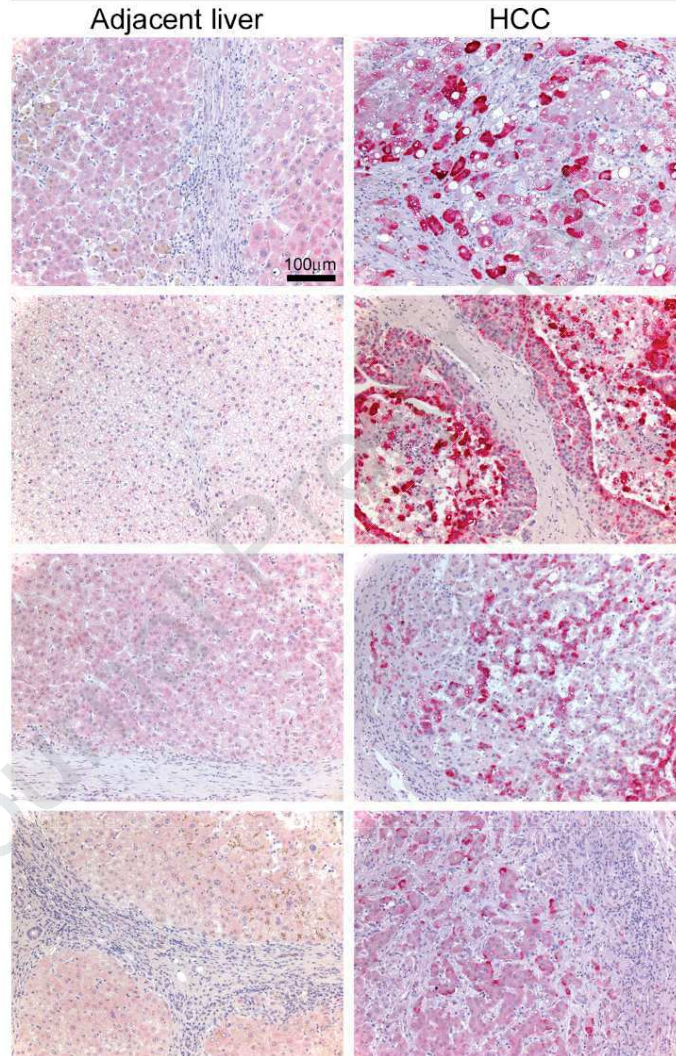


Figure 2



C ADAMTSL5 protein
(human cohort #5: 43 HCC patients; Cleveland Clinic)



D ADAMTSL5

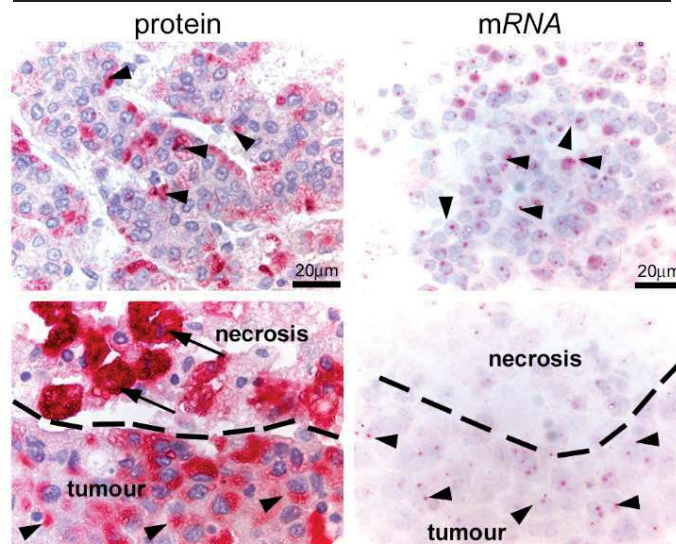


Figure 3

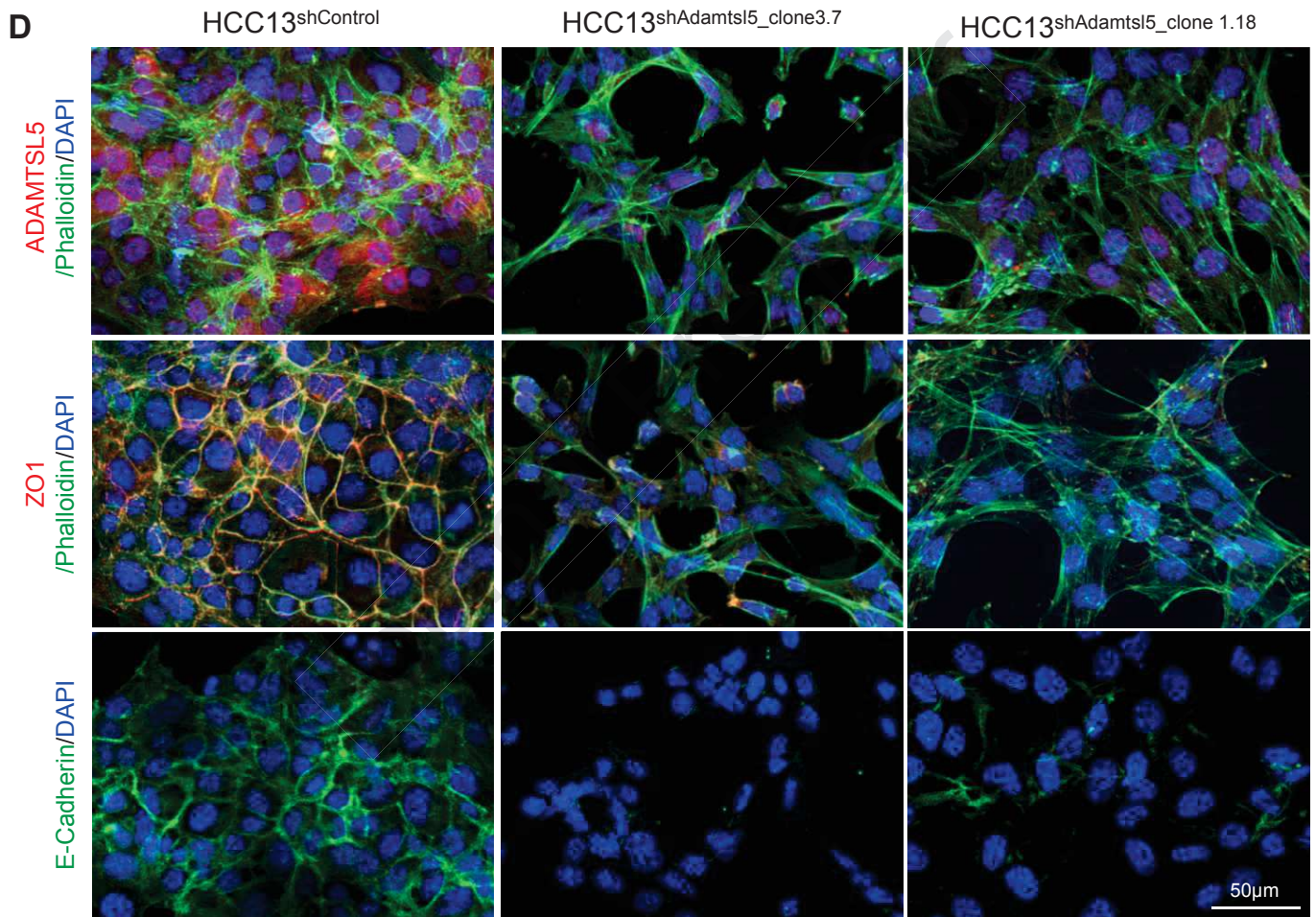
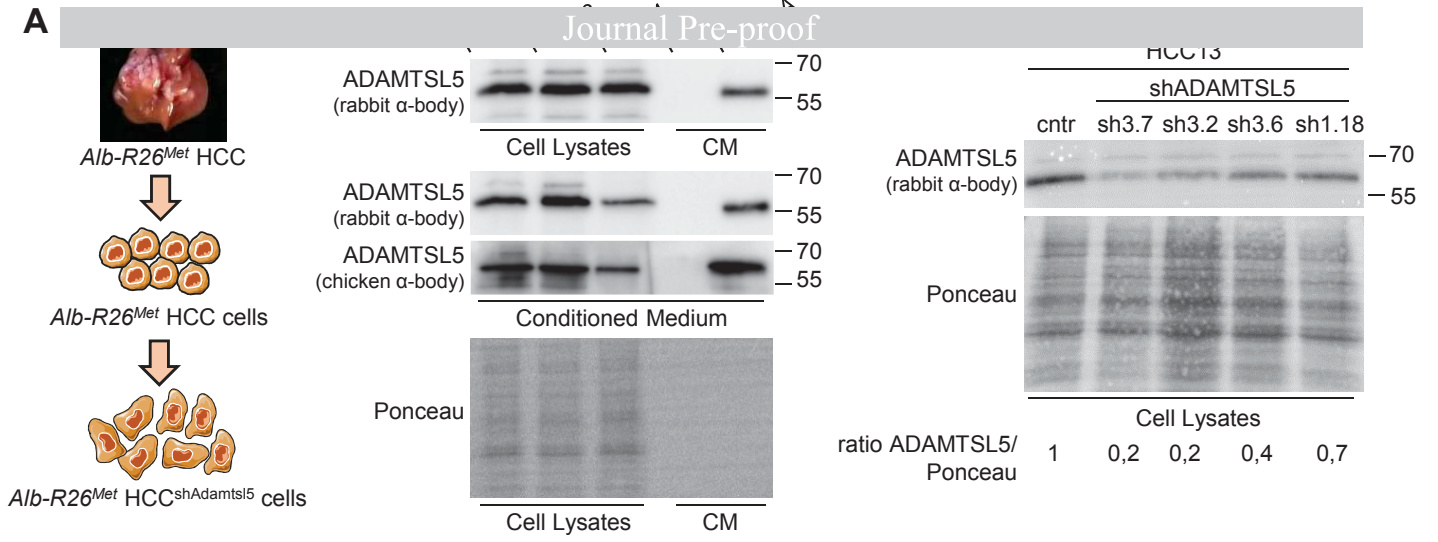


