



HAL
open science

Biomarqueurs et nouvelles approches thérapeutiques ciblant les cellules souches cancéreuses dans le carcinome hépatocellulaire

Yoann Daniel

► **To cite this version:**

Yoann Daniel. Biomarqueurs et nouvelles approches thérapeutiques ciblant les cellules souches cancéreuses dans le carcinome hépatocellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B021 . tel-03545891

HAL Id: tel-03545891

<https://theses.hal.science/tel-03545891>

Submitted on 27 Jan 2022

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

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

Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « *Cancérologie* »

Par

Yoann DANIEL

« **Biomarqueurs et nouvelles approches thérapeutiques ciblant les cellules souches cancéreuses dans le carcinome hépatocellulaire** »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13 septembre 2021

Unité de recherche : UMR 1241 Institut NUMECAN « Nutrition, Métabolismes et Cancer »

Rapporteurs avant soutenance :

Pascale Bossard - Chargée de recherche - INSERM U1016 - CNRS UMR8104 - Institut Cochin – Paris - France

Rodrigue Rossignol - Directeur de recherche - INSERM U1211 - Université de Bordeaux -Bordeaux - France

Composition du Jury :

Jamila Faivre – Professeure des universités-praticienne hospitalière - INSERM U1193 - Université Paris-Sud – Paris – France / **Présidente**

Pascale Bossard - Chargée de recherche - INSERM U1016 - CNRS UMR8104 - Institut Cochin – Paris – France / **Rapportrice**

Rodrigue Rossignol - Directeur de recherche - INSERM U1211 - Université de Bordeaux -Bordeaux – France / **Rapporteur**

Béatrice Desvergne – Professeure émérite – Centre de génomique intégrative - Faculté de biologie et de médecine - Lausanne – Suisse / **Examinatrice**

Philippe Legrand – Professeur – Unité Biochimie et Nutrition Humaine – Agrocampus Ouest – Rennes – France / **Examineur**

Anne Corlu – Directrice de recherche – INSERM U1241 – Institut NuMeCan – Rennes – France / **Directrice de thèse**

Florian Cabillic – Maître de conférences des universités-praticien hospitalier - INSERM U1241 – Institut NuMeCan – Rennes – France / **Co-directeur de thèse**

« La vérité recule, mais le savant avance. »

Henri Poincaré

Remerciements :

Le partage, l'échange et la communication font partie, à mes yeux, des critères essentiels à la réussite d'un projet de recherche. Les personnes ayant participé de près ou de loin à ces travaux trouveront ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je veux tout d'abord remercier mes deux directeurs de thèse **Anne Corlu** et **Florian Cabillic**. Merci à vous deux d'avoir cru en moi de mes débuts en stage de Master 2 jusqu'à la fin de mon doctorat. Je vous remercie également pour vos conseils, votre disponibilité et votre gentillesse. Je vous remercie également de m'avoir fait bénéficier de votre enseignement et de votre expérience qui m'ont aidé à mûrir en tant que chercheur. Nos discussions professionnelles et personnelles vont beaucoup me manquer.

Je tiens à remercier les docteurs **Pascale Bossard** et **Rodrigue Rossignol** de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Mes remerciements vont également aux docteurs **Jamila Faivre** et **Phillipe Legrand** ainsi qu'au professeure émérite **Béatrice Desvergne** pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de mon travail en me faisant l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie également les docteurs **Anne Dubart-Kupperschmitt**, **Dominique Lagadic-Gossmann** et **Giulia Bertolin** pour m'avoir accompagné au cours de ma thèse dans le cadre du comité de suivi de thèse.

Je veux maintenant à remercier les membres de l'institut NuMeCan :

Je remercie **Claudine Rauch** pour l'aide qu'elle m'a apportée dans les dernières expériences de ma thèse. Merci de ton soutien et de ta bonne humeur qui m'ont accompagné dans mon travail. J'espère que tu vas profiter de ta retraite amplement méritée. Je veux remercier **Claude Bendavid** pour son aide dans les dosages de surnageant de culture au service Biochimie du CHU de Pontchaillou. Merci à **Luis Cano** et **Lise Desquilles** pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans mon travail sur les PPAR dans le carcinome hépatocellulaire. Je tiens pareillement à remercier **Xhaferr Tanushi**, étudiant de master 2, pour son aide dans mes dernières expériences d'extraction des acides gras.

Je remercie également **Bernard Fromenty** pour son expertise sur les mitochondries et le métabolisme qui m'ont beaucoup aidé dans la compréhension des résultats de mon travail. Je remercie **Vincent Rioux** et **Daniel Catheline** de m'avoir initié au monde complexe des lipides. Merci pour votre aide dans l'extraction et l'analyse des lipides. Je tiens aussi à remercier **Orlando Musso** pour son expertise d'anatomo-pathologiste et son aide dans l'immunohistochimie des coupes de CHC. Merci également à **Camille Savary** qui m'a encadré mon stage de master 2. La formation qu'elle m'a apportée a contribué à la réussite de ce projet.

Je veux aussi remercier **Caroline Aninat** pour ses conseils, son humour, son accent du sud et sa bonne humeur. J'espère que nous pourrons faire un 10 ou 20 km ensemble un jour. Merci à **Tatiana Victoni** pour son amitié qui m'a beaucoup apporté au cours de ma thèse. Ta jovialité et ton accent brésilien me manquent beaucoup. Merci à **Catherine Ribault** pour son écoute et sa bonne humeur. Les petits travaux de déménagements dans ton appartement m'ont permis de souffler un peu durant la rédaction.

Je tiens bien sûr à remercier les autres membres de l'institut NuMeCan avec qui j'ai eu beaucoup de plaisirs à travailler ou à échanger : **Karima Begriche, Annaig Lan, Thomas Gicquel, Pascal Loyer, Olivier Loréal, Aude Bodin, Julie Massart, Julie Bronsard, Patricia Leroyer, Isabelle Canie, Karen Bourges, Grégory Pinon, Pierre-Jean Ferron** et **Gaëlle Angenard**.

Je veux de même remercier les membres du secrétariat pour leurs disponibilités, leurs aides dans les démarches administratives, mais aussi pour la bonne humeur et la gentillesse qu'ils véhiculent : **Patricia Jouas, Michèle Le Guennec, Adina Pascu** et **Thomas Poussou**.

Je tiens évidemment à remercier les anciens et nouveaux doctorants pour leurs aides, leurs soutiens et leurs amitiés : **Yann Verres, Élise Lelou, Clémence Penhoat, Corentin Louis, Élise Vene, Matthis Desoteux, Simon Bucher, Dounia Le Guilloux, Émile Boyer, Mussa Kenawi, Brendan Le Daré, Thomas Gautier, Sarah Rochdi, Thomas Guerbette**. Je veux remercier plus particulièrement **Kilian Petitjean, Kévin Bevant** et **Julien Allard** pour leur amitié sans faille depuis mes premiers pas dans la recherche. **Kilian Petitjean**, merci pour ton amitié qui m'a beaucoup aidé et merci également de m'avoir initié à ma nouvelle passion, la plongée.

Je remercie de nouveau **Kilian Petitjean, Yann Verres, Élise Lelou, Thomas Gautier et Sarah Rochdi** pour les nombreuses séances de sport que nous avons fait ensemble. Elles m'ont permis de souffler pendant ma rédaction.

Je veux aussi remercier les personnes ne faisant pas partie de NuMeCan, mais qui ont contribué à ce projet :

Laurent Deleurme pour le tri cellulaire et la cytométrie ; **Stéphanie Dutertre** pour la microscopie confocale ; **Agnès Burel, Aurélien Dupont et Marie-Thérèse Lavault** pour la microscopie électronique ; **Brigitte Frénot** pour les dosages de surnageant ; **Rémy Leguevel** pour les tests de normalisation des plaques Seahorse.

Je remercie également mes ami(e)s de Saint-Brieuc de m'avoir soutenu malgré l'éloignement et les chemins différents. Nous avons toujours su nous retrouver et nos moments passés ensemble m'ont permis de relâcher la pression de la thèse. Merci à mes plus vieux amis **Florian Quero et Benjamin Lambert**. Merci à **Julien Lamour, Antoine Gauvin, Thomas Pochon, Alan Nicol, Marine Jegou, Romane Boinet, Rachel Le Roux et Virginie Cabelguen**.

Enfin, j'aimerais dédier ce travail à ma famille qui a toujours été là pour moi. Je veux remercier mon frère **Ronan** ainsi que mes sœurs **Marine, Soizic et Rozenn**. Votre affection m'a porté dans mon travail. Je veux aussi profondément remercier mes parents, **Claude et Françoise**. Votre soutien et vos valeurs ont participé à façonner ce travail. Vous m'avez toujours soutenu surtout dans les moments difficiles et vous avez toujours appuyé mon choix de faire une thèse. Sans vous, ce travail n'aurait pas été possible.

Je veux aussi dédier ce travail à une personne qui a été mon phare durant cette thèse. Je veux finalement remercier ma compagne **Alicia**. Les mots sont insuffisants pour retranscrire la reconnaissance que j'ai pour toi. Tu as toujours cru en moi et tu m'as toujours encouragé au cours de ma thèse. Tu m'as soutenu dans les moments difficiles et tu as su effacer mes peurs et mes doutes. Pour moi, c'est toi qui mériterais le titre de docteur, car sans toi, rien de tout ceci n'aurait été possible. Merci pour ta patience, ta compréhension et ton soutien indéfectible à mon égard.

Liste des abréviations :

15d-PGJ2 :15-déoxy- Δ 12,14-

prostaglandine J2

166Ho: Holmium 166

188Re: Rhénium-188

2-AAF : 2-acétylamino fluorène

2-DG : 2-déoxy glucose

4-PBA : Acide 4-phénylbutyrique

90Y: Yttrium-90

α -SMA : Actine musculaire lisse α

ABCG2: ATP Binding cassette subfamily

G

ACACA : Acétyl-CoA carboxylase α

ACADS : acyl-Coenzyme A

déshydrogénase des chaîne courtes

ACAT : Acétyl coenzyme A

acétyltransférase

ACLY : ATP citrate lyase

ADAM : A disintegrin/metalloproteinase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : Acide désoxyribonucléique
mitochondrial

AGCC : Acide gras à courte chaîne

AGL : Acide gras libre

AGI : Acide gras insaturé

AGL : Acide gras saturé

AGLC : Acide gras à longue chaîne

AGMC : Acide gras à chaîne moyenne

AGMI : Acide gras mono-insaturé

AGPI : Acide gras poly-insaturé

AGTLC : Acide gras à très longue chaîne

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ADP: Adénosine diphosphate

AF: Activator function

AFP : α -fœtoprotéine

AGPAT : 1-acylglycérol-3-phosphate
acyltransférases

AICAR : 5-aminoimidazole-4-
carboxamide ribonucléotide

AJCC: American joint committee on
cancer

AKT : Protéine kinase B

ALDH1 : aldéhyde déshydrogénase 1

AML : leucémie myéloïde aiguë

ANGPTL4: Angiopoïétin like 4

ARALAR : Échangeur glutamate/aspartate

ASC : Transporteurs Na^+ préférentiels de
l'alanine, la sérine et la cystéine

ATAD3: ATPase family AAA domain
containing 3A

ATP : Adénosine triphosphate

BDH1 : β -hydroxy butyrate
déshydrogénase

BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer

B/C-RAF : proto-oncogène RAF,
sérines/thréonines kinases

BMP : Protéine morphogénétique osseuse

BTSC : Cellules souches de tumeur du
cerveau

CAF : Fibroblastes associés au cancer

CCL₄ : Tétrachlorure de carbone

CD : Cluster de différenciation

CDE : Régime déficient en choline et
supplémenté en éthionine
C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein
 α
CEUS : Imagerie échographique à
renforcement de contraste
CHC : Carcinome hépatocellulaire
CHL : Protéine Von Hippel-Lindau
CK : Cytokératine
C-KIT : Proto-oncogène récepteur tyrosine
kinase kit
CLIP: Cancer of the liver italian program
CML : Leucémie myéloïde chronique
MYC : proto-oncogène MYC, facteur de
transcription BHLH
CoA/CoASH : Coenzyme A
CoQ : Coenzyme Q
COX : Cytochrome C oxydase
CPT : Carnitine palmitoyl-transférases
CRP : Protéine C-réactive
CS/P : Cellules souches/progénitrices
CSC : Cellules souches cancéreuses
CT : Tomodensitométrie
CTNNB1: β -caténine 1
CTP: Child-Turcotte-Pugh
CYP450 : Cytochrome P450
monooxygénase
DAMP : Motifs moléculaires associés aux
dommages
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
DCA : Dichloroacétate
DCP : Prothrombine des-gamma-
carboxyprothrombine

DGAT1/2 : Diacylglycérol O-acyltransférase
1/2
DHCA : Acide ditrihydroxycholestanoïque
DHh: Desert Hedgehog
DMS : Diméthylsulfoxyde
DNL : Lipogenèse *de novo*
DRP1/DNM1L: Protéine 1 apparentée à la
dynamine
DWI : Imagerie pondérée par diffusion
ES : Cellules souches embryonnaires
ECM : Matrice extracellulaire
ECOG : Groupe coopératif d'oncologie de
l'Est
EGF : Facteur de croissance épidermique
EGFR : Récepteur du Facteur de
croissance épidermique
EMT : Transition épithélio-
mésenchymateuse
EPCAM : Molécule d'adhésion des cellules
épithéliales
ERK : Kinases régulées par les signaux
extracellulaires 1/2
FABP : Protéines de liaison des acides gras
FAD/FADH₂ : Flavine adénine
dinucléotide
FADS : Désaturases des acides gras
FAH : Fumarylacetoacétate hydrolase
FAP : Protéine d'activation fibroblastique
 α
FASN : Acide gras synthase
FAT/CD36 : Translocase des acides gras
CD36 / cluster de différenciation 36
FATP : Protéines de transport des acides
gras

FFAR1 : Récepteur des acides gras libres
FGF : Facteur de croissance fibroblastique
FIS1 : Protéine de fission 1
FLT3 : Récepteur tyrosine kinase FMS 3
FOXL1: Forkhead box L1
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate
déshydrogénase
G6P : Glucose-6-phosphatase
G6PD: Glucose-6-phosphate
déshydrogénase
GC1 : Transporteur du glutamate
mitochondrial 1
GCLC : Glutamate-cystéine ligase
GED : Domaine effecteur GTPase
GLI : Protéines homologues de l'oncogène
associé aux gliomes
GLS : Glutaminase
GLUT : Transporteurs membranaires du
glucose
GP130 : Glycoprotéine 130
GP73 : Protéine du Golgi 73
GPAT : Glycérol-3-phosphate
acyltransférases
GPC3 : Protéine glypican 3
GRETCH : Groupe d'étude et de
traitement du carcinome hépatocellulaire
GSH/GSSG : Glutathion
GSK-J4 : 3-((6-(4,5-dihydro-1H-
benzo[d]azépine-3(2H)-yl)-2-(pyridin-2-
yl)pyrimidin-4-yl)amino)propanoate
d'éthyle
GSS : Glutathion synthase
GST : Glutathion S-transférase
GTP : Guanosine triphosphate

HB-EGF : Héparine liant l'EGF
HGF : Facteur de croissance des
hépatocytes
HGFR : Récepteur du facteur de croissance
des hépatocytes
Hh : Hedgehog
HIF : Facteurs inducteurs d'hypoxie
HK2 : Hexokinase 2
HKLC: Hong Kong Liver Cancer
HMG-CoA : 3-Hydroxy-3-méthyle-
glutaryl-coenzyme A
HMGCS2 : 3-Hydroxy-3-méthyle-glutaryl-
CoA synthase
HNF1A : Facteur nucléaire 1- α des
hépatocytes
HNSCC : Cellules épithéliales de
carcinome épidermoïde de la tête et du cou
HR : Domaines hélice-boucle-hélice
HSC : Cellules souches hématopoïétiques
HSP90 α : Protéine de choc thermique 90 α
I κ B : Inhibiteur de NF- κ B
ICAM : Molécules d'adhésion
intercellulaire
ICM : Masse cellulaire interne
ITGB1 : β 1-intégrine
IL : Interleukine
IMM : Membrane interne mitochondriale
IMS : Espace intermembranaire
iPS : Cellules souches pluripotentes
induites
ISCI: The International Stem Cell Initiative
JAK : Kinase Janus
JMJD3 : Lysine déméthylase 6B

KEAP1 : Protéine 1 associée à l'ECH de type Kelch
KLF4: Kruppel like factor 4
LAL : Lipase A
LASC : Acyl-CoA synthétase des acides gras à longue chaîne
LBD : Domaine de liaison au ligand
LCAD : Acyl-CoA synthétases des acides gras longue chaîne
LCSGJ: Liver Cancer Study Group of Japan
LDH : Lactates déshydrogénases
LGR5 : Récepteur 5 couplé à une protéine G contenant des répétitions riches en leucine
LIF : Facteur d'inhibition de la leucémie
LIF-R : Récepteur du facteur LIF
LPL : Lipoprotéine lipase
LPS : Lipopolysaccharide
LRCC : cellules souches marquées
M2OM : Transporteur mitochondrial du 2-oxoglutarate/malate
MAM : Membranes associées aux mitochondries
MAPK : Protéines kinases activées par les mitogènes
MDM2 : Protéine E3 ubiquitine ligase
MELD: Model for end-stage liver disease
MET : Transition mésenchymato-épithéliale
M-FISH : Hybridation in situ en fluorescence multiplexe
MFN : Mitofusine
MGAT1 : N-acétylglucosaminyltransférase

mGPD : Glycérophosphate déshydrogénase mitochondriale
miARN : microARN
MPP : Peptidase mitochondriale
MRI : Imagerie par résonance magnétique
MT-CO : Cytochrome C oxidase mitochondrial
mtHsp70 : Protéine chaperonne mitochondriale 70
mTOR : Protéine cible de la kinase rapamycine
NAD⁺/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD : Stéatose hépatique non alcoolique
NANOG : Homéobox Nanog
NASH : Stéatohépatite non alcoolique
NCAM : Molécule d'adhésion des cellules neurales
ND : modules codant pour les sous-unités de la NADH:Ubiquinone oxydoréductase
NF-κB : Facteur nucléaire kappa B
NICD : Domaine intracellulaire actif du récepteur Notch
NLS: Séquence d'adressage nucléaire
NRC1C : Sous-familles des récepteurs nucléaires C1
NRF1/2 : Facteurs respiratoires nucléaires 1/2
NFE2L2 : Facteur nucléaire 2 apparenté à NO : Oxyde nitrique
OMM : membrane externe mitochondriale

OPA1: Optic atrophy 1
 OPN : Ostéopontine
 OXA1: Oxidase (Cytochrome C)
 Assembly 1-Like
 OXPHOS : Phosphorylation oxydative
 pAKT: Protéine kinase B phosphorylé
 PAM : Système d'importation des
 protéines couplé à une translocase
 PAP : Phosphatidate phosphatase-1
 PDC : Complexe pyruvate
 déshydrogénase
 PDGFR β : Récepteur β du facteur de
 croissance plaquettaire
 PDK : Pyruvate déshydrogénase kinase
 PET : Imagerie tomographie par émission
 de positrons
 PFKFB3 : 6-Phosphofructo-2-
 kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
 PGC1 α/β : Peroxisome proliferator-
 activated receptor gamma coactivator 1- α/β
 PHx: Hépatectomie partielle
 Pi : Phosphate inorganique
 PI3K : phosphoinositide 3-kinase
 PIK3CA : Sous-unité catalytique α de la
 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-
 Kinase
 PKM2 : Pyruvate kinase M2
 PLC γ : Phospholipase C γ
 PLIN : Perilipine
 POLG : Polymérase γ de l'ADN
 mitochondrial
 POLRMT : Polymérase de l'ARN
 mitochondrial
 PON1 : Paraoxonase-1
 POU5F1 : Homéoboxe 1 de classe POU 5
 PP: Périportal
 PPAR: Peroxisome proliferator-activated
 receptor
 PPP : Voie des pentoses phosphates
 PPRE : Peroxisome proliferator element
 PTCH: Patched
 PV : Périveineux
 RE : Réticulum endoplasmique
 RET : proto-oncogène RET
 RFA : Ablation par radiofréquence
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène
 RXR : Récepteurs de faible affinité de
 l'acide rétinoïque
 SCD1 : Stéaryl-CoA désaturase 1
 SCHAD : Acyl-CoA synthétase des acides
 gras à courte chaîne
 SCO2 : Protéine de synthèse de la
 cytochrome C oxydase
 SDHA : Sous-unité A de la flavoprotéine
 du complexe de la succinate
 déshydrogénase
 SDHB : Sous-unité B du complexe fer-
 soufre de la succinate déshydrogénase
 SDHC : Sous-unité C du complexe de la
 succinate déshydrogénase
 SDHD : Sous-unité D du complexe de la
 succinate déshydrogénase
 SHh: Sonic hedgehog
 SMAD: Mothers against decapentaplegic
 homolog
 SMO : Smoothened
 SNAT : Transporteur Na⁺ couplé aux
 acides aminés neutres

SOAT1/2 : Stérol O-acyltransférase 1/2

SOX2/9 : Facteur de transcription SRY-Box 2/9

SP: Side population

STAT3 : Transducteur de signal et activateur de transcription 3

SWI : Imagerie de susceptibilité magnétique

TACE : Chimioembolisation transartérielle

TARE : Radioembolisation transartérielle

TCA : Cycle de l'acide tricarboxylique

TIMP : Inhibiteurs de métalloprotéinases

TERT : Transcriptase inverse de la télomérase

TFAM : Facteur de transcription mitochondrial A

TG : Triglycéride

TGF α/β : facteur de croissance transformant- α/β

Th: Lymphocyte T helper

THCA: Acide trihydroxycholestanoïques

TM : Domaines transmembranaires

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

TNM: Tumor-node-metastasis

TP53 : Protéine tumorale p53

TPP : Thiamine pyrophosphate

Treg : lymphocyte T régulateur

uPA: Urokinase

US : Ultrasonographie

UTX : Lysine déméthylase 6A

VCAM : Molécules d'adhésion intercellulaire vasculaire

VLCAD : Acyl-CoA synthétases des acides gras à très longue chaîne

VEGFR : Facteur de croissance endothélial vasculaire

VLACS : Acyl-CoA synthétase des acides gras à très longue chaîne

VLDL: Very low-density lipoprotein

WNT: Wingless Family Member

YAP: Yes1 Associated Transcriptional Regulator

ZBTB20: Zinc finger and BTB domain containing 20

Liste des publications et des communications :

Publications

Daniel, Y., Lelou, E., Aninat, C., Corlu, A., Cabillic, F., 2021. Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells. *Cancers* 13, 1973. <https://doi.org/10.3390/cancers13081973>

Allard, J., Bucher, S., Massart, J., Ferron, P.-J., Le Guillou, D., Loyant, R., Daniel, Y., Launay, Y., Buron, N., Begriche, K., Borgne-Sanchez, A., Fromenty, B., 2020. Drug-induced hepatic steatosis in absence of severe mitochondrial dysfunction in HepaRG cells: proof of multiple mechanism-based toxicity. *Cell Biol Toxicol* 37, 151–175. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09537-1>

da Silva, C.O., Gicquel, T., Daniel, Y., Bártholo, T., Vène, E., Loyer, P., Pôrto, L.C., Lagente, V., Victoni, T., 2020. Alteration of immunophenotype of human macrophages and monocytes after exposure to cigarette smoke. *Scientific Reports* 10, 12796. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68753-1>

Fekir, K., Dubois-Pot-Schneider, H., Désert, R., Daniel, Y., Glaise, D., Rauch, C., Morel, F., Fromenty, B., Musso, O., Cabillic, F., Corlu, A., 2019. Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance. *Cancer Res* 79, 1869–1883. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2110>

Communications

Communications orales

Daniel Yoann, Savary Camille, Cabillic Florian and Corlu Anne « Biomarkers and novel therapeutic approaches targeting metabolism reprogramming in hepatocellular carcinoma ». *Colloque Niches et Cancer*, 21 novembre 2018 à Nantes.

Daniel Yoann, Savary Camille, Bendavid Claude, Frenot Brigitte, Allard Julien, Fromenty Bernard, Cabillic Florian and Corlu Anne « Biomarkers and novel therapeutic approaches targeting metabolism reprogramming in hepatocellular carcinoma ». *Journée CONCERTO*, 1^{er} février 2019 à Tours.

Daniel Yoann, Savary Camille, Bendavid Claude, Frenot Brigitte, Allard Julien, Fromenty Bernard, Cabillic Florian and Corlu Anne « Biomarkers and novel therapeutic approaches targeting metabolism reprogramming in hepatocellular carcinoma ». *Journée CONCERTO*, 20 septembre 2019 à Tours.

Daniel Yoann, Savary Camille, Petitjean Kilian, Rauch Claudine, Catheline Daniel, Allard Julien, Frenot Brigitte, Burel Agnès, Bendavid Claude, Rioux Vincent, Musso Orlando, Fromenty Bernard, Cabillic Florian and Corlu Anne « Plasticity of hepatocellular carcinoma cells across tumor progression leads to metabolic reprogramming and chemoresistance ». *Colloque Génomique Fonctionnel du Foie*, 26 au 28 février 2020 à Rennes.

Posters

Daniel Yoann, Savary Camille, Petitjean Kilian, Allard Julien, Frenot Brigitte, Ribault Catherine, Deleurme Laurent, Le Guevel Rémy, Burel Agnès, Bendavid Claude, Musso Orlando, Fromenty Bernard, Cabillic Florian and Corlu Anne « Biomarkers and novel therapeutic approaches targeting metabolism reprogramming in hepatocellular carcinoma ». *Journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé Bretagne Loire*, 10 et 11 décembre 2019 à Angers.

Daniel Yoann, Savary Camille, Petitjean Kilian, Allard Julien, Frenot Brigitte, Ribault Catherine, Deleurme Laurent, Le Guevel Rémy, Burel Agnès, Bendavid Claude, Musso Orlando, Fromenty Bernard, Cabillic Florian and Corlu Anne « Biomarkers and novel therapeutic approaches targeting metabolism reprogramming in hepatocellular carcinoma ». *Journée recherche du campus santé de Rennes*, 22 janvier 2020 à Rennes.

Daniel Yoann, Savary Camille, Petitjean Kilian, Rauch Claudine, Catheline Daniel, Allard Julien, Frenot Brigitte, Burel Agnès, Bendavid Claude, Rioux Vincent, Musso Orlando, Fromenty Bernard, Cabillic Florian and Corlu Anne « Plasticity of hepatocellular carcinoma cells across tumor progression leads to metabolic reprogramming and chemoresistance ». *Colloque Génomique Fonctionnel du Foie*, 26 au 28 février 2020 à Rennes.