Figure 4

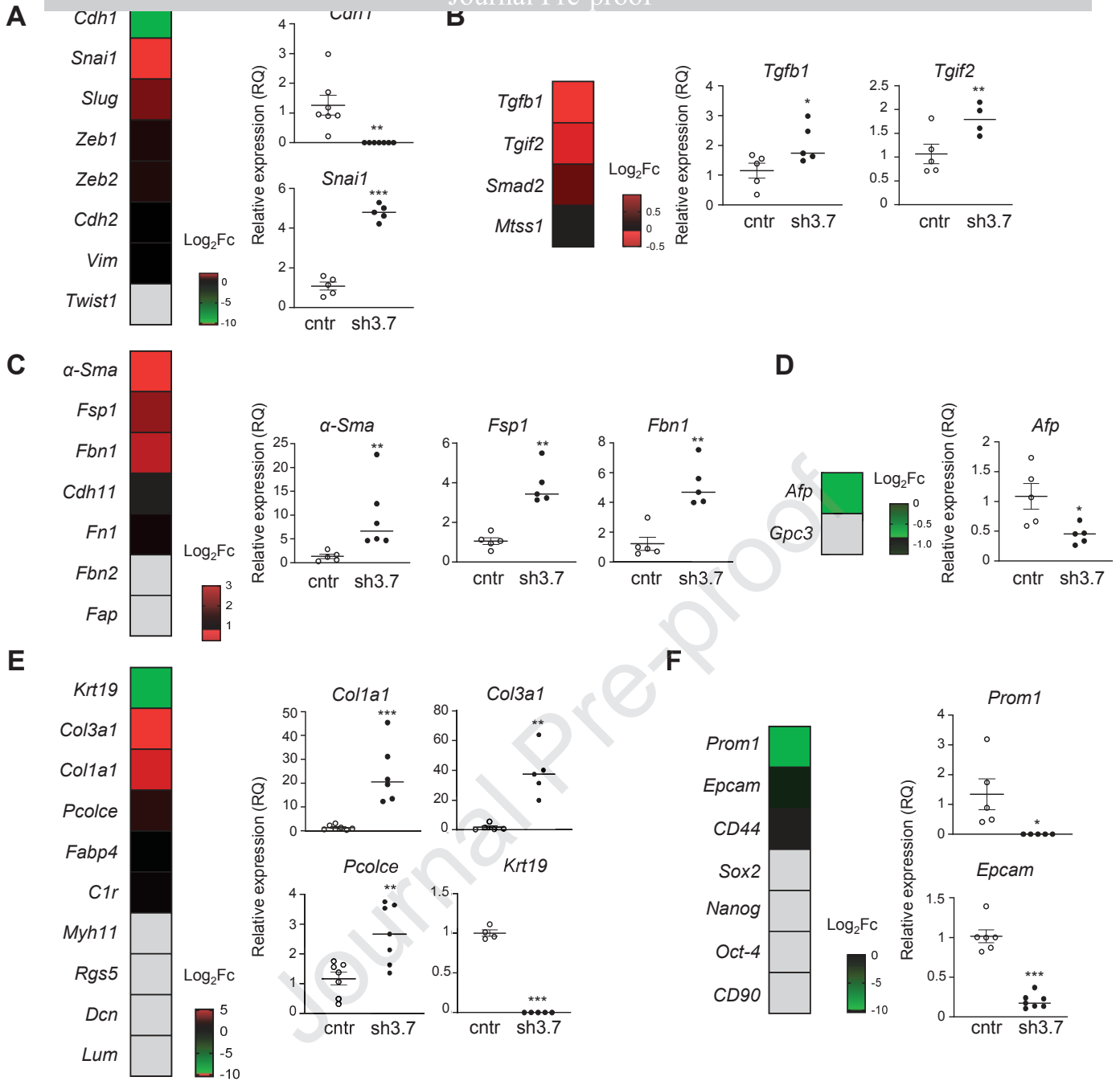


Figure 5

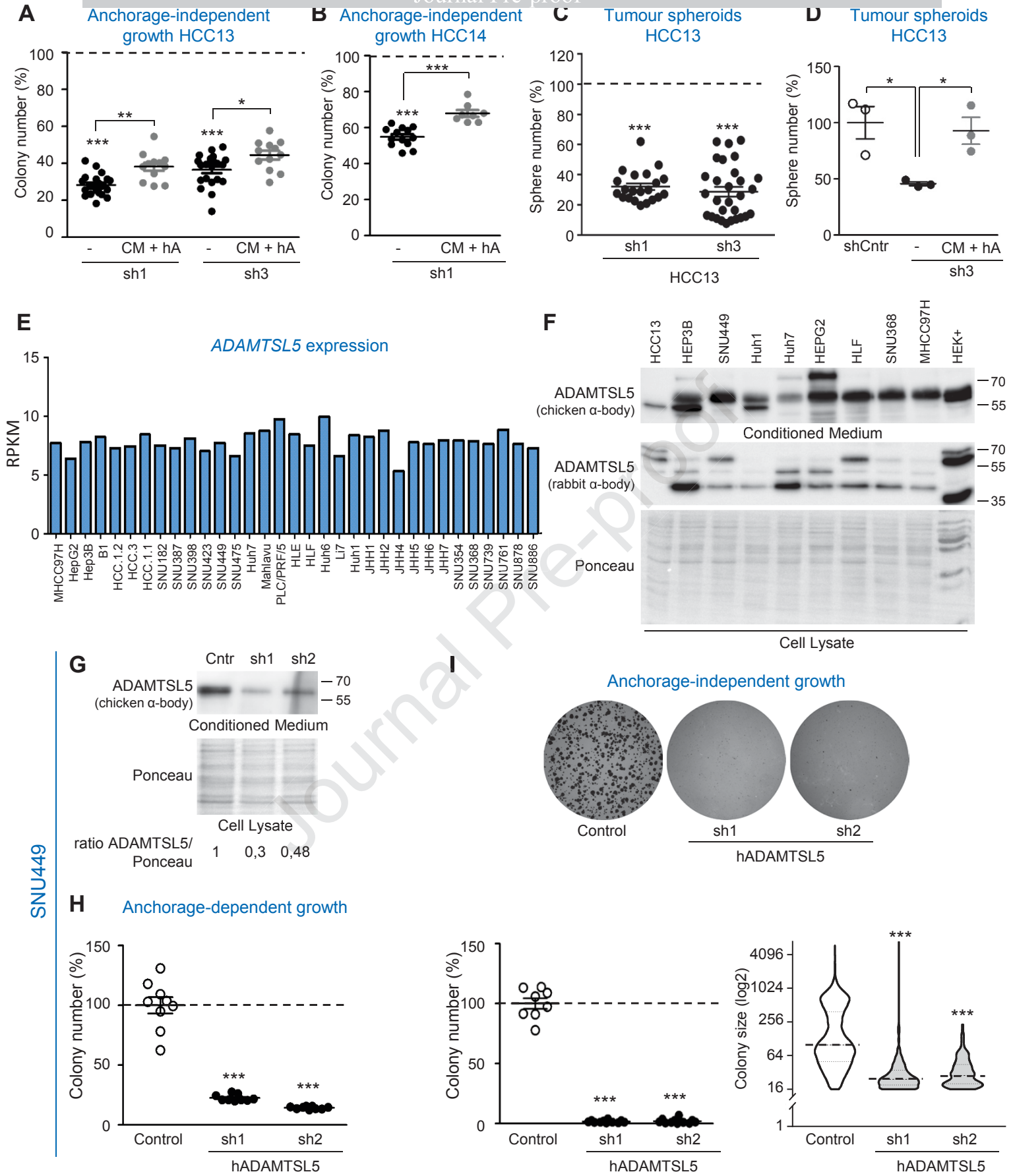


Figure 6

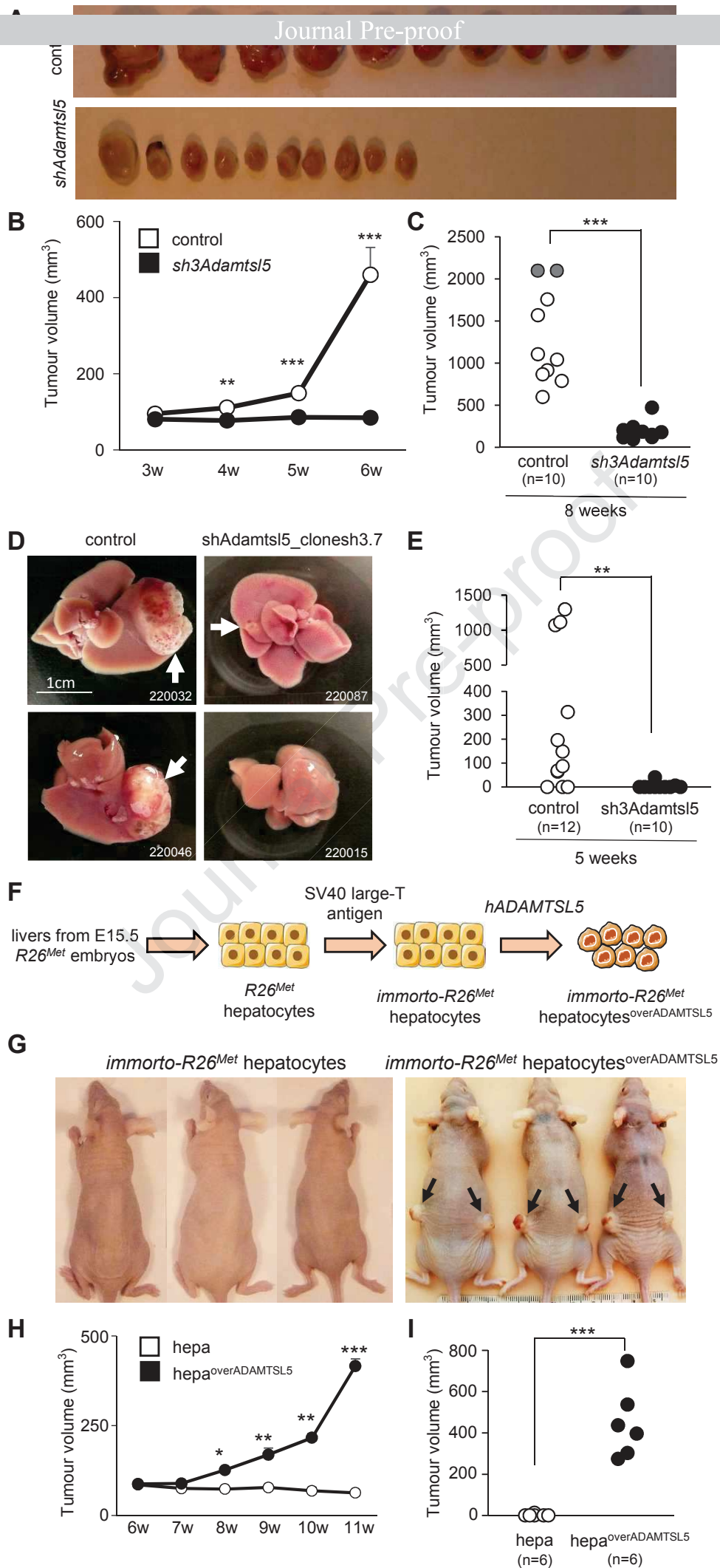


Figure 7

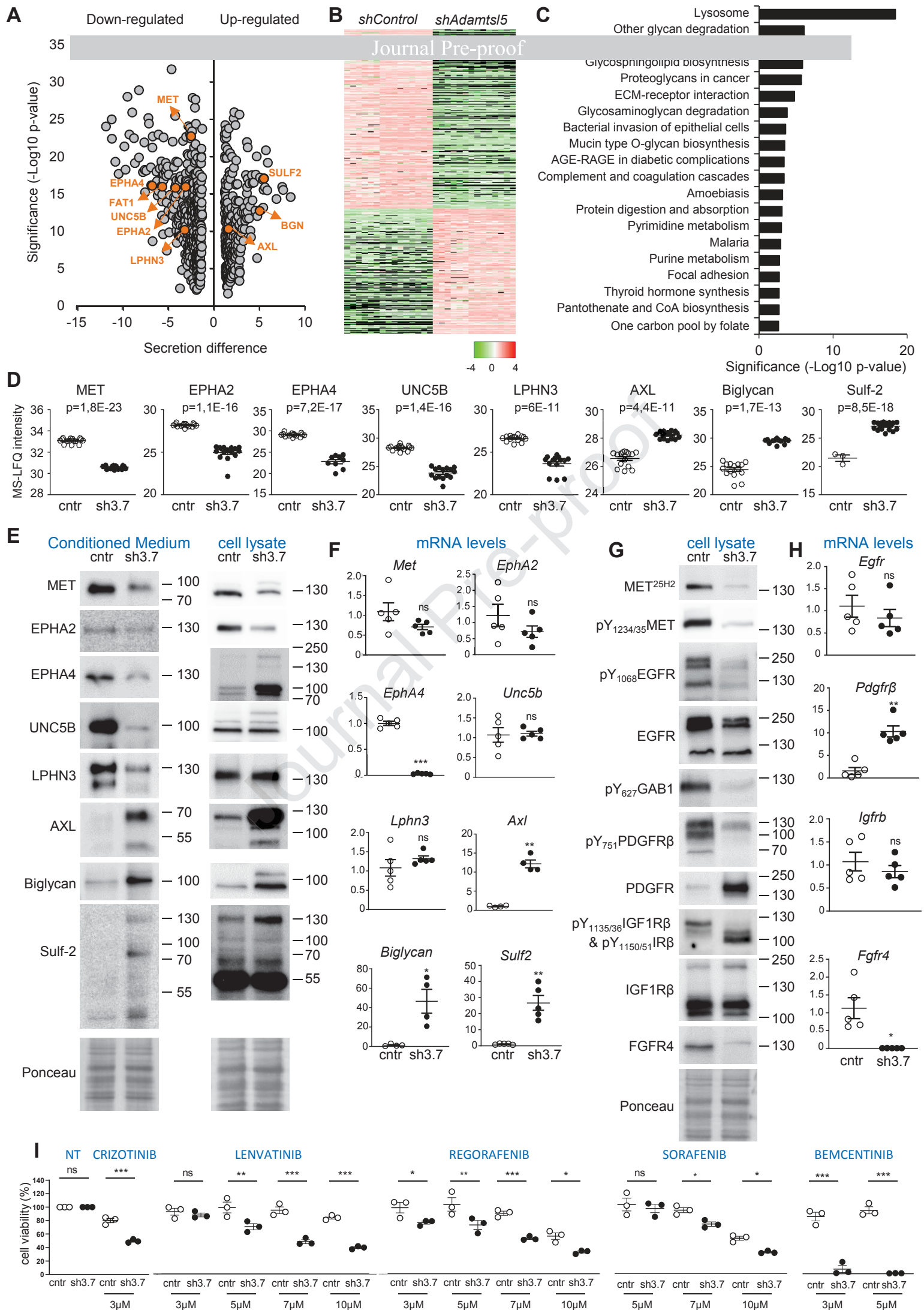


Figure 8

Highlights

- *ADAMTSL5* overexpression in HCC is associated with gene body CGI hypermethylation
- *ADAMTSL5* is strongly expressed in a large fraction of human HCC
- Targeting *ADAMTSL5* diminishes RTK inputs and interferes with tumorigenicity
- *ADAMTSL5* confers tumorigenicity to sensitized, non-transformed liver cells
- Targeting *ADAMTSL5* sensitizes HCC cells to drugs currently used in the clinic

Discussion et perspectives

Au cours de mon travail de thèse j'ai étudié l'impact de l'intensité de signalisation sur la croissance et la diversité clonale des tumeurs hépatiques. Dans ce contexte, il est intéressant de s'interroger sur la vision conceptuelle des voies de signalisation.

Les premières observations suggérant que les cellules communiquent entre elles via la sécrétion de composées « messagers » vient de Claude Bernard, qui en 1855 fait mention de « sécrétions internes », qui diffusent dans la circulation sanguine pour induire une réponse sur les cellules distantes (Nair et al., 2019). Des années plus tard, ces messagers seront qualifiés d'hormones, et c'est au court du XXème siècle que plusieurs découvertes permettent d'identifier les étapes clés de la communication cellulaire. En particulier, l'équipe d' Earl W. Sutherland montre que l'adrénaline et le glucagon se lient aux récepteurs des cellules musculaires pour induire la production d'un second messenger l'AMPc (Sutherland and Rall, 1957). Par la suite, furent découverts les mécanismes intracellulaire d'amplification du signal par les protéines kinases et la régulation de l'expression des gènes par les facteurs de transcriptions. L'ensemble de ces découvertes ont mené à la première vision conceptuelle des voies de signalisations. Selon cette dernière, la transmission de signal se fait à partir de la sécrétion d'une molécule de signalisation qui se fixe spécifiquement à un récepteur cellulaire. Cette interaction induit alors l'activation d'un second messenger intracellulaire dont le signal est ensuite amplifié par une cascade de signalisation, aboutissant à l'expression de gènes cibles initiateurs de la réponse biologique (Alberts et al., 2002). En parallèle, des équipes ont mis en évidence les relations entre de nombreuses pathologies et les perturbations de ces voies de signalisation, notamment dans le cadre du cancer. Le premier exemple est la découverte de la protéine responsable de la transformation oncogénique qui provient du virus du sarcome de Rous (Src), qui active des voies de signalisations en phosphorylant plusieurs protéines au niveau de leur résidus tyrosines (Hunter and Sefton, 1980). Certain de ces travaux ont aboutis au développement de thérapies ciblées visant à éteindre les voies de signalisation dont dépendent les cellules tumorales. Par contre, ces drogues sont rarement efficaces sur le long terme et provoquent l'apparition de résistances, dont la compréhension de mécanismes a emmené à complexifier la vision de la signalisation. Par exemple, les inhibiteurs de d'un mutant oncogénique de BRAF inhibent les boucles de rétrocontrôles de la voie MAPK, ce qui induit sa réactivation contradictoire (McKay et al.,

2011b). En parallèle, ce traitement provoque aussi l'activation d'autres voies en aval de RAS, comme celle de PI3K/AKT (Villanueva et al., 2010). Par simplification, les voies de signalisation sont souvent représentées de façon linéaire, mais il s'agit en réalité d'un réseau complexe d'interactions avec d'autres voies. De plus, leur activité est contrôlée par de nombreuses boucles de régulation positives et négatives, qui déterminent la durée et l'intensité de la signalisation (Lemmon et al., 2016). Dans mon projet, je me suis intéressé à ces problématiques dans le cadre de la signalisation RAS/MAPK.

I – Sélection d'un niveau optimal de signalisation RAS/MAPK

Il a été montré que la modulation de la durée et de l'intensité d'activation de la signalisation RAS est importante pour la régulation des mécanismes biologiques en conditions physiologiques (Murphy and Blenis, 2006). Par exemple, la stimulation des cellules PC12 avec le NGF induit une forte activation de la voie MAPK qui provoque la différenciation des cellules en neurones (Dikic et al., 1994; Traverse et al., 1994). Par ailleurs, la stimulation par l'EGF ou par l'insuline maintient l'état indifférencié et prolifératif de ces cellules en induisant qu'une activation transitoire de la voie MAPK. Le dosage et l'activation de RAS a également été décrit comme ayant différentes conséquences sur la transformation oncogénique (Li et al., 2018). L'origine de cette affirmation vient du fait qu'un dosage excessif de RAS oncogénique induit l'arrêt de la prolifération et l'induction de la sénescence (Sarkisian et al., 2007; Serrano et al., 1997). Ce mécanisme ne peut être contourné qu'à la suite de la perte des suppresseurs de tumeurs p16^{INK4A} ou p53. L'induction de la sénescence oncogénique par RAS a été élégamment illustré dans une étude où les auteurs modulent le niveau d'expression de KRAS en remplaçant les codons de sa séquence (Pershing et al., 2015). La séquence de KRAS contient une grande proportion de codons rares, ce qui limite l'efficacité de sa traduction. À l'inverse, la séquence de HRAS est majoritairement constituée de codons communs ; son niveau protéique est donc plus élevé que celui de KRAS. Les auteurs ont alors augmenté le niveau d'expression de KRAS en développant un modèle de souris où l'exon 3 de HRAS est inséré dans la séquence de KRAS (KRAS^{ex3op}). De manière intéressante, les souris KRAS^{ex3op} traitées à l'uréthane, qui provoque des mutations KRAS^{Q61L/R}, développent moins de tumeurs pulmonaires que les WT. Cette inhibition de la croissance tumorale s'accompagne d'une augmentation de l'expression de p16 dans les cellules KRAS^{ex3op}, indicative de la sénescence oncogénique. À l'inverse, il a été montré qu'une faible activation de la signalisation RAS n'est pas toujours suffisante pour induire l'oncogénèse. Par exemple, une équipe a mis au point un modèle de souris exprimant d'une façon ubiquitaire un allèle muté de KRAS^{G12V} (Guerra et al., 2003). Ces souris développent des tumeurs broncho-

alvéolaires après 8 mois. Toutefois, et ceci malgré la présence de 5 à 15% de cellules KRAS^{G12V} positives dans le foie, les reins, les testicules, le derme, le cerveau, le pancréas et l'intestin, ces tissus restent normaux et ne présentent pas de signe d'expansion néoplasique. Cette étude montre que des niveaux faibles de RAS muté sont dans ces cas insuffisants pour induire la transformation oncogénique. De plus, ce seuil d'activation semble être dépendant du contexte cellulaire car l'activation présentée ici est suffisante pour induire la tumorigenèse pulmonaire. Dans leur ensemble ces études montrent qu'il existe une fenêtre d'activation optimale pour que la signalisation RAS puisse opérer son rôle oncogénique. D'autres études soulignent que les variations du dosage oncogénique au sein de cette fenêtre optimale sont aussi susceptibles d'induire des différences phénotypiques. Par exemple, il a été montré qu'un dosage élevé de RAS oncogénique était associé à une augmentation de la capacité métastatique des cancer du pancréas (Mueller et al., 2018) ; ou à la transition vers un métabolisme glycolytique pour les cancer pulmonaires (Kerr et al., 2016). Ces observations suggèrent que les variations intratumorales du dosage oncogénique de RAS constituent une source potentielle d'hétérogénéité fonctionnelle.

Nos résultats expérimentaux indiquent également qu'*in vivo* une importante sélection s'opère pour les cellules dont le dosage oncogénique se situe dans une fenêtre d'expression qualifiée d'optimale. Il est intéressant de s'interroger sur les mécanismes moléculaires induisant cet avantage sélectif.

Il a été montré que la persistance de la forme sauvage de RAS dans le contexte de l'expression de sa forme oncogénique limite l'activation de ERK et que l'allèle sauvage est fréquemment perdue au cours du développement tumoral (Zhang et al., 2001) Une étude a montré que l'antagonisme de RAS sauvage vis-à-vis de RAS muté disparaît lorsque une mutation de la protéine la rend incapable de former des homo-dimères (Ambrogio et al., 2018b). Il est donc possible que dans notre modèle expérimental où les cellules contiennent un faible niveau de RAS oncogénique (RAS^{LOW}), les formes sauvages de la protéine limitent l'activation de la voie en formant des dimères avec RAS muté. A l'inverse, quand le nombre de copies de RAS muté augmente cet effet devient négligeable. Nous notons cependant que ce mécanisme hypothétique ne semble pas pleinement actif, car même ce faible niveau de l'expression de Ras muté aboutit au changement du profil de l'expression génique dans notre modèle.

Il est à noter que malgré l'activation constitutive de RAS, les protéines situées en aval restent sensibles aux boucles de rétrocontrôle négatives, qui peuvent affecter la transmission du signal. Par exemple, il a été montré que l'activation de ERK dans le noyau induisait l'expression de DUSP5, une phosphatase nucléaire qui inhibe ERK et le séquestre dans le noyau (Kidger et

al., 2017). La rétention de ERK dans le noyau libère sa boucle de rétrocontrôle sur RAF, ce qui favorise alors l'activité cytoplasmiques de ERK. D'autres études, suggèrent que les phosphatases impliquées dans les boucles de rétrocontrôle négatifs peuvent aussi avoir un rôle pro-oncogénique (Kidger and Keyse, 2016). Notamment, la surexpression de DUSP6 dans des cellules de glioblastomes réduit leur potentiel prolifératif, mais augmente leur phénotype migratoire et leur capacité à former des colonies en soft agar (Messina et al., 2011). Il est donc envisageable que dans notre modèle un niveau élevé de RAS activé augmente la capacité de ERK à agir sur ses substrats cytoplasmiques, ou bien induit l'expression de gènes affectant le phénotype des cellules. Bien que nos données transcriptomiques indiquent qu'un niveau élevé de RAS régule l'expression de gènes en lien avec la signalisation MAPK, elles ne nous permettent pas de conclure sur un effet exclusif de cette voie de signalisation sur l'avantage sélectif observé *in vivo*. Parmi les effecteurs de RAS, plusieurs ont aussi un rôle oncogénique établis (Mott and Owen, 2015). Ces autres voies de signalisation situées en aval de RAS sont donc également susceptibles d'être impactées par l'augmentation de dosage oncogénique. L'augmentation du nombre de copies de RAS recrutées à la membrane peut lui permettre de lier une plus grande diversité de substrats. Pour appréhender la question de l'importance de la voie MAPK/ERK dans le phénotype tumoral *in vivo*, nous avons prévu de traiter nos animaux avec des inhibiteurs de RTK utilisé en clinique (Sorafénib) et un inhibiteur de MEK (Tramétinib).

II – Impact de l'environnement sur la sélection sous-clonale

Nous avons montré que l'injection intrahépatique de cellules BMEL transformées par HRAS^{G12V} induisait une carcinose péritonéale massive. Le processus métastatique mutli-étape inclus la migration des cellules tumorales, qui est suivie de leur intravasation puis l'extravasation de la circulation sanguine et/ou lymphatique, aboutissant ainsi en la colonisation d'un site distant (Chitty et al., 2018). Dans notre cas, il faut noter que la procédure chirurgicale facilite la fuite où l'évasion des cellules dans la cavité péritonéale. Nos efforts pour quantifier cette fuite au moment de l'injection nous ont permis d'estimer que moins de 1% des cellules injectées se retrouvaient en suspension dans la cavité péritonéale. Ces tumeurs sont donc probablement issues de la faible fuite au moment de l'injection, possiblement additionnée de l'essaimage de quelques cellules depuis la tumeur primaire, sans qu'on puisse estimer la participation relative de deux phénomènes. Bien que l'ensemble des étapes du processus métastatique ne soient probablement pas reproduites lors de la formation de tumeurs péritonéales, ces dernières constituent un outil intéressant pour étudier la croissance tumorale dans un environnement différent de celui de la tumeur primaire. De plus, ces tumeurs sont pertinentes dans le contexte de la pathologie humaine

où 6 à 11% des patients atteints de CHC développent des carcinomes péritonéaux (Becker et al., 2014). Cette dissémination intervient fréquemment suite à la rupture de la capsule de Glisson, qui est une gaine de tissu conjonctif recouvrant le parenchyme hépatique (Spiliotis et al., 2017).

Nos résultats ont montré que le niveau d'activation optimal de la signalisation RAS est différent en fonction de la localisation de la tumeur. Cette différence semble due à l'élimination des cellules non adaptées, qui s'opère plus efficacement dans l'environnement hépatique.

L'oncogenèse provoque une réponse immunitaire complexe, qui est dépendante des propriétés intrinsèques des cellules tumorales. La signalisation RAS joue un rôle important dans la promotion de l'inflammation et la modulation du microenvironnement tumoral (Hamarshah et al., 2020). Il a été montré que l'activation oncogénique de RAS induisait la sécrétion d'IL-6, qui est nécessaire à la carcinogenèse dans plusieurs modèles cellulaires et murins (Angrile et al., 2007). Par exemple, lors de la carcinogenèse pancréatique l'activation de la voie STAT3 induite par l'IL6 coopère avec l'activation de la voie MAPK pour permettre la détoxification des ROS et la survie cellulaire (Zhang et al., 2013). L'IL6 a également de nombreux effets sur le recrutement et la modulation du microenvironnement (Chonov et al., 2019). Associé au TNF α il promeut la prolifération des hépatocytes, la régénération hépatique et le recrutement des cellules étoilées du foie (Tanaka and Miyajima, 2016). NF- κ B est un des médiateurs principaux de l'inflammation liée à la signalisation RAS (Bassères et al., 2010; Norris and Baldwin, 1999). La translocation nucléaire de NF- κ B mène à la sécrétion de nombreuses cytokines ayant un impact sur le microenvironnement tumoral et l'inflammation, comme par exemple l'IL-1, IL-8 et la lymphotoxine B (Liu et al., 2017). Lors de la sénescence oncogénique liée à RAS, le recrutement de NF- κ B au niveau des sites de dommage à l'ADN permet la production du « senescence associated secretory phenotype » (SASP) (Chien et al., 2011). Les cytokines sécrétées permettent alors le recrutement des cellules NK et l'élimination des cellules sénescents (Xue et al., 2007). L'expression de RAS oncogénique dans les cellules pancréatiques induit également l'expression de la protéine membranaire ICAM-1, ce qui provoque l'infiltration des macrophages (Liou et al., 2015). Ces derniers sécrètent du TNF α et des protéases, ce qui favorise la progression tumorale.

Les conséquences de ces signaux pro-inflammatoires sont toutefois dépendantes du contexte environnemental et des interactions entre le système immunitaire inné et adaptatif.

L'environnement immunitaire hépatique est particulier, notamment par rapport à sa tolérance vis-à-vis de la réponse immunitaire. Le foie est en permanence en contact avec des éléments étrangers et les pathogènes issues du microbiote intestinal qui produisent des « pathogen associated molecular patterns » (PAMPs) et « damage associated molecular patterns » (DAMPs) (Robinson et al., 2016).

Dans la majorité des tissus, ces molécules induisent une activation de l'immunité innée et inflammation locale (Janeway, 1992). Dans le foie en revanche, l'expression de « pattern recognition receptors » (PRR) au niveau des hépatocytes et des cellules de Kupffer (KC) permet la phagocytose des DAMPS et PAMPS sans induire de réponse inflammatoire (Kubes and Mehal, 2012). Les KC sont un des exemples de la complexité et de la spécificité des cellules immunes résidentes du foie. Elles ont un rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire, la production de cytokines inflammatoires et la réponse au stress (Bilzer et al., 2006). En cas d'infection ou de formation néoplasique, l'environnement hépatique reste capable de produire une réponse immunitaire rapide. Le foie est particulièrement enrichi en cellules NK qui composent environ 50% de ses cellules lymphoïdes (Gao et al., 2008). Les NK hépatiques sont complexes et hétérogènes et semblent jouer un rôle important dans la surveillance immunitaire (Mikulak et al., 2019) En cas de stress hépatique, l'action des NK permet l'activation des KC. Ces dernières produisent alors des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le TGF- β et le TNF α . Ces cytokines induisent l'activation des cellules étoilées du foie (HSC), responsables de la réparation du tissu. De surcroît, l'activation des KC permet aussi d'initier une réponse adaptative effectrice en induisant la présentation d'antigène par les cellules dendritiques du foie (Kelly et al., 2014). La présentation d'antigène hépatique est toutefois moins efficace que dans d'autres tissus (Bamboate et al., 2009). Cette faible potentialité à induire une réponse adaptative efficace est probablement due à la sécrétion d'IL-10 par les KC, et à la co-présentation d'antigènes par les cellules des sinusoides et les HSC. Ces signaux semblent orienter les cellules T vers un état de tolérance immunogénique (Thomson and Knolle, 2010).

L'environnement péritonéal est bien différent. Le péritoine est constitué d'une couche de cellules mésothéliales et d'un espace de tissu conjonctifs, recouvrant les muscles abdominaux et viscéraux. Les macrophages y sont particulièrement abondants et représentent entre 30 et 35% des cellules lymphoïde du tissu (Cassado et al., 2015). En cas d'infection ou de dommage tissulaire, les DAMPS et PAMPS libérés induisent l'activation des macrophages péritonéaux, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires (Capobianco et al., 2017). Ces cytokines stimulent l'infiltration et la maturation des cellules dendritiques, qui sont alors capable de présenter l'antigène et de migrer vers les nœuds lymphatiques pour y initier une réponse adaptative efficace (McCully and Madrenas, 2006). Les cytokines produites par les macrophages péritonéaux initient également la transition mesothélio-mésenchymateuse des cellules du mésothélium péritonéal, qui vont pouvoir participer à la réparation du tissu (Strippoli et al., 2008). Une étude a montré que des cellules NK résidentes du péritoine sont particulières et ressemblent aux NK immatures de la rate (Gonzaga et al., 2011). De plus, seules ces cellules immatures sont capables de migrer depuis

la rate vers la cavité péritonéale. Lorsqu'elles sont transférés directement dans le péritoine, les cellules NK matures survivent, mais sont incapables de s'y reproduire. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'environnement hépatique présente une immunité innée forte, contrôlée par différentes populations de cellules NK; en revanche la réponse adaptative dépendante des cellules T cytotoxique et de la présentation d'antigène semble moins efficace par rapport à d'autres tissus. L'environnement péritonéal à l'inverse, permet une forte réponse adaptative, mais les cellules NK y présentent peu d'activité.

Au cours de mon travail expérimental, je me suis concentré sur l'étude de l'environnement immunitaire dans des animaux déficient en cellules T fonctionnelles (Athymic nude) et sévèrement immunodéficients (NSG). Nos analyses montrent que dans le foie l'expression d'un niveau élevé de RAS induit un avantage sélectif, qui est contrebalancé par une probabilité plus importante d'induire la mort cellulaire. Dans les tumeurs produites chez les animaux déficients de toute réponse immunitaire on observe une réduction de la mort cellulaire, suggérant un effet « non-cell autonomous ». L'infiltration des cellules NK dans des tumeurs hépatiques, et l'expression augmentée de FasL au sein de leur microenvironnement, suggère un rôle important de ces cellules dans l'élimination des cellules non adaptées. A l'inverse, les NK semblent avoir une plus faible activité dans les tumeurs péritonéales. Nous avons tenté d'identifier le lien entre l'expression d'un niveau élevé de RAS et la sélection exercée par le microenvironnement tumoral. CEACAM1 fait partie des gènes co-exprimés par les tumeurs hépatiques et les cellules avec un niveau élevé de RAS. CEACAM1 est une protéine d'adhésion qui est impliqué dans des interactions avec les cellules immunitaires (Kim et al., 2019). Il a été montré que l'expression de CEACAM1 induite suite à l'infection par le VHC protège les hépatocytes de la cytotoxicité des NK (Suda et al., 2018). Cependant dans notre modèle, le niveau moyen de CEACAM1 en l'absence totale de réponse immunitaire n'augmente pas autant que le niveau d'expression de CEACAM1. Il est possible que l'expression du gène soit contrôlée par d'autres mécanismes « non cell autonomous ». Il est également envisageable qu'un niveau trop important de signalisation RAS induit une boucle de rétro-contrôle négatif inhibant son expression. De manière intéressante, il a été montré que l'expression de CEACAM1 dans des cellules de cancer mammaire était contrôlée par l'activité des facteurs de transcriptions SP1, USF1/2 et IRS1/2 (Gencheva et al., 2010). L'activité de IRF1/2 est dépendante de la signalisation par l'interferon- γ , tandis que USF1/2 est activé par la phosphorylation de ERK, p38 et GSK-3 (Blazanin et al., 2019; Horbach et al., 2015). Une autre étude a montré que l'expression de CEACAM1 dans des cellules de mélanomes BRAF mutées est dépendante du facteur de transcription ETS1 (Kfir-Elirachman et al., 2018), également sous contrôle de la signalisation

MAPK. Les auteurs ont également montré que les cellules traitées avec des inhibiteurs de BRAF oncogénique ou de MEK perdent l'expression de CEACAM1 et deviennent plus sensibles à l'élimination par les cellules T. En se basant sur ces données, il est probable que l'expression de CEACAM1 soit contrôlée par une combinaison de signaux intrinsèques et extrinsèques, ce qui rend compliqué l'analyse de son implication dans le mécanisme de sélection. Afin de mieux identifier sa contribution à la sélection des cellules avec un niveau optimal de RAS nous avons prévu de produire des cellules KO pour CEACAM1.

Enfin, il est intéressant de replacer mes résultats dans le contexte de l'évolution des tumeurs et de leur hétérogénéité.