Table des matières

Introduction.....	33
I. Le foie	35
A. Anatomie et structure	35
1. Structure générale	35
2. Structure du tissu hépatique	36
3. Vascularisation.....	37
4. L'axe biliaire	38
5. Réseau lymphatique et neural	38
B. Les cellules du foie	39
1. Hépatocytes	39
2. Cholangiocytes.....	40
3. Cellules endothéliales	40
4. Cellules de Kupffer	40
5. Cellules stellaires	40
6. Pit cells.....	41
7. Cellules progénitrices/souches progénitrices résidentes du foie.....	41
C. Le système de régénération hépatique	41
1. Les modèles de régénération par les hépatocytes	43
2. Les modèles de régénération par réaction ductulaire.....	43
3. Réplication, différenciation, transdifférenciation et dédifférenciation	44
4. Séquence de la régénération.....	46
a) Initiation de la régénération	46
b) Phase de prolifération	48
c) Phase d'arrêt de la régénération	48
II. Le carcinome hépatocellulaire	49
A. Généralités	49
B. Étiologie.....	50
C. Classification.....	51
1. Classification d'Edmondson et Steiner	51
2. Les nouvelles classifications basées sur les mutations génétiques et moléculaires.....	52
D. Carcinogénèse	54
1. Contexte anatomo-physiologique	54
2. La fibrose hépatique et la cirrhose	55
E. Diagnostic et suivi.....	56
1. Outils cliniques	56

2.	Classification clinique des patients	58
F.	Traitements	60
G.	La résistance primaire ou acquise	63
H.	Origines cellulaires du carcinome hépatocellulaire	63
III.	Les cellules souches cancéreuses	64
A.	Origine et définition	64
B.	Propriétés	66
1.	Facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence	66
2.	Les voies de signalisation	67
C.	Caractéristiques	70
D.	Microenvironnement, CSC et EMT	71
E.	CSC, EMT et reprogrammation métabolique	74
IV.	Le Métabolisme	75
A.	Les voies métaboliques	75
1.	Le métabolisme des glucides	75
2.	Le cycle tricarboxylique et la phosphorylation oxydative	79
3.	Le métabolisme des acides aminés	82
4.	Le métabolisme des lipides	83
a)	L'absorption des acides gras	83
b)	L'oxydation des acides gras	84
c)	La céto-genèse	87
d)	La lipogenèse <i>de novo</i>	88
e)	Le stockage des lipides	91
B.	Les mitochondries	91
1.	Structure et fonctions	91
2.	La biogenèse mitochondriale	93
3.	La dynamique mitochondriale	95
C.	Métabolisme et cancer	97
1.	Théorie Warburg et controverse	97
2.	Les autres voies métaboliques	102
V.	La famille PPAR	104
A.	Structure	105
B.	Mécanisme d'activation des PPAR	106
C.	Ligands	107
D.	Fonctions	108
1.	Inflammation	108
2.	Différenciation	110

3. Métabolisme.....	110
E. PPARs et cancer	113
1. PPAR et CSC	113
2. PPAR et CHC	114
Contexte du projet et objectifs	119
Modèles cellulaires.....	125
I. HepaRG.....	127
II. HBG-BC2.....	129
III. Huh-7.....	130
IV. Huh-6.....	130
V. HepG2	131
VI. La side population	132
Résultat	137
Résultats complémentaires	217
Discussion générale et perspectives.....	245
Conclusion	265
Bibliographie	271
Annexes	315

Table des figures

Figure 1 : Segmentation des lobes du foie (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).....	35
Figure 2 : Ligaments maintenant le foie (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).....	36
Figure 3 : Aspect tridimensionnel du lobule hépatique (Servier Medical art).....	37
Figure 4 : Vascularisation hépatique (“Chirurgie du Foie Centre,” 2021).....	38
Figure 5 : Architecture cellulaire du parenchyme hépatique	39
Figure 6 : Principales caractéristiques des modèles de régénération hépatique par hépatotoxicité et hépatectomie partielle	42
Figure 7 : Plasticité cellulaire au cours de la régénération hépatique (W. Li et al., 2020)	45
Figure 8 : Activation de la régénération hépatique (Michalopoulos and Bhushan, 2021).....	48
Figure 9 : Répartition globale des cancers primitifs du foie en ASR par 100.000 personnes selon l’incidence (A) et la mortalité (B) (“Cancer today,” 2020)	49
Figure 10 : Les facteurs de risque dans le CHC (Dhanasekaran et al., 2012).....	50
Figure 11 : Résumé des classifications moléculaires dans le CHC (Caruso et al., 2019).....	53
Figure 12 : Mécanisme de la fibrose hépatique (Roehlen et al., 2020).....	55
Figure 13 : Diagnostic du CHC grâce à l’imagerie (Dimitroulis et al., 2017)	57
Figure 14 : Diagnostic du CHC établi selon la classification BCLC (Forner et al., 2016).....	59
Figure 15 : Planning de traitement selon le stade d’avancement du CHC établi selon la classification BLCL (Raoul et al., 2011).....	61
Figure 16 : Modèle de croissance tumorale (Koren and Fuchs, 2016).....	65
Figure 17 : Voies de signalisation modulant les cellules souches (Mossahebi-Mohammadi et al., 2020).....	68
Figure 18 : Rôle du microenvironnement dans la maintenance et la promotion des CSC (Cabillic and Corlu, 2016).....	73
Figure 19 : Les différentes étapes de la glycolyse	77
Figure 20 : Décarboxylation du pyruvate par le complexe pyruvate déshydrogénase (Oxidative decarboxylation of Pyruvate, 2018).....	78
Figure 21 : Schéma simplifié de l’entrée des différentes voies dans le cycle TCA. Adapté de Korla and Mitra, 2014	79
Figure 22 : Représentation schématique de l’OXPHOS	81
Figure 23 : Schéma simplifié de la glutaminolyse	83
Figure 24 : Schéma simplifié de l’entrée et de l’oxydation des acides gras. Adapté de Allard et al., 2020 et Fromenty, 2019.....	87
Figure 25 : Métabolisme des corps cétoniques (Grabacka et al., 2016).....	88
Figure 26 : Schéma simplifié de la lipogenèse <i>de novo</i> ainsi que de la synthèse et du stockage des acides gras. Adapté de Rui, 2014.....	89
Figure 27 : Biosynthèse des acides gras à longue chaîne (Guillou et al., 2010).....	90
Figure 28 : Structure de la mitochondrie en microscopie tomographique (Kühlbrandt, 2015).....	92
Figure 29 : Représentation de l’ADN mitochondrial (Nissanka and Moraes, 2018).....	93
Figure 30 : Mécanismes moléculaires de la biogenèse mitochondriale	94
Figure 31 : Représentation des processus mitochondriaux de fusion/fission (He et al., 2020).....	95
Figure 32 : Fusion transitoire et fusion complète des mitochondries (Liu et al., 2009).....	97
Figure 33 : Représentation de l’effet Warburg (Naudin, 2018)	99
Figure 34 : Les différentes voies impliquées dans le métabolisme du glucose (Mirzaei and Hamblin, 2020).....	100
Figure 35 : Principaux domaines des PPAR (Han et al., 2017a)	105
Figure 36 : Mécanisme d’action génétique des PPAR (Han et al., 2017a).....	107
Figure 37 : Ligands spécifiques des isoformes de PPAR (Grygiel-Górniak, 2014)	108
Figure 38 : Les fonctions des PPAR selon la localisation tissulaire (Hong et al., 2019).....	111

Figure 39 : Caryotype pseudo-diploïde de la lignée HepaRG (M-FISH)	127
Figure 40 : Lignée cellulaire HepaRG au cours des processus de différenciation et rétrodifférenciation cellulaire	128
Figure 41 : Lignée cellulaire HBG-BC2	129
Figure 42: Lignée cellulaire Huh-7	130
Figure 43 : Lignée cellulaire Huh-6	131
Figure 44 : Lignée cellulaire HepG2.....	131
Figure 45 : Tri de la side population de la lignée cellulaire HepaRG	132
Figure 46 : Profil métabolique des CSC et des cellules différenciées dans les modèles de CHC <i>in vitro</i>	252
Figure 47 : Analyse de survie Kaplan-Meyer dans les cohortes Roessler, TCGA et ICGC ..	258

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification d'Edmondson et Steiner (Edmondson and Steiner, 1954)	52
Tableau 2 : Classification moléculaire des CHC (Désert et al., 2018).....	54

Introduction

I. Le foie

A. Anatomie et structure

1. Structure générale

Le foie, organe le plus volumineux du corps humain avec une moyenne de 1.4 kg (2 à 3%), est situé dans la partie supérieure de l'abdomen majoritairement à droite. Il est séparé des poumons et du cœur par le diaphragme et est positionné à droite de l'estomac, au-dessus du duodénum et de l'angle colique droit. Le foie est subdivisé en 4 lobes : les lobes droit et gauche qui sont les plus importants morphologiquement et les lobes carré et caudé. Ces différents lobes sont divisés de façon anatomique en 8 segments (Figure 1). C'est au niveau des lobes carré et caudé que se situe la vésicule biliaire. Ces deux lobes sont séparés par un sillon, nommé le hile du foie, point de convergence de la veine porte et de l'artère hépatique ainsi que des canaux biliaires majeurs (Abdel-Misih and Bloomston, 2010; "Le Foie et les Voies biliaires," 2014; "The liver," 2018).

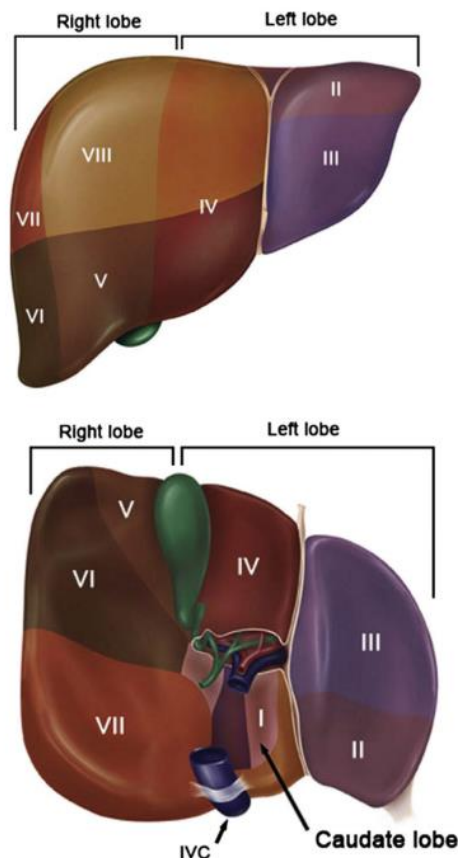


Figure 1 : Segmentation des lobes du foie. Le foie est constitué de 4 lobes (lobes droit, gauche, carré et caudé) subdivisés en 8 segments (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

Les différents lobes sont parcourus par des ligaments permettant de maintenir la position du foie, notamment au diaphragme. Plusieurs ligaments sont décrits : le ligament coronaire, les ligaments triangulaires droit et gauche, le ligament falciforme et le ligament *omentum* (Figure 2). L'ensemble du foie est recouvert d'un tissu conjonctif, la capsule de Glisson (Abdel-Misih and Bloomston, 2010; "Le Foie et les Voies biliaires," 2014; "The liver," 2018).

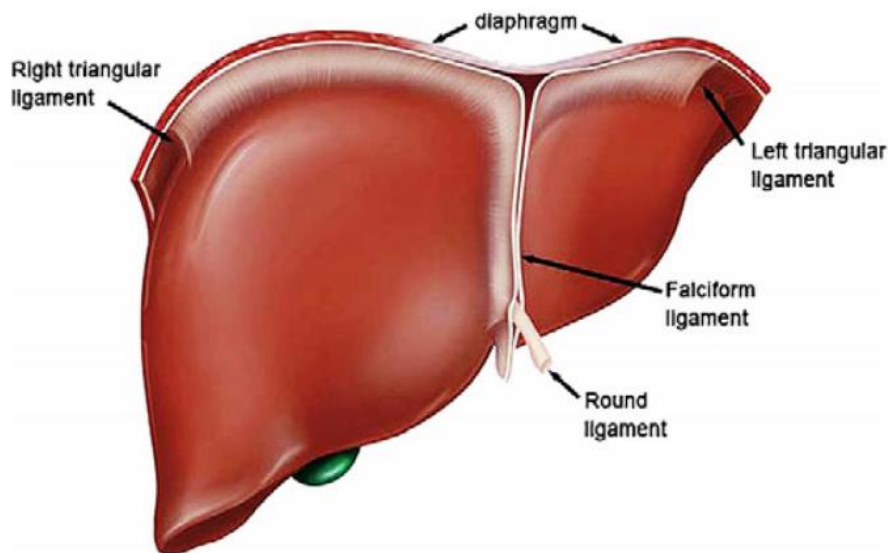


Figure 2 : Ligaments maintenant le foie. Le foie est entouré de différents ligaments : coronaire, triangulaire droit, triangulaire gauche, falciforme et *omentum* (Abdel-Misih and Bloomston, 2010).

2. Structure du tissu hépatique

L'organisation du tissu hépatique se caractérise par le rassemblement de plusieurs milliers d'hépatocytes en lobules (Figure 3). Ces unités parenchymateuses sont de forme hexagonale et sont organisées autour d'une veine centrolobulaire qui récupère le sang circulant dans les lobules hépatiques. Ce sang ira ensuite dans la veine sus-hépatique, puis la veine cave. À l'extrémité de chaque lobule se trouve un espace porte qui comprend la veine porte, un canal biliaire et une artère. Les échanges entre les hépatocytes et le sang se font dans les sinusoides. Enfin, les canalicules biliaires permettent la récupération de la bile qui rejoint ensuite le canal biliaire (Abdel-Misih and Bloomston, 2010; "Le Foie et les Voies biliaires," 2014; "The liver," 2018).

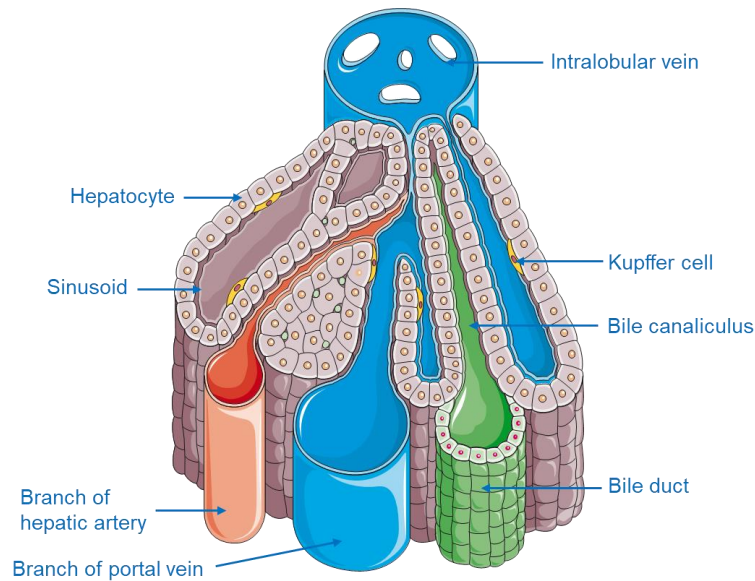


Figure 3 : Aspect tridimensionnel du lobule hépatique. Le lobule hépatique est l'unité anatomique du parenchyme hépatique ; le lobule est centré par la veine centrolobulaire et limité en périphérie par des cloisons réunissant les espaces portes adjacents. L'espace porte regroupe la veine porte, le canal biliaire et l'artère hépatique (Servier Medical art).

3. Vascularisation

Le foie est un des organes les plus vascularisés du corps. Il reçoit, dans des conditions physiologiques standards, l'équivalent de 25% du débit sanguin, correspondant à un afflux d'environ 1,4 litre de sang en moyenne par minute. Le sang du foie provient de deux vaisseaux : l'artère hépatique (25-30% du sang hépatique) et la veine porte (75-80% du sang hépatique) (Figure 4).

La veine porte résulte de la convergence de la veine splénique ainsi que des veines mésentériques inférieure et supérieure. D'autres veines viennent se greffer à la veine porte ; c'est le cas des veines coronaire et kystique, mais aussi des affluents des veines gastriques et de la veine pancréatico-duodénale supéro-postérieure. Le sang arrivant dans la veine porte est chargé en diverses substances qui proviennent des autres organes du système digestif. Une fois arrivée dans le foie, la veine porte se scinde en veine porte gauche et droite, innervant ainsi les différents lobes. Enfin, le sang est évacué du foie par la veine cave inférieure.

La vascularisation artérielle fait quant à elle intervenir l'artère hépatique qui apporte essentiellement de l'oxygène au foie. Il peut y avoir une à trois artères hépatiques au sein du foie. Il existe cependant une configuration plus commune se caractérisant par une artère provenant de l'axe cœliaque avec les artères gastrique et splénique gauche.

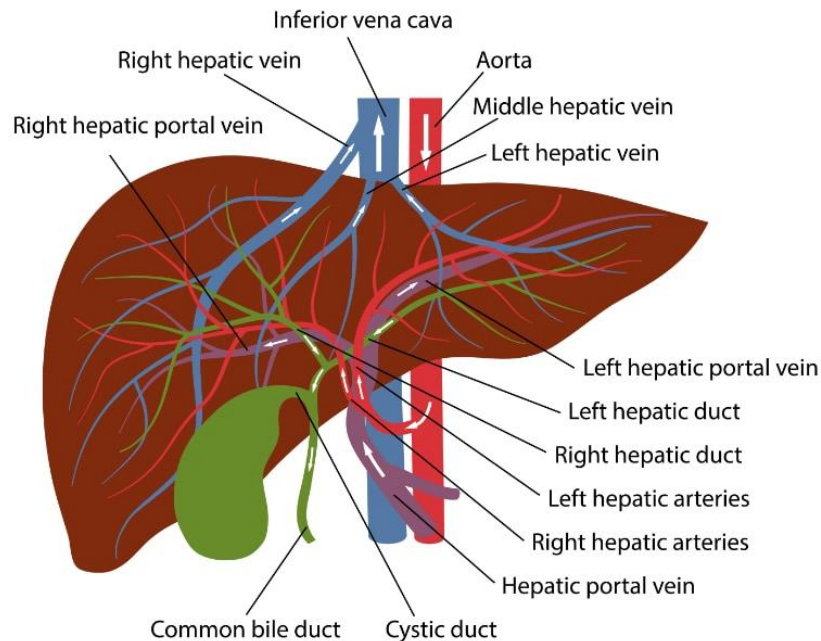


Figure 4 : Vascularisation hépatique. Le sang circule dans le foie par l'intermédiaire des nombreuses ramifications de l'artère hépatique et de la veine porte. La veine porte apporte les nutriments et l'artère hépatique l'oxygène. Le sang est évacué par la veine cave inférieure ("Chirurgie du Foie | Centre," 2021).

4. L'axe biliaire

Les voies biliaires se caractérisent par de nombreux canaux permettant la production et le transport de la bile à travers le foie. Ces canaux biliaires, qui forment les canaux hépatiques gauche, droit et para-médian dans les lobes du foie, suivent généralement la veine porte et se rejoignent au niveau de la plaque hilare donnant le canal hépatique commun. Ce canal hépatique commun, sortant du foie, prend le nom de canal cholédoque et est rattrapé par le canal cystique qui relie la vésicule biliaire au reste des ramifications biliaires. La vésicule biliaire est un compartiment qui sert à stocker une petite partie de la bile produite dans le foie. Par la suite, le canal cholédoque se dirige vers le pancréas et fusionne avec le canal de Wirsung (canal pancréatique principal) pour s'écouler dans le duodénum par l'intermédiaire de l'ampoule de Vater.

5. Réseau lymphatique et neural

De façon moins décrite, le foie possède aussi un réseau lymphatique et neuronal. La lymphe produite par le foie s'écoule dans le réseau lymphatique dit « profond ». Ce réseau achemine la lymphe vers les ganglions phréniques latéraux et le hile. Un autre réseau lymphatique dit « superficiel » est situé dans la capsule de Glisson, au niveau des faces antérieure et postérieure. La face antérieure se dirige vers les ganglions phréniques et rejoint ensuite les réseaux mammaires médiastinaux et internes. Le réseau postérieur achemine la lymphe vers les

ganglions lymphatiques hilaires incluant le canal cystique, le canal cholédoque, l'artère hépatique ainsi que les ganglions lymphatiques péripancréatiques, péricardiques et cœliaques. Il existe, au niveau du foie, une innervation neuronale parasymphatique et sympathique. Les fibres nerveuses proviennent du plexus cœliaque, des ganglions thoraciques inférieurs, du nerf phrénique droit et des nerfs vagues. Le nerf vague se divise en nerf vague postérieur et nerf vague antérieur. L'innervation parasymphatique est assurée par le nerf vague antérieur, et l'innervation sympathique par le plexus cœliaque et les nerfs splanchniques thoraciques (Abdel-Misih and Bloomston, 2010; "Le Foie et les Voies biliaires," 2014; "The liver," 2018).

B. Les cellules du foie

Le foie est composé de cellules parenchymateuses, les hépatocytes, et de cellules non parenchymateuses : les cholangiocytes, les cellules stellaires, les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales, les cellules « pit cells » et les cellules souches/progénitrices résidentes du foie (CS/P) (Figure 5).

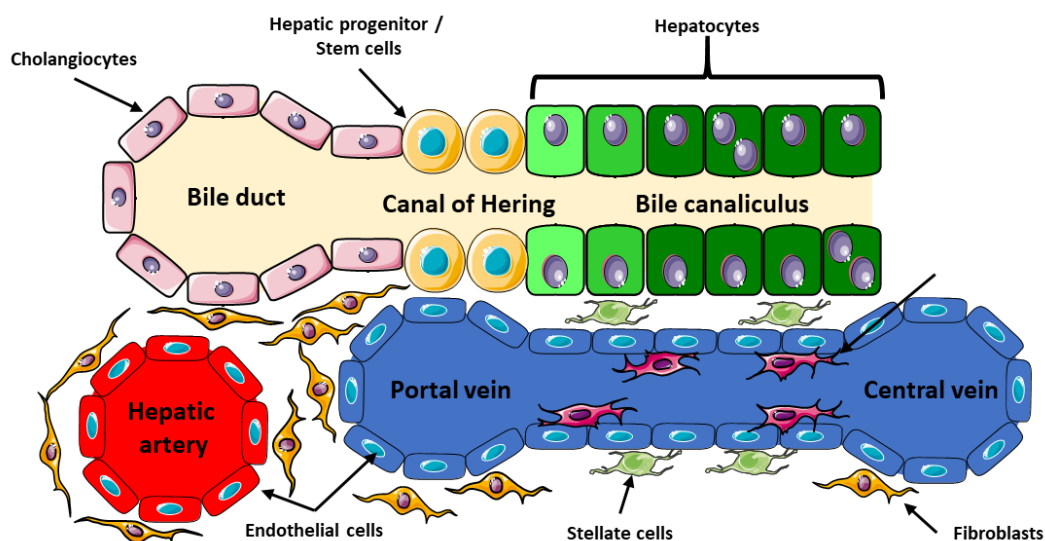


Figure 5 : Architecture cellulaire du parenchyme hépatique. Cette architecture est constituée des cellules parenchymateuses, les hépatocytes, et des cellules non parenchymateuses dont font partie les cholangiocytes, les cellules stellaires, les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales, les « pit cells » et les cellules souches progénitrices résidentes du foie.

1. Hépatocytes

Les cellules hépatocytaires sont les cellules majoritaires du foie. Elles représentent environ 70% de la population cellulaire (Blouin et al., 1977; Gissen and Arias, 2015; Rosenbaum et al., 1991; Sato et al., 2019). Les hépatocytes sont également les premières cellules du foie de par leurs nombreuses fonctions qui vont de la sécrétion de protéines au métabolisme du cholestérol en passant par la détoxification du foie (Rosenbaum et al., 1991; Si-Tayeb et al., 2010). Ces

cellules sont polarisées et leur surface basolatérale est en contact avec les cellules endothéliales sinusoides, facilitant l'export dans la circulation sanguine. Les hépatocytes sont disposés côte à côte et liés par des jonctions serrées. Entre ces hépatocytes sont formés les canalicules biliaires qui permettent de recueillir les sécrétions biliaires et de les acheminer, à travers la surface apicale des hépatocytes, à la vésicule biliaire (Si-Tayeb et al., 2010).

2. Cholangiocytes

Les cellules endothéliales biliaires représentent environ 3-5% des cellules du foie. Elles entourent les canaux biliaires entre les hépatocytes et sont en contact direct avec eux. Elles peuvent former avec les hépatocytes, le canal de Hering qui transporte les sécrétions biliaires aux canaux biliaires interlobulaires (Hall et al., 2017; Rosenbaum et al., 1991). Malgré leur faible représentativité dans le foie, les cholangiocytes jouent un rôle majeur dans la composition de la bile durant son trajet vers l'intestin. Les modifications de la composition de la bile passent par des phénomènes d'absorption et de sécrétion d'eau et d'électrolytes (Glaser et al., 2009; Hall et al., 2017). Ces échanges sont facilités par la présence de microvillosités au pôle apical des cholangiocytes (Hall et al., 2017; Kanno et al., 2001). Les cholangiocytes ont aussi un rôle dans la réabsorption de constituants qui sont présents dans la bile comme le glucose ou les acides aminés (Kanno et al., 2001).

3. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont pour la plupart positionnées autour des capillaires sinusoides. Elles possèdent des fenestrations, petits pores permettant les échanges entre le sang et l'espace de Disse, et aucune lame basale. Ces différences vis-à-vis d'autres cellules endothéliales permettent des échanges plus performants avec le sang, mais aussi avec les hépatocytes (Rosenbaum et al., 1991; Sørensen et al., 2015).

4. Cellules de Kupffer

Ce sont les macrophages résidents du foie. Ils représentent la plus grande proportion de macrophages tissulaires de l'organisme. Leur découverte a été faite en 1876 par Karl Wilhelm Von Kupffer, en même temps que les cellules stellaires. À l'origine, ce sont des monocytes issus de la moelle osseuse qui migrent dans le foie. Ces cellules immunitaires ont plusieurs rôles dans l'immunité, notamment la phagocytose d'éléments pathogènes qui arrivent par la circulation sanguine et la sécrétion de cytokines (Dixon et al., 2013).

5. Cellules stellaires

Les cellules stellaires ont également été décrites par Kupffer en 1876. Elles représentent un tiers des cellules non parenchymateuses et 15% du nombre total de cellules dans le foie (Lee and

Friedman, 2010). Elles sont situées dans l'espace périsinusoïdal de Disse, c'est-à-dire à la jonction entre les hépatocytes et les cellules endothéliales. Les cellules stellaires ont un rôle très important dans le remodelage tissulaire et la réponse au stress du foie, notamment grâce à leur rôle dans le stockage de l'acide rétinolique (vitamine A) et dans la sécrétion de cytokines. Dans un contexte de stress répété, les cellules stellaires se transforment en myofibroblastes et synthétisent de la matrice extracellulaire de manière incontrôlée. (Higashi et al., 2017; Lee and Friedman, 2010; Rosenbaum et al., 1991; Si-Tayeb et al., 2010).

6. Pit cells

Les « pit cells » sont des cellules lymphocytaires « natural killer », découvertes dans les années 1970, localisées au niveau de l'endothélium. Elles peuvent être résidentes du foie ou non et participent à la défense immunitaire innée grâce à leur activité cytotoxique (Peng et al., 2016; Rosenbaum et al., 1991). Il faut noter que d'autres cellules lymphocytaires sont présentes dans le foie. Il s'agit des « natural killer T », des lymphocytes T $\gamma\delta$, mais aussi des lymphocytes adaptatifs comme les cellules lymphocytaires B et T $\alpha\beta$ (Peng et al., 2016).

7. Cellules progénitrices/souches progénitrices résidentes du foie

Les premières découvertes concernant la présence de cellules immatures dans le foie datent de 1958 avec les travaux de Wilson et Leduc. Ils mettent en évidence la participation de cellules, qu'ils nomment cholangiocytes indifférenciés, dans la régénération du foie de souris préalablement endommagé par un régime riche en méthionine et en bentonite (Wilson and Leduc, 1958). Plus tard, Grisham réussit à identifier des cellules souches qu'il qualifie de cellules non parenchymateuses dans des cultures *in vitro* de foie de rat (Grisham, 1980). Ces petites cellules ovales sont présentes dans le compartiment biliaire, plus précisément dans la partie distale, proche du canal de Hering (Itoh, 2016; Kaur et al., 2015; Theise et al., 1999). Elles ont été par la suite identifiées, grâce à leur expression de marqueurs hépatocytaires et cholangiocytaires, comme des précurseurs bipotents du foie (Kubota and Reid, 2000; Suzuki et al., 2000). Dans le cas de dommages hépatiques, il est admis que ce sont les hépatocytes qui prolifèrent pour reconstituer le tissu hépatique. Cependant, il est apparu que dans le cas où les hépatocytes ne peuvent plus maintenir leur rôle de reconstitution du tissu, ce sont les cellules CS/P résidentes du foie qui assurent cette fonction (Forbes et al., 2002; Itoh, 2016).

C. Le système de régénération hépatique

La régénération hépatique est une hypergenèse compensatoire du foie. Elle fait intervenir les cellules hépatiques et/ou progénitrices du foie et est régie par un ratio entre le poids du corps et

celui du foie (hepatostat) (Michalopoulos, 2017). Il existe dans le foie, une constante régénération qui intervient de manière locale pour répondre à l'homéostasie du foie. Cette régénération n'est pas à confondre avec les processus de régénération consécutifs à une atteinte hépatique mécanique (hépatectomie) ou chimique (Figure 6). De plus, cette régénération « forcée » ne permet pas au foie de retrouver complètement son aspect anatomique d'origine (Fausto et al., 2006; Michalopoulos, 2007; Michalopoulos and Bhushan, 2021; Van Haele et al., 2019). Lors d'une hépatectomie partielle ou d'une atteinte chimique, la régénération du foie est assurée par les hépatocytes. Cependant, la régénération peut faire intervenir les cellules progénitrices dans la situation où les hépatocytes sont dans l'incapacité de reconstituer la masse hépatique. C'est notamment le cas dans les modèles de régénération avec des atteintes chimiques comme l'exposition au 2-acétylaminofluorène (2-AFF) ou encore au D-galactosamine. Ces processus de régénération sont complexes et incluent plusieurs voies de signalisation comprenant différents acteurs comme des cytokines et des facteurs de croissance (Mao et al., 2014).

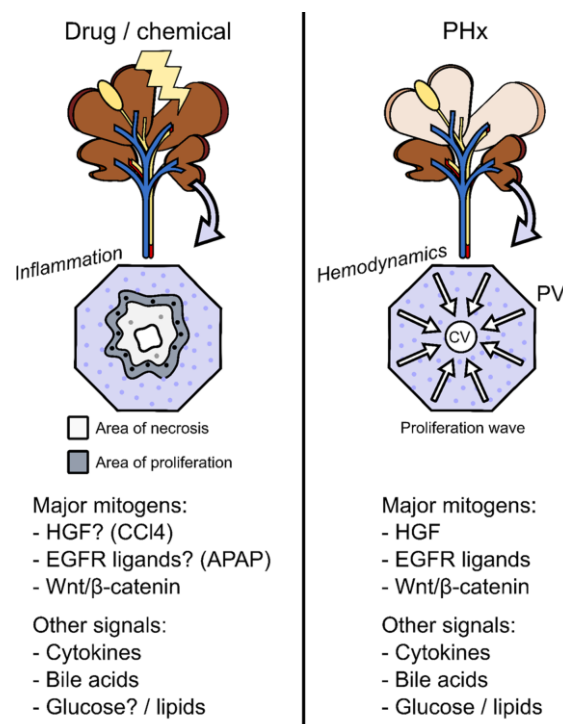


Figure 6 : Principales caractéristiques des modèles de régénération hépatique par hépatotoxicité et hépatectomie partielle. L'hépatotoxicité induite par les traitements chimiques provoque une nécrose et une inflammation des tissus ainsi qu'une production de facteurs mitogéniques dépendants du produit utilisé. Dans le cas d'une hépatectomie, on retrouve un changement du flux et de la pression sanguine. Ces changements induisent la production des mitogènes majeurs HGF, EGFR et β-caténine. D'autres signaux comme les cytokines, les acides biliaires, le glucose et les lipides peuvent participer à la régénération (Clemens et al., 2019).

1. Les modèles de régénération par les hépatocytes

Le premier modèle de régénération hépatique a été établi chez le rongeur. Les souris ont subi une hépatectomie partielle (PHx) des 2/3 de la masse de leur foie. Il a alors été observé, chez le rongeur, que la régénération totale du foie après cette chirurgie ne prenait que cinq à sept jours (Fausto et al., 2006; Mao et al., 2014; Michalopoulos, 2017, 2007; Michalopoulos and Bhushan, 2021; Van Haele et al., 2019).

D'autres modèles de régénération hépatique ont par la suite été proposés et utilisent des substances chimiques pour provoquer une hépatotoxicité. On peut citer l'utilisation du tétrachlorure de carbone (CCL₄), du D-galactosamine ou de l'acétaminophène (Fausto et al., 2006; Mao et al., 2014). On notera que les atteintes hépatiques par les substances chimiques ne provoquent pas les mêmes réponses régénératives du fait du mode d'action qui diffère de l'hépatectomie partielle. Le CCL₄ provoque par exemple des nécroses et une réponse inflammatoire qui affectent les processus de régénération (Figure 6).

De façon intéressante, un modèle d'étude de la recolonisation des hépatocytes du foie a été mis en place au moyen d'une déficience du gène de la fumarylacetoacétate hydrolase (*Fah*) chez la souris. L'inactivation de *Fah* induit une hépatotoxicité. Par la suite, des transplantations successives d'hépatocytes normaux permettent le remplacement des hépatocytes *Fah*-négatifs. Enfin, les souris dont le foie a été recolonisé par des hépatocytes *Fah*-positifs servent à la transplantation d'autres souris dont les hépatocytes sont *Fah*-négatifs (Mao et al., 2014; Michalopoulos and Bhushan, 2021).

Plus récemment, l'utilisation du poisson-zèbre comme modèle de régénération hépatique s'est démocratisée. Son coût très faible et son aspect translucide permettent d'étudier plus facilement le foie. Comme le modèle murin, la régénération hépatique peut être provoquée chez le poisson-zèbre par un traitement chimique ou par résection des 2/3 du foie (Forbes and Newsome, 2016; Mao et al., 2014).

2. Les modèles de régénération par réaction ductulaire

La réaction ductulaire ou prolifération ductulaire implique le plus souvent les cellules biliaires et les CS/P, bien que cette réaction concerne également les hépatocytes. Elle consiste en une prolifération de cellules à l'interface entre l'arbre biliaire et les hépatocytes en réponse aux lésions hépatiques (Roskams et al., 2004). Elle intervient dans des conditions spécifiques, lorsque les hépatocytes ne peuvent plus régénérer le foie de façon optimale.

La régénération hépatique à partir des cellules biliaires et/ou CS/P a initialement été établie sur des modèles murins, après administration du 2-acétylamino-fluorène (2-AAF). En 1984,

Tatematsu et ses collaborateurs notent l'implication de cellules ovales, dont l'origine est ductulaire, dans la régénération du foie (Tatematsu et al., 1984). Toujours dans le modèle 2-AAF, l'équipe de Nagy propose la possibilité d'un apport des cellules ovales biliaires dans l'ontogenèse hépatique (Nagy et al., 1994). Dans un modèle murin après administration de CCL₄, Español-Suñer démontre que les cellules biliaires et les CS/P génèrent respectivement 2,45% et 0,78% des cellules hépatiques (Español-Suñer et al., 2012). Cette régénération par les cellules biliaires peut monter jusqu'à 25% dans certains modèles murins génétiquement modifiés où la prolifération hépatocytaire est bloquée (Raven et al., 2017). Cependant, la plupart des articles faisant mention de régénération par les cellules biliaires n'identifient pas la part de CS/P qui peut contribuer à la régénération. Plus spécifiquement pour les CS/P, des chercheurs ont mis au point un modèle murin d'inhibition de l'expression du marqueur des CS/P « Forkhead box L1 » (*Foxl1*). Ils ont ainsi démontré que les CS/P sont nécessaires à la régénération consécutive à un régime déficient en choline et supplémenté en éthionine (CDE) (Shin et al., 2015). Un autre modèle murin de blocage de la régénération hépatocytaire par invalidation de la protéine E3 ubiquitine ligase (*Mdm2*), enzyme de dégradation de la protéine p53, montre une régénération progressive du foie par les CS/P (Lu et al., 2015).

3. Réplication, différenciation, transdifférenciation et dédifférenciation

Des études récentes ont mis en lumière l'implication de plusieurs types hépatocytaires dans la régénération par réplication. Une étude de Lin démontre ainsi l'existence d'hépatocytes avec une forte activité de la transcriptase inverse de la télomérase (*Tert^{high}*) dans tout le lobule. Ces hépatocytes *Tert^{high}* participent à la régénération dans les conditions physiologiques normales et dans les situations de dommages du foie (Lin et al., 2018). De plus, Font-Burgada et ses collègues prouvent l'existence d'une sous-population hépatocytaire, qu'ils nomment hépatocytes hybrides (HybHP), qui possède un fort potentiel de régénération. Ces cellules sont localisées dans la région périportale et expriment certains marqueurs correspondant aux cellules ductulaires. Elles se caractérisent également par une faible expression du facteur de transcription « SRY-box » (*Sox9*) (Font-Burgada et al., 2015).

Outre la réplication hépatocytaire, d'autres processus participent à la régénération hépatique. Ces mécanismes de plasticité cellulaire sont communément nommés transdifférenciation, dédifférenciation ou rétrodifférenciation (Figure 7). La transdifférenciation se définit par une conversion entre les hépatocytes et les cellules biliaires, alors que la dédifférenciation ou rétrodifférenciation permet aux hépatocytes de redevenir des progéniteurs hépatiques bipotents

(Tarlow et al., 2014). À noter que la rétrodifférenciation est une différenciation rétrograde complète vers des états fœtaux/embryonnaires (Uriel, 1976) alors que la dédifférenciation peut conduire à des états intermédiaires.

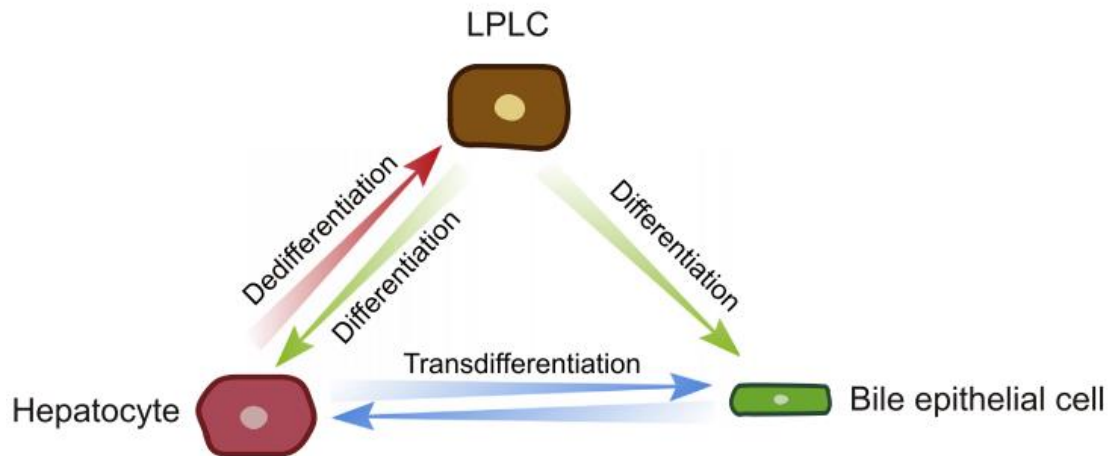


Figure 7 : Plasticité cellulaire au cours de la régénération hépatique. Lors de dommages hépatiques, les hépatocytes peuvent se transdifférencier en cellule biliaire ou se dédifférencier en cellules souches/progénitrices hépatiques (CS/P ou LPLC). Ces CS/P donnent par différenciation des hépatocytes et des cholangiocytes afin de régénérer le foie. Dans le cas où les hépatocytes sont en incapacité d’assumer leur rôle dans la régénération, ce sont les cellules biliaires et les CS/P qui prennent le relais, respectivement par transdifférenciation et différenciation en hépatocytes (W. Li et al., 2020).

Les hépatocytes possèdent une capacité mémorielle de leur lignage d’origine. Ils bénéficient ainsi d’un phénotype mixte hépatocyttaire/biliaire se traduisant par l’expression de marqueurs des deux types cellulaires. Tarlow et ses collaborateurs montrent notamment que les hépatocytes qui se dédifférencient en progéniteurs hépatiques expriment fortement *SOX9*, contrairement à ce qui est observé dans l’étude de Font-Burgada. Les hépatocytes sont ainsi capables, suite à des lésions induites par 0,1% de 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine, de se dédifférencier de manière réversible en progéniteurs hépatiques. L’étude de Tarlow est corroborée par Sekiya et Suzuki qui démontrent que les hépatocytes, tout comme les cellules biliaires, sont capables de reformer des structures ductulaires lors de dommages chroniques du foie (Sekiya and Suzuki, 2014). En outre, une étude sur le poisson-zèbre, après administration de métronidazole, prouve la transdifférenciation des cellules biliaires dans la régénération du foie (He et al., 2014). Il a été montré que 2,45% des hépatocytes sont d’origine biliaire (Español-Suñer et al., 2012). Cependant, ce pourcentage d’hépatocytes dérivés de cellules biliaires peut monter jusqu’à 20-30% dans certains contextes de dommages au foie où les hépatocytes ont subi des modifications génétiques. Ces modifications sont une invalidation de la $\beta 1$ -intégrine (*Itgb1*) ou une surexpression de l’inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline 1A (*Cdkn1a/p21*) qui compromettent le pouvoir de régénération des hépatocytes par leur entrée

en sénescence (Raven et al., 2017). De manière complémentaire, une étude de Russell démontre dans un modèle murin de mutation de la β -caténine, que 20% des hépatocytes totaux proviennent de cellules biliaires 14 jours après induction de dommages hépatiques par CDE.

Dans l'étude de Español–Suñer, l'implication des CS/P dans la régénération est à hauteur de 0,78%. Dans les études sur les cellules épithéliales biliaires, il est apparu que certaines cellules impliquées dans la régénération exprimaient des marqueurs de niche liés aux CS/P comme le récepteur 5 couplé à une protéine G contenant des répétitions riches en leucine (*Lgr5*) (Barker et al., 2007; Jaks et al., 2008). Les investigations démontrent qu'après isolement, ces CS/P possèdent une capacité d'expansion clonale et peuvent former des structures biliaires (Huch et al., 2015, 2013). Dans l'étude de Wang, les cellules progénitrices sont décrites comme présentes dans des niches au niveau de la veine centrale. Ces progéniteurs, qu'ils décrivent comme des cellules diploïdes exprimant la protéine Axine 2 (*Axin2*), participent au renouvellement homéostatique des hépatocytes par leur capacité de différenciation (B. Wang et al., 2015). Les progéniteurs expriment notamment, dans les premiers temps de leur prolifération, un mélange de marqueurs hépatocytaires et cholangiocytaires (Stanger, 2015).

Il existe encore quelques zones d'ombre concernant les différents mécanismes de la plasticité cellulaire. Nous ne savons pas avec certitude si les cellules hépatocytaires ou biliaires se transdifférencient directement ou si elles passent par une rétrodifférenciation en CS/P avant d'entamer une différenciation pour régénérer le foie. Finalement, les cholangiocytes et les progéniteurs hépatiques sont également des acteurs de la régénération tout comme les hépatocytes. Il faut toutefois prendre ces systèmes de régénération comme des mécanismes de secours dans le cas où les hépatocytes sont incapables de régénérer le parenchyme hépatique.

4. Séquence de la régénération

Dans le modèle murin d'hépatectomie partielle, la régénération hépatique se déroule en trois phases détaillées ci-dessous. Il est probable que ces mécanismes concernent exclusivement la régénération par les hépatocytes. Dans le cadre d'autres modèles de régénération hépatique, les voies d'activations peuvent être légèrement différentes (Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2018).

a) Initiation de la régénération

La première phase de la régénération est nommée phase de « Priming ». Elle fait intervenir de nombreux processus en relation avec l'inflammation pour répondre à une éventuelle infection,

mais aussi pour nettoyer la zone afin d'entamer la réparation et la régénération du tissu. Le premier signal qui lance la régénération est la modification du rapport « flow-to-mass » consécutif à l'hépatectomie. Le sang de la veine porte est redirigé au niveau des lobes restants. Le changement de pression sanguine libère de l'oxyde nitrique (NO) et de l'adénosine, ce qui module la vasoconstriction et protège le foie (Lautt, 2007). L'hépatectomie provoque très rapidement l'induction de l'urokinase (uPA) qui active les métalloprotéinases et donc, la dégradation la matrice extracellulaire et la sécrétion du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) par les cellules étoilées (Michalopoulos and Bhushan, 2021). En parallèle de la sécrétion d'HGF, il y a augmentation des concentrations sanguines du facteur de croissance épidermique (EGF), du facteur de nécrose tumorale α (TNF α), de l'interleukine 6 (IL-6) et de la noradrénaline. Ces facteurs sont en partie sécrétés par les cellules de Kupffer préalablement stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) provenant de différents sites, notamment l'intestin (Darnaud et al., 2013). L'IL-6 et le TNF α activent respectivement la voie du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) et la voie du transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3), initiant ainsi le passage de la phase G0 à la phase G1 dans les hépatocytes (Figure 8). Dans le même temps, les cellules endothéliales produisent la protéine « Wingless » (WNT) qui active la protéine β -caténine. La β -caténine est très importante dans l'activation de la régénération des hépatocytes (Yang et al., 2014), mais aussi des progéniteurs hépatiques (Lade and Monga, 2011). Une fois activée, la β -caténine est transloquée dans le noyau et induit la transcription des gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire comme la cycline D1. On peut également citer d'autres voies d'activation comme Hippo-Yap qui participe aussi à la réparation et la prolifération hépatocytaire et qui interagit avec la voie WNT/ β -caténine de façon différentielle selon la localisation cellulaire (Figure 8). Enfin, le rôle de la voie Hedgehog dans la régénération n'est pas encore complètement compris (Gilgenkrantz and Collin de l'Hortet, 2018; Michalopoulos and Bhushan, 2021).

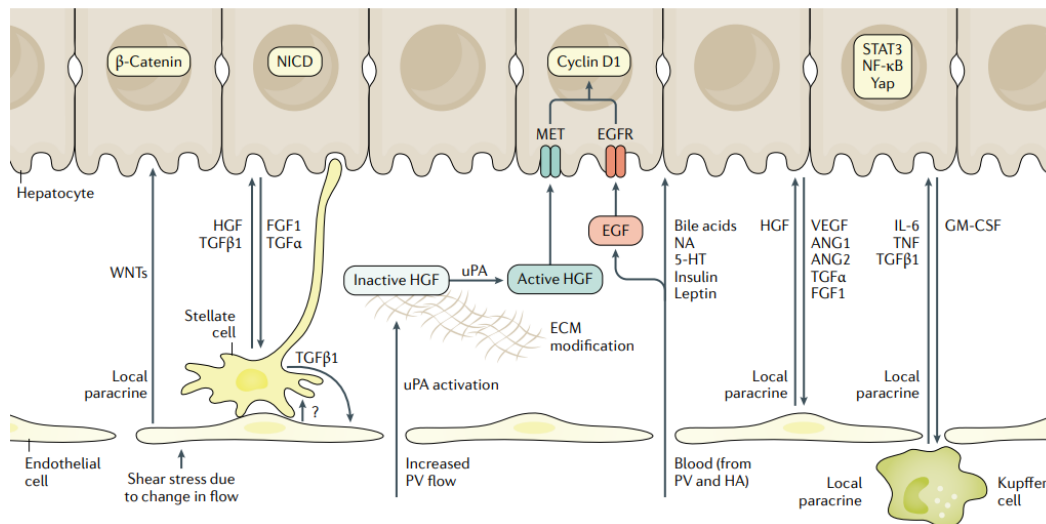


Figure 8 : Activation de la régénération hépatique. Le changement du rapport « flow-to-mass » et l'augmentation de la pression sanguine induisent l'activation de l'uPA et la sécrétion des métalloprotéinases qui remodelent la matrice extracellulaire. L'HGF et l'EGF présents dans l'environnement hépatique ainsi que d'autres facteurs sécrétés comme le TNF α , l'IL-6 et la noradrénaline activent les voies NF- κ B, YAP et WNT/ β -caténine. Ces voies permettent l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire et l'activation de la régénération (Michalopoulos and Bhushan, 2021).

b) Phase de prolifération

Arrivées à la phase G1, les cellules impliquées dans la régénération subissent l'action de différents facteurs de croissance qui les font progresser en phase S. Les facteurs les plus connus sont l'HGF, le facteur de croissance transformant- α (TGF α), l'EGF et l'héparine liant l'EGF (HB-EGF). Ils agissent de manière à stimuler la voie des kinases régulées par les signaux extracellulaires 1/2 (ERK1/2) et la voie phosphoinositide 3-kinase/protéine kinase B (PI3K/AKT) par activation des récepteurs à l'EGF et au HGF (EGFR et HGFR), entraînant ainsi la survie et la prolifération des cellules. Ces facteurs, essentiels pour cette étape, sont nommés mitogènes complets. Il existe aussi des facteurs dits mitogènes auxiliaires comme le TNF α , la noradrénaline, l'IL-6 qui participent à la phase de prolifération, mais dont le rôle ne conditionne pas la régénération du foie (Mao et al., 2014; Michalopoulos and Bhushan, 2021; Tao et al., 2017).

c) Phase d'arrêt de la régénération

Cette étape est communément appelée phase de terminaison et correspond au moment où le foie a retrouvé une masse nécessaire à sa fonction. Des signaux sont alors émis et stoppent la prolifération cellulaire. L'acteur le plus étudié dans cette phase est le TGF- β qui joue un rôle antiprolifératif (Mao et al., 2014; Tao et al., 2017).

II. Le carcinome hépatocellulaire

A. Généralités

Avec 905.677 nouveaux cas et 830.180 décès dénombrés dans le monde en 2020, le cancer primitif du foie est le 6^e cancer le plus fréquent et le 2^e cancer le plus mortel (Global Cancer Observatory, 2020). Les régions les plus touchées par le cancer du foie sont l'Asie, l'Europe, l'Afrique et l'Amérique du Nord (Figure 9). Parmi les cancers primitifs du foie, on distingue le cholangiocarcinome intrahépatique (15-25%) et le carcinome hépatocellulaire (CHC) (75-85%). L'incidence et la mortalité du CHC sont dépendantes de plusieurs facteurs de risque qui peuvent être environnementaux ou infectieux, mais aussi de la capacité de détection de celui-ci à un stade permettant un traitement curatif efficace. Le CHC est plus fréquent chez l'homme que chez la femme et son incidence augmente avec l'âge. De plus, la majorité des cas de CHC détectés sont situés dans des pays dits pauvres ou en voie de développement. On peut également noter que l'âge médian d'apparition du CHC diffère selon la localisation géographique. En Europe, au Japon ou en Amérique du Nord, la médiane d'âge se situe au-dessus de 60 ans alors que pour les pays d'Afrique ou d'Asie, elle oscille autour de 30-60 ans. Cette différence s'explique principalement par son étiologie (Yang et al., 2019).

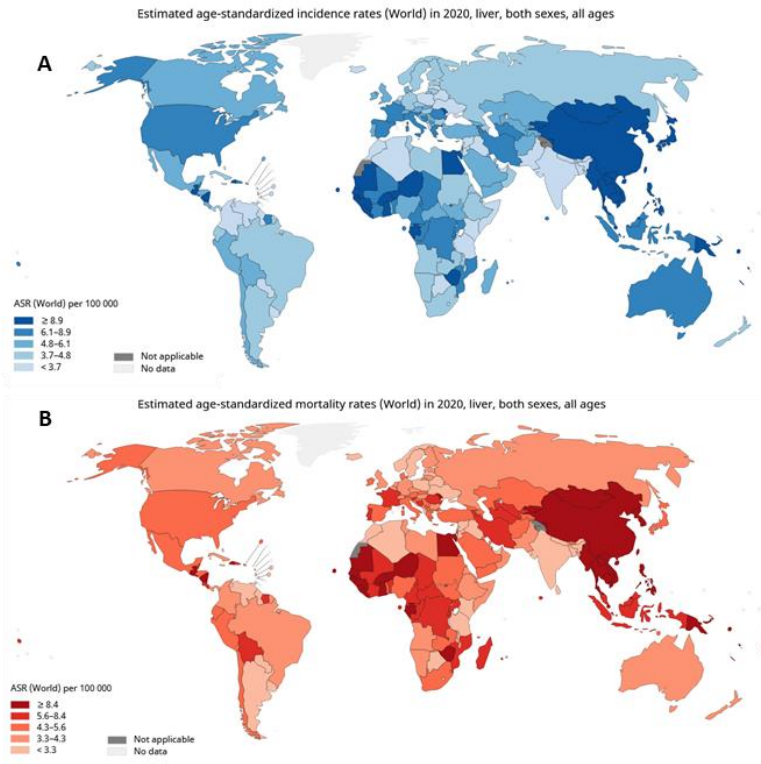


Figure 9 : Répartition globale des cancers primitifs du foie en ASR par 100.000 personnes selon l'incidence (A) et la mortalité (B). L'incidence et la mortalité des cancers primitifs du foie sont plus important dans les pays d'Asie et d'Afrique ("Cancer today," 2020).

B. Étiologie

Les facteurs de risque d'apparition des CHC sont multiples et dépendants de critères sociodémographiques comme l'habitat ou le revenu des patients. Dans la majorité des cas, le CHC se développe sur un foie cirrhotique ou subissant une inflammation chronique. On retient parmi les causes majeures d'apparition, les infections aux virus de l'hépatite B et C, les contaminations à l'aflatoxine, l'alcool, le tabac et la stéatopathie non alcoolique (NAFLD) (McGlynn et al., 2015) (Figure 10).

La majorité des cas de CHC surviennent dans un contexte d'infection aux virus de l'hépatite B et C. L'hépatite peut se transmettre verticalement chez la femme enceinte ou horizontalement par le biais d'expositions au sang ou encore par transmission sexuelle. La solution la plus efficace pour prévenir l'hépatite B est la vaccination des nouveau-nés. Il n'existe pas en revanche de vaccin pour le virus de l'hépatite C, mais des thérapies permettant de diminuer et réguler la charge virale chez le patient. L'hépatite B est la cause majeure de survenue de CHC dans les pays d'Asie et d'Afrique, alors que le virus le plus retrouvé dans les CHC en Europe, au Japon et en Amérique du nord est le virus de l'hépatite C.

L'alcool est le deuxième facteur de risque du CHC derrière l'hépatite C en Europe et en Amérique du Nord. La consommation d'alcool que ce soit de façon chronique ou aiguë peut entraîner une stéatohépatite alcoolique qui augmente le risque de développer une cirrhose pouvant conduire à l'apparition de CHC. La consommation d'alcool couplée à une infection chronique à l'hépatite augmente par deux les risques de développer un CHC.

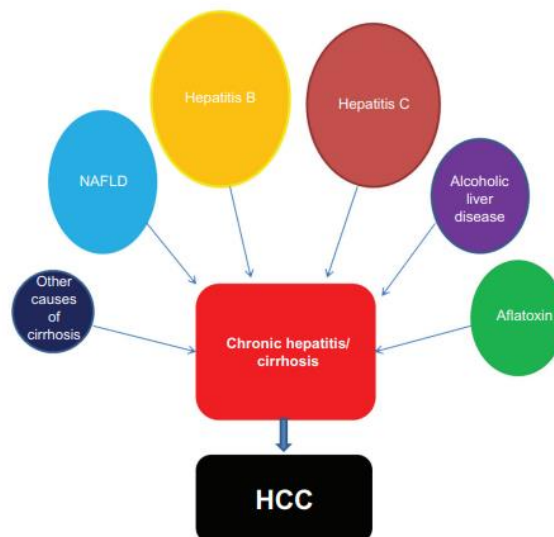


Figure 10 : Les facteurs de risque dans le CHC. Parmi ceux-ci, nous retrouvons la NAFLD, l'hépatite B et C, l'alcool et l'aflatoxine. Les dommages provoqués par les facteurs de risque entraînent une inflammation et une fibrose conduisant à l'apparition d'une cirrhose ou d'une hépatite chronique. À terme, la répétition des dommages mène au CHC (Dhanasekaran et al., 2012).

Le tabac est également un facteur de risque. La cigarette apporte de nombreux carcinogènes qui agissent de façon globale sur l'organisme. Des études ont montré l'effet inducteur du tabagisme sur l'apparition d'une fibrose hépatique par l'apport de substances chimiques cytotoxiques qui provoquent un stress oxydatif et une inflammation hépatique.

L'aflatoxine est aussi connue comme un toxique très hépatocarcinogène. L'association entre le CHC et l'aflatoxine est retrouvée dans les pays en développement. Le mauvais stockage des céréales et des oléagineux permet le développement d'*Aspergillus* qui produit l'aflatoxine. La métabolisation de l'aflatoxine provoque l'apparition d'adduits à l'acide l'ADN provoquant le plus souvent la mutation du gène codant la protéine tumorale p53 (*TP53*). Il existe dans les pays en développement une colocalisation géographique des contaminations à l'aflatoxine avec le virus de l'hépatite B ce qui augmente très fortement les risques de cancer du foie.

Les maladies de type stéatopathie alcoolique ou non alcoolique (ASH ou NAFLD) regroupent les stades allant du foie stéatosé au foie cirrhotique en passant par la stéatohépatite et la fibrose. Ces maladies se traduisent par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes qui morphologiquement s'arrondissent (hepatocyte-ballooning) et entrent en apoptose, conduisant à une inflammation du tissu et à une fibrose. Dans le cas de la stéatopathie non alcoolique, le facteur de risque majeur est l'obésité associée à un syndrome métabolique et un diabète de type 2 insulino-dépendant. La NAFLD est une maladie liée le plus souvent au mode de vie des pays dits développés. On la retrouve le plus fréquemment aux États-Unis, en Europe et en Australie.

D'autres facteurs de risque existent, comme l'acide aristolochique produit par les plantes du genre *Aristolochia*. Utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise, l'acide aristolochique s'avère être un mutagène et contribue à la prévalence des CHC en Asie. Enfin, les maladies chroniques biliaires et les maladies métaboliques du foie constituent aussi des facteurs de risque (Bettermann et al., 2014; Kim and Viatour, 2020; Levrero, 2006; Neuschwander-Tetri, 2017; Severi et al., 2010; Yang et al., 2019).

C. Classification

1. Classification d'Edmondson et Steiner

Le CHC est un cancer connu pour sa grande hétérogénéité ce qui a amené à la recherche de thérapie pouvant cibler le spectre large de CHC existant. D'un point de vue histologique, on peut aujourd'hui classer les CHC selon leur état de différenciation. La première classification ayant pris en compte l'état de différenciation des CHC date de 1954 (Edmondson et Steiner). Cette classification en quatre grades (I à IV) permet une meilleure évaluation du CHC, mais

aussi un regroupement des patients d'un même grade en vue de faciliter la réalisation d'essais cliniques (Edmondson and Steiner, 1954) (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification d'Edmondson et Steiner (Edmondson and Steiner, 1954)

Grade	Architecture	Morphologie cellulaire
I	CHC bien différencié d'aspect trabéculaire	Hépatocyte d'aspect « normal »
II	CHC bien différencié, d'aspect trabéculaire avec de rares aspects acineux et glandulaires	Cellules avec cytoplasmes abondants, noyaux plus larges, hyperchromatiques, nucléolés
III	Bile moins abondante, rares formations acineuses	Atypies nucléaires marquées (> grade II), cellules géantes multinucléées
IV	CHC peu différencié	Cellules avec cytoplasme réduit et noyaux proéminents

2. Les nouvelles classifications basées sur les mutations génétiques et moléculaires

L'avènement du séquençage et des analyses transcriptomiques a permis d'améliorer considérablement les connaissances sur les mécanismes de développement des CHC. La très forte hétérogénéité des CHC explique l'existence d'une multitude de classifications (Figure 11). Les nombreux facteurs de risque et les différentes altérations génétiques et épigénétiques qui en découlent contribuent à cette hétérogénéité. Néanmoins, quelques altérations sont fréquemment retrouvées, telles que les mutations de *TP53* et du gène codant la β -caténine (*CTNNB1*) et respectivement dans 20-40% et 20% des CHC (Zucman-Rossi, 2010).