La théorie des « histoires de vie » est un aspect de la biologie évolutive, qui en écologie vise à étudier les traits permettant aux êtres vivants d'atteindre un succès reproductif (Stearns, 2000). Le succès reproductif d'une espèce est alors dépendant des compromis (trade-off) entre (1) la reproduction ou la survie, (2) une reproduction immédiate ou plus tardive, et (3) la quantité des descendants ou leur qualité. Par exemple, les grands mammifères ont tendance à favoriser la survie, une maturité de reproduction tardive et une longue durée de vie. A l'inverse, les petits mammifères capitalisent sur la reproduction immédiate et une faible durée de vie. Dans une certaine mesure, cette théorie s'applique aussi dans à l'évolution des cellules tumorales où les caractéristiques intrinsèques de la cellule l'orientent vers une reproduction rapide ou lente. En cas de reproduction rapide, les cellules favorisent le fitness au détriment de la qualité de la descendance, qui est alors à risque de compromettre sa survie. Au contraire, les cellules qui orientent leur stratégie vers la survie sont plus susceptibles de répondre favorablement à un stress (Aktipis et al., 2013). L'efficacité d'une stratégie par rapport à l'autre est dépendante des limitations spatiales, de la disponibilité des ressources et des pressions de sélections exercées par le microenvironnement tumoral. Une belle illustration de l'efficacité relative de chacune de ces stratégies apparaît dans une étude de l'équipe de Kornelia Polyak où un clone avec un fitness faible survit efficacement en produisant une molécule (l'IL11) qui permet de conserver un équilibre stable des populations sous-clonales composant la tumeur (Marusyk et al., 2014). Par la même occasion, cet équilibre permet au clone IL11 d'assurer la stabilité des ressources qui lui sont accessibles. En revanche, lorsque le clone IL11 est confronté à une autre population cellulaire, qui favorise sa prolifération au détriment de la survie (FOXL3), l'équilibre est rompu, l'autre clone concentre l'utilisation des ressources, ce qui induit la disparition du clone IL11. Le « choix » d'une stratégie favorisant la survie ou la prolifération est définie par l'acquisition des traits phénotypiques qui découlent des « hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2011). Par exemple, la maintenance de l'immortalité répliquative favorise la prolifération tandis que la

résistance à la surveillance immunitaire favorise la survie. Classiquement, l'expression de ces traits est dépendante des altérations génétiques, des modifications épigénétiques, et des interactions avec le microenvironnement, qui sont toutes les trois interconnectés. Mes résultats ajoutent un élément nouveau à cette vision néo-darwinienne de la tumorigénèse en mettant en évidence une nouvelle forme de diversification phénotypique, qui s'applique à l'hétérogénéité intratumorale et dépend du dosage oncogénique, qui à son tour contrôle l'activité de la signalisation. Cette hétérogénéité quantitative, que j'ai étudié dans le contexte de l'activation de la voie RAS/MAPK, est susceptible de s'appliquer à d'autres voies oncogéniques. Par exemple, il a été décrit que le dosage oncogénique de MYC pouvait influencer l'expression des gènes de la voie β -caténine (Molina-Sánchez et al., 2020).

Mes résultats peuvent également être considérés dans le contexte de la prise en charge thérapeutique. En effet, certaines stratégies innovantes proposent de contrôler la croissance tumorale de manière moins drastique que celle visant l'élimination totale de la tumeur. En effet, la stratégie visant l'éradication de l'ensemble de la tumeur en utilisant des doses maximales de drogues, souvent induit l'apparition de résistances et l'échec thérapeutique. Une stratégie alternative vise à réduire séquentiellement la progression tumorale ou encore à générer des conditions permettant d'orienter le trajet évolutif des tumeurs (Gatenby and Brown, 2020). À partir de ces approches, il pourrait être intéressant de considérer le développement des stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de drogues pouvant diminuer ou augmenter l'intensité de signalisation. Combiner à d'autres stratégies innovantes, notamment celles exploitant la réponse immune anti-tumorale, ces approches pourraient s'avérer utiles dans les futures interventions thérapeutiques.

Bibliographie

A

Abe, M., Koga, H., Yoshida, T., Masuda, H., Iwamoto, H., Sakata, M., Hanada, S., Nakamura, T., Taniguchi, E., Kawaguchi, T., et al. (2012). Hepatitis C virus core protein upregulates the expression of vascular endothelial growth factor via the nuclear factor- κ B/hypoxia-inducible factor-1 α axis under hypoxic conditions. *Hepatology*. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol. *42*, 591–600.

Affara, N.I., Ruffell, B., Medler, T.R., Gunderson, A.J., Johansson, M., Bornstein, S., Bergsland, E., Steinhoff, M., Li, Y., Gong, Q., et al. (2014). B Cells Regulate Macrophage Phenotype and Response to Chemotherapy in Squamous Carcinomas. *Cancer Cell* *25*, 809–821.

Agarwal, D., Nowak, C., Zhang, N.R., Pusztai, L., and Hatzis, C. (2017). Functional germline variants as potential co-oncogenes. *NPJ Breast Cancer* *3*.

Akkari, L., Haouzi, D., Binamé, F., Floc'h, N., Lassus, P., Baghdiguian, S., and Hibner, U. (2010). Cell shape and TGF- β signaling define the choice of lineage during in vitro differentiation of mouse primary hepatic precursors. *J. Cell. Physiol.* *225*, 186–195.

Akkari, L., Grégoire, D., Floc'h, N., Moreau, M., Hernandez, C., Simonin, Y., Rosenberg, A.R., Lassus, P., and Hibner, U. (2012). Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors. *J. Hepatol.* *57*, 1021–1028.

Aktipis, C.A., Boddy, A.M., Gatenby, R.A., Brown, J.S., and Maley, C.C. (2013). Life history tradeoffs in cancer evolution. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 883–892.

Albani, A.E., Bengtson, S., Canfield, D.E., Bekker, A., Macchiarelli, R., Mazurier, A., Hammarlund, E.U., Boulvais, P., Dupuy, J.-J., Fontaine, C., et al. (2010). Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature* *466*, 100–104.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *General Principles of Cell Communication*. Mol. Biol. Cell 4th Ed.

Alfarouk, K.O., Ibrahim, M.E., Gatenby, R.A., and Brown, J.S. (2013). Riparian ecosystems in human cancers. *Evol. Appl.* *6*, 46–53.

Allis, C.D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* *17*, 487–500.

Almendro, V., Marusyk, A., and Polyak, K. (2013). Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *8*, 277–302.

Alvarado, A.S., and Yamanaka, S. (2014). Rethinking Differentiation: Stem Cells, Regeneration, and Plasticity. *Cell* *157*, 110–119.

Ambrogio, C., Köhler, J., Zhou, Z.-W., Wang, H., Paranal, R., Li, J., Capelletti, M., Caffarra, C., Li, S., Lv, Q., et al. (2018a). KRAS Dimerization Impacts MEK Inhibitor Sensitivity and Oncogenic Activity of Mutant KRAS. *Cell* *172*, 857-868.e15.

Ambrogio, C., Köhler, J., Zhou, Z.-W., Wang, H., Paranal, R., Li, J., Capelletti, M., Caffarra, C., Li, S., Lv, Q., et al. (2018b). KRAS Dimerization Impacts MEK Inhibitor Sensitivity and Oncogenic Activity of Mutant KRAS. *Cell* *172*, 857-868.e15.

An, F.Q., Matsuda, M., Fujii, H., Tang, R.F., Amemiya, H., Dai, Y.M., and Matsumoto, Y. (2001). Tumor heterogeneity in small hepatocellular carcinoma: analysis of tumor cell proliferation, expression and mutation of p53 AND beta-catenin. *Int. J. Cancer* *93*, 468–474.

Ancrile, B., Lim, K.-H., and Counter, C.M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.* *21*, 1714–1719.

Andor, N., Graham, T.A., Jansen, M., Xia, L.C., Aktipis, C.A., Petritsch, C., Ji, H.P., and Maley, C.C. (2016). Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat. Med.* *22*, 105–113.

Andreu, P., Johansson, M., Affara, N.I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D.G., et al. (2010). FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* *17*, 121–134.

Angelova, M., Mlecnik, B., Vasaturo, A., Bindea, G., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Buttard, B., Morgand, E., Bruni, D., Jouret-Mourin, A., et al. (2018). Evolution of Metastases in Space and Time under Immune Selection. *Cell* *175*, 751-765.e16.

Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O., and Heikenwalder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 411–428.

Aoidi, R., Maltais, A., and Charron, J. (2016). Functional redundancy of the kinases MEK1 and MEK2: Rescue of the Mek1 mutant phenotype by Mek2 knock-in reveals a protein threshold effect. *Sci. Signal.* *9*, ra9–ra9.

Arbuthnot, P., and Kew, M. (2001). Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Exp. Pathol.* *82*, 77–100.

Arechederra, M., Bazai, S.K., Abdouni, A., Sequera, C., Mead, T.J., Richelme, S., Daian, F., Audebert, S., Dono, R., Lozano, A., et al. (2020). ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *0*.

Armitage, P., and Doll, R. (1954). The Age Distribution of Cancer and a Multi-stage Theory of Carcinogenesis. *Br. J. Cancer* *8*, 1–12.

Aryee, M.J., Liu, W., Engelmann, J.C., Nuhn, P., Gurel, M., Haffner, M.C., Esopi, D., Irizarry, R.A., Getzenberg, R.H., Nelson, W.G., et al. (2013). DNA methylation alterations exhibit intraindividual stability and interindividual heterogeneity in prostate cancer metastases. *Sci. Transl. Med.* *5*, 169ra10.

Asgharpour, A., Cazanave, S.C., Pacana, T., Seneshaw, M., Vincent, R., Banini, B.A., Kumar, D.P., Daita, K., Min, H.-K., Mirshahi, F., et al. (2016). A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J. Hepatol.* *65*, 579–588.

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* 789586.

- Bailey, M.H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M.C., Kim, J., Reardon, B., et al. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* 173, 371–385.e18.
- Bambace, N.M., and Holmes, C.E. (2011). The platelet contribution to cancer progression. *J. Thromb. Haemost.* 9, 237–249.
- Bamboot, Z.M., Stableford, J.A., Plitas, G., Burt, B.M., Nguyen, H.M., Welles, A.P., Gonen, M., Young, J.W., and DeMatteo, R.P. (2009). Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 1901–1911.
- Barbie, D.A., Tamayo, P., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Moody, S.E., Dunn, I.F., Schinzel, A.C., Sandy, P., Meylan, E., Scholl, C., et al. (2009). Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS -driven cancers require TBK1. *Nature* 462, 108–112.
- Bashiardes, S., Shapiro, H., Rozin, S., Shibolet, O., and Elinav, E. (2016). Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota. *Mol. Metab.* 5, 782–794.
- Bassères, D.S., Ebbs, A., Levantini, E., and Baldwin, A.S. (2010). Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 70, 3537–3546.
- Becker, A.K., Tso, D.K., Harris, A.C., Malfair, D., and Chang, S.D. (2014). Extrahepatic Metastases of Hepatocellular Carcinoma: A Spectrum of Imaging Findings. *Can. Assoc. Radiol. J.* 65, 60–66.
- Behari, J. (2010). The Wnt/ β -catenin signaling pathway in liver biology and disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 745–756.
- Bélanger, L.-F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A.-M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R., and Charron, J. (2003). Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4778–4787.
- Bilzer, M., Roggel, F., and Gerbes, A.L. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 26, 1175–1186.
- Blazanin, N., Cheng, T., Carbajal, S., and DiGiovanni, J. (2019). Activation of a protumorigenic IFN γ /STAT1/IRF-1 signaling pathway in keratinocytes following exposure to solar ultraviolet light. *Mol. Carcinog.* 58, 1656–1669.
- Boll, M., Weber, L.W., Becker, E., and Stampfl, A. (2001). Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 56, 649–659.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.
- Bonura, T., Town, C.D., Smith, K.C., and Kaplan, H.S. (1975). The Influence of Oxygen on the Yield of DNA Double-Strand Breaks in X-Irradiated Escherichia coli K-12. *Radiat. Res.* 63, 567–577.
- Boyault, S., Rickman, D.S., Reyniès, A. de, 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.

Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A.G., Slaby, O., et al. (2019). A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers* *11*.

Bréchet, C., Hadchouel, M., Scotto, J., Fonck, M., Potet, F., Vyas, G.N., and Tiollais, P. (1981). State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and -negative liver diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 3906–3910.

Bremner, R., and Balmain, A. (1990). Genetic changes in skin tumor progression: Correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* *61*, 407–417.

Brocks, D., Assenov, Y., Minner, S., Bogatyrova, O., Simon, R., Koop, C., Oakes, C., Zucknick, M., Lipka, D.B., Weischenfeldt, J., et al. (2014). Intratumor DNA methylation heterogeneity reflects clonal evolution in aggressive prostate cancer. *Cell Rep.* *8*, 798–806.

Brondello, J.-M., Brunet, A., Pouyssegur, J., and McKenzie, F.R. (1997). The Dual Specificity Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1 and -2 Are Induced by the p42/p44MAPK Cascade. *J. Biol. Chem.* *272*, 1368–1376.

de Bruin, E.C., McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, D.C., Yates, L., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Murugaesu, N., Rowan, A.J., et al. (2014). Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* *346*, 251–256.

Bürckstümmer, T., Kriegs, M., Lupberger, J., Pauli, E.K., Schmittl, S., and Hildt, E. (2006). Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *FEBS Lett.* *580*, 575–580.

Buscà, R., Christen, R., Lovern, M., Clifford, A.M., Yue, J.-X., Goss, G.G., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2015). ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1. *BMC Evol. Biol.* *15*, 179.

Buscà, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front. Cell Dev. Biol.* *4*.

Calbo, J., van Montfort, E., Proost, N., van Drunen, E., Beverloo, H.B., Meuwissen, R., and Berns, A. (2011). A Functional Role for Tumor Cell Heterogeneity in a Mouse Model of Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* *19*, 244–256.

Calderaro, J., Zioli, M., Paradis, V., and Zucman-Rossi, J. (2019). Molecular and histological correlations in liver cancer. *J. Hepatol.* *71*, 616–630.

Calvisi, D.F., Pinna, F., Meloni, F., Ladu, S., Pellegrino, R., Sini, M., Daino, L., Simile, M.M., De Miglio, M.R., Viridis, P., et al. (2008). Dual-specificity phosphatase 1 ubiquitination in extracellular signal-regulated kinase-mediated control of growth in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* *68*, 4192–4200.

Calvisi, D.F., Ladu, S., Conner, E.A., Seo, D., Hsieh, J.-T., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2011). Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *J. Hepatol.* *54*, 311–319.

Capasso, L.L. (2005). Antiquity of cancer. *Int. J. Cancer* *113*, 2–13.

Capobianco, A., Cottone, L., Monno, A., Manfredi, A.A., and Rovere-Querini, P. (2017). The peritoneum: healing, immunity, and diseases. *J. Pathol.* *243*, 137–147.