En 2004, à partir de données transcriptomiques provenant de 91 CHC de patients, l'équipe de Thorgeirsson délimite deux groupes, le cluster A et le cluster B, associés à la survie du patient. Ils corrélaient la faible survie du patient à des signatures de gènes relatives à la prolifération et la survie soulignant de ce fait l'aspect de différenciation, déjà décrit par Edmondson et Steiner, dans les CHC (Lee et al., 2004).

D'autres classifications basées sur les données transcriptomiques permettent d'enrichir les connaissances sur les groupes de CHC, notamment par l'apport de données cliniques. En intégrant les données cliniques et génétiques de 57 patients, l'équipe de Zucman-Rossi distingue 6 sous-groupes de CHC de G1 à G6. G1 correspond à un groupe de patients jeunes

présentant une infection à l'hépatite B et une mutation du gène de l'Axine 1 (*AXIN1*). Il partage avec G2 la mutation *AXIN1* et l'activation de la voie AKT. En plus de la mutation *AXIN1*, les CHC de G2 possèdent des mutations de *TP53* et de la sous-unité catalytique α de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase (*PIK3CA*). G3 est également muté *TP53*. G4 est un groupe possédant la mutation du gène codant le facteur nucléaire 1- α des hépatocytes (*HNF1A*) et les groupes G5 et G6 sont mutés *CTNNB1* avec activation de la voie WNT/ β -caténine. Par la suite, l'intégration de données de 125 CHC dont 24 ayant un séquençage de l'exome permettra d'identifier la voie WNT/ β -caténine comme la voie la plus fréquemment altérée. Elle est suivie de *TP53* et des complexes de remodelage de la chromatine. On retrouve aussi les voies des protéines kinases activées par les mitogènes (RAS/MAPK) et le facteur nucléaire 2 apparenté à l'érythroïde (*NFE2L2*) impliquées dans l'homéostasie du stress redox (Boyault et al., 2007; Guichard et al., 2012).

La classification d'Hoshida intègre ensuite les données génétiques de 603 patients en y incluant des données cliniques, anatomopathologiques (immunohistochimie β -caténine ; protéine kinase B phosphorylé, pAKT ; p53) et biologiques (culture cellulaire Huh7 et SNU-387). Trois groupes (S1, S2 et S3) sont identifiés. On retrouve la mutation *CTNNB1* qui est enrichie dans la signature S3, la mutation *TP53* dans les signatures S1 et S2 et une dérégulation de la voie AKT pour S2. Les groupes S1-S2 sont caractérisés par une différenciation faible à modérée, contrairement au groupe S3 bien différencié. Cette étude corrèle également la survie très faible des patients à un phénotype des cellules faiblement différenciées (Hoshida et al., 2009).

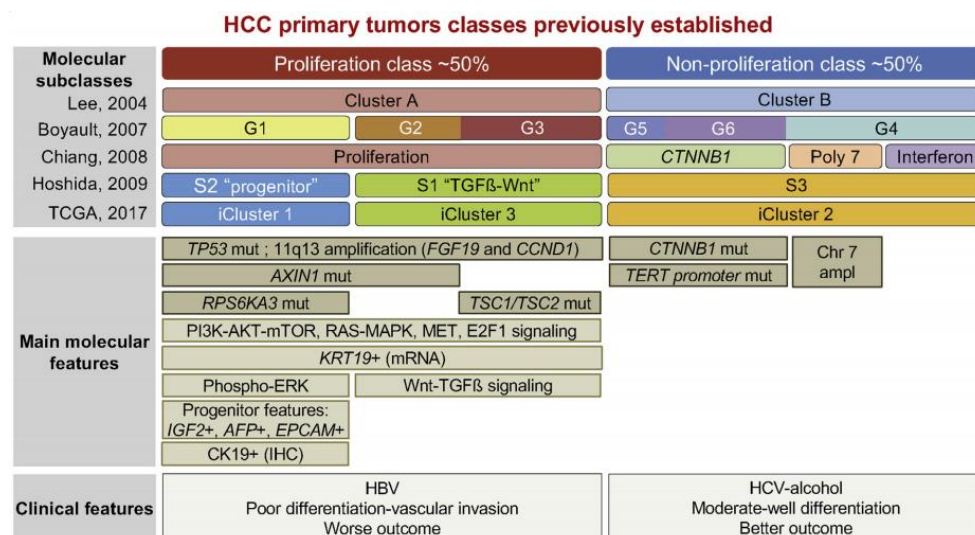


Figure 11 : Résumé des classifications moléculaires dans le CHC. Nous distinguons les CHC prolifératifs et non prolifératifs. Les CHC prolifératifs sont peu différenciés contrairement aux CHC non-prolifératifs dont la différenciation va de modéré à bien différencié. La classe proliférative regroupe les mutations *TP53*, *AXIN1*, *RPS6KA3* et *TSC1/TSC2* alors que la classe non proliférative réunit les mutations *CTNNB1* et *TERT* (Caruso et al., 2019).

Plus récemment, l'intégration de nouvelles variables dans le but de préciser les groupes de CHC est devenue un enjeu dans la recherche de nouvelles thérapies ciblées. Depuis peu, l'étude du métabolisme au sein des tumeurs permet une nouvelle approche dans le traitement des tumeurs. En 2018, Musso et ses collaborateurs ont intégré, à partir des données de 1133 CHC, une dimension métabolique. Leur classification décrit 4 groupes qui sont répartis selon la zonation dans le foie, le microenvironnement tumoral, le profil de différenciation (progéniteur or hépatocyte) et le métabolisme. Ces groupes sont nommés : périportal (PP), périveineux (PV), matrice extracellulaire (ECM) et cellule souche (STEM). Les signatures « périportal » et « périveineux » sont les moins agressives et elles possèdent le plus souvent la mutation *CTNNB1*. À l'inverse, les signatures « matrice extracellulaire » et « cellule souche » sont plus agressives et possèdent quant à elles la mutation *TP53* de façon majoritaire (Désert et al., 2017, 2018) (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification moléculaire des CHC (Désert et al., 2018)

Premier auteur	Année	Nombre de CHC	Nombre de groupes	Classification
Lee	2004	91	2	Cluster A-Cluster B
Boyault	2006	56	6	G1-G6
Chiang	2008	91	5	CTNNB1-prolifération
Hoshida	2009	232	3	S1-S3
Désert	2017	1133	4	PP – PV- ECM-STEM
TCGA network	2017	559	3	iCluster 1-iCluster 3

D. Carcinogénèse

1. Contexte anatomo-physiologique

Le CHC est connu pour se développer majoritairement (80-90%) sur foie cirrhotique. Le foie évolue vers une fibrose hépatique, puis une cirrhose. L'apparition d'une cirrhose suivi d'un CHC est consécutive aux différents facteurs de risque environnementaux (Alcool, tabac, alimentation, etc...) et infectieux (Hépatite B et C) décrits dans le CHC (Bralet et al., 2000; Desai et al., 2019; Kumar et al., 2007). La cirrhose peut également être divisée en deux catégories : la cirrhose « compensée » qui est asymptomatique et cirrhose « décompensée » qui est la phase où les symptômes apparaissent avec notamment des complications. Il subsiste cependant une proportion non négligeable des CHC qui se développent sur foie non cirrhotique

(10-20% des cas). Ils sont très difficiles à appréhender, car détectés dans des stades tardifs, souvent métastatiques du fait de l'absence de signes cliniques précurseurs. Les facteurs de risque les plus retrouvés dans ce contexte sont les syndromes métaboliques associés à la NAFLD, l'hépatite B ou encore une surcharge en fer.

2. La fibrose hépatique et la cirrhose

La fibrose se caractérise par une accumulation de matrice extracellulaire (ECM) qui va interférer avec l'architecture du foie. Dans un contexte délétère pour le foie, les cellules hépatiques sont endommagées et relarguent des corps apoptotiques ainsi que des molécules nommées motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP). Ces signaux de danger sont interceptés par les cellules stellaires et Kupffer de l'environnement immédiat qui activent une réponse inflammatoire et provoquent la fibrose. Les cellules stellaires activées se transforment en myofibroblastes. Ces cellules, d'ordinaire impliquées dans la réparation tissulaire, prolifèrent et produisent de façon excessive de la matrice. Un effet pervers de cette activation des myofibroblastes est l'activation des cellules de la réponse immunitaire (Kupffer et lymphocyte) par production de cytokines pro-inflammatoires. Une boucle se forme alors entre l'activation des cellules inflammatoires et le maintien de la population de myofibroblastes (Figure 12). La progression de la fibrose provoquera l'apparition de la cirrhose hépatique (Roehlen et al., 2020).

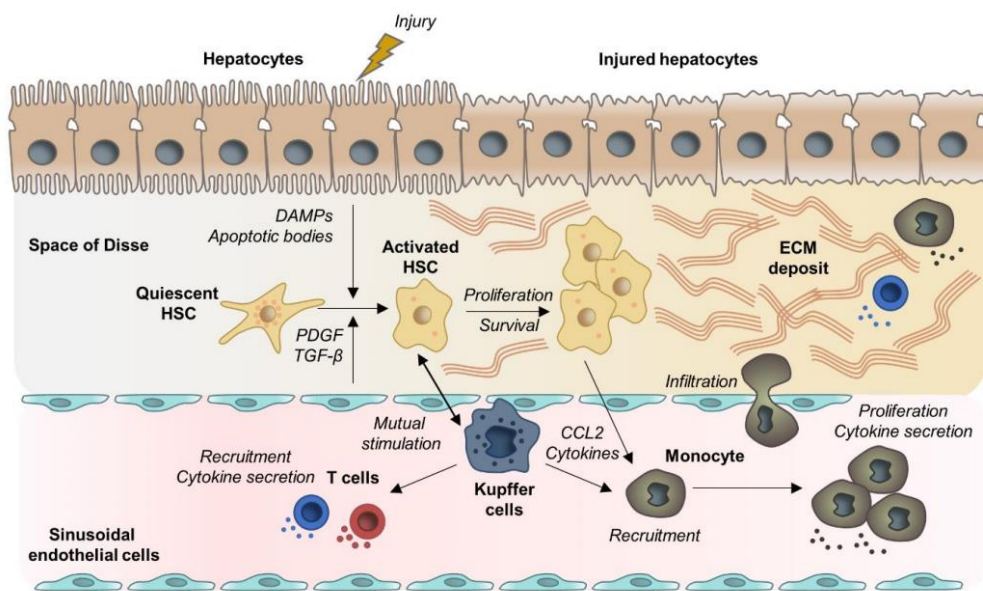


Figure 12 : Mécanisme de la fibrose hépatique. Les dommages répétés au niveau du foie provoquent un relargage de signaux DAMPs. Ces signaux activent les cellules stellaires hépatiques qui se transforment en myofibroblastes caractérisés par une production excessive de matrice extracellulaire. En parallèle, les cellules immunitaires sécrètent des cytokines pro-inflammatoires participant à l'inflammation et à l'activation des myofibroblastes. La répétition de ces processus provoque une accumulation de matrice extracellulaire (fibrose) qui débouche sur une cirrhose et un CHC (Roehlen et al., 2020).

Enfin, la répétition des processus inflammatoires, de la fibrose et de l'extinction du parenchyme provoquent la cirrhose hépatique. Tous ces phénomènes mènent à un remodelage architectural du foie et une apparition de nodules hépatiques hyperplasiques et dysplasiques, avec remplacement des hépatocytes par des zones de dépôt de collagènes. L'augmentation de la pression portale qui en résulte est un des principaux signes cliniques de la cirrhose, le dernier stade avant l'apparition du CHC (Tsochatzis et al., 2014; Wanless, 2020).

E. Diagnostic et suivi

1. Outils cliniques

La surveillance du CHC est très importante notamment dans les premières étapes de la maladie. Plusieurs facteurs permettent un dépistage assez simple chez le patient, notamment le fait que les populations à risques sont identifiées et que les moyens de diagnostic sont très efficaces. Le diagnostic d'un CHC chez un patient se base sur des critères histologiques couplés à des tests cliniques (sérologie).

La surveillance par imagerie tous les 6 mois à 12 mois est la plus méthode la plus commune, car elle est non invasive. Il existe différentes méthodes d'imagerie : l'ultrasonographie (US), la tomodensitométrie (CT) ou encore l'imagerie par résonance magnétique (MRI) (Yang et al., 2019; Yang and Roberts, 2010).

Dans le cas des CHC inférieurs à 1 cm, l'ultrasonographie est la plus courante, car elle est peu coûteuse et n'utilise pas de radiation ionique. Elle fonctionne par échogénéicité et sa sensibilité de détection est de 58-70%. L'injection de produits de contraste couplé à l'US, nommée imagerie échographique à renforcement de contraste (CEUS), permet également d'observer en temps réel la vascularisation de la tumeur (Figure 13) (Palmieri et al., 2015).

Pour les CHC de plus de 1 cm, on recourt à la tomodensitométrie (CT) ou l'imagerie par résonance magnétique (Figure 13). La CT reste la méthode la plus commune et fait appel à des produits de contraste peu radioactif. Sa sensibilité et sa spécificité de détection sont respectivement de 81 et 93%. Cette méthode fournit des informations comme le niveau de graisse, de fer, de calcification, d'hémorragie ou encore permet le suivi d'un traitement après chimioembolisation. Elle permet de reconstituer une image tridimensionnelle utile dans la préparation d'une opération. Cependant, la CT n'est pas conseillée de manière répétée, car elle peut provoquer des réactions allergiques, des néphropathies et il y a également des risques de fuites de produit de contraste.

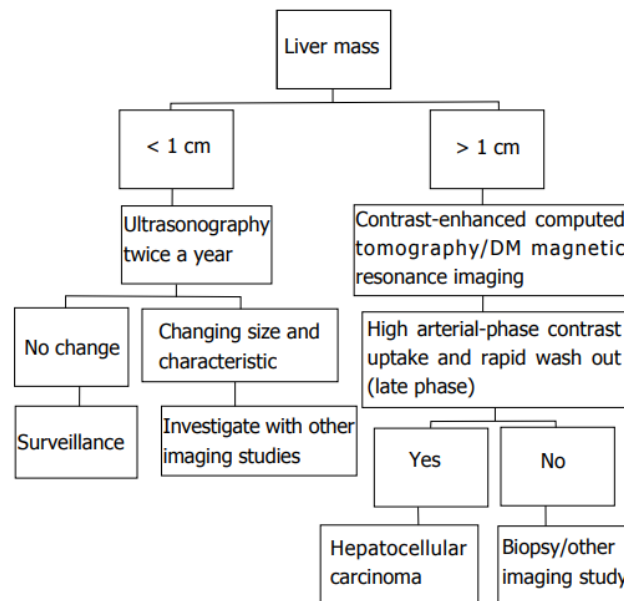


Figure 13 : Diagnostic du CHC grâce à l'imagerie. La taille de la tumeur conditionne le diagnostic du CHC. Une tumeur de moins de 1 cm entraîne une première phase de suivi par ultrasonographie. Une évolution des paramètres de la tumeur mène à une évaluation par d'autres méthodes d'imageries. Dans le cas d'une tumeur supérieure à 1 cm, le suivi se fait par tomographie ou imagerie à résonance magnétique afin d'évaluer la présence de CHC. Dans le cas d'une absence de CHC, d'autres investigations sont menées comme un prélèvement de type biopsie ou d'autres méthodes d'imagerie (Dimitroulis et al., 2017).

La MRI est considérée comme la méthode la plus sensible pour détecter et caractériser un CHC. Sa sensibilité et sa spécificité sont de 91 et 95%. L'avantage de cette méthode est l'association à l'imagerie fonctionnelle. La plus utilisée est l'imagerie pondérée par diffusion (DWI) qui se base sur les mouvements browniens de l'eau dans les tissus. En effet, les tumeurs malignes sont sujettes à des modifications de diffusion de l'eau se traduisant par un changement de signal. L'imagerie de susceptibilité magnétique (SWI) est très utile pour détecter les petites tumeurs. Cette méthode fait appelle également à un agent contrastant non spécifique à base de gadolinium (Ayuso et al., 2018; Dimitroulis et al., 2017; Henedige and Kundapur Venkatesh, 2013; Sun and Song, 2015).

L'autre versant du diagnostic est la recherche de marqueurs sérologiques permettant d'évaluer l'état du CHC chez le patient. Le plus connu des marqueurs est la protéine sérologique α -foetoprotéine (AFP) qui est souvent combinée à l'imagerie. Introduit dans les années 1960, ce marqueur de dommages au niveau hépatique est généralement utilisé pour la détection du CHC. Bien que sa spécificité soit d'environ 90%, sa sensibilité dans le diagnostic du CHC n'est que de 60% ce qui est insuffisant dans le diagnostic du CHC (Trevisani et al., 2001). De plus, le marqueur AFP n'est plus recommandé dans la détection de CHC précoce, car il ne détecte pas

30% de ceux-ci, que son taux peut revenir à la normale dans 15-30% des cancers et enfin que son augmentation est parfois spécifique notamment dans le cas d'hépatite et de cirrhose ce qui rend le diagnostic du CHC incertain (De Stefano et al., 2018; Luo et al., 2020).

On peut par ailleurs noter que d'autres marqueurs, plus sensibles et spécifiques, ont été découverts, permettant une meilleure détection des CHC. C'est notamment le cas de l'AFP-L3 qui est une classe d'AFP se fixant à la lectine qui est plus spécifique que l'AFP totale. La protéine glypicane 3 (GPC3) est un membre de la famille héparane sulfate qui module la morphogénèse. Son expression est quasiment nulle dans le foie normal alors qu'elle est très forte dans le CHC. À noter que des études cliniques sur des anticorps anti-GPC3 et des peptides dérivés de GPC3 ont montré des effets prometteurs dans le traitement du CHC. L'ostéopontine (OPN) est une protéine de la matrice extracellulaire qui n'est pas exprimée normalement dans l'hépatocyte. Sa forte expression est retrouvée dans le CHC et de façon intéressante, son expression est corrélée avec le phénotype souche des cellules dans le CHC. La prothrombine des-gamma-carboxyprothrombine (DCP) est pareillement utilisée dans le diagnostic du CHC, car c'est un marqueur qui peut traduire une prolifération et une angiogenèse. De la même manière, l'augmentation de la protéine du Golgi 73 (GP73) dans le sang traduit une prolifération et une invasion cellulaire du CHC après la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

D'autres études ont mis en évidence l'importance d'analyser la présence de microARN (ARNmi). Ces ARNmi, que l'on peut retrouver dans la circulation sanguine, sont fortement exprimés dans les CHC. Un autre marqueur prometteur est la protéine de choc thermique 90 α (HSP90 α) qui augmente fortement dans les cancers et qui est retrouvé dans le CHC. Il a été démontré que cette chaperonne permet la détection des CHC AFP négatif de manière très performante (De Stefano et al., 2018; Luo et al., 2020).

2. Classification clinique des patients

Il existe plusieurs classifications permettant aux cliniciens de hiérarchiser les patients atteints de CHC et d'adapter le traitement. Cependant, il n'y a pas, à ce jour, de classification qui fasse l'unanimité. La classification « Tumor-node-metastasis » (TNM) développée par le comité « American joint committee on cancer » (AJCC) prend en compte la taille et la propagation de la tumeur (statut de la tumeur). La première version de cette classification n'était pas optimale et a subi une révision en 2002 (Vauthey et al., 2002). Elle sera par la suite améliorée encore par

des chercheurs japonais du groupe d'étude « Liver Cancer Study Group of Japan » (LCSGJ), mais elle n'est pas la plus utilisée en clinique (Olthoff et al., 2011).

Il existe également la classification d'Okuda qui inclut en plus des paramètres tumoraux, les paramètres de fonctionnalité hépatique (albumine, bilirubine ...). Ces paramètres sont importants, car le pronostic du patient dépend aussi des performances hépatiques. D'ailleurs, le « Child-Turcotte-Pugh » (CTP) est un système simple de classification, exclusivement basé sur une notation de la fonction hépatique. Le problème de cette classification est finalement sa simplicité qui ne permet pas une approche précise de l'évaluation des CHC. D'autres classifications ont été établies comme le « Model for end-stage liver disease » (MELD), le « Cancer of the Liver Italian Program » (CLIP), le « Hong Kong Liver Cancer » (HKLC) ou encore en France le « Groupe d'Étude et de Traitement du Carcinome Hépatocellulaire » (GRETCH). C'est finalement la classification « Barcelona Clinic Liver Cancer » (BCLC) qui semble faire consensus. Elle prend en compte les paramètres de la tumeur (taille, nombre ...), de la fonction hépatique en intégrant le CTP et de la santé générale du patient (Score du groupe coopératif d'oncologie de l'Est, ECOG) (Figure 14).

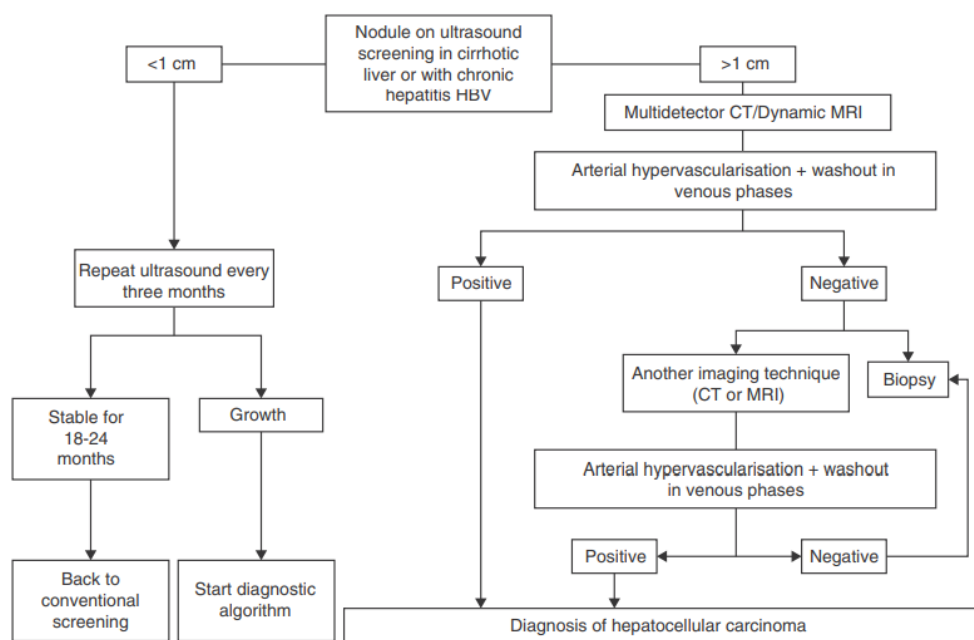


Figure 14 : Diagnostic du CHC établi selon la classification BCLC. Dans un contexte d'apparition de la tumeur dans le foie du patient, la taille des nodules conditionne l'examen. Une taille de moins de 1 cm est suivie tous les 3 mois par ultrasonographie. Une tumeur stable amène un retour à un dépistage conventionnel alors qu'une croissance tumorale provoque une réévaluation du diagnostic. Dans le cas où la tumeur est supérieure à 1 cm, une tomographie à émission de positons ou une imagerie à résonance magnétique sont réalisés. Le résultat positif de l'imagerie conduit au diagnostic d'un CHC alors qu'un résultat négatif mène à un approfondissement des examens avec des biopsies et d'autres techniques d'imagerie (Forner et al., 2016).

En définitive, ces différentes classifications nous montrent la multitude de paramètres à prendre en compte dans le pronostic du patient. Ces paramètres comprennent les caractéristiques de la tumeur tels que la taille, le nombre de nodules, l'invasion vasculaire et la propagation intrahépatique mais aussi des paramètres physiologiques du foie comme la fonction hépatique (Ayuso et al., 2018; Dimitroulis et al., 2017; Liver and Cancer, 2012; Olthoff et al., 2011; Yang et al., 2019).

F. Traitements

La transplantation hépatique est indiquée pour les patients dans les stades précoces du CHC. Cette approche permet non seulement d'enlever la tumeur, mais elle permet aussi d'effacer la cirrhose sous-jacente. Néanmoins, la forte incidence du CHC et le peu de greffons disponibles restreignent ce choix. Un délai trop important peut finalement conduire à l'annulation de la transplantation qui ne serait plus efficace. Elle sera alors remplacée par un autre traitement comme l'ablation ou la chimio-embolisation. La transplantation hépatique est envisagée quand la résection est exclue et que le patient rentre dans les critères de Milan. Ce sont un ensemble de critères restrictifs qui ont permis d'améliorer la transplantation et la survie du patient (70% de survie à 5 ans) (Figure 15). Pour rentrer dans ces critères, la taille de la tumeur ne doit pas être inférieure à 3 cm pour deux-trois nodules et inférieure à 5 cm pour un nodule (Mazzaferro et al., 2011).

La résection hépatique ou hépatectomie consiste en une ablation d'une partie du foie contenant la tumeur. Cette opération est privilégiée chez les patients contractant un CHC sans cirrhose. Sur cirrhose, les critères de sélection des patients sont rigoureusement appliqués pour éviter les complications et le risque accru de mortalité. Les patients doivent par ailleurs avoir des fonctions hépatiques préservées ou une cirrhose compensée sans hypertension portale (CTP, BCLC) et ils ne doivent pas présenter de métastases. Le problème de la résection hépatique réside dans son taux de survie à 5 ans qui est très bas (20-30%) et varie fortement. De plus, la récurrence à 5 ans varie également beaucoup avec des pourcentages allant de 18% jusqu'à 72% (Orcutt and Anaya, 2018).

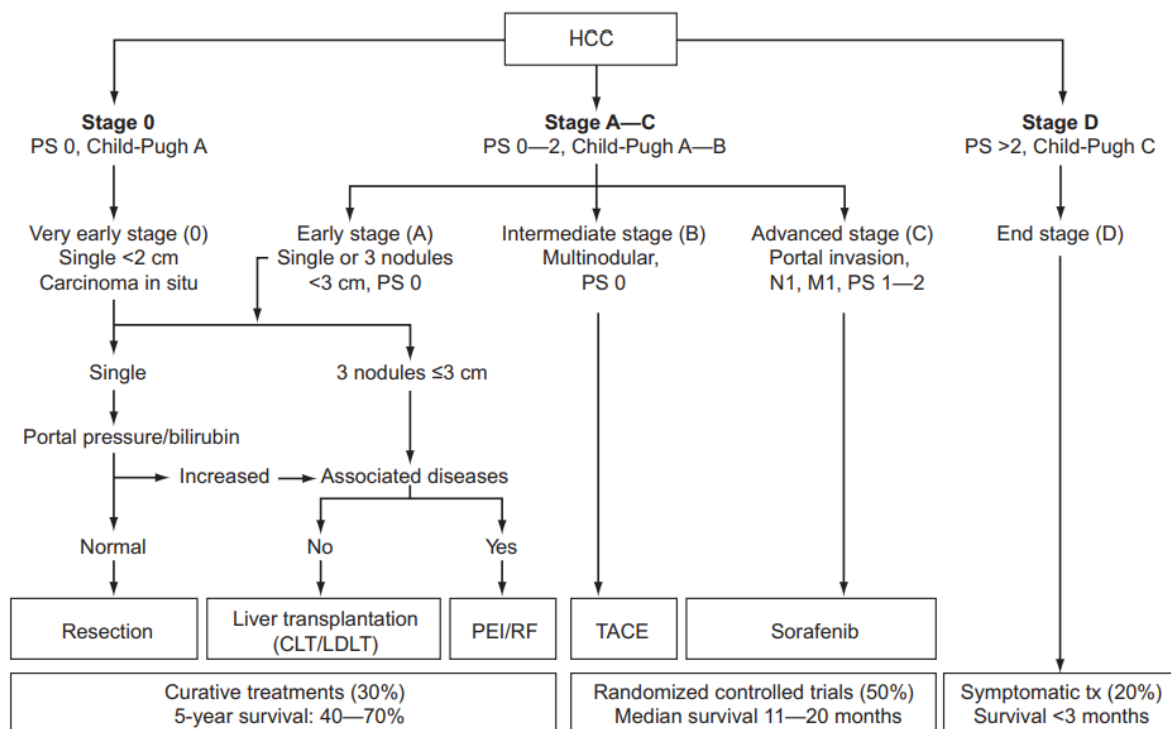


Figure 15 : Planning de traitement selon le stade d'avancement du CHC établi selon la classification BLCL. Les stades 0 et A correspondant aux stades précoces entraînent selon le diagnostic une résection, une transplantation ou une ablation percutanée. Dans le cas du stade B, le patient subit une chimioembolisation transartérielle alors que dans le stade C le patient est traité au sorafénib. Le stade D traduit un stade tardif sans possibilité de traitements (Raoul et al., 2011).

Dans les années 90, des équipes de chercheurs ont tenté une nouvelle approche en modifiant un appareil de radiofréquence pour étudier les effets d'une piqûre thermique sur des nodules du foie. Ils inventent alors la technique d'ablation par radiofréquence (RFA) ou destruction percutanée. Ils ont pour cela utilisé une aiguille comme électrode monopolaire isolée pour permettre d'appliquer un courant à l'extrémité de l'aiguille. Les piqûres des nodules du foie avec application d'un courant provoquent un point thermique engendrant alors une nécrose coagulante. Dans le cas de la RFA, les nodules ne doivent pas dépasser 5 cm de diamètre. Cette méthode peut aussi faire appel non pas à un point thermique, mais à l'injection d'éthanol dans la tumeur. Cette technique d'injection percutanée cause la déshydratation et la nécrose des cellules tumorales causant une thrombose et une ischémie de la tumeur. Elle est efficace sur des nodules de moins de 3 cm. D'autres alternatives existent utilisant notamment l'acide acétique, les micro-ondes, le froid ou encore le laser. Ces différentes techniques sont considérées comme sûres et efficaces dans le traitement de CHC dans le cas où la chirurgie n'est pas adaptée. Cette méthode nécessite cependant une bonne fonction hépatique. La cirrhose avancée ne permet donc pas d'envisager cette voie (McGahan and Dodd, 2001; Weis et al., 2013).

La chimioembolisation transartérielle (TACE) est l'intervention standard dans le cadre d'un CHC intermédiaire multinodulaire non résécable sans invasion vasculaire ou extrahépatique. Elle consiste en l'injection de l'agent chimiothérapeutique (doxorubicine, cisplatine, epirubicine, ...) couplé à de l'huile éthiodée (Lipiodol) par l'artère hépatique suivie d'une embolisation de celle-ci afin de provoquer une rétention du produit dans la zone d'intérêt et d'induire l'ischémie et la nécrose de la tumeur. L'inconvénient majeur de la TACE est l'apparition du syndrome post-embolisation consécutif à l'ischémie se traduisant par des douleurs abdominales, des nausées ou de la fatigue (Liver and Cancer, 2012; Prenner and Kulik, 2018; Raoul et al., 2011). La radioembolisation transartérielle (TARE) est une alternative à la TACE où l'on injecte des composants radioactifs à la place des chimiothérapies. Cette méthode a l'avantage de réduire le syndrome post-embolisation de la TACE (Moreno Luna et al., 2009). Différents isotopes radioactifs couplés au lipiodol sont utilisés comme l'Iode 131 (131I), le Rhénium-188 (188Re), l'Holmium 166 (166Ho) ou encore l'Yttrium-90 (90Y). C'est ce dernier qui est le plus utilisé sous la forme de microsphères radiomarquées 90Y qui une fois injectées provoquent une embolisation en plus d'avoir un effet radiothérapeutique (Kallini et al., 2016; Mahnken, 2016; Salem et al., 2011).

Dans le cadre d'un CHC très avancé sans possibilité d'opération, la dernière ligne thérapeutique utilisée est l'administration systémique d'agents pharmaceutiques. Le médicament standard est le sorafenib (Nexavar®) qui est administré oralement. C'est un inhibiteur de sérine-thréonine kinases qui inhibe de nombreux facteurs impliqués dans la prolifération (les sérines/thréonines kinases C-RAF et B-RAF) ainsi que l'angiogenèse (le facteur de croissance endothélial vasculaire, VEGFR ; le récepteur β du facteur de croissance plaquettaire, PDGFR β ; le proto-oncogène RET ; le récepteur tyrosine kinase FMS 3, FLT3). Ce traitement a démontré une augmentation de la survie des patients lors d'essais cliniques randomisés. Cette augmentation reste cependant modeste avec une médiane de 3 mois par rapport au placebo. Plusieurs effets secondaires ont été recensés comme de l'hypertension, de la toxicité rénale ou encore une hépatotoxicité (Llovet et al., 2008; Yamamoto and Kondo, 2018). Plus récemment, le regorafenib (BAY 73-4506), un autre inhibiteur de sérines/thréonines kinases, a montré une amélioration de la médiane de survie de 2 mois chez les patients comparés au placebo. Le regorafenib pourrait ainsi être utilisé en combinaison d'autres agents thérapeutiques pour améliorer la survie du patient ou encore dans le cas d'un échec dans le traitement des patients au sorafénib. Il faut cependant noter que le regorafenib possède, comme le sorafenib, plusieurs

effets secondaires dont les plus fréquents sont de l'hypertension, des réactions cutanées et des diarrhées (Bruix et al., 2017).

G. La résistance primaire ou acquise

Au cours des traitements de patients, il a été observé que des tumeurs résistaient au sorafénib. Xin et ses collaborateurs ont ainsi démontré que des cellules souches marquées à la cyanine 5 (LRCC) résistaient au Sorafénib. En outre, ils ont constaté que ces cellules résistantes pouvaient reconstituer une tumeur à partir d'un petit nombre de cellules (Xin et al., 2013). Cette résistance peut être de deux types : la résistance primaire est constitutive et liée à un sous-groupe de CHC ; la résistance acquise ou adaptative apparaît en cours de traitement sur des cellules initialement sensibles (Zhu et al., 2017). Nous pouvons également retenir que la résistance aux thérapies est souvent liée à un profil cellulaire peu différencié comme les CS/P (Cai et al., 2007; Chow et al., 2013; Xin et al., 2013; Xu et al., 2009). Ces cellules moins différenciées d'origine variée (Cai et al., 2007; Cerec et al., 2007; Holczbauer et al., 2013) sont associées à un mauvais pronostic (J.-S. Lee et al., 2006a).

H. Origines cellulaires du carcinome hépatocellulaire

L'origine des CHC a longtemps été attribuée à des altérations génétiques subies par des hépatocytes différenciés (J.-S. Lee et al., 2006a). Il apparaît cependant que d'autres types cellulaires peuvent être impliqués. Des études transcriptomiques ont ainsi montré que les CHC les plus agressifs possèdent des marqueurs de CS/P, suggérant que des cellules souches cancéreuses (CSC) contribuent à leur développement (J.-S. Lee et al., 2006a). L'équipe de Cai a proposé que les cellules souches résidentes du foie se transforment en CSC (Cai et al., 2007). Plus récemment, Holczbauer et al. (2013) ont montré que toutes les cellules du lignage hépatique (hépatocytes, hépatoblastes et CS/P) pouvaient être à l'origine des CHC. De plus, il a été montré que les hépatocytes tumoraux ont une capacité à se rétrodifférencier en CS/P, contribuant ainsi à l'alimentation du contingent de CSC (Cerec et al., 2007; Holczbauer et al., 2013). Des études au sein de notre laboratoire ont mis en évidence le rôle joué par l'environnement inflammatoire dans cette rétrodifférenciation (Dubois Pot Schneider et al., 2014a). Ainsi, la diversité des cellules à l'origine des CHC et la plasticité des cellules hépatiques contribuent à l'hétérogénéité des CHC, mais également à l'hétérogénéité cellulaire au sein d'un CHC.

III. Les cellules souches cancéreuses

A. Origine et définition

Les premières hypothèses sur le rôle des cellules souches dans la tumorigenèse apparaissent dans les années 60 et 70 avec le concept d'hétérogénéité tumorale. En séparant les cellules de myélomes des cellules hématopoïétiques normales, Park et ses collaborateurs constatent qu'un très faible pourcentage de cellules forme des colonies *in vitro* et *in vivo* (injection chez la souris). Ils émettent alors l'hypothèse que seule une fraction de cellules est capable de proliférer et de donner une tumeur (Park et al., 1971; Reya et al., 2001). Cette petite fraction est constituée de cellules indifférenciées qui génèrent de manière spontanée des tumeurs (Bruce and Van Der Gaag, 1963; Hamburger and Salmon, 1977; Kleinsmith and Pierce, 1964).

En 1990, l'équipe de John E. Dick identifie dans la leucémie myéloïde aiguë (AML) une sous-population cellulaire caractérisée par une présence du cluster de différenciation (CD) $CD34^+$ et une absence du $CD38^-$. Cette population $CD34^+/CD38^-$, qu'il définit comme des CSC, est la seule population cellulaire qui provoque une leucémie lorsqu'on l'injecte à des souris immunodéficientes (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Par la suite, des CSC sont identifiées dans différentes tumeurs solides telles que le cancer du sein, du colon, du pancréas, du foie ou des poumons (Visvader and Lindeman, 2012a). Dans le cancer du sein, une sous-population souche $CD44^+/CD24^-$ est à l'origine de l'émergence d'une tumeur alors que des dizaines de milliers de cellules de profils différents échouent à initier une tumeur (Al-Hajj et al., 2003). Ces différentes études soulignent l'hétérogénéité tumorale et amènent la communauté scientifique à distinguer deux modèles de croissance tumorale : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (Figure 16).

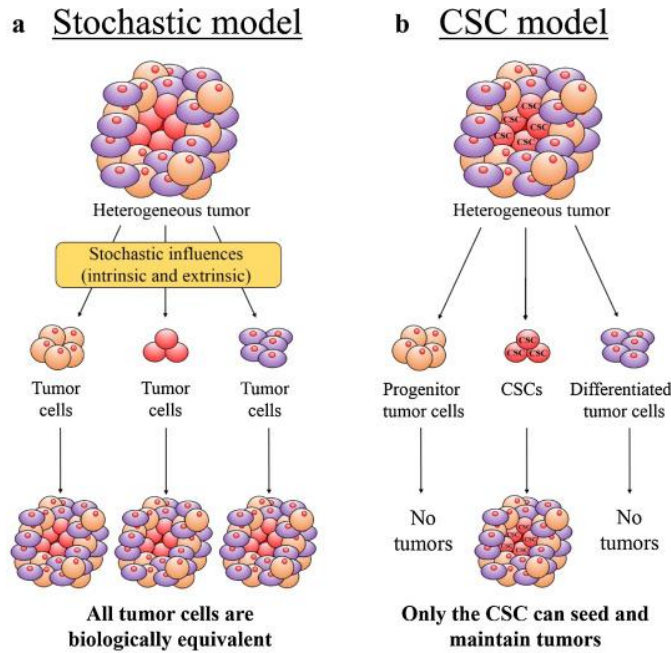


Figure 16 : Modèle de croissance tumorale. Le modèle stochastique considère qu’au sein de la tumeur, toutes les cellules ont un potentiel tumoral équivalent et peuvent faire émerger la tumeur. Dans le modèle CSC, il est établi que ce sont seulement les CSC qui peuvent initier et maintenir la tumeur (Koren and Fuchs, 2016).

Le modèle stochastique ne distingue pas les CSC du reste des cellules de la tumeur. N’importe quelle cellule peut ainsi subir des altérations génétiques et être à l’origine d’un clone tumoral (Fanali et al., 2014). Ce modèle suggère que de nombreuses cellules contribuent à l’hétérogénéité intratumorale. Dans ce modèle, la formation et la sélection des clones tumoraux résultent de facteurs intrinsèques (mutations) et extrinsèques (influence du micro-environnement) (Ginestier, 2017).

Dans le modèle hiérarchique, les CSC sont positionnées en haut de la pyramide hiérarchique. Elles ont la capacité d’initier et de maintenir la tumeur. Leur capacité d’autorenouvellement et de différenciation en différents types cellulaires contribue à l’hétérogénéité tumorale. Elles sont notamment à l’origine des non-CSC de la tumeur. Les chimiothérapies classiques qui ciblent principalement les cellules en forte prolifération éliminent les cellules tumorales non-CSC mais épargneraient les CSC quiescentes (Koren and Fuchs, 2016). Il semble donc pertinent de développer des traitements ciblant les CSC pour éliminer la tumeur à son origine et empêcher les récurrences. Il faut cependant noter que les modèles stochastique et hiérarchique ne sont pas mutuellement exclusifs. La création d’une matrice combinant les deux modèles a permis de mettre en évidence leur coexistence dans des cellules de cancer du côlon. De plus, ces modèles ont montré qu’une transition des cellules non-CSC vers les CSC peut passer par le modèle

stochastique (Wang et al., 2014). Un autre modèle hiérarchique plus récent permet de réconcilier ces deux modèles. Il explique l'hétérogénéité tumorale dans le modèle CSC en y incluant le concept de mutation du modèle stochastique. Il s'agit du modèle hiérarchique d'évolution clonale des CSC. Dans ce modèle, les CSC sont également sujettes à diverses mutations qui peuvent créer différents groupes de CSC ayant des capacités de prolifération et de différenciation différentes. Ceci contribue à la résistance aux traitements et à l'hétérogénéité tumorale (Kreso and Dick, 2014).

Un autre point intéressant à souligner est la plasticité cellulaire au sein de la tumeur. Les cellules peuvent, dans le cadre de traitements ou de conditions défavorables du micro-environnement, se différencier en CSC pour échapper à l'apoptose (Vermeulen et al., 2012). Cette notion rend difficile un traitement ciblant un type cellulaire, mais incite à développer des traitements ciblant la plasticité cellulaire.

B. Propriétés

1. Facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence

Les CSC, comme les cellules souches normales, expriment des facteurs de transcription qui participent à l'autorenouvellement et au maintien de la pluripotence. Les plus décrits sont l'homéobox 1 de classe POU 5 (POU5F1 ou OCT-4), l'homéobox Nanog (NANOG) et le facteur de transcription SRY-Box (SOX2). OCT4 est présent au stade précoce embryonnaire et dans les cellules germinales (Nichols et al., 1998). Des expériences d'inactivation de *OCT4* ont provoqué une différenciation des cellules souches embryonnaires (ES), démontrant son rôle primordial dans le maintien de la pluripotence (Matin et al., 2004). Les mêmes constatations ont été faites pour le facteur de transcription *NANOG* dont la délétion induit une perte de pluripotence de la masse cellulaire interne (ICM) et des cellules ES (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Enfin, *SOX2* est exprimé dans les stades embryonnaires, notamment dans l'ICM. L'inactivation de *SOX2* dans des cellules ES réimplantées chez la souris est défavorable à la survie de l'embryon (Avilion et al., 2003). *POU5F1* (OCT-4), *NANOG* et *SOX2* sont d'autant plus importants qu'ils interagissent entre eux. Pesce et son équipe ont notamment mis en évidence une coopération entre OCT4 et SOX2 pour l'activation du facteur de croissance fibroblastique 4 (*Fgf4*) et du facteur de transcription 1 des cellules embryonnaires indifférenciées (*Utf1*) qui sont impliqués dans le développement embryonnaire (Pesce and Schöler, 2001). Loh et ses collaborateurs suggèrent également le rôle en tandem d'OCT4 et SOX2, mais aussi de NANOG et OCT4 dans l'expression d'une multitude de gènes. En effet,

ils ont mis en lumière environ 1000 et 3000 sites de liaison à l'ADN pour OCT4 et NANOG (Loh et al., 2006). Il existe d'autres facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la pluripotence comme le facteur « Kruppel-like factor 4 » (KLF4) et le proto-oncogène MYC dans le cadre des cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Takahashi and Yamanaka, 2006).

2. Les voies de signalisation

Les différents facteurs de transcription précédemment décrits agissent sur des voies de signalisation impliquant de nombreuses protéines. Les voies les plus souvent décrites comme dérégulées dans les CSC impliquent le FGF, le TGF β ainsi que le facteur d'inhibition de la leucémie (LIF), Notch, Hedgehog et WNT (Figure 17).

Le FGF est très important dans la régulation de la pluripotence. La famille FGF compte 22 membres qui interagissent avec 4 récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (FGFR) (DePhillips and Lenhoff, 2004). La famille FGF active plusieurs voies dont la voie phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K)-AKT qui module, via l'Activine A et les protéines « Mothers Against Decapentaplegic Homolog » 2/3 (SMAD2/3), la balance entre autorenouvellement et différenciation. La famille FGF, en association avec la protéine cible de la kinase rapamycine (mTOR), inhibe également les voies ERK et WNT impliquées dans la différenciation et l'EMT (Singh et al., 2012; Zhou et al., 2009). Le FGF module également d'autres voies telles que la voie RAS/MAPK impliquée dans la survie (McCubrey et al., 2007), la voie phospholipase C γ (PLC γ) impliquée dans la motilité et la prolifération cellulaire (Jang et al., 2018) et la voie du transducteur et activateur de signaux de transcription 3 (STAT3) impliquée dans la survie, la migration, la différenciation et la prolifération (Recio et al., 2019).

Le TGF β existe sous trois isoformes différentes : TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3. Cette famille est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comprenant la prolifération, la migration et la différenciation (Poniatowski et al., 2015). Il est admis aujourd'hui que le TGF β est présent durant le stade embryonnaire et participe au maintien de la pluripotence, notamment par la voie TGF β /Activine A/NODAL (Hassani et al., 2014; Zwijsen et al., 1999). Plus spécifiquement, la voie TGF β /Activine A/NODAL permet l'activation des protéines SMAD2/3. À l'inverse, les SMAD 1/5/8 associées à la voie des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) jouent un rôle dans la différenciation et sont par conséquent réprimés pour garantir la

pluripotence. SMAD4, surnommé co-SMAD, est quant à lui impliqué dans la formation des complexes hétérodimériques pour activer des gènes spécifiques dans le noyau (Xu et al., 2008).

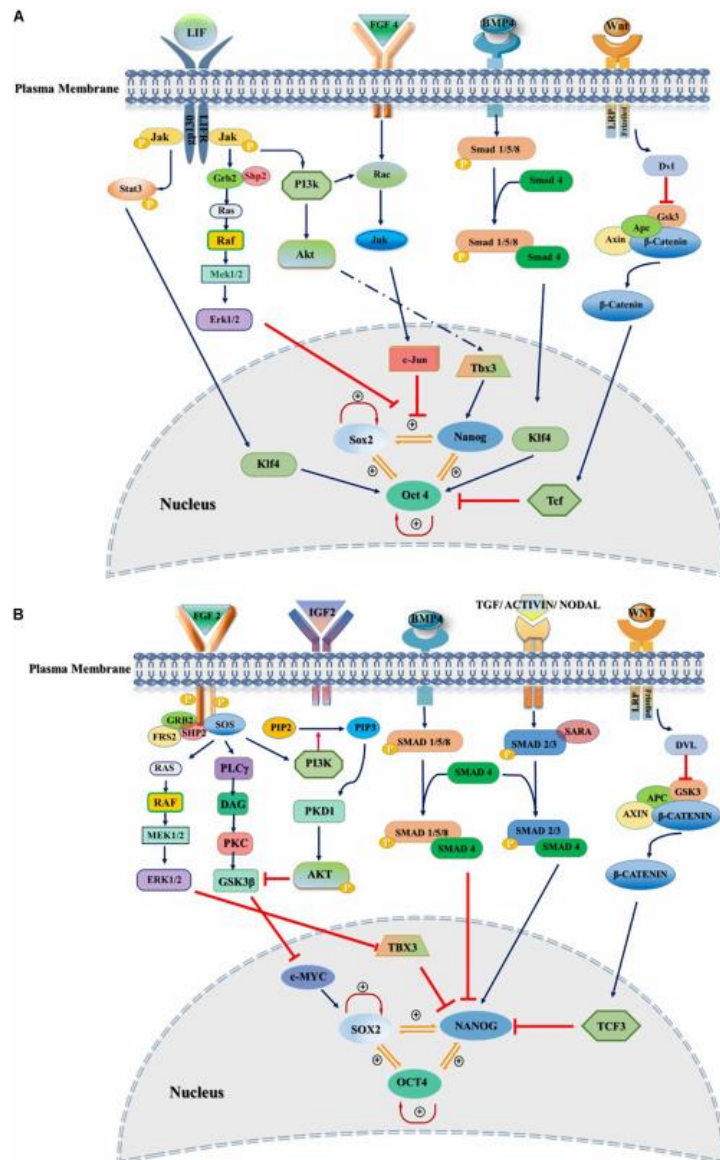


Figure 17 : Voies de signalisation modulant les cellules souches. Les voies dérégulées dans les CSC impliquent le FGF, le TGFβ, WNT ainsi que le facteur LIF. L'activation de ces différentes voies permettent le maintien de la pluripotence, la prolifération et la survie des CSC et de contribuer à leur potentiel tumoral (Mossahebi-Mohammadi et al., 2020).

Il existe deux voies principales d'activation de la voie WNT. La première, dite canonique, empêche la dégradation de la β-caténine par le protéasome et permet ainsi sa translocation dans le noyau. Cette voie est importante au cours de différents stades de l'embryogenèse. Son activation permet notamment la différenciation des cellules méso-endodermiques durant le stade post-implantatoire du blastocyste. À l'inverse, son activation permet le maintien de la pluripotence dans les cellules ES (de Jaime-Soguero et al., 2018; Sato et al., 2004). La

seconde voie d'activation de WNT, dite non-canonique, est indépendante de l'activation de la β -caténine (Komiya and Habas, 2008).

La voie Notch fait aussi partie des voies de signalisation impliquées dans le développement tissulaire chez l'embryon et l'adulte, mais également dans les processus de différenciation et de maintien des capacités souches des ES. Elle fait appel à une interaction entre la cellule qui est porteuse du signal et la cellule qui possède le récepteur Notch. Le récepteur Notch sera clivé à deux reprises par le complexe de protéines contenant un domaine désintégrine et métalloprotéinase (ADAM10/17), puis la γ -secrétase, permettant la libération du domaine intracellulaire actif du récepteur Notch (NICD). Ce NICD est transloqué dans le noyau et agit sur ses gènes cibles (Koch et al., 2013). Dans le contexte des ES, la voie Notch interagit notamment avec les familles « Hairy/Enhancer of split » (*HES*) et « Hairy-related transcription factors » (*HRT*) qui agissent sur la transcription et la traduction des protéines de type hélice-boucle-hélice (HLH) qui inhibent la différenciation (Bigas and Espinosa, 2012).

La voie Hedgehog est impliquée, comme toutes les voies citées précédemment, dans de nombreux processus comme la prolifération, la survie et la croissance chez l'embryon et l'adulte. Il existe 3 ligands Hedgehog (Hh) différents : Sonic Hedgehog (SHh), Indian Hedgehog (IHh) et Desert Hedgehog (DHh). Leur activation par autoprotéolyse conduit à leur sécrétion par la cellule au moyen des protéines « Dispatched 1 » et « Scube 2 ». Ces ligands Hh se fixent alors et inhibent le récepteur « Patch » (PTCH), qui lui-même inhibe « Smoothed » (SMO), ce qui permet l'activation des protéines homologues de l'oncogène associé aux gliomes (GLI1, 2 et 3) qui activent à leur tour les gènes cibles de la voie Hedgehog (Cochrane et al., 2015). À noter que les protéines GLI sont également impliquées dans d'autres voies comme WNT et peuvent être régulées par le FGF (Ruiz i Altaba et al., 2002).

La dernière voie majeure impliquée dans l'embryogenèse fait appel au facteur LIF. C'est une cytokine glycoprotéique qui maintient la pluripotence par activation de la voie kinase Janus (JAK)/STAT3 après hétérodimérisation de son récepteur LIF-R/Glycoprotéine 130 (GP130) (Cartwright et al., 2005; Metcalf, 2003). En outre, LIF joue un rôle d'inhibiteur de la voie ERK, permettant de bloquer l'induction de la différenciation des cellules souches (Cherepkova et al., 2016).

C. Caractéristiques

Les CSC sont présentes en très faible quantité dans les tumeurs, ce qui constitue, un obstacle à leur caractérisation. On sait cependant qu'elles présentent des propriétés communes avec les cellules souches comme l'autorenouveaulement par division asymétrique et les processus de différenciation. Elles possèdent également d'importantes capacités migratoires. Au niveau moléculaire, les CSC présentent une augmentation de l'activité des télomérases et des voies anti-apoptotiques, ainsi qu'une forte expression des transporteurs membranaires d'efflux, favorisant leur résistance aux chimiothérapies (Magee et al., 2012; Reya et al., 2001).

À l'instar des cellules souches normales, les CSC utilisent la division asymétrique (Magee et al., 2012). Cette division a en effet été retrouvée dans des sous-populations cellulaires qui partagent des propriétés souches. Néanmoins, il a été constaté que le modèle de division asymétrique n'est pas exclusif, les mêmes études tendant en effet à montrer qu'il y a un glissement de la division asymétrique vers la division symétrique (Lathia et al., 2011; Pece et al., 2010; Pine et al., 2010). La diminution de la division asymétrique est notamment décrite dans les précurseurs des oligodendrocytes comme associé à un état précancéreux (Sugiarto et al., 2011).

Il n'existe pas aujourd'hui de marqueurs spécifiques permettant d'identifier des CSC. Les marqueurs proposés sont souvent également exprimés par les cellules souches normales. De plus, des différences existent selon la localisation tissulaire et le sous-type de la tumeur considéré. Parmi les marqueurs les plus utilisés, on peut citer : CD133 (prominin), CD44, CD90, CD24, CD326 (molécule d'adhésion des cellules épithéliales, EPCAM) ou encore l'aldéhyde déshydrogénase 1 (ALDH1) (Visvader and Lindeman, 2012b; Yu et al., 2012). CD133 est observé pour la première fois par l'équipe de Singh dans les tumeurs du cerveau. Ils démontrent qu'un petit contingent de cellules CD133⁺ peut initier des tumeurs chez la souris alors que 10⁵ cellules CD133⁻ n'ont pas cette capacité (Singh et al., 2004). CD44 est aussi un marqueur de CSC. On associe CD44 à l'absence de CD24 pour détecter les CSC (Al-Hajj et al., 2003) dans le cancer du sein alors que dans le cancer colorectal, on l'associe à la présence d'EPCAM (Dalerba et al., 2007). Différents marqueurs ont pu être identifiés dans le cadre du CHC afin d'isoler les CSC (et la side population). Il s'agit d'EpCAM, CD133, CD44, CD13, CD90, CD24, CD47, et OV6. On peut également citer d'autres marqueurs de surface comme la cytokératine 19 (CK19), le proto-oncogène récepteur tyrosine kinase kit (C-KIT ou CD117), la

protéine 2 de la sous-famille G de liaison à l'ATP (ABCG2) et ALDH1 qui jouent un rôle dans la résistance aux traitements (Liu et al., 2020).

D. Microenvironnement, CSC et EMT

Le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans la maintenance, la prolifération et le développement des tumeurs. Il est indissociable du concept de niche tumorale et par extension des CSC. L'étude sur les cellules de leucémie myéloïde aiguë (AML) et chronique (CML) a permis d'identifier et d'éradiquer pour la première fois des cellules souches CD44⁺ dans la moelle osseuse. Le marqueur de surface CD44 est notamment connu pour être impliqué dans l'adhérence aux niches. À partir de ce moment, on considère qu'il existe des niches tumorales dans certains cancers liquides (Jin et al., 2006; Krause et al., 2006). Par la suite, dans des tumeurs solides de cerveau, une interaction a été observée entre des CSC CD133⁺/NESTIN⁺ et des cellules endothéliales. Le but de cette interaction est de maintenir leur état indifférencié (Calabrese et al., 2007). Dans des modèles de CHC, la coculture de fibroblastes associés au cancer (CAF) avec des cellules Huh7 et JHH-6 entraîne une expression de *TGFβ1* et de la protéine d'activation fibroblastique α (*FAP*). L'augmentation de l'expression de ces protéines, non retrouvée avec des cocultures de fibroblastes normaux, contribue au maintien et à la progression tumorale (Liu et al., 2020). La présence de niches tumorales dans les tumeurs solides est ainsi confirmée.

Une question émerge alors : comment les niches passent-elles d'un état physiologique normal à un état pathologique ? Une proposition a été avancée qui incrimine les CSC dans le changement de fonction de la niche. Les CSC s'engageraient dans un processus cancéreux et perturberaient l'osmose de la niche, créant ainsi un déséquilibre qui empêche le maintien de la quiescence des cellules souches par la niche et l'engagement des CSC dans les processus de prolifération (Iwasaki and Suda, 2009). Ce déséquilibre influe sur le microenvironnement tumoral afin de promouvoir différents mécanismes tumoraux. Cependant, cette hypothèse ne prend pas en compte le fait que les cellules de support composant la niche peuvent elles-mêmes devenir cancéreuses et provoquer l'apparition des CSC par leur impact sur le microenvironnement composant la niche. Ainsi, dans certains types de neuroblastomes, une mutation conjointe des cellules de support et des cellules de Schwann est nécessaire au développement de la maladie (Zhu et al., 2002).