- Caruso, S., Calatayud, A.-L., Pilet, J., La Bella, T., Rekić, 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.
- Casar, B., Sanz-Moreno, V., Yazicioglu, M.N., Rodríguez, J., Berciano, M.T., Lafarga, M., Cobb, M.H., and Crespo, P. (2007). Mxi2 promotes stimulus-independent ERK nuclear translocation. *EMBO J.* *26*, 635–646.
- Casci, T., Vinós, J., and Freeman, M. (1999). Sprouty, an Intracellular Inhibitor of Ras Signaling. *Cell* *96*, 655–665.
- Cassado, A. dos A., D’Império Lima, M.R., and Bortoluci, K.R. (2015). Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front. Immunol.* *6*.
- Castellano, E., and Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K. *Genes Cancer* *2*, 261–274.
- Castellano, E., and Santos, E. (2011). Functional Specificity of Ras Isoforms. *Genes Cancer* *2*, 216–231.
- Caunt, C.J., Sale, M.J., Smith, P.D., and Cook, S.J. (2015). MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 577–592.
- Ceriani, M., Scanduzzi, C., Amigoni, L., Tisi, R., Berruti, G., and Martegani, E. (2007). Functional analysis of RalGSP2, a murine guanine nucleotide exchange factor for RalA GTPase. *Exp. Cell Res.* *313*, 2293–2307.
- Chaffer, C.L., Marjanovic, N.D., Lee, T., Bell, G., Kleer, C.G., Reinhardt, F., D’Alessio, A.C., Young, R.A., and Weinberg, R.A. (2013). Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* *154*, 61–74.
- Chakravarthi, B.V.S.K., Nepal, S., and Varambally, S. (2016). Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. *Am. J. Pathol.* *186*, 1724–1735.
- Chan, L.-K., Ho, D.W.-H., Kam, C.S., Chiu, E.Y.-T., Lo, I.L.-O., Yau, D.T.-W., Cheung, E.T.-Y., Tang, C.-N., Tang, V.W.-L., Lee, T.K.-W., et al. (2021). RSK2-inactivating mutations potentiate MAPK signaling and support cholesterol metabolism in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *74*, 360–371.
- Chang, H.H., Hemberg, M., Barahona, M., Ingber, D.E., and Huang, S. (2008). Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* *453*, 544–547.
- Chapman, A., Fernandez del Ama, L., Ferguson, J., Kamarashev, J., Wellbrock, C., and Hurlstone, A. (2014). Heterogeneous Tumor Subpopulations Cooperate to Drive Invasion. *Cell Rep.* *8*, 688–695.
- Chen, X., and Calvisi, D.F. (2014). Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. *Am. J. Pathol.* *184*, 912–923.
- Chen, Q.W., Zhu, X.Y., Li, Y.Y., and Meng, Z.Q. (2014). Epigenetic regulation and cancer (Review). *Oncol. Rep.* *31*, 523–532.
- Cheng, N., Bhowmick, N.A., Chytil, A., Gorksa, A.E., Brown, K.A., Muraoka, R., Arteaga, C.L., Neilson, E.G., Hayward, S.W., and Moses, H.L. (2005). Loss of TGF- β type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF- α -, MSP- and HGF-mediated signaling networks. *Oncogene* *24*, 5053–5068.

- Chien, Y., Kim, S., Bumeister, R., Loo, Y.-M., Kwon, S.W., Johnson, C.L., Balakireva, M.G., Romeo, Y., Kopelovich, L., Gale, M., et al. (2006). RalB GTPase-mediated activation of the I κ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* *127*, 157–170.
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J.E., Premssirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* *25*, 2125–2136.
- Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., and Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 671–688.
- Chitadze, G., Lettau, M., Bhat, J., Wesch, D., Steinle, A., Fürst, D., Mytilineos, J., Kalthoff, H., Janssen, O., Oberg, H.-H., et al. (2013). Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. *Int. J. Cancer* *133*, 1557–1566.
- Chitty, J.L., Filipe, E.C., Lucas, M.C., Herrmann, D., Cox, T.R., and Timpson, P. (2018). Recent advances in understanding the complexities of metastasis. *F1000Research* *7*.
- Chonov, D.C., Ignatova, M.M.K., Ananiev, J.R., and Gulubova, M.V. (2019). IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* *7*, 2391–2398.
- Cohen, S., and Cohen, M.C. (1978). Mechanisms of tumor immunity. An overview. *Am. J. Pathol.* *93*, 449–457.
- Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* *513*, 559–563.
- Connor, F., Rayner, T.F., Aitken, S.J., Feig, C., Lukk, M., Santoyo-Lopez, J., and Odom, D.T. (2018). Mutational landscape of a chemically-induced mouse model of liver cancer. *J. Hepatol.* *69*, 840–850.
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol.* *6*.
- Corbin, K.D., and Zeisel, S.H. (2012). Choline Metabolism Provides Novel Insights into Non-alcoholic Fatty Liver Disease and its Progression. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *28*, 159–165.
- Cornils, K., Thielecke, L., Hüser, S., Forgber, M., Thomaschewski, M., Kleist, N., Hussein, K., Riecken, K., Volz, T., Gerdes, S., et al. (2014). Multiplexing clonality: combining RGB marking and genetic barcoding. *Nucleic Acids Res.* *42*, e56.
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., et al. (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* *33*, 463-479.e10.
- Craig, A.J., von Felden, J., Garcia-Lezana, T., Sarcognato, S., and Villanueva, A. (2020). Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *17*, 139–152.
- Crane, C.A., Austgen, K., Haberthur, K., Hofmann, C., Moyes, K.W., Avanesyan, L., Fong, L., Campbell, M.J., Cooper, S., Oakes, S.A., et al. (2014). Immune evasion mediated by tumor-derived lactate

- dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 12823–12828.
- Davis, B.H., and Kresina, T.F. (1996). Hepatic fibrogenesis. *Clin. Lab. Med.* *16*, 361–375.
- Davis, A., Gao, R., and Navin, N. (2017). Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochim. Biophys. Acta* *1867*, 151–161.
- Delire, B., and Stärkel, P. (2015). The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur. J. Clin. Invest.* *45*, 609–623.
- Desmedt, C., Fumagalli, D., Pietri, E., Zoppoli, G., Brown, D., Nik-Zainal, S., Gundem, G., Rothé, F., Majjaj, S., Garuti, A., et al. (2015). Uncovering the genomic heterogeneity of multifocal breast cancer. *J. Pathol.* *236*, 457–466.
- Dhamija, E., Paul, S.B., and Kedia, S. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease associated with hepatocellular carcinoma: An increasing concern. *Indian J. Med. Res.* *149*, 9–17.
- Dikic, I., Schlessinger, J., and Lax, I. (1994). PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr. Biol.* *4*, 702–708.
- Ding, X., He, M., Chan, A.W.H., Song, Q.X., Sze, S.C., Chen, H., Man, M.K.H., Man, K., Chan, S.L., Lai, P.B.S., et al. (2019). Genomic and Epigenomic Features of Primary and Recurrent Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology* *0*.
- Disson, O., Haouzi, D., Desagher, S., Loesch, K., Hahne, M., Kremer, E.J., Jacquet, C., Lemon, S.M., Hibner, U., and Lerat, H. (2004). Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* *126*, 859–872.
- Dong, L.-Q., Peng, L.-H., Ma, L.-J., Liu, D.-B., Zhang, S., Luo, S.-Z., Rao, J.-H., Zhu, H.-W., Yang, S.-X., Xi, S.-J., et al. (2020). Heterogeneous immunogenomic features and distinct escape mechanisms in multifocal hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *72*, 896–908.
- Dorard, C., Vucak, G., and Baccarini, M. (2017a). Deciphering the RAS/ERK pathway in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* *45*, 27–36.
- Dorard, C., Estrada, C., Barbotin, C., Larcher, M., Garancher, A., Leloup, J., Beermann, F., Baccarini, M., Pouponnot, C., Larue, L., et al. (2017b). RAF proteins exert both specific and compensatory functions during tumour progression of NRAS-driven melanoma. *Nat. Commun.* *8*, 15262.
- Dougherty, M.K., Müller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., and Morrison, D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by Direct Feedback Phosphorylation. *Mol. Cell* *17*, 215–224.
- Douville, E., and Downward, J. (1997). EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene* *15*, 373–383.
- Eblen, S.T., Slack-Davis, J.K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J.T., Weber, M.J., and Catling, A.D. (2004). Mitogen-Activated Protein Kinase Feedback Phosphorylation Regulates MEK1 Complex Formation and Activation during Cellular Adhesion. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2308–2317.

Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevsa, T., Klotz, S., Medina-Echeverz, J., Longerich, T., Forgues, M., Reisinger, F., et al. (2016). Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* 30, 533–547.

Einhorn, J. (1985). Nitrogen mustard: the origin of chemotherapy for cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11, 1375–1378.

El Kasmi, K.C., Qualls, J.E., Pesce, J.T., Smith, A.M., Thompson, R.W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R.J., König, T., Schleicher, U., Koo, M.-S., et al. (2008). Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* 9, 1399–1406.

El-Serag, H.B. (2012). Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 142, 1264-1273.e1.

Emuss, V., Garnett, M., Mason, C., and Marais, R. (2005). Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res.* 65, 9719–9726.

Erdogan, B., Ao, M., White, L.M., Means, A.L., Brewer, B.M., Yang, L., Washington, M.K., Shi, C., Franco, O.E., Weaver, A.M., et al. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J. Cell Biol.* 216, 3799–3816.

Eroglu, Z., and Ribas, A. (2016). Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 8, 48–56.

Ezzeldin, M., Borrego-Diaz, E., Taha, M., Esfandyari, T., Wise, A.L., Peng, W., Rouyanian, A., Asvadi Kermani, A., Soleimani, M., Patrad, E., et al. (2014). RalA signaling pathway as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma (HCC). *Mol. Oncol.* 8, 1043–1053.

Faguet, G.B. (2015). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int. J. Cancer* 136, 2022–2036.

Fang, M., Yuan, J., Peng, C., and Li, Y. (2014). Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 2871–2882.

Fasterius, E., Uhlén, M., and Szgyarto, C.A.-K. (2019). Single-cell RNA-seq variant analysis for exploration of genetic heterogeneity in cancer. *Sci. Rep.* 9, 1–11.

Fausto, N., Lemire, J.M., and Shiojiri, N. (1993). Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 204, 237–241.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.

Feng, D.-Y., Sun, Y., Cheng, R.-X., Ouyang, X.-M., and Zheng, H. (2005). Effect of hepatitis C virus nonstructural protein NS3 on proliferation and MAPK phosphorylation of normal hepatocyte line. *World J. Gastroenterol.* 11, 2157–2161.

Figueiredo, M.L., Stein, T.J., Jochem, A., and Sandgren, E.P. (2012). MUTANT HRASG12V AND KRASG12D HAVE OVERLAPPING BUT NON-IDENTICAL EFFECTS ON HEPATOCYTE GROWTH AND

TRANSFORMATION FREQUENCY IN TRANSGENIC MICE. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 32, 582–591.

Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083–1093.

Finn, R.S., Ryoo, B.-Y., Merle, P., Kudo, M., Bouattour, M., Lim, H.Y., Breder, V., Edeline, J., Chao, Y., Ogasawara, S., et al. (2020a). Pembrolizumab As Second-Line Therapy in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma in KEYNOTE-240: A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 38, 193–202.

Finn, R.S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P.R., Ducreux, M., Kim, T.-Y., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A.O., et al. (2020b). Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 382, 1894–1905.

Foo, J., Leder, K., and Michor, F. (2011). Stochastic dynamics of cancer initiation. *Phys. Biol.* 8, 015002.

Forner, A., Reig, M., and Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet* 391.

Friemel, J., Rechsteiner, M., Frick, L., Böhm, F., Struckmann, K., Egger, M., Moch, H., Heikenwalder, M., and Weber, A. (2015). Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 1951–1961.

Gallarreta, M.R. de, Bresnahan, E., Molina-Sánchez, P., Lindblad, K.E., Maier, B., Sia, D., Puigvehi, M., Miguela, V., Casanova-Acebes, M., Dhainaut, M., et al. (2019). β -Catenin Activation Promotes Immune Escape and Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Discov.* 9, 1124–1141.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Gao, B., Jeong, W.-I., and Tian, Z. (2008). Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47, 729–736.

Gao, R., Davis, A., McDonald, T.O., Sei, E., Shi, X., Wang, Y., Tsai, P.-C., Casasent, A., Waters, J., Zhang, H., et al. (2016). Punctuated Copy Number Evolution and Clonal Stasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Nat. Genet.* 48, 1119–1130.

Garcia, S.B., Novelli, M., and Wright, N.A. (2000). The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 89–116.

Gardner, A., and Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* 37, 855–865.

Gatenby, R.A., and Brown, J.S. (2020). Integrating evolutionary dynamics into cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17, 675–686.

Gencheva, M., Chen, C.-J., Nguyen, T., and Shively, J.E. (2010). Regulation of CEACAM1 transcription in human breast epithelial cells. *BMC Mol. Biol.* 11, 79.

- Gentry, L.R., Martin, T.D., Reiner, D.J., and Der, C.J. (2014). Ral small GTPase signaling and oncogenesis: More than just 15minutes of fame. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 2976–2988.
- Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., et al. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* *366*, 883–892.
- Ghadially, H., Brown, L., Lloyd, C., Lewis, L., Lewis, A., Dillon, J., Sainson, R., Jovanovic, J., Tigue, N.J., Bannister, D., et al. (2017). MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br. J. Cancer* *116*, 1208–1217.
- Gimple, R.C., and Wang, X. (2019). RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Front. Oncol.* *9*.
- Gochee, P.A., Jonsson, J.R., Clouston, A.D., Pandeya, N., Purdie, D.M., and Powell, E.E. (2003). Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor-alpha and cytochrome P450 2E1. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *18*, 386–392.
- Gonzaga, R., Matzinger, P., and Perez-Diez, A. (2011). Resident Peritoneal NK Cells. *J. Immunol.* *187*, 6235–6242.
- Gooz, M. (2010). ADAM-17: The Enzyme That Does It All. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *45*, 146–169.
- Gould, S. Jay, and Eldredge, N. (1993). Punctuated equilibrium comes of age. *Nature* *366*, 223–227.
- Grant, B.F., Chou, S.P., Saha, T.D., Pickering, R.P., Kerridge, B.T., Ruan, W.J., Huang, B., Jung, J., Zhang, H., Fan, A., et al. (2017). Prevalence of 12-Month Alcohol Use, High-Risk Drinking, and DSM-IV Alcohol Use Disorder in the United States, 2001-2002 to 2012-2013. *JAMA Psychiatry* *74*, 911–923.
- Gross, S.M., Dane, M.A., Bucher, E., and Heiser, L.M. (2019). Individual Cells Can Resolve Variations in Stimulus Intensity along the IGF-PI3K-AKT Signaling Axis. *Cell Syst.* *9*, 580-588.e4.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* *4*, 111–120.
- Hamada, S., Masamune, A., Takikawa, T., Suzuki, N., Kikuta, K., Hirota, M., Hamada, H., Kobune, M., Satoh, K., and Shimosegawa, T. (2012). Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *421*, 349–354.
- Hamarsheh, S., Groß, O., Brummer, T., and Zeiser, R. (2020). Immune modulatory effects of oncogenic KRAS in cancer. *Nat. Commun.* *11*, 5439.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hardy, T., and Mann, D.A. (2016). Epigenetics in liver disease: from biology to therapeutics. *Gut* *65*, 1895–1905.

- Harrington, L.S., Findlay, G.M., and Lamb, R.F. (2005). Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 35–42.
- Hashimoto, E., and Tokushige, K. (2012). Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic? *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* *42*, 1–14.
- Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T., and Ogata, M. (2003). Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* *8*, 847–856.
- Hayashi, J., Aoki, H., Kajino, K., Moriyama, M., Arakawa, Y., and Hino, O. (2000). Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor α . *Hepatology* *32*, 958–961.
- Hiratsuka, T., Bordeu, I., Pruessner, G., and Watt, F.M. (2020). Regulation of ERK basal and pulsatile activity control proliferation and exit from the stem cell compartment in mammalian epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *117*, 17796–17807.
- Horbach, T., Götz, C., Kietzmann, T., and Dimova, E.Y. (2015). Protein kinases as switches for the function of upstream stimulatory factors: implications for tissue injury and cancer. *Front. Pharmacol.* *6*.
- Hosseini, N., Shor, J., and Szabo, G. (2019). Alcoholic Hepatitis: A Review. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* *54*, 408–416.
- Hsiang, C.-Y., Wu, S.-L., Chen, J.-C., Lo, H.-Y., Li, C.-C., Chiang, S.-Y., Wu, H.-C., and Ho, T.-Y. (2007). Acetaldehyde induces matrix metalloproteinase-9 gene expression via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells: Association with the invasive potential. *Toxicol. Lett.* *171*, 78–86.
- Hsu, T., Möröy, T., Etiemble, J., Louise, A., Trépo, C., Tiollais, P., and Buendia, M.A. (1988). Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell* *55*, 627–635.
- Hu, B., Li, H., Guo, W., Sun, Y.-F., Zhang, X., Tang, W.-G., Yang, L.-X., Xu, Y., Tang, X.-Y., Ding, G.-H., et al. (2020). Establishment of a hepatocellular carcinoma patient-derived xenograft platform and its application in biomarker identification. *Int. J. Cancer* *146*, 1606–1617.
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., and Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* *14*, 1483–1496.
- Hubbard, S.R., and Miller, W.T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 117–123.
- Hunter, T., and Sefton, B.M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 1311–1315.
- Hussain, S.P., Schwank, J., Staib, F., Wang, X.W., and Harris, C.C. (2007). TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* *26*, 2166–2176.
- Huynh, H., Nguyen, T.T.T., Chow, K.-H.K.-P., Tan, P.H., Soo, K.C., and Tran, E. (2003). Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: Its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol.* *3*, 19.