Enfin, savoir si des CSC ou de la niche impacte l'autre s'apparente au paradoxe de l'œuf ou de la poule. Nous pouvons cependant nous pencher sur les voies de signalisation qui sont impliquées dans les deux et qui sont reconnues comme dysfonctionnelles dans le contexte tumoral. On retrouve ainsi les voies WNT/ β -caténine, Hedgehog et Notch qui sont des voies très importantes dans le maintien du phénotype souche et qui ont une activité aberrante dans les CSC et la niche (Bajaj et al., 2019). Tout d'abord la voie WNT/ β -caténine, dont la dérégulation a été observée pour la première fois dans le cancer du sein, est connue pour son rôle dans le développement tumoral. Il a été ainsi constaté que la voie WNT/ β -caténine est suractivée dans les CSC de différents cancers comme le côlon, le sein, la leucémie ou encore le CHC (Jang et al., 2015; Liu et al., 2020; Vermeulen et al., 2010; Zhao et al., 2007). Une activation anormale de la voie Hedgehog provoque une prolifération et une survie des CSC, par exemple dans le gliome, le cancer du sein, le cancer du pancréas ou le CHC (Clement et al., 2007; Hanna and Shevde, 2016). La dysfonction de la voie Notch est quant à elle assez difficile à évaluer de manière globale (Lai, 2004). Des études menées dans les cancers du cerveau, du sein et du côlon ont démontré une activation de la voie Notch permettant l'inhibition de la différenciation et le maintien des CSC (Karamboulas and Ailles, 2013). Néanmoins, on notera que des études mettent en évidence une inhibition de Notch en association avec une augmentation de la voie WNT/ β -caténine dans les cellules myéloïdes de la leucémie (Y.-A. Kang et al., 2019). La coordination entre ces différentes voies de signalisation est fortement probable dans la mesure où certaines cibles nucléaires d'une voie peuvent jouer un rôle dans l'activation ou l'inhibition d'une autre voie. Nous pouvons citer en exemple la voie Hedgehog qui, par son activation, augmente la transcription de la protéine 1 sécrétée par Frizzled (*SFRP1*) qui agit comme suppresseur de la voie WNT/ β -caténine (Takebe et al., 2011; Takebe and Ivy, 2010).

La modulation de ces différentes voies peut en outre se faire par le biais du microenvironnement tumoral et notamment via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines sont produites et sécrétées dans le microenvironnement par différentes cellules comme les CAF (Albini et al., 2015; Calon et al., 2014) ou encore les macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Ding et al., 2012; Raggi et al., 2016; Shijian Zhang et al., 2018). Il est par ailleurs intéressant de noter que les différentes voies de signalisation, ainsi que l'environnement inflammatoire, sont impliqués dans les processus associés aux CSC, mais aussi dans l'EMT ou la transition mésenchymo-épithéliale (MET) (Figure 18). Cela a amené la communauté scientifique à considérer la plasticité cellulaire des CSC comme une EMT ou une MET (Huber et al., 2005; Singh and Settleman, 2010). Il s'agit d'un processus physiologique finement régulé participant

aux processus relatifs au développement, à l'embryogenèse et à la cicatrisation. Il se traduit par une transdifférenciation ou une dédifférenciation réversible des cellules d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux qui est un phénotype moins différencié ou indifférencié.

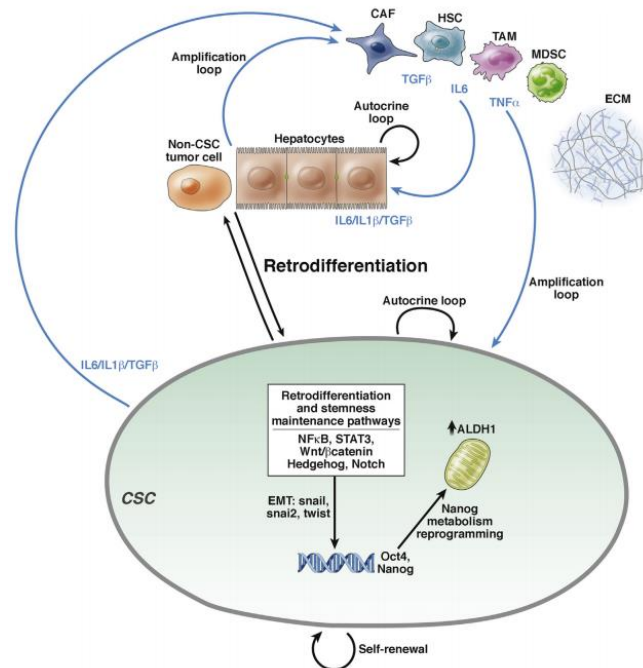


Figure 18 : Rôle du microenvironnement dans la maintenance et la promotion des CSC. Les cellules du microenvironnement et les CSC sécrètent différents facteurs comme le $TNF\alpha$, le $TGF\beta$, l'IL-6, l'IL-1 qui contribuent à la rétrodifférenciation des hépatocytes en CSC mais aussi au maintien des propriétés souches des CSC via les voies NFκB, STAT3, WNT, Hedgehog et Notch (Cabillic and Corlu, 2016).

Les cytokines les plus décrites pour leur rôle sur l'EMT et les CSC sont l'IL-6, le $TGF\beta$ et le $TNF\alpha$. On sait par exemple que l'IL-6 et le $TGF\beta$ activent la voie Notch-Jagged, causant ainsi l'apparition d'un phénotype CSC associé à une EMT dans des cellules cancéreuses du sein ou dans le carcinome spinocellulaire oral (Bocci et al., 2019; S. H. Lee et al., 2012). L'IL-6 peut également agir au niveau de la voie Hedgehog dans le cancer du poumon afin de promouvoir la croissance tumorale des cellules souches $CD133^+$ (Lee et al., 2015). En outre, l'introduction du gène de l'IL-6 dans des cellules du cancer des ovaires provoque la formation de colonies en sphère associées à un phénotype CSC (Ding et al., 2016). Le $TGF\beta$ et le $TNF\alpha$ influent sur l'EMT et les CSC de la même façon que l'IL-6. En effet, leur sécrétion dans le microenvironnement a pour effet l'activation de l'EMT et l'acquisition de marqueurs souches des cellules subissant ce processus (Achyut and Yang, 2011; Albini et al., 2015; Katsuno et al., 2013; L. Zhang et al., 2014; Shijian Zhang et al., 2018). Ces différentes observations se retrouvent dans le CHC où le blocage de $TGF\beta$ provoque une diminution des marqueurs

souches dans les cellules Hep1-6 (Fan et al., 2014). Ces données concordent également avec une étude menée dans notre laboratoire sur des cellules HepaRG. Il a été déterminé que les cellules hépatiques sont capables d'une forte plasticité cellulaire et que l'action du microenvironnement inflammatoire représenté par les trois cytokines IL-6, TGF β et TNF α mène à une rétrodifférenciation des cellules avec acquisition d'un phénotype progéniteur/souche (Dubois Pot Schneider et al., 2014a), participant ainsi à la maintenance et la promotion des CSC (Cabillic and Corlu, 2016). La sécrétion de ces cytokines a aussi des effets négatifs sur la réponse aux traitements chez le patient. L'IL-6 induit par exemple une résistance des cellules aux thérapies par son rôle dans la voie Hedgehog (Jinushi et al., 2011) ou encore dans l'hypoxie avec la stabilisation des facteurs inducteurs d'hypoxie (HIF) (Zhang et al., 2016).

L'hypoxie se traduit par un environnement pauvre en oxygène qui peut avoir des conséquences, comme évoqué précédemment, sur la progression tumorale en augmentant le potentiel de résistance et d'invasion de la tumeur (Zhang et al., 2016). En outre, l'induction de HIF s'accompagne d'une induction du phénotype de CSC (Kim et al., 2018). Dans la plupart des études qui s'intéressent à l'hypoxie, on retrouve l'activation de la voie HIF dont le facteur de transcription le plus connu est HIF1 α . Cette voie est impliquée dans plusieurs mécanismes dont l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et l'invasion tumorale (Couvelard et al., 2005). La protéine HIF1 α est inhibée par sa fixation à la protéine « Von Hippel-Lindau » (CHL) via la présence d'O₂. En l'absence de celui-ci, elle forme un hétérodimère avec HIF1 β pour former HIF1 qui se fixe sur un élément de réponse (HRE) activant ainsi la transcription des gènes cibles (Harris, 2002). Finalement, l'EMT provoque une acquisition de marqueurs souches (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008), soulignant l'intérêt de cibler la plasticité cellulaire dans le cadre de la résistance aux traitements (Biddle and Mackenzie, 2012; Zhou et al., 2017).

E. CSC, EMT et reprogrammation métabolique

L'apport de substrats par le microenvironnement influence également les CSC et peut jouer un rôle dans l'EMT. Rossignol et son équipe montrent, par exemple, que les substrats présents dans l'environnement proche des cellules contribuent à modifier la structure et la composition des mitochondries (Rossignol et al., 2004). Cette modification du métabolisme des cellules par le microenvironnement peut induire l'EMT (H. Kang et al., 2019). Dans leurs analyses de données, Thomson et son équipe démontrent que l'EMT et l'acquisition du caractère souche

sont intrinsèquement liées à une reprogrammation du métabolisme des cellules. Ils décrivent notamment que l'EMT s'accompagne d'une diminution de l'expression de gènes associés à la glycolyse et une augmentation de la capacité des enzymes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Ces changements sont décrits dans cette étude comme permettant de diminuer le stress oxydant durant l'EMT (Thomson et al., 2011). De manière intéressante, les travaux de Menendez discutent de l'influence du métabolisme sur l'EMT et introduisent la théorie de la « metabostemness ». Menendez explique que le caractère souche des cellules n'est pas que la conséquence de modifications génétiques et épigénétiques. Il serait contrôlé par certaines voies métaboliques qui jouent un rôle pivot dans le phénomène de différenciation/rétrodifférenciation (Menendez et al., 2014, 2014). Cette relation étroite entre le microenvironnement, les CSC et le métabolisme a été détaillée dans une revue que j'ai corédigée au cours de mon doctorat (Daniel et al., 2021) (Annexes).

IV. Le Métabolisme

A. Les voies métaboliques

1. Le métabolisme des glucides

Les glucides sont des composés organiques contenant un groupe carbonyle et au moins deux groupes hydroxyles. Ils sont répartis en deux classes : les oses qui sont des monomères (glucose, galactose ou fructose) et les osides (oligosaccharide ou polysaccharide) qui sont constitués de plusieurs oses. Parmi les osides, on distingue les holosides composés exclusivement d'oses et les hétérosides qui possèdent un ou plusieurs groupements non glucidiques.

La digestion des glucides commence dans la cavité buccale sous l'action de l'alpha-amylase. L'étape suivante se déroule dans l'intestin grêle avec l'amylase pancréatique qui digère en grande partie l'amidon. Les enzymes des cellules épithéliales, présentes à la bordure de brosse, digèrent les glucides de plus de six carbones grâce aux enzymes lactase (lactose → glucose et galactose), sucrase (sucrose → glucose et fructose) et maltase (maltose → glucose). Une fois digérés, les glucides à six carbones (hexoses) traversent la barrière des entérocytes par diffusion facilitée (Dashty, 2013). La diffusion du glucose est permise par les transporteurs membranaires du glucose (GLUT). Cette famille de 14 membres est localisée au niveau des membranes de la majorité des cellules de l'organisme. Les transporteurs GLUT sont constitués de 12 segments transmembranaires, un site de glycosylation en N terminal et un domaine cytoplasmique en N et C terminal (Mueckler and Thorens, 2013). Le transporteur le plus exprimé dans l'intestin, le

foie, les reins et le pancréas est GLUT2. Les hexoses diffusent à travers la membrane des cellules par l'intermédiaire des transporteurs GLUT pour atteindre un équilibre entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme de la cellule. Une fois dans la cellule, le glucose sera maintenu dans le cytoplasme grâce à la première enzyme de la glycolyse (glucokinase) qui le phosphoryle (Uldry and Thorens, 2004). Les glucides de moins de six carbones (triose, tétrorse et pentose), ils diffusent librement à travers la membrane de l'intestin et ne requièrent aucune dégradation.

Une fois dans l'entérocyte, les glucides passent la membrane basale pour gagner la circulation sanguine et être transportés vers le foie. Le foie joue un rôle important dans l'homéostasie du glucose sanguin (glycémie) : la glycogénogenèse permet la captation et le stockage du glucose sous forme de glycogène ; la glycogénolyse est la voie de libération du glucose par hydrolyse du glycogène ; la gluconéogenèse désigne la voie de synthèse du glucose à partir d'éléments non glucidiques (pyruvate, lactate, oxaloacétate, glutamine ou encore α -cétooglutarate).

Outre la glycogénogenèse et la néoglucogénogenèse, le glucose sert de substrat à d'autres voies métaboliques dans la cellule. On peut citer la glycolyse, la voie des pentoses phosphates (PPP) et la voie des hexosamines. La voie PPP fournit du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et du ribose 5-phosphate. Le NADPH sert à la synthèse des acides gras et au maintien du pool de glutathion. Le ribose 5-phosphate est quant à lui utilisé dans les processus de synthèse des nucléotides. La voie des hexosamines produit des UDP-N-acétylglucosamine à partir de fructose-6-phosphate et de glutamine. La UDP-N-acétylglucosamine est par la suite utilisée dans les réactions de glycosylation (Adeva-Andany et al., 2016). Enfin, la voie d'utilisation du glucose la plus décrite est la glycolyse. Elle est constituée de 10 réactions enzymatiques qui aboutissent à la production de pyruvate et de lactate (Figure 19). Dans les conditions physiologiques, on distingue deux voies de la glycolyse : la glycolyse aérobie et anaérobie. En présence d'oxygène, la glycolyse aérobie produit du pyruvate qui servira de substrat pour le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et l'OXPPOS au niveau des mitochondries. En absence d'oxygène, on parle de glycolyse anaérobie et le pyruvate est converti en lactate par les lactates déshydrogénases (LDH) (Keohane et al., 2019). Il faut cependant noter que la production de lactate à partir du pyruvate existe également en présence d'oxygène. Le lactate serait ainsi produit en permanence par la glycolyse et serait d'ailleurs considéré comme le produit final de la glycolyse (Rogatzki et al., 2015). Il a été également constaté, dans des conditions physiopathologiques, que la glycolyse par production

de lactate est une voie privilégiée par les cellules cancéreuses. Cette forte production de lactate, par les tumeurs, est un des éléments à l'origine de la théorie de Warburg (IV.C.1 Théorie Warburg et controverse).

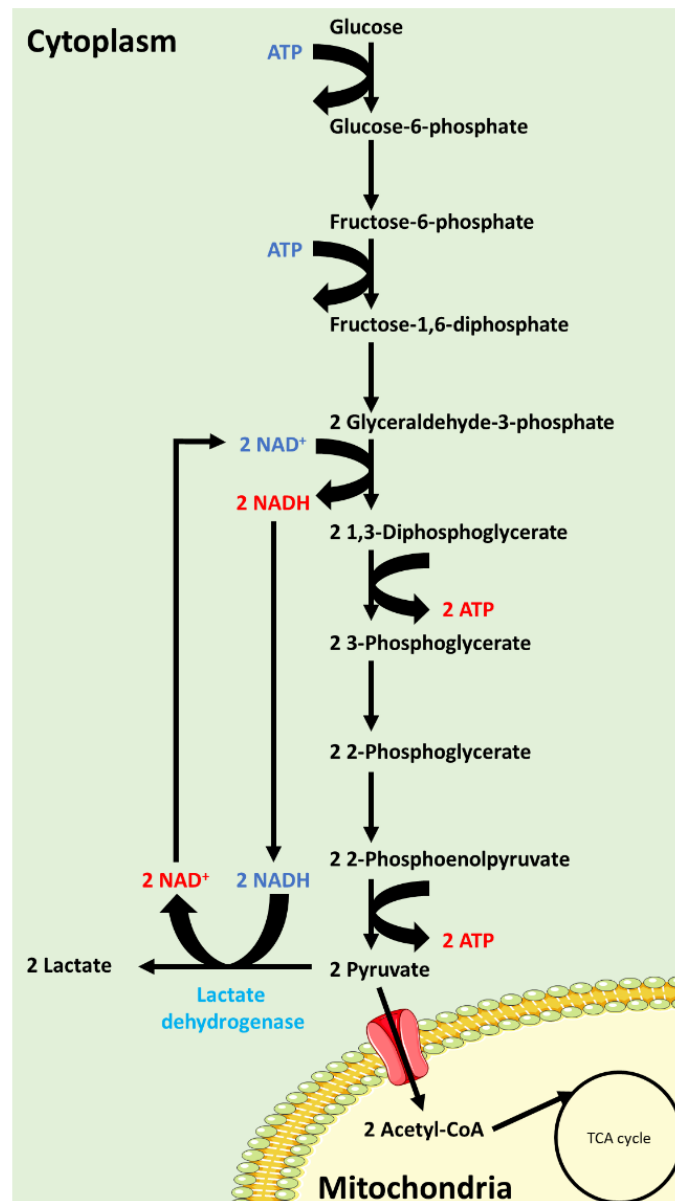


Figure 19 : Les différentes étapes de la glycolyse. Le glucose arrivant dans le cytoplasme est pris en charge par la glycolyse. Cette voie métabolique est constituée de 10 réactions qui conduisent à la production de deux molécules de pyruvate. Deux directions sont décrites pour le pyruvate, soit il est transformé par la LDH en deux molécules de lactate soit il est décarboxylé par la PDH dans la mitochondrie.

La décarboxylation du pyruvate fait la jonction entre la glycolyse et les réactions dans la mitochondrie. Cette décarboxylation se situe dans la matrice mitochondriale et est dépendante de l'entrée du pyruvate. Le transport du pyruvate vers la matrice mitochondriale est permis par une famille qui est encore peu connue. Il s'agit des transporteurs mitochondriaux du pyruvate (MPC) décrits chez la levure (Mpc1, 2 et 3) et plus récemment dans l'intestin chez la souris

(Mpc1) (Bensard et al., 2020; Herzig et al., 2012). Chez la levure, ces transporteurs semblent agir en hétérodimère de Mpc1/2 ou 1/3. La faible activité de Mpc1/2 serait favorable à un processus fermentatif alors que la forte activité de Mpc1/3 permettrait l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie (Bender et al., 2015). Une fois dans la matrice mitochondriale, le pyruvate est pris en charge par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) (Figure 20). Ce complexe situé dans la membrane interne mitochondriale est composé de :

- La pyruvate déshydrogénase E1 qui catalyse la décarboxylation du pyruvate
- La dihydrolipoamide S-acétyltransférase E2 qui fait une acétylation réductrice des groupements lipoïques
- La dihydrolipoamide déshydrogénase E3 qui réoxyde les groupements lipoïques réduits de l'enzyme E2 avec réduction de la forme oxydée de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) en sa forme réduite (NADH)
- 5 coenzymes : la coenzyme A (CoA ou CoASH), le NAD⁺, la flavine adénine dinucléotide sous forme oxydée (FAD), l'acide lipoïque et la thiamine pyrophosphate (TPP)

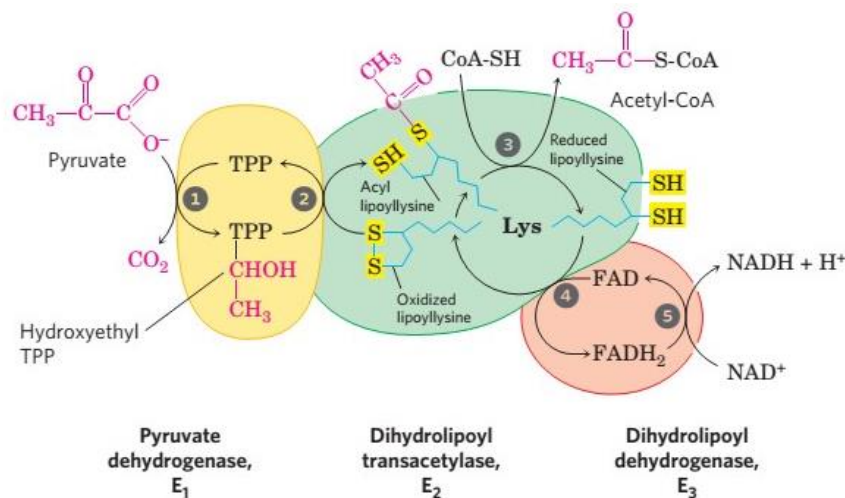


Figure 20 : Décarboxylation du pyruvate par le complexe pyruvate déshydrogénase. Le complexe PDH est constitué de trois sous-unités E1, E2 et E3 qui transforment le pyruvate en acétyl-CoA et NADH. L'acétyl-CoA entre dans le cycle TCA et l'OXPPOS (Oxidative decarboxylation of Pyruvate, 2018).

La décarboxylation du pyruvate permet ainsi de transformer deux molécules de pyruvate en acétyl-CoA et NADH. Le NADH sert pour l'OXPPOS alors que l'acétyl-CoA entre directement dans le cycle TCA pour ensuite servir à l'OXPPOS ou à la synthèse des acides gras par sa conversion en citrate (Patel and Korotchkina, 2003).

2. Le cycle tricarboxylique et la phosphorylation oxydative

Le cycle TCA (ou cycle de Krebs) est la voie de métabolisation commune au métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés. Le cycle TCA est composé de 9 réactions enzymatiques qui ont pour finalité la production de deux guanosine triphosphate (GTP), six NADH et deux FADH₂ à partir des deux molécules de pyruvate. Le NADH et le FADH₂ cèdent leur proton dans les réactions de la chaîne respiratoire (Figure 21). Les voies de métabolisation du glucose et des acides gras conduisent à la production d'acétyl-CoA qui entre dans le cycle TCA par sa conversion en citrate. Pour la glutaminolyse, l'entrée se fait par la transformation du glutamate en α -cétoglutarate. Les produits générés par le cycle TCA sont utilisés par la chaîne respiratoire ou servent de substrats à d'autres voies (Anderson et al., 2018; Fernie et al., 2004; Raimundo et al., 2011).

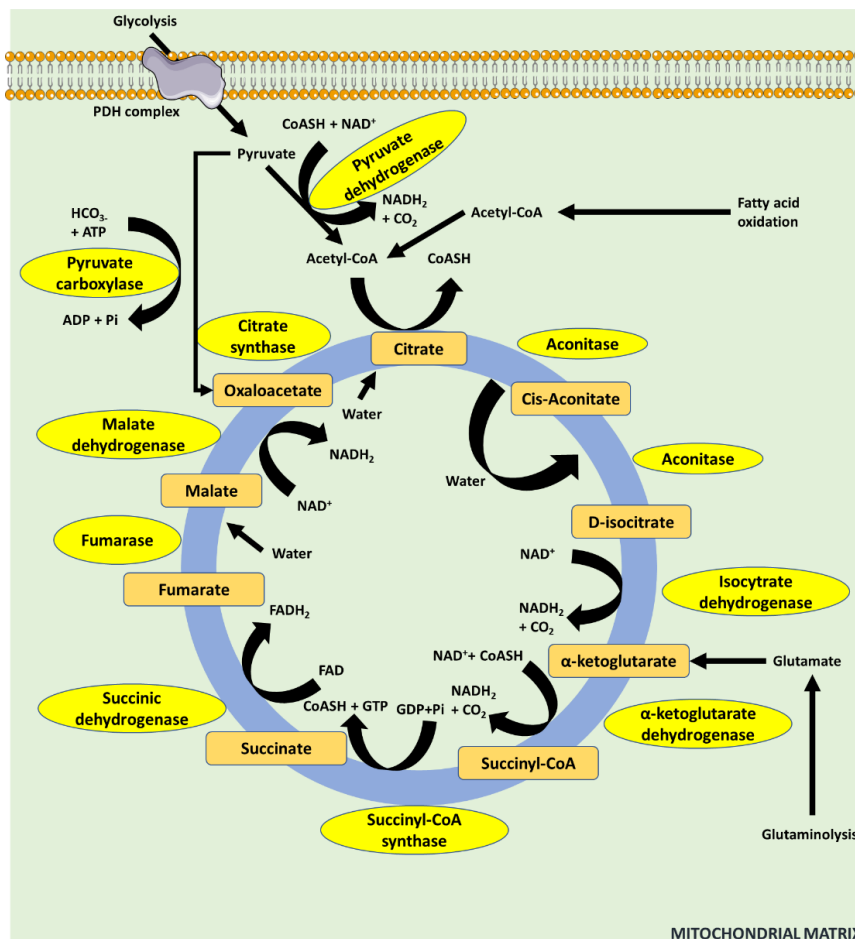


Figure 21 : Schéma simplifié de l'entrée des différentes voies dans le cycle TCA. Le cycle TCA est constitué de 9 réactions enzymatiques permettant de fournir des substrats à la chaîne respiratoire à partir des produits de la glycolyse, de la β -oxydation et de la glutaminolyse. Le pyruvate de la glycolyse arrive dans la mitochondrie, il est soit pris en charge par la pyruvate décarboxylase pour devenir de l'oxaloacétate ou est transformé en acétyl-CoA puis citrate par la citrate synthase dans le cycle TCA. La β -oxydation des acides gras donne également de l'acétyl-CoA et ensuite du citrate. Enfin, la glutaminolyse transforme la glutamine en glutamate qui entre dans le cycle TCA par sa conversion en α -cétoglutarate (Adapté de Korla and Mitra, 2014).

La chaîne respiratoire est composée de cinq gros complexes protéiques :

- La NADH-coenzyme Q oxydoréductase (Complexe I) est composée de 45 sous-unités ce qui en fait le complexe le plus important de l'OXPPOS. Ce complexe possède une partie hydrophile dans la matrice permettant le transfert de protons de NADH à la coenzyme Q (CoQ) et un bras hydrophobe qui libère les protons dans l'espace intermembranaire. Ce complexe contient 6 modules codant pour les sous-unités de la NADH:Ubiquinone oxydoréductase qui sont annotés N, Q, ND1, ND2, ND4 et ND5.
- La succinate-déshydrogénase (Complexe II) est une enzyme qui est partagée entre le cycle TCA et la chaîne respiratoire. Elle ne permet pas la translocation de protons, mais catalyse la formation de fumarate à partir de succinate par oxydation de FADH₂. Elle possède quatre sous-unités : deux sous-unités hydrophiles que sont la sous-unité A de la flavoprotéine du complexe de la succinate déshydrogénase (SDHA) et la sous-unité B du complexe fer-soufre de la succinate déshydrogénase (SDHB) ainsi que deux sous-unités hydrophobes du complexe de la succinate déshydrogénase (SDHC et SDHD).
- L'ubiquinol-cytochrome C réductase (Complexe III) transfère deux électrons et dans le même temps permet le pompage de protons dans l'espace intermembranaire. Elle est composée de dimères formant le complexe CIII₂.
- Le cytochrome C oxydase (Complexe IV) catalyse la dernière réaction avec l'oxydation du cytochrome c, la réduction de l'oxygène en eau et la translocation de protons dans l'espace intermembranaire. Ce complexe est constitué de trois unités cytochrome C oxydase (MT-CO) notées MT-CO1, MT-CO2 et MT-CO3 réunissant ainsi 13 ou 14 petites sous-unités.

Ces complexes assurent le transfert des électrons le long de la membrane interne. Ce transfert est à l'origine de la création d'un gradient électrochimique de protons noté $\Delta\psi$. Ce gradient permet de faire fonctionner le dernier complexe de la chaîne :

- F₀F₁-ATPase (Complexe V) utilise la force motrice dépendante des protons et générée par les complexes I, III et IV. La sous-unité F₀ est dans la membrane interne alors que la sous-unité F₁ est attachée à F₀ et orientée vers la matrice. Ce complexe utilise la force motrice pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi).

Ces différents complexes produisent ainsi un gradient de protons menant à une synthèse d'ATP ; ce processus porte le nom de phosphorylation oxydative (Signes and Fernandez-Vizarra, 2018) (Figure 22). Finalement, les réactions combinées de la glycolyse, du cycle TCA et de la chaîne respiratoire génèrent 34 molécules d'ATP, 6 CO₂ et 6 H₂O (Dashty, 2013).

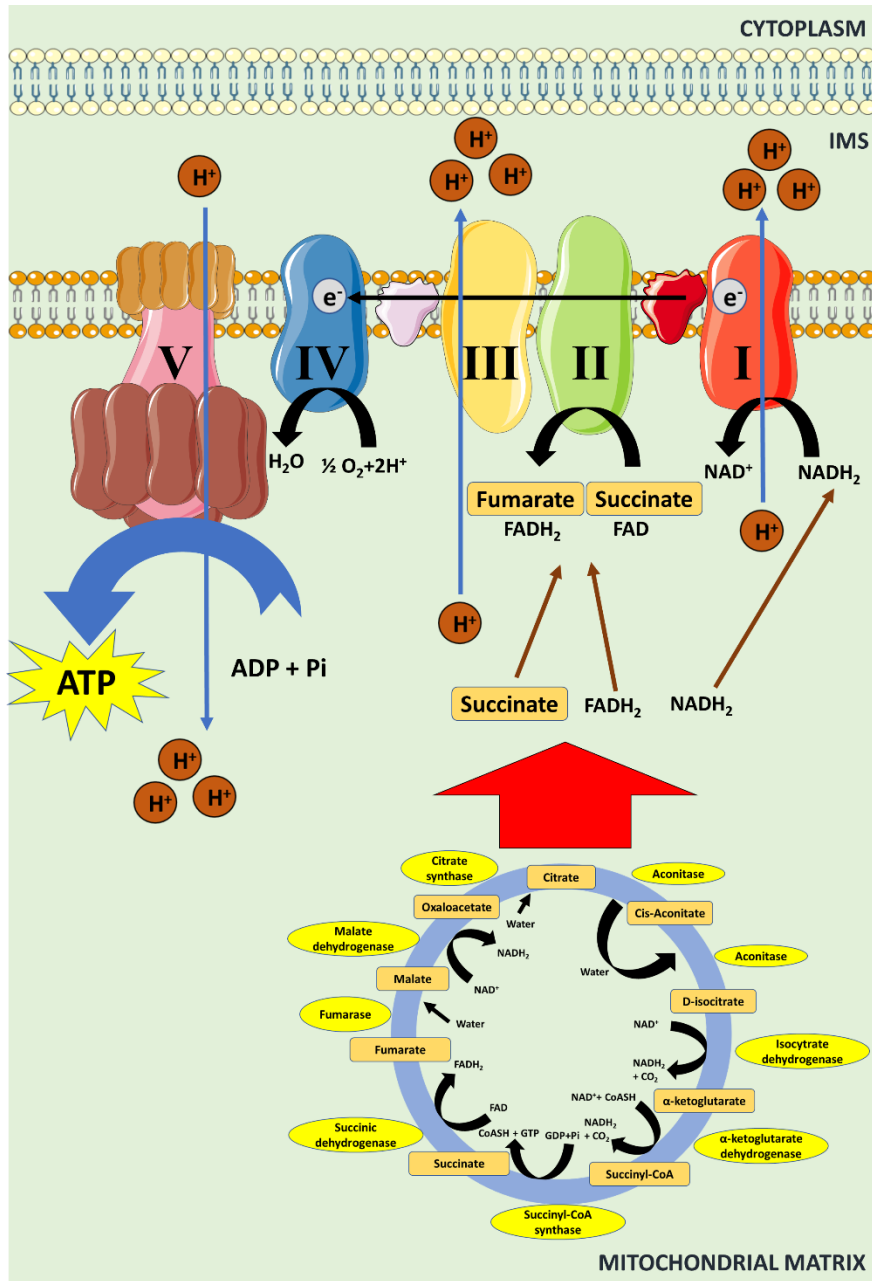


Figure 22 : Représentation schématique de l'OXPHOS. La chaîne respiratoire est un important complexe enzymatique constitué de cinq unités. L'ensemble des réactions de la chaîne respiratoire permet la génération d'énergie sous forme d'ATP. Le cycle TCA apporte du succinate, du $FADH_2$ et du $NADH_2$ à la chaîne respiratoire. Le $NADH_2$ est réduit en NAD^+ par le complexe I permettant un transfert d'électrons et une sortie de protons. Le complexe II correspond à l'enzyme succinate-déshydrogénase du cycle TCA qui permet le transfert d'électrons au complexe III par utilisation du $FADH_2$ et transformation du malate en fumarate. Le complexe III conditionne le transfert d'électrons et la sortie de protons. Le complexe IV produit de l' H_2O à partir de protons et d' O_2 . Le complexe V correspond à l'ATP synthase et utilise la fuite de protons pour générer une force motrice afin de produire de l'ATP à partir d'ADP et P_i .

3. Le métabolisme des acides aminés

Les acides aminés peuvent servir à la synthèse de molécules protéiques (protéines structurales, plasmatiques et enzymes) ou non protéiques (hormones et créatine) ou être utilisés comme source d'énergie dans différentes voies métaboliques (Blanco and Blanco, 2017). Les voies majeures du métabolisme impliquant des acides aminés dans la mitochondrie sont le métabolisme de la glutamine, de la sérine/glycine, des acides aminés branchés (leucine, isoleucine et valine) et de l'arginine.

La voie métabolique des acides aminés la plus décrite dans le contexte du cancer est la glutaminolyse. Cette voie permet l'apport de substrat au cycle TCA par l'intermédiaire de la glutamine. Cet acide aminé est particulier, car il n'est pas considéré comme un acide aminé essentiel, mais il joue quand même un rôle primordial dans les mécanismes de survie de certaines tumeurs. La glutamine peut entrer dans la cellule par de nombreux transporteurs tels que les transporteurs Na^+ préférentiels de l'alanine, la sérine et la cystéine (ASC) et le Na^+ couplé aux acides aminés neutres (SNAT). Ces transporteurs sont surexprimés dans certains types de cancers (Bhutia et al., 2015). La glutamine entre ensuite dans les mitochondries par des transporteurs encore peu décrits, car récemment étudiés (Matés et al., 2009; Pochini et al., 2014). Récemment, il a été décrit dans les astrocytes que la glutamine serait directement transformée dans le cytoplasme en glutamate pour ensuite passer dans les mitochondries par trois transporteurs différents : le transporteur du 2-oxoglutarate/malate (M2OM), le transporteur du glutamate 1 (GC1) et l'échangeur glutamate/aspartate (ARALAR) (Robinson et al., 2020). Elle subit dans tous les cas une transformation en glutamate par l'action de la glutaminase (GLS). Le glutamate est ensuite transformé en α -cétoglutarate par une désamination oxydative réalisée par la glutamate déshydrogénase (GLUD1) ou par une transamination réalisée par la transaminase liée au glutamate. Ce processus permet l'apport du substrat α -cétoglutarate dans le cycle TCA (83Figure 23) (Wei et al., 2021). L'oxydation de la glutamine dans le cycle TCA fournit à la chaîne respiratoire un FADH_2 et trois NADH pour générer de l'énergie. Il est à noter que la glutaminolyse est un substrat préférentiel du cycle TCA dans les cas où la glycolyse n'assure plus l'alimentation du cycle par le pyruvate. Ce processus est nommé anaplérose et contribue au maintien de l'OXPPOS.

Un autre rôle de cette voie est la contribution au pool d'agents antioxydants via la production de glutathion sous forme réduite (GSH). La GSH est un tripeptide composé d'une γ -

glutamylcystéine produite à partir du L-glutamate et d'une cystéine conjugués grâce à la glutamate-cystéine ligase (GCLC). Une glycine est ensuite ajoutée à la partie C terminale de la γ -glutamylcystéine par la glutathion synthase (GSS). La glutaminolyse fournit du glutamate pour la synthèse de GSH, mais également de la cystéine par son activation du transporteur x_c^- -cystine/glutamate. L'oxydation de la GSH permet d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS). La forme oxydée du glutathion (GSSG) est par la suite converti de nouveau en GSH par l'utilisation d'un NADPH (Yang et al., 2017).

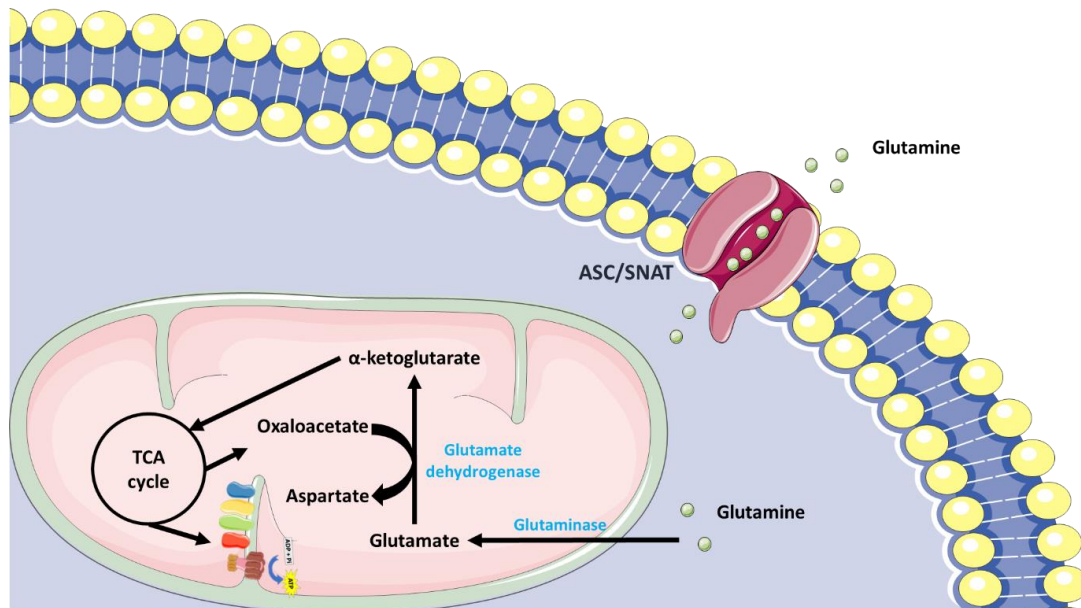


Figure 23 : Schéma simplifié de la glutaminolyse. La glutamine est transportée dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs Na⁺ ASCs et SNATs. La glutamine est incorporée dans la mitochondrie et est convertie en glutamate par l'intermédiaire de la glutaminase. La glutamate déshydrogénase permet l'entrée du glutamate dans le cycle TCA par sa transformation en α -cétoglutarate.

4. Le métabolisme des lipides

a) L'absorption des acides gras

Les acides gras sont pour la plupart apportés par l'alimentation. Leur digestion se déroule principalement dans l'intestin grêle où les entérocytes absorbent les acides gras et les transforment en triglycérides (TG) par la voie du monoacylglycérol. Les entérocytes peuvent également sécréter les acides gras sous forme liés à l'albumine (AGL). Les TG sont ensuite excrétés dans le système lymphatique intestinal sous forme de chylomicrons. Les chylomicrons arrivent dans le foie et sont libérés sous forme d'acides gras libres grâce à la lipoprotéine lipase (LPL).

L'entrée des acides gras dans les hépatocytes est assurée par de nombreux transporteurs dont les protéines de transport des acides gras (FATP) avec au niveau du foie FATP2, 4 et 5, les

protéines de liaison des acides gras (FABP) et la translocase des acides gras CD36 (FAT/CD36) (Figure 24). Dans le cytoplasme des hépatocytes, il existe le transporteur L-FABP qui joue également un rôle de chaperonne et de transporteur intracellulaire. L-FABP participe également à l'activation de récepteur nucléaire comme la famille des « Peroxisome Proliferator Activated Receptor » (PPAR) (Alves-Bezerra and Cohen, 2017; Rui, 2014).

b) L'oxydation des acides gras

L'oxydation des acides gras constitue une voie très importante de production d'énergie pour la cellule. Les acides gras utilisés proviennent de l'hydrolyse des gouttelettes triglycérides contenues dans les hépatocytes ou des AGL. L'oxydation des acides gras peut se faire dans trois organites distincts (mitochondries ; peroxysomes ; réticulum endoplasmique, RE) : la β -oxydation mitochondriale des acides gras concerne les acides gras courts (<C4) (AGCC), moyens (C4-C12) (AGMC) et longs (C12-C20) (AGLC) ; la β -oxydation peroxysomale concerne les acides gras à très longue chaîne (C20-C26) (AGTLC) et également les acides gras ramifiés ; les oxydations α et ω se déroulent, respectivement dans le peroxysome et dans le RE (Alves-Bezerra and Cohen, 2017).

La voie d'oxydation α a été décrite dans les années 60 grâce à la découverte de l'acide phytanique. Klenk et Kahlke ont découvert une accumulation de cet acide gras dans la maladie de Refsum (Klenk and Kahlke, 1963). Par la suite, des études sur sa structure ont démontré qu'il possédait quatre groupements méthyles pour C16 carbones dont 1 groupement méthyle sur la position 3 ce qui ne permet pas la β -oxydation. Les scientifiques émettent à ce moment-là, l'hypothèse de l'implication de la voie α ou ω . Finalement, les études montreront que l'acide phytanique subit une α -oxydation. Cette réaction permet l'élimination d'un atome de carbone en position alpha. Elle commence par la formation d'un CoA-ester, en l'occurrence le phytanoyl-CoA qui sera hydroxylé en 2-hydroxyphytanoyl-CoA par l'enzyme phytanoyl-CoA 2-hydroxylase. Ce produit est ensuite clivé par la 2-hydroxyacyl-CoA lyase en pristanal et formyl-CoA, puis hydrolysé en acide formique et coenzyme A (CoASH). Le pristanal est quant à lui oxydé en acide pristanique. Enfin, cet acide pristanique se lie à un CoASH pour donner le pristanoyl-CoA qui fait encore 3 cycles de β -oxydation dans les peroxysomes avant d'aller dans les mitochondries. La β -oxydation dans les mitochondries produit ensuite 3 acétyl-CoA (Jansen and Wanders, 2006; Wanders et al., 2003).

La voie d'oxydation ω , découverte dans les années 30 par Verkade et ses collaborateurs (Verkade and Van Der Lee, 1934) fait intervenir des membres de la famille des cytochromes

P450 monooxygénase (CYP450) dans la première étape de cette voie. Parmi les CYP, on distingue 3 membres importants pour l'oxydation des acides gras : CYP4B pour les acides gras courts (C7-C10), CYP4A pour les acides gras moyens (C10-C16) et CYP4F pour les acides gras longs (C16-C26). Ces CYP ω -hydroxylent les acides gras qui seront ensuite métabolisés par les alcool et aldéhyde déshydrogénases. Enfin, ces acides gras subissent une transformation en acides dicarboxyliques qui seront ensuite β -oxydés dans le peroxyosome en acides gras plus courts, puis dans les mitochondries dans le cas d'une oxydation complète (Hardwick, 2008; Wanders et al., 2011).

La β -oxydation peroxyosomale concerne les acides gras ayant une chaîne carbonée supérieure à 20 carbones. Ces acides gras ne peuvent pas être oxydés dans les mitochondries qui ne possèdent pas les enzymes nécessaires, c'est-à-dire les acyl-CoA synthétase des acides gras à longue chaîne (LASC) et très longue chaîne (VLACS). Ces enzymes sont présentes dans la membrane des peroxyosomes et permettent l'entrée des acides gras dans l'organite. Cela concerne les acides gras ayant plus de 24 carbones, l'acide pristanique, les prostanoïdes, les acides gras intermédiaires de la bile et les acides di- et trihydroxycholestanoïques (DHCA et THCA). Contrairement aux mitochondries, les peroxyosomes ne contiennent pas de chaîne respiratoire ce qui conduit à une moindre production d'ATP. Le transport des acides gras dans les peroxyosomes ne fait pas intervenir les carnitine palmitoyl-transférases (CPT), ce qui ne permet pas l'entrée des acides gras à chaîne courte et moyenne. Par conséquent, les acides gras à longue chaîne sont les seuls à subir un raccourcissement de leurs chaînes carbonées dans les peroxyosomes pour ensuite finir leur oxydation complète en CO₂ et H₂O dans les mitochondries (Nguyen et al., 2008; Reddy and Hashimoto, 2001; Wanders et al., 2000, 2011).

Enfin, l'oxydation des acides gras à chaîne courte, moyenne et longue (C4 à C20) prend place dans les mitochondries (Figure 24). C'est la voie la plus couramment étudiée et la plus productive en termes d'énergie, car elle contribue, comme la glycolyse et la glutaminolyse, à la production d'ATP par l'OXPPOS. La β -oxydation mitochondriale produit en effet 3 fois plus d'ATP que la métabolisation des glucides. La production d'ATP suite à l'oxydation de l'acide palmitique peut par exemple, 129 ATP (Carracedo et al., 2013). Deux mécanismes différents existent selon la taille de la chaîne carbonée de l'acide gras. Les acides gras à chaîne courte et moyenne, traversent passivement la membrane et sont directement pris en charge par l'acétyl-CoA synthase (ACS). Les acides gras à chaîne longue sont quant à eux pris en charge par les CPT, une famille de protéines carnitine dépendantes présentes dans la membrane des

mitochondries. CPT1 permet l'entrée des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie sous forme d'acyl-carnitine. L'acyl-carnitine est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale grâce à la carnitine-acylcarnitine translocase. La protéine CPT2, située dans la membrane interne mitochondriale, enlève alors la carnitine pour donner l'acyl-CoA.

Les β -oxydations dans les mitochondries et dans les peroxysomes comportent une boucle de 4 réactions nommée hélice de Lynen. Chaque cycle de l'hélice de Lynen provoque un raccourcissement de 2 carbones de la chaîne de l'acide gras et permet la production de FADH_2 , NADH et H_2O_2 . Selon la localisation de la réaction, l'acide gras sera transformé en trans- Δ^2 -énoyl-CoA soit par une acyl-CoA déshydrogénase (mitochondrie) soit une acyl-CoA oxydase (peroxysome). Ces enzymes sont spécifiques de la longueur de la chaîne carbonée. Ensuite, une hydratation par l'énoyl-CoA hydratase donne du L-3-hydroacyl-CoA qui est pris en charge par la 3-hydroacyl-CoA déshydrogénase qui le transforme en β -cétoacyl-CoA. La fin de la réaction est catalysée par la β -céthiolase pour produire de l'acétyl-CoA et de l'acyl-CoA avec deux carbones en moins (Poirier et al., 2006; Wanders et al., 2011). Des études ont mis en évidence que les acides gras à chaîne longue n'étaient pas directement oxydés dans la matrice mitochondriale. Il semble qu'ils subissent une β -oxydation dans la membrane interne mitochondriale, produisant des acyl-CoA à courte chaîne. L'oxydation des acides gras dans les mitochondries par l'hélice de Lynen alimente ainsi le cycle TCA en acétyl-CoA. Les acétyl-CoA excédentaires seront stockés par le foie sous forme de corps cétoniques lesquels seront relargués dans la circulation sanguine en cas de jeûne, pour fournir de l'énergie aux tissus extrahépatiques (Nguyen et al., 2008; Reddy and Hashimoto, 2001).

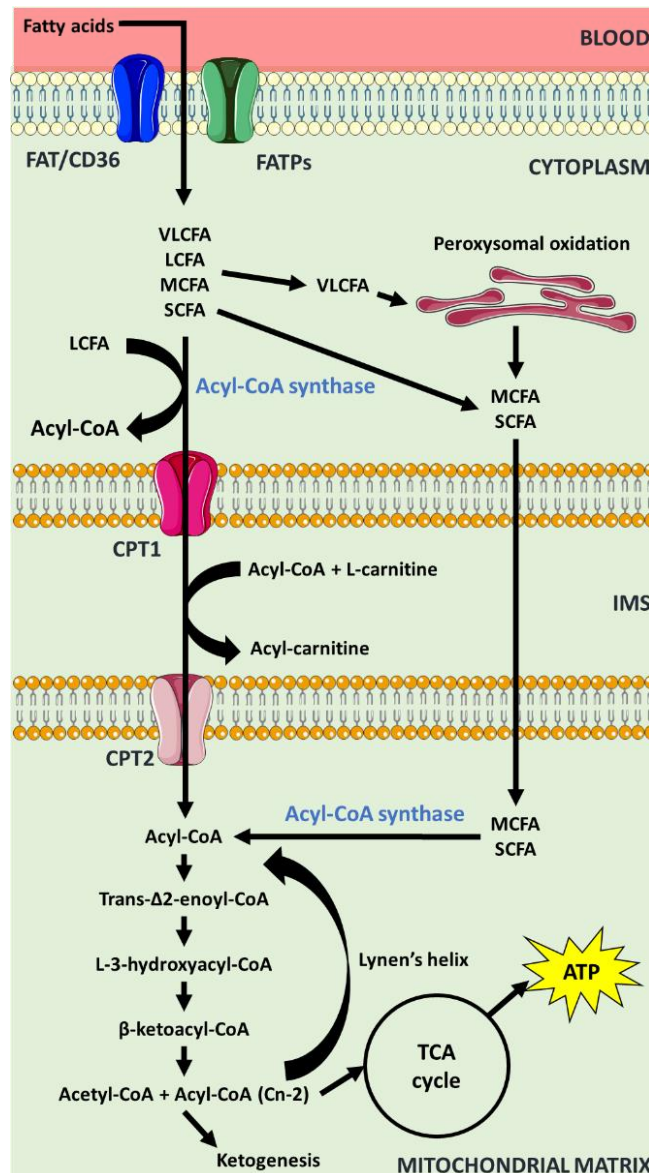


Figure 24 : Schéma simplifié de l'entrée et de l'oxydation des acides gras. Les acides gras rentrent dans la cellule par les transporteurs FAT/CD36 et FATPs. Les acides gras à très longue chaîne sont dirigés dans le peroxysome où ils sont oxydés et raccourcis avant d'aller dans la mitochondrie. Les autres acides gras sont directement transportés dans la mitochondrie pour subir la β -oxydation. L'oxydation des acides gras génère dans la mitochondrie de l'acétyl-CoA, substrat du cycle TCA (Adapté de Allard et al., 2020 et Fromenty, 2019).

c) La cétogénèse

La cétogénèse est une voie métabolique qui fonctionne en parallèle de la β -oxydation des acides gras et fait suite à un excès de production d'acétyl-CoA. Elle produit de manière continue trois corps cétoniques : l'acétoacétate, le β -hydroxybutyrate et l'acétone. Ces corps cétoniques peuvent être utilisés par l'organisme pour générer l'équivalent en énergie de 22 ATP. Lors du jeûne, les corps cétoniques sont libérés dans la circulation sanguine en réponse à une diminution des réserves glucidiques. Ces corps cétoniques sont solubles dans l'eau et ne nécessitent donc pas de lipoprotéine pour circuler dans les vaisseaux sanguins. Dans le foie, la cétogénèse débute

par la conversion de deux acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA par l'acétyl coenzyme A acétyltransférase (ACAT). Par la suite, cette molécule est transformée en 3-Hydroxy-3-méthyle-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) par la HMG-CoA synthase puis en acétoacétate par la HMG-CoA lyase. Enfin, l'acétoacétate donnera de l'acétone par décarboxylation non enzymatique ou du β -hydroxybutyrate suite à l'action de la β -hydroxybutyrate déshydrogénase. La cétolyse correspond à l'utilisation des corps cétoniques par les tissus extrahépatiques. Lors de cette réaction, le β -hydroxybutyrate sera utilisé pour produire de l'énergie (Figure 25) (Dhillon and Gupta, 2021; Puchalska and Crawford, 2017).

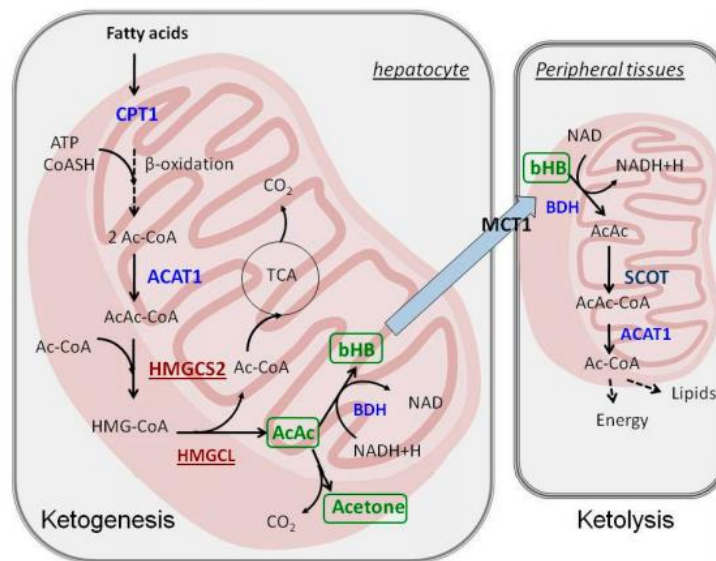


Figure 25 : Métabolisme des corps cétoniques. La cétogenèse correspond à la synthèse des corps cétoniques à partir des acétyl-CoA produits en excès par la β -oxydation. Deux acétyl-CoA sont convertis en acétoacétyl-CoA par l'acétyl coenzyme A acétyltransférase (ACAT) puis en 3-Hydroxy-3-méthyle-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) par la HMG-CoA synthase. L'HMG-CoA est ensuite transformé en acétoacétate par la HMG-CoA lyase. Enfin, l'acétoacétate est décarboxylé en acétone ou transformé en β -hydroxybutyrate suite à l'action de la β -hydroxybutyrate déshydrogénase. Les corps cétoniques sont par la suite utilisés par les tissus extrahépatiques pour produire de l'énergie par la cétolyse (Grabacka et al., 2016).

d) La lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* (DNL) est une voie métabolique qui permet la synthèse des acides gras à partir de l'acétyl-CoA, principalement produit par la glycolyse. Les acides gras seront ensuite estérifiés en triglycérides et finalement sécrétés via les « very low density lipoprotein » (VLDL). Dans les conditions de jeûne, la lipogenèse *de novo* est réduite. Après l'apport de nutriments riches en glucides, la lipogenèse *de novo* augmente, permettant de stocker de l'énergie sous forme de lipides (Y. Wang et al., 2015).

Cette voie métabolique prend place dans le cytoplasme. Elle débute par la conversion du citrate, issu du cycle TCA en acétyl-CoA par l'ATP-citrate lyase (ACLY). L'acétyl-CoA est

décarboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACACA), puis le malonyl-CoA transformé en acide palmitique par l'acide gras synthase (FASN) (Figure 26) (Ameer et al., 2014; Lambert et al., 2014; Solinas et al., 2015; Song et al., 2018).

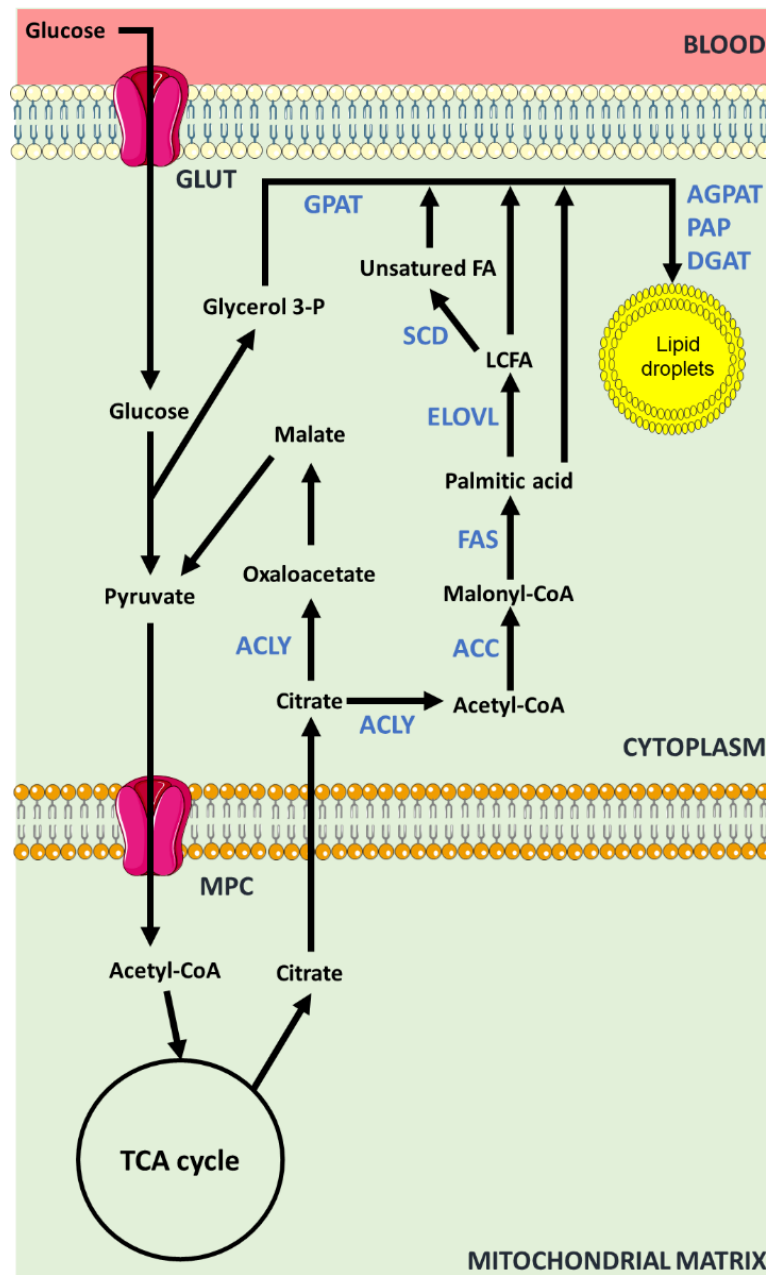


Figure 26 : Schéma simplifié de la lipogenèse *de novo* ainsi que de la synthèse et du stockage des acides gras. Le glucose entrant dans la cellule est directement transformé en glycérol 3-phosphate puis en acides gras ou être utilisé par la glycolyse et le cycle TCA pour former du citrate. Le citrate est ensuite converti en acétyl-CoA puis en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACACA). Enfin, le malonyl-CoA est transformé en acide palmitique par l'acide gras synthase (FASN). L'acide palmitique peut alors être allongé et désaturé dans les voies de biosynthèse des acides gras (Adapté de Rui, 2014).

L'acide palmitique (C16:0) peut être allongé par des élongases et désaturé par des désaturases. Pour cela, il est d'abord converti en palmitoyl-CoA pour être ensuite pris en charge par les

élongases des acides gras à chaîne très longue (ELOVL) qui le transformeront en acide stéarique C18:0. À noter que ces ELOVL participent à l'élongation de tous les acides gras. L'acide stéarique peut ensuite être désaturé en position 9 par la stéaryl-CoA désaturase 1 (SCD1) (Figure 26). D'autres désaturases (FADS) contribuent également à la désaturation des acides gras en introduisant des doubles liaisons en position $\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 9$ sur les acides gras à longue chaîne (Green et al., 2010).