- Ijuin, T. (2019). Phosphoinositide phosphatases in cancer cell dynamics—Beyond PI3K and PTEN. *Semin. Cancer Biol.* 59, 50–65.
- Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science* 240, 1468–1474.
- Janeway, C.A. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13, 11–16.
- Janiszewska, M., Tabassum, D.P., Castaño, Z., Cristea, S., Yamamoto, K.N., Kingston, N.L., Murphy, K.C., Shu, S., Harper, N.W., Del Alcazar, C.G., et al. (2019). Subclonal cooperation drives metastasis by modulating local and systemic immune microenvironments. *Nat. Cell Biol.* 21, 879–888.
- Jhappan, C., Noonan, F.P., and Merlino, G. (2003). Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22, 3099–3112.
- Jiménez-Sánchez, A., Memon, D., Pourpe, S., Veeraraghavan, H., Li, Y., Vargas, H.A., Gill, M.B., Park, K.J., Zivanovic, O., Konner, J., et al. (2017). Heterogeneous Tumor-Immune Microenvironments among Differentially Growing Metastases in an Ovarian Cancer Patient. *Cell* 170, 927-938.e20.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 582–598.
- Kao, C.-F., Chen, S.-Y., Chen, J.-Y., and Wu Lee, Y.-H. (2004). Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene* 23, 2472–2483.
- Karademir, S. (2018). Staging of hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res.* 4.
- Kasai, F., Hirayama, N., Ozawa, M., Satoh, M., and Kohara, A. (2018). HuH-7 reference genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. *Hum. Cell* 31, 261–267.
- Kashyap, A.S., Schmittnaegel, M., Rigamonti, N., Pais-Ferreira, D., Mueller, P., Buchi, M., Ooi, C.-H., Kreuzaler, M., Hirschmann, P., Guichard, A., et al. (2020). Optimized antiangiogenic reprogramming of the tumor microenvironment potentiates CD40 immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 541–551.
- Kelly, A., Fahey, R., Fletcher, J.M., Keogh, C., Carroll, A.G., Siddachari, R., Geoghegan, J., Hegarty, J.E., Ryan, E.J., and O’Farrelly, C. (2014). CD141⁺ myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver. *J. Hepatol.* 60, 135–142.
- Kemkemer, R., Schrank, S., Vogel, W., Gruler, H., and Kaufmann, D. (2002). Increased noise as an effect of haploinsufficiency of the tumor-suppressor gene neurofibromatosis type 1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13783–13788.
- Keng, V.W., Largaespada, D.A., and Villanueva, A. (2012). Why men are at higher risk for hepatocellular carcinoma? *J. Hepatol.* 57, 453–454.
- Kerr, E.M., Gaude, E., Turrell, F.K., Frezza, C., and Martins, C.P. (2016). Mutant Kras copy number defines metabolic reprogramming and therapeutic susceptibilities. *Nature* 531, 110–113.
- Kfir-Elirachman, K., Ortenberg, R., Vigel, B., Besser, M.J., Barshack, I., Schachter, J., Nemlich, Y., and Markel, G. (2018). Regulation of CEACAM1 Protein Expression by the Transcription Factor ETS-1 in BRAF-Mutant Human Metastatic Melanoma Cells. *Neoplasia N. Y.* N 20, 401–409.

- Kidger, A.M., and Keyse, S.M. (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin. Cell Dev. Biol.* *50*, 125–132.
- Kidger, A.M., Rushworth, L.K., Stellzig, J., Davidson, J., Bryant, C.J., Bayley, C., Caddy, E., Rogers, T., Keyse, S.M., and Caunt, C.J. (2017). Dual-specificity phosphatase 5 controls the localized inhibition, propagation, and transforming potential of ERK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Kim, M.P., and Lozano, G. (2018). Mutant p53 partners in crime. *Cell Death Differ.* *25*, 161–168.
- Kim, W.M., Huang, Y.-H., Gandhi, A., and Blumberg, R.S. (2019). CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications. *Semin. Immunol.* *42*, 101296.
- Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Lücknerath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W.S., Martoglio, B., Hueber, A.-O., et al. (2007). The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ.* *14*, 1678–1687.
- Klein, N.P., and Schneider, R.J. (1997). Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6427–6436.
- Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2005). Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* *105*, 721–727.
- Kocieniewski, P., and Lipniacki, T. (2013). MEK1 and MEK2 differentially control the duration and amplitude of the ERK cascade response. *Phys. Biol.* *10*, 035006.
- Koike, K., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Tsutsumi, T., and Kimura, S. (1998). Compensatory apoptosis in preneoplastic liver of a transgenic mouse model for viral hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* *134*, 181–186.
- Koo, S.-Y., Park, E.-J., and Lee, C.-W. (2020). Immunological distinctions between nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Med.* *52*, 1209–1219.
- Kruijff, E.M. de, Sajet, A., Nes, J.G.H. van, Natanov, R., Putter, H., Smit, V.T.H.B.M., Liefers, G.J., Elsen, P.J. van den, Velde, C.J.H. van de, and Kuppen, P.J.K. (2010). HLA-E and HLA-G Expression in Classical HLA Class I-Negative Tumors Is of Prognostic Value for Clinical Outcome of Early Breast Cancer Patients. *J. Immunol.* *185*, 7452–7459.
- Kuang, D.-M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J.-P., Wu, C., and Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J. Exp. Med.* *206*, 1327–1337.
- Kubes, P., and Mehal, W.Z. (2012). Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* *143*, 1158–1172.
- Kumagai, Y., Naoki, H., Nakasyo, E., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. (2015). Heterogeneity in ERK activity as visualized by in vivo FRET imaging of mammary tumor cells developed in MMTV-Neu mice. *Oncogene* *34*, 1051–1057.
- Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., and Cemazar, M. (2018). Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front. Oncol.* *8*.

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* *367*, 645–648.
- Lavoie, H., and Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 281–298.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 750–761.
- Lee, S.J., Lee, J., Sohn, I., Mao, M., Kai, W., Park, C.-K., and Lim, H.Y. (2013). A Survey of c-MET Expression and Amplification in 287 Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res.* *33*, 5179–5186.
- Lemmon, M.A., Freed, D.M., Schlessinger, J., and Kiyatkin, A. (2016). The Dark Side of Cell Signaling: Positive Roles for Negative Regulators. *Cell* *164*, 1172–1184.
- Levine, A.J., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2019). The Roles of Initiating Truncal Mutations in Human Cancers: The Order of Mutations and Tumor Cell Type Matters. *Cancer Cell* *35*, 10–15.
- Levrero, M., and Zucman-Rossi, J. (2016). Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *64*, S84–S101.
- Li, P., Shan, J.-X., Chen, X.-H., Zhang, D., Su, L.-P., Huang, X.-Y., Yu, B.-Q., Zhi, Q.-M., Li, C.-L., Wang, Y.-Q., et al. (2015). Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell Res.* *25*, 588–603.
- Li, S., Balmain, A., and Counter, C.M. (2018). A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat. Rev. Cancer* *18*, 767–777.
- Li, Y., Chen, J., Wu, C., Wang, L., Lu, M., and Chen, X. (2010). Hepatitis B virus/hepatitis C virus upregulate angiopoietin-2 expression through mitogen-activated protein kinase pathway. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* *40*, 1022–1033.
- Liang, J.T., Chang, K.J., Chen, J.C., Lee, C.C., Cheng, Y.M., Hsu, H.C., Wu, M.S., Wang, S.M., Lin, J.T., and Cheng, A.L. (1999). Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* *57*, 149–156.
- Lidicker, W.Z. (1979). A Clarification of Interactions in Ecological Systems. *BioScience* *29*, 475–477.
- Lim, K.-H., Brady, D.C., Kashatus, D.F., Ancrile, B.B., Der, C.J., Cox, A.D., and Counter, C.M. (2010). Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 508–523.
- Lin, D.-C., Mayakonda, A., Dinh, H.Q., Huang, P., Lin, L., Liu, X., Ding, L.-W., Wang, J., Berman, B.P., Song, E.-W., et al. (2017). Genomic and Epigenomic Heterogeneity of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* *77*, 2255–2265.
- Ling, S., Hu, Z., Yang, Z., Yang, F., Li, Y., Lin, P., Chen, K., Dong, L., Cao, L., Tao, Y., et al. (2015). Extremely high genetic diversity in a single tumor points to prevalence of non-Darwinian cell evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E6496–6505.

- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M., and Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67–68.
- Liou, G.-Y., Döppler, H., Necela, B., Edenfield, B., Zhang, L., Dawson, D.W., and Storz, P. (2015). Mutant KRAS-induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions. *Cancer Discov.* 5, 52–63.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023.
- Llovet, J.M., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., Sangro, B., Schwartz, M., Sherman, M., and Gores, G. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16018.
- Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., Singal, A.G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., and Finn, R.S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 7, 1–28.
- Loechel, F., Fox, J.W., Murphy, G., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2000). ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 511–515.
- Losic, B., Craig, A.J., Villacorta-Martin, C., Martins-Filho, S.N., Akers, N., Chen, X., Ahsen, M.E., Felden, J. von, Labgaa, I., D’Avola, D., et al. (2020). Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer. *Nat. Commun.* 11, 1–15.
- Louvet, A., and Mathurin, P. (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 231–242.
- Lu, S.C., Huang, Z.Z., Yang, H., Mato, J.M., Avila, M.A., and Tsukamoto, H. (2000). Changes in methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine homeostasis in alcoholic rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G178-185.
- Luo, X., and Feng, G.-S. (2014). VEGFA Genomic Amplification Tailors Treatment of HCCs with Sorafenib. *Cancer Discov.* 4, 640–641.
- Lynch, M. (2010). Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 961–968.
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 401–426.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.
- Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J.-C., Touboul, T., Roux, D., Pouysségur, J., and Pagès, G. (2005). Extracellular Signal-Regulated Kinases Phosphorylate Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 3/DUSP6 at Serines 159 and 197, Two Sites Critical for Its Proteasomal Degradation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 854–864.
- Margolis, B., and Skolnik, E.Y. (1994). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 1288–1299.

- Marisi, G., Cucchetti, A., Ulivi, P., Canale, M., Cabibbo, G., Solaini, L., Foschi, F.G., De Matteis, S., Ercolani, G., Valgiusti, M., et al. (2018). Ten years of sorafenib in hepatocellular carcinoma: Are there any predictive and/or prognostic markers? *World J. Gastroenterol.* *24*, 4152–4163.
- Martini, M., De Santis, M.C., Braccini, L., Gulluni, F., and Hirsch, E. (2014). PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann. Med.* *46*, 372–383.
- Marusyk, A., Almendro, V., and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer* *12*, 323–334.
- Marusyk, A., Tabassum, D.P., Altrock, P.M., Almendro, V., Michor, F., and Polyak, K. (2014). Non-cell autonomous tumor-growth driving supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* *514*, 54–58.
- Masrouf-Roudsari, J., and Ebrahimpour, S. (2017). Causal role of infectious agents in cancer: An overview. *Casp. J. Intern. Med.* *8*, 153–158.
- Massarweh, N.N., and El-Serag, H.B. (2017). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* *24*.
- Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.-S., Shea, L.K., et al. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* *482*, 400–404.
- Mazor, T., Pankov, A., Song, J.S., and Costello, J.F. (2016). Intratumoral heterogeneity of the epigenome. *Cancer Cell* *29*, 440–451.
- McCully, M.L., and Madrenas, J. (2006). Dendritic Cells as Arbiters of Peritoneal Immune Responses. *Perit. Dial. Int.* *26*, 8–25.
- McFarland, C.D., Korolev, K.S., Kryukov, G.V., Sunyaev, S.R., and Mirny, L.A. (2013). Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 2910–2915.
- McFarland, C.D., Yaglom, J.A., Wojtkowiak, J.W., Scott, J.G., Morse, D.L., Sherman, M.Y., and Mirny, L.A. (2017). The Damaging Effect of Passenger Mutations on Cancer Progression. *Cancer Res.* *77*, 4763–4772.
- McGlynn, K.A., Petrick, J.L., and El-Serag, H.B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* *n/a*.
- McGranahan, N., Furness, A.J.S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., et al. (2016). Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* *351*, 1463–1469.
- McGranahan, N., Rosenthal, R., Hiley, C.T., Rowan, A.J., Watkins, T.B.K., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Veeriah, S., Van Loo, P., Herrero, J., et al. (2017). Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* *171*, 1259-1271.e11.
- McKay, M.M., Ritt, D.A., and Morrison, D.K. (2009). Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 11022–11027.
- McKay, M.M., Ritt, D.A., and Morrison, D.K. (2011a). RAF inhibitor-induced KSR1/B-RAF binding and its effects on ERK cascade signaling. *Curr. Biol. CB* *21*, 563–568.

- McKay, M.M., Ritt, D.A., and Morrison, D.K. (2011b). Raf Inhibitor-induced KSR1/B-Raf Binding and Its Effects on ERK Cascade Signaling. *Curr. Biol. CB* 21, 563–568.
- Messina, S., Frati, L., Leonetti, C., Zuchegna, C., Di Zazzo, E., Calogero, A., and Porcellini, A. (2011). Dual-specificity phosphatase DUSP6 has tumor-promoting properties in human glioblastomas. *Oncogene* 30, 3813–3820.
- Mikulak, J., Bruni, E., Oriolo, F., Di Vito, C., and Mavilio, D. (2019). Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Front. Immunol.* 10.
- Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity* 40, 642–656.
- Moghadam, A.R., Patrad, E., Tafhiri, E., Peng, W., Fangman, B., Pluard, T.J., Accurso, A., Salacz, M., Shah, K., Ricke, B., et al. (2017). Ral signaling pathway in health and cancer. *Cancer Med.* 6, 2998–3013.
- Molina-Sánchez, P., and Lujambio, A. (2019). Experimental Models for Preclinical Research in Hepatocellular Carcinoma. In *Hepatocellular Carcinoma: Translational Precision Medicine Approaches*, Y. Hoshida, ed. (Cham (CH): Humana Press), p.
- Molina-Sánchez, P., Ruiz de Galarreta, M., Yao, M.A., Lindblad, K.E., Bresnahan, E., Bitterman, E., Martin, T.C., Rubenstein, T., Nie, K., Golas, J., et al. (2020). Cooperation Between Distinct Cancer Driver Genes Underlies Intertumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*.
- Monteran, L., and Erez, N. (2019). The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 10.
- Moreau, M., Rivière, B., Vegna, S., Aoun, M., Gard, C., Ramos, J., Assenat, E., and Hibner, U. (2015). Hepatitis C viral proteins perturb metabolic liver zonation. *J. Hepatol.* 62, 278–285.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLOS ONE* 3, e2888.
- Morgan, T.R., Mandayam, S., and Jamal, M.M. (2004). Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127, S87-96.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* 160, 985–1000.
- Morris, L.G.T., Riaz, N., Desrichard, A., Şenbabaoğlu, Y., Hakimi, A.A., Makarov, V., Reis-Filho, J.S., and Chan, T.A. (2016). Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity as a prognostic determinant of survival. *Oncotarget* 7, 10051–10063.
- Moskalenko, S., Tong, C., Rosse, C., Mirey, G., Formstecher, E., Daviet, L., Camonis, J., and White, M.A. (2003). Ral GTPases Regulate Exocyst Assembly through Dual Subunit Interactions*. *J. Biol. Chem.* 278, 51743–51748.
- Mott, H.R., and Owen, D. (2015). Structures of Ras superfamily effector complexes: What have we learnt in two decades? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50, 85–133.

- Moya, I.M., Castaldo, S.A., Mooter, L.V. den, Soheily, S., Sansores-Garcia, L., Jacobs, J., Mannaerts, I., Xie, J., Verboven, E., Hillen, H., et al. (2019). Peritumoral activation of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ suppresses liver cancer in mice. *Science* 366, 1029–1034.
- Mrazek, A.A., Carmical, J.R., Wood, T.G., Hellmich, M.R., Eltorky, M., Bohanon, F.J., and Chao, C. (2014). Colorectal Cancer-Associated Fibroblasts are Genotypically Distinct. *Curr. Cancer Ther. Rev.* 10, 97–218.
- Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., Konukiewitz, B., Öllinger, R., Zwiebel, M., Strong, A., et al. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* 554, 62–68.
- Munakata, T., Liang, Y., Kim, S., McGivern, D.R., Huibregtse, J., Nomoto, A., and Lemon, S.M. (2007). Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog.* 3, 1335–1347.
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Grace, M., and Huh, K. (2004). Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J. Virol.* 78, 11451–11460.
- Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* 31, 268–275.
- Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.-H., Fingar, D.C., and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* 4, 556–564.
- Murray, C.L., and Rice, C.M. (2011). Turning Hepatitis C into a Real Virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 307–327.
- Muthukkaruppan, V.R., Kubai, L., and Auerbach, R. (1982). Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. *J. Natl. Cancer Inst.* 69, 699–708.
- Nair, A., Chauhan, P., Saha, B., and Kubatzky, K.F. (2019). Conceptual Evolution of Cell Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Nakatani, T., Roy, G., Fujimoto, N., Asahara, T., and Ito, A. (2001). Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 92, 249–256.
- Nault, J.C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., Zucman-Rossi, J., et al. (2013). High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat. Commun.* 4, 2218.
- Nazareth, M.R., Broderick, L., Simpson-Abelson, M.R., Kelleher, R.J., Yokota, S.J., and Bankert, R.B. (2007). Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 5552–5562.
- Negro, F. (2020). Natural history of NASH and HCC. *Liver Int.* 40, 72–76.
- Nekrasova, T., Shive, C., Gao, Y., Kawamura, K., Guardia, R., Landreth, G., and Forsthuber, T.G. (2005). ERK1-deficient mice show normal T cell effector function and are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 2374–2380.

Neureiter, D., Stintzing, S., Kiesslich, T., and Ocker, M. (2019). Hepatocellular carcinoma: Therapeutic advances in signaling, epigenetic and immune targets. *World J. Gastroenterol.* 25, 3136–3150.

Nevozhay, D., Adams, R.M., Murphy, K.F., Josic, K., and Balázsi, G. (2009). Negative autoregulation linearizes the dose-response and suppresses the heterogeneity of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5123–5128.

Newell, P., Villanueva, A., Friedman, S.L., Koike, K., and Llovet, J.M. (2008). Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 48, 858–879.

Nguyen, A., Burack, W.R., Stock, J.L., Kortum, R., Chaika, O.V., Afkarian, M., Muller, W.J., Murphy, K.M., Morrison, D.K., Lewis, R.E., et al. (2002). Kinase Suppressor of Ras (KSR) Is a Scaffold Which Facilitates Mitogen-Activated Protein Kinase Activation In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3035–3045.

Ningarhari, M., Caruso, S., Hirsch, T.Z., Bayard, Q., Franconi, A., Védie, A.-L., Noblet, B., Blanc, J.-F., Amaddeo, G., Ganne, N., et al. (2020). Telomere length is key to hepatocellular carcinoma diversity and telomerase addiction is an actionable therapeutic target. *J. Hepatol.* 0.

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* 2, 213–219.

Norris, J.L., and Baldwin, A.S. (1999). Oncogenic Ras Enhances NF- κ B Transcriptional Activity through Raf-dependent and Raf-independent Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathways *. *J. Biol. Chem.* 274, 13841–13846.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.

O’Connell, J.T., Sugimoto, H., Cooke, V.G., MacDonald, B.A., Mehta, A.I., LeBleu, V.S., Dewar, R., Rocha, R.M., Brentani, R.R., Resnick, M.B., et al. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16002–16007.

Ohm, J.E., Shurin, M.R., Esche, C., Lotze, M.T., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (1999). Effect of vascular endothelial growth factor and FLT3 ligand on dendritic cell generation in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 3260–3268.

Olenyuk, B.Z., Zhang, G.-J., Klco, J.M., Nickols, N.G., Kaelin, W.G., and Dervan, P.B. (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16768–16773.

de Oliveria Andrade, L.J., D’Oliveira, A., Melo, R.C., De Souza, E.C., Costa Silva, C.A., and Paraná, R. (2009). Association Between Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. *J. Glob. Infect. Dis.* 1, 33–37.

Ott, J.J., Stevens, G.A., Groeger, J., and Wiersma, S.T. (2012). Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 30, 2212–2219.

Palma, M.D., Biziato, D., and Petrova, T.V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 17, 457–474.

Papavramidou, N., Papavramidis, T., and Demetriou, T. (2010). Ancient Greek and Greco–Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 665–667.

- Park, P.-H., Lim, R.W., and Shukla, S.D. (2005). Involvement of histone acetyltransferase (HAT) in ethanol-induced acetylation of histone H3 in hepatocytes: potential mechanism for gene expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *289*, G1124-1136.
- Parsons, B.L. (2018). Multiclonal tumor origin: Evidence and implications. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *777*, 1–18.
- Pelon, F., Bourachot, B., Kieffer, Y., Magagna, I., Mermet-Meillon, F., Bonnet, I., Costa, A., Givel, A.-M., Attieh, Y., Barbazan, J., et al. (2020). Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat. Commun.* *11*, 404.
- Pershing, N.L.K., Lampson, B.L., Belsky, J.A., Kaltenbrun, E., MacAlpine, D.M., and Counter, C.M. (2015). Rare codons capacitate *Kras*-driven de novo tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *125*, 222–233.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Huber, A.R., Hoeck, A. van, Wood, H.M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmaso, G., Stege, P.B., et al. (2020). Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks + *E. coli*. *Nature* 1–5.
- Pricl, S., Fermeglia, M., Ferrone, M., and Tamborini, E. (2005). T315I-mutated Bcr-Abl in chronic myeloid leukemia and imatinib: insights from a computational study. *Mol. Cancer Ther.* *4*, 1167–1174.
- Pullikuth, A., McKinnon, E., Schaeffer, H.-J., and Catling, A.D. (2005). The MEK1 Scaffolding Protein MP1 Regulates Cell Spreading by Integrating PAK1 and Rho Signals. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5119–5133.
- Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Bowman, R.L., Sevenich, L., Quail, D.F., Olson, O.C., Quick, M.L., Huse, J.T., Teijeiro, V., et al. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* *19*, 1264–1272.
- Quatela, S.E., and Philips, M.R. (2006). Ras signaling on the Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 162–167.
- Rahman, M., Deleyrolle, L., Vedam-Mai, V., Azari, H., Abd-El-Barr, M., and Reynolds, B.A. (2011). The Cancer Stem Cell Hypothesis Failures and Pitfalls. *Neurosurgery* *68*, 531–545.
- Rao, C.V., Asch, A.S., and Yamada, H.Y. (2017). Frequently mutated genes/pathways and genomic instability as prevention targets in liver cancer. *Carcinogenesis* *38*, 2–11.
- Raoul, J.-L., Forner, A., Bolondi, L., Cheung, T.T., Kloeckner, R., and Baere, T. de (2019). Updated use of TACE for hepatocellular carcinoma treatment: How and when to use it based on clinical evidence. *Cancer Treat. Rev.* *72*, 28–36.
- Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 520–531.
- Reiberger, T., Chen, Y., Ramjiawan, R.R., Hato, T., Fan, C., Samuel, R., Roberge, S., Huang, P., Lauwers, G.Y., Zhu, A.X., et al. (2015). An orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma with underlying liver cirrhosis. *Nat. Protoc.* *10*, 1264–1274.
- Reynolds, S.H., Stowers, S.J., Maronpot, R.R., Anderson, M.W., and Aaronson, S.A. (1986). Detection and identification of activated oncogenes in spontaneously occurring benign and malignant hepatocellular tumors of the B6C3F1 mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 33–37.

- Rinella, M.E., and Green, R.M. (2004). The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J. Hepatol.* *40*, 47–51.
- Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M.C., Morton, J.P., Sansom, O.J., Zender, L., and Keyes, W.M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* *31*, 172–183.
- Ritt, D.A., Blanco, M.A., Bindu, L., Durrant, D.E., Zhou, M., Specht, S.I., Stephen, A.G., Holderfield, M., and Morrison, D.K. (2016). Inhibition of Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Signaling by a Stress-induced Phospho-regulatory Circuit. *Mol. Cell* *64*, 875–887.
- Roberts, E.W., Broz, M.L., Binnewies, M., Headley, M.B., Nelson, A.E., Wolf, D.M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M.F. (2016). Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* *30*, 324–336.
- Robinson, M.W., Harmon, C., and O’Farrelly, C. (2016). Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 267–276.
- Rosseland, C.M., Wierød, L., Flinder, L.I., Oksvold, M.P., Skarpen, E., and Huitfeldt, H.S. (2008). Distinct functions of H-Ras and K-Ras in proliferation and survival of primary hepatocytes due to selective activation of ERK and PI3K. *J. Cell. Physiol.* *215*, 818–826.
- Rous, P. (1910). A TRANSMISSIBLE AVIAN NEOPLASM. (SARCOMA OF THE COMMON FOWL.). *J. Exp. Med.* *12*, 696–705.
- Rowshanravan, B., Halliday, N., and Sansom, D.M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* *131*, 58–67.
- Rygaard, J., and Poulsen, C.O. (1969). Heterotransplantation of a Human Malignant Tumour to “Nude” Mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* *77*, 758–760.
- Saad, M.I., Alhayyani, S., McLeod, L., Yu, L., Alanazi, M., Deswaerte, V., Tang, K., Jarde, T., Smith, J.A., Prodanovic, Z., et al. (2019). ADAM17 selectively activates the IL-6 trans-signaling/ERK MAPK axis in KRAS-addicted lung cancer. *EMBO Mol. Med.* *11*.
- Sahin, F., Kannangai, R., Adegbola, O., Wang, J., Su, G., and Torbenson, M. (2004). mTOR and P70 S6 Kinase Expression in Primary Liver Neoplasms. *Clin. Cancer Res.* *10*, 8421–8425.
- Sambi, M., Bagheri, L., and Szewczuk, M.R. (2019). Current Challenges in Cancer Immunotherapy: Multimodal Approaches to Improve Efficacy and Patient Response Rates (Hindawi).
- Sanyal, A.J., Yoon, S.K., and Lencioni, R. (2010). The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *The Oncologist* *15 Suppl 4*, 14–22.
- Sarkisian, C.J., Keister, B.A., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Moody, S.E., and Chodosh, L.A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 493–505.
- Scarlett, U.K., Rutkowski, M.R., Rauwerdink, A.M., Fields, J., Escovar-Fadul, X., Baird, J., Cubillos-Ruiz, J.R., Jacobs, A.C., Gonzalez, J.L., Weaver, J., et al. (2012). Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J. Exp. Med.* *209*, 495–506.

- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333–338.
- Schulze, K., Nault, J.-C., and Villanueva, A. (2016). Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J. Hepatol.* 65, 1031–1042.
- Seeger, C., and Mason, W.S. (2015). Molecular Biology of Hepatitis B Virus Infection. *Virology* 0, 672–686.
- Seehawer, M., Heinzmann, F., D’Artista, L., Harbig, J., Roux, P.-F., Hoenicke, L., Dang, H., Klotz, S., Robinson, L., Doré, G., et al. (2018). Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer. *Nature* 562, 69–75.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
- Shalapour, S., Lin, X.-J., Bastian, I.N., Brain, J., Burt, A.D., Aksenov, A.A., Vrbanac, A.F., Li, W., Perkins, A., Matsutani, T., et al. (2017). Inflammation-induced IgA+ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature* 551, 340–345.
- Sharma, A., Merritt, E., Hu, X., Cruz, A., Jiang, C., Sarkodie, H., Zhou, Z., Malhotra, J., Riedlinger, G.M., and De, S. (2019). Non-Genetic Intra-Tumor Heterogeneity Is a Major Predictor of Phenotypic Heterogeneity and Ongoing Evolutionary Dynamics in Lung Tumors. *Cell Rep.* 29, 2164-2174.e5.
- Shimasaki, N., Jain, A., and Campana, D. (2020). NK cells for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 19, 200–218.
- Shin, S.-Y., Rath, O., Choo, S.-M., Fee, F., McFerran, B., Kolch, W., and Cho, K.-H. (2009). Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J. Cell Sci.* 122, 425–435.
- Shulman, M., and Nahmias, Y. (2013). Long-Term Culture and Coculture of Primary Rat and Human Hepatocytes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 945, 287–302.
- Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S.L., and Llovet, J.M. (2017). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology* 152, 745–761.
- Simanshu, D.K., Nissley, D.V., and McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 170, 17–33.
- Simonin, Y., Disson, O., Lerat, H., Antoine, E., Binamé, F., Rosenberg, A.R., Desagher, S., Lassus, P., Bioulac-Sage, P., and Hibner, U. (2009). Calpain activation by hepatitis C virus proteins inhibits the extrinsic apoptotic signaling pathway. *Hepatol. Baltim. Md* 50, 1370–1379.
- Simonin, Y., Vegna, S., Akkari, L., Grégoire, D., Antoine, E., Piette, J., Floc’h, N., Lassus, P., Yu, G.-Y., Rosenberg, A.R., et al. (2013). Lymphotoxin Signaling Is Initiated by the Viral Polymerase in HCV-linked Tumorigenesis. *PLOS Pathog.* 9, e1003234.
- Singer, B., and Kuśmierk, J.T. (1982). Chemical mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 655–693.
- Singh, A., and Soltani, M. (2013). Quantifying Intrinsic and Extrinsic Variability in Stochastic Gene Expression Models. *PLoS ONE* 8.

- Slagle, B.L., Lee, T.H., Medina, D., Finegold, M.J., and Butel, J.S. (1996). Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol. Carcinog.* *15*, 261–269.
- Sliz, A., Locker, K.C.S., Lampe, K., Godarova, A., Plas, D.R., Janssen, E.M., Jones, H., Herr, A.B., and Hoebe, K. (2019). Gab3 is required for IL-2- and IL-15-induced NK cell expansion and limits trophoblast invasion during pregnancy. *Sci. Immunol.* *4*.
- Sottoriva, A., Kang, H., Ma, Z., Graham, T.A., Salomon, M.P., Zhao, J., Marjoram, P., Siegmund, K., Press, M.F., Shibata, D., et al. (2015). A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat. Genet.* *47*, 209–216.
- Spiliotis, J., Nikolaou, G., Kopanakis, N., Vassiliadou, D., Terra, A., and Efstathiou, E. (2017). Hepatocellular Carcinoma Peritoneal Metastasis: Role of Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC). *Gulf J. Oncolog.* *1*, 20–23.
- Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* *523*, 231–235.
- Stearns, S.C. (2000). Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften* *87*, 476–486.
- Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., et al. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* *144*, 27–40.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* *458*, 719–724.
- Strick-Marchand, H., and Weiss, M.C. (2002). Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology* *36*, 794–804.
- Strick-Marchand, H., and Weiss, M.C. (2003). Embryonic liver cells and permanent lines as models for hepatocyte and bile duct cell differentiation. *Mech. Dev.* *120*, 89–98.
- Strick-Marchand, H., Morosan, S., Charneau, P., Kremsdorf, D., and Weiss, M.C. (2004). Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8360–8365.
- Strippoli, R., Benedicto, I., Lozano, M.L.P., Cerezo, A., López-Cabrera, M., and Pozo, M.A. del (2008). Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF- κ B/Snail1 pathway. *Dis. Model. Mech.* *1*, 264–274.
- Stuelten, C.H., Byfield, S.D., Arany, P.R., Karpova, T.S., Stetler-Stevenson, W.G., and Roberts, A.B. (2005). Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- α and TGF- β . *J. Cell Sci.* *118*, 2143–2153.
- Suda, T., Tatsumi, T., Nishio, A., Kegasawa, T., Yoshioka, T., Yamada, R., Furuta, K., Kodama, T., Shigekawa, M., Hikita, H., et al. (2018). CEACAM1 Is Associated With the Suppression of Natural Killer Cell Function in Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepatology* *68*, 1247–1258.
- Sun, X., Wang, S.C., Wei, Y., Luo, X., Jia, Y., Li, L., Gopal, P., Zhu, M., Nassour, I., Chuang, J.-C., et al. (2017). Arid1a has context-dependent oncogenic and tumor suppressor functions in liver cancer. *Cancer Cell* *32*, 574–589.e6.

Sutherland, E.W., and Rall, T.W. (1957). THE PROPERTIES OF AN ADENINE RIBONUCLEOTIDE PRODUCED WITH CELLULAR PARTICLES, ATP, Mg⁺⁺, AND EPINEPHRINE OR GLUCAGON. *J. Am. Chem. Soc.* *79*, 3608–3608.

Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 471–485.

Syed, G.H., Amako, Y., and Siddiqui, A. (2010). Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *21*, 33–40.

Szabo, G., and Bala, S. (2010). Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J. Gastroenterol.* *16*, 1321–1329.

Szerlip, N.J., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., Ozawa, T., Holland, E.C., Huse, J.T., Jhanwar, S., et al. (2012). Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 3041–3046.

Tabassum, D.P., and Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 473–483.

Tajan, M., Paccoud, R., Branka, S., Edouard, T., and Yart, A. (2018). The RASopathy Family: Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway. *Endocr. Rev.* *39*, 676–700.

Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Yamamoto, S., Fujiwara, T., Tanaka, N., and Yokota, J. (2007). Clonal and Parallel Evolution of Primary Lung Cancers and Their Metastases Revealed by Molecular Dissection of Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* *13*, 111–120.

Takeda, H., Wei, Z., Koso, H., Rust, A.G., Yew, C.C.K., Mann, M.B., Ward, J.M., Adams, D.J., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2015). Transposon mutagenesis identifies genes and evolutionary forces driving gastrointestinal tract tumor progression. *Nat. Genet.* *47*, 142–150.

Tanaka, M., and Miyajima, A. (2016). Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm. Regen.* *36*, 19.

Tang, W., Chen, Z., Zhang, W., Cheng, Y., Zhang, B., Wu, F., Wang, Q., Wang, S., Rong, D., Reiter, F.P., et al. (2020). The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct. Target. Ther.* *5*, 1–15.

Tanooka, H. (1988). Monoclonal Growth of Cancer Cells: Experimental Evidence. *Jpn. J. Cancer Res.* *79*, 657–665.

Terradillos, O., Billet, O., Renard, C.A., Levy, R., Molina, T., Briand, P., and Buendia, M.A. (1997). The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* *14*, 395–404.

Terradillos, O., Pollicino, T., Lecoeur, H., Tripodi, M., Gougeon, M.L., Tiollais, P., and Buendia, M.A. (1998). p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene* *17*, 2115–2123.

Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 753–766.

Thorson, J.A., Yu, L.W.K., Hsu, A.L., Shih, N.-Y., Graves, P.R., Tanner, J.W., Allen, P.M., Piwnica-Worms, H., and Shaw, A.S. (1998). 14-3-3 Proteins Are Required for Maintenance of Raf-1 Phosphorylation and Kinase Activity. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5229–5238.

Tomasetti, C., Li, L., and Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* *355*, 1330–1334.

Torrecilla, S., Sia, D., Harrington, A.N., Zhang, Z., Cabellos, L., Cornella, H., Moeini, A., Camprecios, G., Leow, W.-Q., Fiel, M.I., et al. (2017). Trunk mutational events present minimal intra- and inter-tumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *67*, 1222–1231.

Torres, C.M., Biran, A., Burney, M.J., Patel, H., Henser-Brownhill, T., Cohen, A.-H.S., Li, Y., Ben-Hamo, R., Nye, E., Spencer-Dene, B., et al. (2016). The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science* *353*.

Torroella-Kouri, M., Silvera, R., Rodriguez, D., Caso, R., Shatry, A., Opiela, S., Ilkovitch, D., Schwendener, R.A., Iragavarapu-Charyulu, V., Cardentey, Y., et al. (2009). Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Res.* *69*, 4800–4809.

Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C.J., Cohen, P., and Ullrich, A. (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr. Biol.* *4*, 694–701.

Turajlic, S., Sottoriva, A., Graham, T., and Swanton, C. (2019). Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat. Rev. Genet.* *20*, 404–416.

Ünal, E.B., Uhlitz, F., and Blüthgen, N. (2017). A compendium of ERK targets. *FEBS Lett.* *591*, 2607–2615.

Vaidyanathan, H., and Ramos, J.W. (2003). RSK2 Activity Is Regulated by Its Interaction with PEA-15. *J. Biol. Chem.* *278*, 32367–32372.

Varley, J.M. (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* *21*, 313–320.

Vatsyayan, R., Lelsani, P.C.R., Awasthi, S., and Singhal, S.S. (2010). RLIP76: A versatile transporter and an emerging target for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* *79*, 1699–1705.

Verna, L., Whysner, J., and Williams, G.M. (1996). N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* *71*, 57–81.

Viel, S., Marçais, A., Guimaraes, F.S.-F., Loftus, R., Rabilloud, J., Grau, M., Degouve, S., Djebali, S., Sanlaville, A., Charrier, E., et al. (2016). TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.* *9*, ra19.

Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* *18*, 683–695.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 755–768.

- Vitiello, P.P., Cardone, C., Martini, G., Ciardiello, D., Belli, V., Matrone, N., Barra, G., Napolitano, S., Della Corte, C., Turano, M., et al. (2019). Receptor tyrosine kinase-dependent PI3K activation is an escape mechanism to vertical suppression of the EGFR/RAS/MAPK pathway in KRAS-mutated human colorectal cancer cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *38*, 41.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* *339*, 1546–1558.
- Vomastek, T., Schaeffer, H.-J., Tarcsafalvi, A., Smolkin, M.E., Bissonette, E.A., and Weber, M.J. (2004). Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 6981–6986.
- Walker, C., Mojares, E., and del Río Hernández, A. (2018). Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Walker, E.J., Rosenberg, S.A., Wands, J.R., and Kim, M. (2011). Role of Raf Kinase Inhibitor Protein in Hepatocellular Carcinoma. *Forum Immunopathol. Dis. Ther.* *2*, 195–204.
- Wang, H.P., and Rogler, C.E. (1991). Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro. *J. Virol.* *65*, 2381–2392.
- Wang, J., Zindy, F., Chenivesse, X., Lamas, E., Henglein, B., and Bréchet, C. (1992). Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* *7*, 1653–1656.
- Wang, M.-T., Holderfield, M., Galeas, J., Delrosario, R., To, M.D., Balmain, A., and McCormick, F. (2015). K-Ras Promotes Tumorigenicity through Suppression of Non-canonical Wnt Signaling. *Cell* *163*, 1237–1251.
- Wang, R., Ferrell, L.D., Faouzi, S., Maher, J.J., and Bishop, J.M. (2001). Activation of the Met Receptor by Cell Attachment Induces and Sustains Hepatocellular Carcinomas in Transgenic Mice. *J. Cell Biol.* *153*, 1023–1034.
- Wang, X.W., Gibson, M.K., Vermeulen, W., Yeh, H., Forrester, K., Stürzbecher, H.W., Hoeijmakers, J.H., and Harris, C.C. (1995). Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res.* *55*, 6012–6016.
- Waxman, D.J., and Azaroff, L. (1992). Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* *281 (Pt 3)*, 577–592.
- Wculek, S.K., Cueto, F.J., Mujal, A.M., Melero, I., Krummel, M.F., and Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 7–24.
- Weber, C.K., Slusky, J.R., Kalmes, H.A., and Rapp, U.R. (2001). Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res.* *61*, 3595–3598.
- Weber, K., Thomaschewski, M., Warlich, M., Volz, T., Cornils, K., Niebuhr, B., Täger, M., Lütgehetmann, M., Pollok, J.-M., Stocking, C., et al. (2011). RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat. Med.* *17*, 504–509.
- Wei, S.C., Fattet, L., Tsai, J.H., Guo, Y., Pai, V.H., Majeski, H.E., Chen, A.C., Sah, R.L., Taylor, S.S., Engler, A.J., et al. (2015). Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat. Cell Biol.* *17*, 678–688.

- Wheeler, D.A., and Roberts, L.R. (2017). Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell* 169, 1327-1341.e23.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E413-422.
- White, E., and DiPaola, R.S. (2009). The Double-edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5308–5316.
- Whitehurst, A.W., Robinson, F.L., Moore, M.S., and Cobb, M.H. (2004). The Death Effector Domain Protein PEA-15 Prevents Nuclear Entry of ERK2 by Inhibiting Required Interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 12840–12847.
- Wiemann, S.U., Satyanarayana, A., Tshuridu, M., Tillmann, H.L., Zender, L., Klempnauer, J., Flemming, P., Franco, S., Blasco, M.A., Manns, M.P., et al. (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 935–942.
- Williams, M.J., Werner, B., Barnes, C.P., Graham, T.A., and Sottoriva, A. (2016). Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat. Genet.* 48, 238–244.
- Wimmer, R., and Baccarini, M. (2010). Partner exchange: protein-protein interactions in the Raf pathway. *Trends Biochem. Sci.* 35, 660–668.
- van der Windt, D.J., Sud, V., Zhang, H., Varley, P.R., Goswami, J., Yazdani, H.O., Tohme, S., Loughran, P., O’Doherty, R.M., Minervini, M.I., et al. (2018). NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS PROMOTE INFLAMMATION AND DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS. *Hepatology*. Baltimore, Md 68, 1347–1360.
- Wiseman, R.W., Stowers, S.J., Miller, E.C., Anderson, M.W., and Miller, J.A. (1986). Activating mutations of the c-Ha-ras protooncogene in chemically induced hepatomas of the male B6C3 F1 mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5825–5829.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J.C., and Xu, T. (2010). Interaction between Ras V12 and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature* 463, 545–548.
- Wunderlich, V. (2002). JMM — Past and Present. *J. Mol. Med.* 80, 545–548.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 496, 445–455.
- Xiao, L., Gong, L.-L., Yuan, D., Deng, M., Zeng, X.-M., Chen, L.-L., Zhang, L., Yan, Q., Liu, J.-P., Hu, X.-H., et al. (2010). Protein phosphatase-1 regulates Akt1 signal transduction pathway to control gene expression, cell survival and differentiation. *Cell Death Differ.* 17, 1448–1462.
- Xu, W., Zhao, Z.-Y., An, Q.-M., Dong, B., Lv, A., Li, C., Guan, X.-Y., Tian, X.-Y., Wu, J.-H., and Hao, C.-Y. (2020). Comprehensive comparison of patient-derived xenograft models in Hepatocellular Carcinoma and metastatic Liver Cancer. *Int. J. Med. Sci.* 17, 3073–3081.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656–660.

- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J.F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 24052–24056.
- Yau, T., Park, J.W., Finn, R.S., Cheng, A.-L., Mathurin, P., Edeline, J., Kudo, M., Han, K.-H., Harding, J.J., Merle, P., et al. (2019). LBA38_PR - CheckMate 459: A randomized, multi-center phase III study of nivolumab (NIVO) vs sorafenib (SOR) as first-line (1L) treatment in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (aHCC). *Ann. Oncol.* *30*, v874–v875.
- Youn, A., Kim, K.I., Rabadan, R., Tycko, B., Shen, Y., and Wang, S. (2018). A pan-cancer analysis of driver gene mutations, DNA methylation and gene expressions reveals that chromatin remodeling is a major mechanism inducing global changes in cancer epigenomes. *BMC Med. Genomics* *11*.
- Yuan, Y. (2016). Spatial Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *6*.
- Zafra, M.P., Parsons, M.J., Kim, J., Alonso-Curbelo, D., Goswami, S., Schatoff, E.M., Han, T., Katti, A., Fernandez, M.T.C., Wilkinson, J.E., et al. (2020). An In Vivo Kras Allelic Series Reveals Distinct Phenotypes of Common Oncogenic Variants. *Cancer Discov.* *10*, 1654–1671.
- Zavala, V.A., and Kalergis, A.M. (2015). New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology* *145*, 182–201.
- Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A., and Seger, R. (2010). The subcellular localization of MEK and ERK—a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol. Cell. Endocrinol.* *314*, 213–220.
- Zhai, W., Lim, T.K.-H., Zhang, T., Phang, S.-T., Tiang, Z., Guan, P., Ng, M.-H., Lim, J.Q., Yao, F., Li, Z., et al. (2017). The spatial organization of intra-tumour heterogeneity and evolutionary trajectories of metastases in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* *8*, 4565.
- Zhang, M., Zhang, C., Zhang, L., Yang, Q., Zhou, S., Wen, Q., and Wang, J. (2015). Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* *15*, 531.
- Zhang, Y., Yan, W., Collins, M.A., Bednar, F., Rakshit, S., Zetter, B.R., Stanger, B.Z., Chung, I., Rhim, A.D., and di Magliano, M.P. (2013). Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. *Cancer Res.* *73*, 6359–6374.
- Zhang, Z., Wang, Y., Vikis, H.G., Johnson, L., Liu, G., Li, J., Anderson, M.W., Sills, R.C., Hong, H.L., Devereux, T.R., et al. (2001). Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat. Genet.* *29*, 25–33.
- Zhao, L., and Vogt, P.K. (2010). Hot-spot mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase (p13K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 596–600.
- Zhao, L.-J., Wang, L., Ren, H., Cao, J., Li, L., Ke, J.-S., and Qi, Z.-T. (2005). Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp. Cell Res.* *305*, 23–32.
- Zheng, H., Pomyen, Y., Hernandez, M.O., Li, C., Livak, F., Tang, W., Dang, H., Greten, T.F., Davis, J.L., Zhao, Y., et al. (2018). Single cell analysis reveals cancer stem cell heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *68*, 127–140.

Zimmerman, H.J., and Lewis, J.H. (1995). Chemical- and toxin-induced hepatotoxicity. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 24, 1027–1045.

Zucman-Rossi, J., Benhamouche, S., Godard, C., Boyault, S., Grimber, G., Balabaud, C., Cunha, A.S., Bioulac-Sage, P., and Perret, C. (2007). Differential effects of inactivated Axin1 and activated β -catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 26, 774–780.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C., and Llovet, J.M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 149, 1226-1239.e4.