Les acides gras qui proviennent de la lipogenèse et de l'alimentation subissent ainsi des élongations et des désaturations. Les acides gras peuvent être classés en acides gras saturés (AGS) et mono-insaturés/polyinsaturés (AGMI/AGPI). On compte de nombreuses voies de synthèse des acides gras ; les plus connus et décrites sont les voies $\omega 7$ (n-7), $\omega 9$ (n-9), $\omega 6$ (n-6) et $\omega 3$ (n-3) (Figure 27). Le chiffre indique la position de la double liaison dans la chaîne carbonée de l'acide gras à partir de l'extrémité carboxyle. Les voies $\omega 6$ et $\omega 3$ sont des voies qui synthétisent des acides gras longs provenant exclusivement de l'alimentation (Guillou et al., 2010).

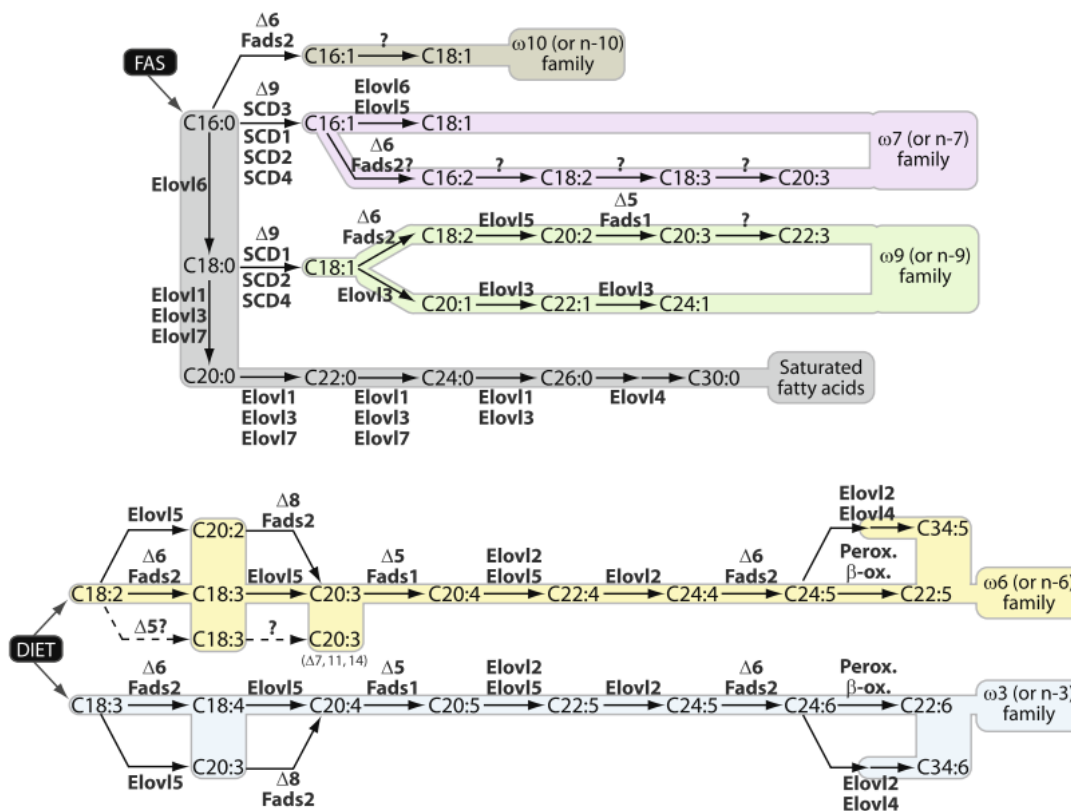


Figure 27 : Biosynthèse des acides gras à longue chaîne. Les acides gras subissent des allongements de leurs chaînes carbonées et des désaturations par l'intermédiaire d'élongases (ELOVL) et de désaturases (SCD ou FADS). Les voies $\omega 7$ et $\omega 9$ utilisent des acides gras provenant de l'alimentation ou des voies de synthèse de l'organisme alors que les voies $\omega 6$ et $\omega 3$ sont conditionnées par les acides gras issus de l'alimentation (Guillou et al., 2010).

e) Le stockage des lipides

Les acides gras synthétisés à partir de la lipogenèse *de novo* ou bien apportés par l'alimentation sont stockés dans les hépatocytes. Le stockage commence par la formation des lipides neutres, forme estérifiée sans groupement ionisable, au niveau du RE. Les TG sont la forme la plus courante et la plus connue de stockage des acides gras. Il existe deux voies de synthèse des TG : la voie du glycérol phosphate et la voie du monoacylglycérol. Au niveau du foie, la voie majoritaire est la voie du glycérol phosphate. La première réaction consiste en une acylation du glycérol-3-phosphate en acide lysophosphatidique par la famille des glycérol-3-phosphate acyltransférases (GPAT) localisées au niveau des mitochondries ou du RE. La 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) ajoute par la suite un autre acide gras pour former de l'acide phosphatidique. Cet acide peut servir de précurseur aux phospholipides ou continuer dans la voie de synthèse. Cette synthèse continue par l'action de la phosphatidate phosphatase-1 (PAP) et des protéines de la famille LIPIN (LIPIN1/2/3). Le diglycéride formé est ensuite pris en charge par les diacylglycérol O-acyltransférases 1/2 (DGAT) pour donner les TG ou être utilisé pour la synthèse des phospholipides (Figure 26) (Takeuchi and Reue, 2009). L'autre forme de stockage des lipides est l'ester de cholestérol. Cette forme de stockage réduit le fort potentiel détergent du cholestérol et permet de le stocker en vue d'une utilisation dans les processus de synthèse des hormones, des acides biliaires ou des membranes lipidiques. La synthèse et l'estérification du cholestérol prennent place dans le RE. La synthèse est permise par les stérol O-acyltransférase 1/2 (SOAT1/2) (Gluchowski et al., 2017).

La formation des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes serait la conséquence d'une accumulation de lipides neutres au niveau de la membrane du RE. Cette accumulation provoque, une fois un seuil critique atteint, un bourgeonnement de la membrane accompagné d'une acquisition de protéines membranaires telles que les périlipines (PLIN) (Choudhary et al., 2015).

B. Les mitochondries

1. Structure et fonctions

Les mitochondries ont été décrites pour la première fois par Kölliker en 1857. Il faudra cependant attendre les années 50 et l'étude de Chance et Williams pour réussir à les isoler (Chance and Williams, 1956). Ce travail mène plusieurs équipes à approfondir les mécanismes englobant le métabolisme des mitochondries et notamment, la théorie chimiosmotique de l'OXPPOS et le rôle du cycle TCA (Mitchell, 1961; Williams, 1965). Finalement, la mitochondrie est l'organite par excellence pour la production d'énergie sous forme d'ATP.

Les mitochondries ont la particularité de posséder deux membranes : une membrane externe (OMM) et une membrane interne (IMM) mitochondriale. Ces deux bicouches lipidiques sont séparées par un espace intermembranaire (IMS). L'IMM délimite une cavité centrale appelée matrice. Elle possède des replis ou crêtes mitochondriales qui constituent le site préférentiel des cytochromes c et de l'ATP synthase (Figure 28) (Munn, 2014).

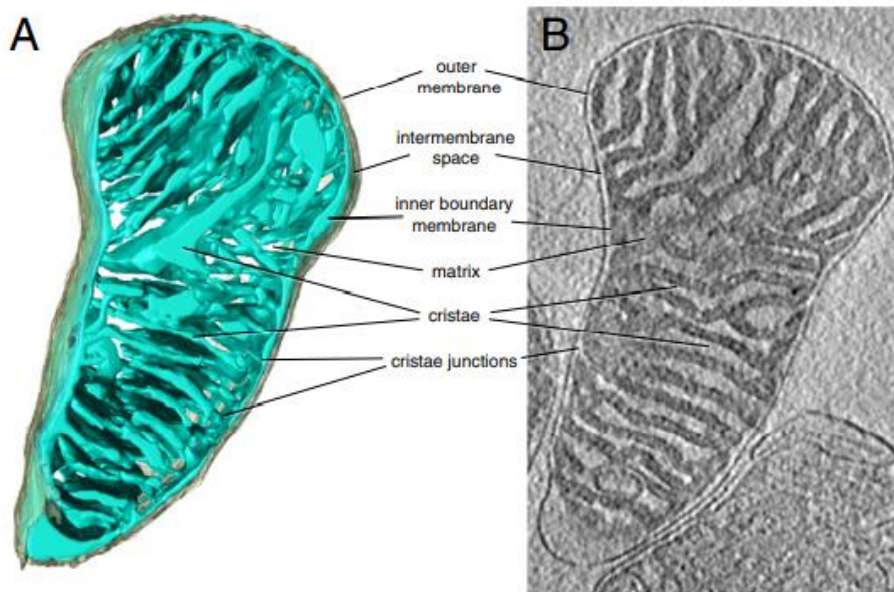


Figure 28 : Structure de la mitochondrie en microscopie tomographique. (A) Image tridimensionnelle d'une mitochondrie de cœur de souris déterminée par cryo-ET. La membrane externe (gris) enveloppe la membrane interne (bleu clair). La membrane interne est repliée en crêtes qui sillonnent la matrice. (B) Coupe tomographique. La matrice dense, qui contient la plupart des protéines mitochondriales, apparaît sombre au microscope électronique, tandis que l'espace intermembranaire et la lumière des crêtes apparaissent clairs en raison de leur faible teneur en protéines. La membrane interne se replie brusquement au niveau des jonctions des crêtes, où les crêtes rejoignent la membrane interne (Kühlbrandt, 2015)

Selon la théorie endosymbiotique, elles proviendraient de bactéries phagocytées par un eucaryote primitif (Kühlbrandt, 2015). Cette hypothèse est supportée par une composition membranaire spécifique (cardiolipide), la présence d'un ADN circulaire et par leur non-appartenance au système endomembranaire de la cellule. La matrice mitochondriale renferme plusieurs copies d'un ADN circulaire bicaténaire de 16,6 kb (Figure 29). Cet ADN code pour des ARN ribosomiques (ARNr) et pour seulement 13 protéines de la chaîne respiratoire. En effet, 99% des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire (McBride et al., 2006; Wallace, 2012).

mitochondrial (POLRMT) (Figure 30) (Jornayvaz and Shulman, 2010; Kelly and Scarpulla, 2004; Lee and Wei, 2005; Popov, 2020).

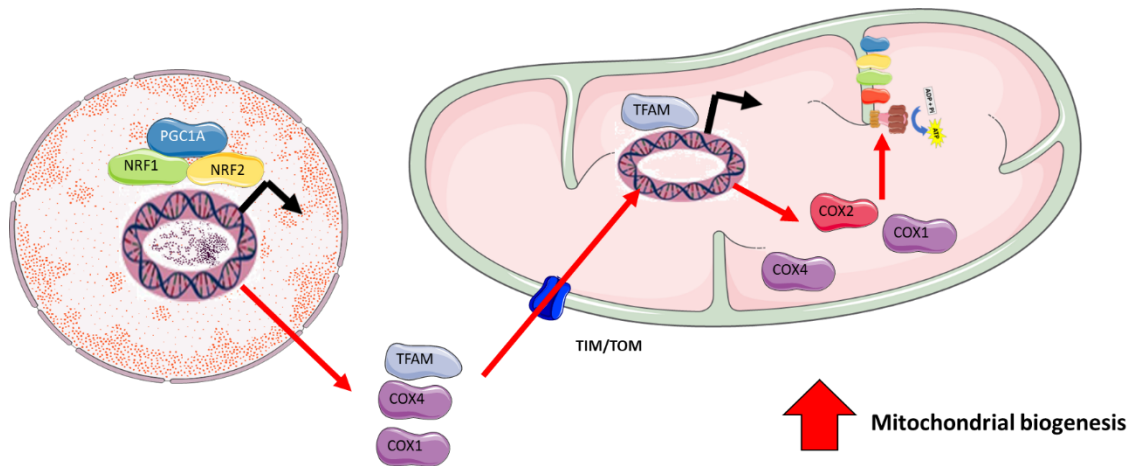


Figure 30 : Mécanismes moléculaires de la biogenèse mitochondriale. PGC1 α/β , coactivateurs de la biogenèse mitochondriale, permettent la transcription des facteurs NRF1/2. Ces facteurs activent la transcription de gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire mais aussi du facteur de transcription TFAM qui est transloqué dans la mitochondrie. TFAM active la transcription des gènes de l'ADN mitochondrial, dont des protéines de la chaîne respiratoire.

Il existe différents mécanismes de translocation des protéines dans la mitochondrie. Le transport le plus connu fait appel aux préséquences. Les protéines précurseurs synthétisées dans le cytoplasme possèdent une séquence d'acides aminés appelée préséquence qui permet leur reconnaissance par le récepteur translocase de la membrane externe (TOM). Ce récepteur permet la translocation à travers la membrane externe de la mitochondrie. Le passage de la membrane interne fait appel à la protéine de translocation de la membrane interne 23 (TIM23). Elle est accompagnée d'un système d'importation des protéines couplé à une translocase (PAM), mais également par le potentiel de membrane $\Delta\psi$ qui active TIM23. Enfin, une peptidase mitochondriale (MPP) aidée d'autres protéines comme une peptidase de clivage intermédiaire (ICP55) et une peptidase octapeptidyl (OCT1) coupe la préséquence et donne la forme stable de la protéine. La protéine est prise en charge dans la matrice par des chaperonnes comme la protéine chaperonne mitochondriale 70 (mtHSP70). Ces chaperonnes replient la protéine sous sa forme active. Il existe également des protéines synthétisées dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie qui seront insérées dans la membrane interne grâce à l'intervention la protéine « oxidase (cytochrome C) assembly 1-like » (OXA1) (Baker et al., 2007; Pfanner et al., 2019).

On peut aussi citer les mécanismes de transports des protéines riches en résidus cystéines, des précurseurs protéiques non clivables, des protéines « β -barrel » et enfin des protéines disposant de domaines hélices α . À noter que la translocation des protéines dans la membrane est consommatrice d'ATP.

3. La dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale englobe les mécanismes de fusion et de fission de la mitochondrie (Figure 31). Elle est finement régulée par des protéines spécifiques qui permettent une modulation du nombre de mitochondries, de leur taille et leur position dans la cellule. Les phénomènes de fusion/fission sont liés au métabolisme. Ils sont modulés par les changements intervenant au niveau de l'O₂PHOS et inversement (Benard et al., 2007). Les phénomènes de fusion/fission interviennent lors des phases de synthèse intense, pour coordonner la production d'ATP et permettre la production de quantités supérieures d'énergie (Rambold et al., 2011).

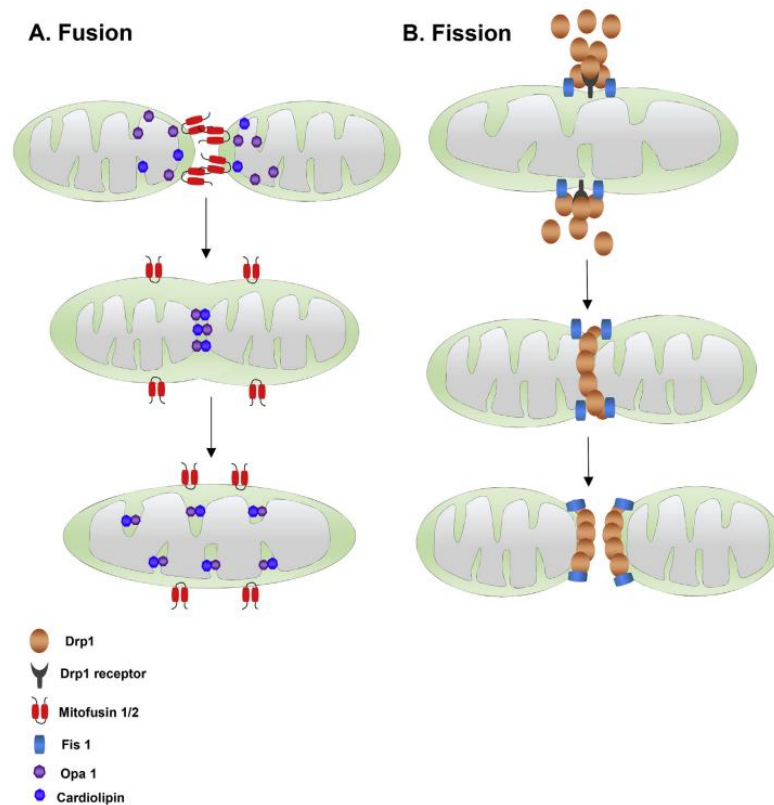


Figure 31 : Représentation des processus mitochondriaux de fusion/fission. (A) La fusion des mitochondries fait appel aux protéines MFN1/2 et OPA1. La fusion débute par l'hétérodimérisation des MFN de deux mitochondries au niveau de la membrane externe. Une fois les membranes externes fusionnées, les protéines OPA1 présentes dans la membrane interne permettent la fixation et la fusion des membranes internes. (B) La fission fait appel à la protéine DRP1 qui, aidé de FIS1, se fixe à son récepteur. La fixation de DRP1 à son récepteur provoque l'apparition d'un anneau de constriction permettant à terme la séparation de la mitochondrie (He et al., 2020).

La fusion de deux mitochondries est catalysée par les protéines de fusion, mitofusines 1 et 2 (MFN1/2) ainsi que la protéine « optic atrophy 1 » (OPA1). Les MFN sont des GTPases transmembranaires localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. MFN1 et MFN2 présentent environ 60% d'homologie. La structure des MFN se caractérise par deux domaines transmembranaires (TM), deux domaines hélice-boucle-hélice (HR1 et HR2), un domaine GTPase en N-terminal. Pour MFN2, on notera la présence d'un domaine riche en proline (PR) qu'on ne retrouve pas dans MFN1. Elles fonctionnent par hydrolyse de GTP et forment des hétérodimères de MFN formant ainsi un lien entre deux membranes externes de deux mitochondries différentes. La fusion des mitochondries est plus efficace lorsqu'elle est assurée par un homodimère MFN1 que par un hétérodimère MFN1-MFN2, probablement en raison d'une activité enzymatique plus importante de l'homodimère. Ces MFN sont exprimés dans tous les tissus. Cependant, on note une expression plus élevée de MFN2 dans le cerveau et de MFN1 dans le cœur. Alors que la MFN1 est plus spécifique de la fusion mitochondriale, MFN2 joue un rôle dans l'interaction membranaire entre les mitochondries et le RE (MAM). MFN2 est retrouvé à la jonction entre le RE et la mitochondrie et participe à l'ancrage entre les deux organites, notamment pour permettre le flux calcique. Chez la souris, l'inhibition de *Mfn2* provoque une augmentation de la distance entre le RE et la mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008). Une mutation inhibant les deux *Mfn* provoque la fragmentation du réseau mitochondrial démontrant leur rôle essentiel dans la dynamique mitochondriale (Chen et al., 2003; Eura et al., 2003; Ishihara et al., 2004).

Les MFN fonctionnent en coordination avec OPA1 qui est également une GTPase de la famille des dynamines. OPA1 assure la fusion de la membrane interne des mitochondries (Song et al., 2009). Cette protéine est constituée comme les MFN des domaines GTPase, HR et TM, mais possède également un domaine effecteur GTPase (GED). Elle fonctionne de la même manière que les MFN en permettant par hydrolyse du GTP un rapprochement des domaines homotypiques HR (Liesa et al., 2009; Tilokani et al., 2018). On distingue deux types de fusion : la fusion transitoire et complète. La fusion transitoire est majoritaire et instable (phénomène kiss and run) (Figure 32). Elle permet un échange de composants solubles, puis les mitochondries se séparent rapidement. La fusion complète, minoritaire, affecte la morphologie des mitochondries dans la mesure où elles fusionnent complètement et forment une mitochondrie longue. Cette fusion provoque l'échange de tout le matériel mitochondrial (Liu et al., 2009).

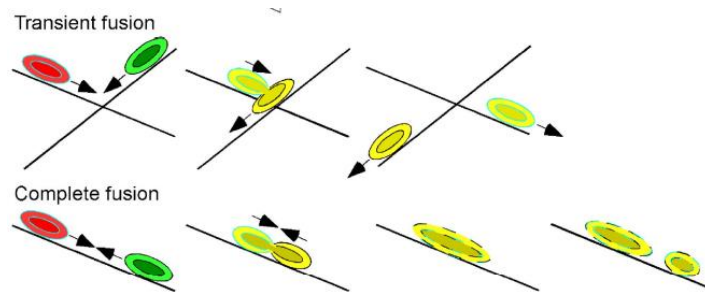


Figure 32 : Fusion transitoire et fusion complète des mitochondries. La fusion transitoire correspond à une fusion incomplète des mitochondries visant à échanger des composants solubles. Dans le cas d'une fusion complète, les deux mitochondries unifient leurs membranes interne et externe. Elles vont alors former une seule mitochondrie (Liu et al., 2009).

La fission est également coordonnée par des protéines spécifiques dont les plus connues sont la protéine 1 apparentée à la dynamine (DRP1/DNM1L) et la protéine de fission 1 (FIS1). FIS est une petite protéine localisée dans la membrane externe de la mitochondrie. FIS1 permet le recrutement de DRP1 lors des phases de fission (Koch et al., 2005; Losón et al., 2013). DRP1 est quant à lui localisé dans le cytoplasme, mais également au niveau des sites qui subissent une fission. C'est également une GTPase possédant les domaines GED et GTPase. Quand débute la fission, on observe une oligomérisation de cette protéine par leur domaine GED. Il y a alors formation d'anneaux et de spirales autour du site de fission. L'hydrolyse de GTP par le domaine GTPase fournit une force mécanique permettant la constriction au site de fission (Chang and Blackstone, 2010; Tilokani et al., 2018).

D'autres facteurs peuvent également jouer un rôle dans cette régulation de la dynamique mitochondriale. C'est notamment le cas du potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\psi$ qui inactive la fusion en cas de réduction du flux ou au contraire l'active en cas de restauration du flux (Legros et al., 2002). Mis à part la fusion/fission mitochondriale, on peut citer d'autres implications des protéines MFN, OPA1, FIS et DRP1 dans les phénomènes d'apoptose, de sénescence, d'autophagie et de maintenance de l'ADN mitochondrial (Frank et al., 2001; Gomes et al., 2011; Landes et al., 2010; Lee et al., 2007).

C. Métabolisme et cancer

1. Théorie Warburg et controverse

En 1927, Otto Warburg observe que des tumeurs privilégient la glycolyse avec production de lactate, y compris en présence d'oxygène (Warburg, 1928) (Figure 33). Il montre que cette glycolyse permet aux cellules cancéreuses d'ascites de produire autant d'énergie que par

l'OXPPOS. Il conclut que les cellules normales deviennent cancéreuses par acquisition de dysfonctions mitochondriales (Warburg, 1956). Ce concept d'une dysfonction mitochondriale a été retrouvé dans différents cancers (Modica-Napolitano and Singh, 2004; Xu et al., 2005). Cependant, cette dysfonction mitochondriale était contestée dès les années 20 avec les travaux de Crabtree sur des tumeurs de souris. Il démontre qu'il existe une variation dans les niveaux de respiration intertumorale et intratumorale. Il démontre également l'implication de l'environnement dans le métabolisme respiratoire des tumeurs (Crabtree, 1929).

La production de lactate par la glycolyse produit seulement deux molécules ATP par molécule de glucose. Cette faible production d'ATP est compensée par un rendement 100 fois supérieur à l'OXPPOS (Costello and Franklin, 2005). Ainsi, les cellules cancéreuses utiliseraient cette voie métabolique pour sa rapidité de production d'ATP. Les besoins de la cellule pour faire fonctionner la glycolyse sont assurés par l'augmentation de la captation du glucose par les transporteurs GLUT et une augmentation de l'activité, des enzymes de conversion du pyruvate en lactate LDH de même que des enzymes de la glycolyse comme la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et l'hexokinase 2 (HK2) (Amann et al., 2009; Chen et al., 2007; Singer et al., 2011; Wolf et al., 2011). La captation accrue du glucose a notamment servi à l'élaboration de la technique d'incorporation d'un traceur analogue du glucose, le ¹⁸fluorodeoxyglucose (FdG) en imagerie tomographie par émission de positrons (PET), pour détecter les tumeurs et les métastases chez les patients (Bos et al., 2002). Dans le cas des CSC, on retrouve également une utilisation plus intense de la glycolyse. Une étude sur l'induction de la dédifférenciation de cellules somatiques, dépendantes de l'OXPPOS, démontre que les iPS acquièrent un métabolisme glycolytique lié à une diminution du pool mitochondrial. Ces observations sont corroborées par une étude de Domenichini et son équipe qui montrent, dans des tumeurs pancréatiques en sphère, une diminution de la consommation de l'oxygène et une augmentation de la glycolyse (Domenichini et al., 2019). Il est admis aujourd'hui que le métabolisme des cellules tumorales est complexe et que les cellules cancéreuses possèdent des mitochondries fonctionnelles sans toutefois les privilégier pour la production d'énergie. On constate d'ailleurs dans certains cas, une participation des mitochondries à la résistance aux traitements dans les cellules cancéreuses. Dans des modèles *in vitro*, il a été montré que les cellules résistantes au cisplatine se caractérisaient par une forte activité OXPPOS (Zampieri et al., 2020). De la même façon dans des tumeurs d'ovaires chez la souris, Pastò et son équipe ont mis en évidence que les CSC possèdent une forte activité de la voie PPP associée à une augmentation de l'OXPPOS et de la production de ROS. La voie des PPP apporte dans ce

contexte du NADPH nécessaire aux enzymes anti-oxydantes, préservant ainsi l'intégrité des CSC (Pastò et al., 2014).

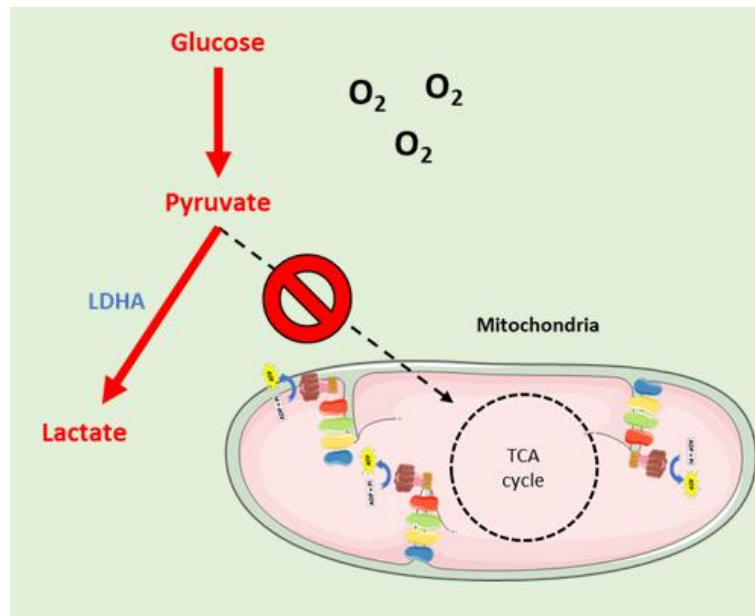


Figure 33 : Représentation de l'effet Warburg. La théorie de Warburg considère que les cellules tumorales possèdent des mitochondries dysfonctionnelles. Cette incapacité mitochondriale à produire de l'énergie entraîne une utilisation excessive de la glycolyse avec conversion de pyruvate en lactate en présence d'oxygène (Naudin, 2018).

Plusieurs hypothèses ont alors été évoquées pour expliquer les changements du métabolisme vers la production de lactate : une diminution de la décarboxylation du pyruvate qui conduit à une diminution du complexe PDH et du transport mitochondrial du pyruvate ; une dysfonction de certaines enzymes du cycle TCA engendrant une diminution de l'OXPPOS ; un pool de mitochondries plus faible dans les cellules cancéreuses ; l'effet Crabtree ou l'inhibition de l'OXPPOS par la glycolyse ; une augmentation des peptides inhibant l'ATP synthase ; le stress oxydatif de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Moreno-Sánchez et al., 2007). Il ressort majoritairement des études que l'effet Warburg constitue un phénomène d'adaptation des cellules à différentes contraintes du microenvironnement et que les cellules peuvent aussi faire appel aux mitochondries pour produire de l'énergie (Lim et al., 2011; Scott et al., 2011). Par exemple, dans des cellules cancéreuses du col de l'utérus et du sein, Rodríguez-Enríquez et ses collaborateurs notent qu'en fonction de l'oxygénation de l'environnement, les cellules privilégient la production d'énergie non dépendante de l'OXPPOS en hypoxie et inversement en normoxie (Rodríguez-Enríquez et al., 2010). On parle dorénavant d'effet Warburg pour décrire le phénomène de shift métabolique de l'OXPPOS à la glycolyse avec production de lactate en condition aérobie. L'effet Warburg est associé à l'activation d'oncogènes (MYC),

aux mutations de gènes suppresseurs de tumeur (p53) ou encore aux dérégulations de voies de signalisation (PI3K, AMPK, HIF1 α) qui sont connues comme communes aux cellules cancéreuses et aux CSC (Figure 34).

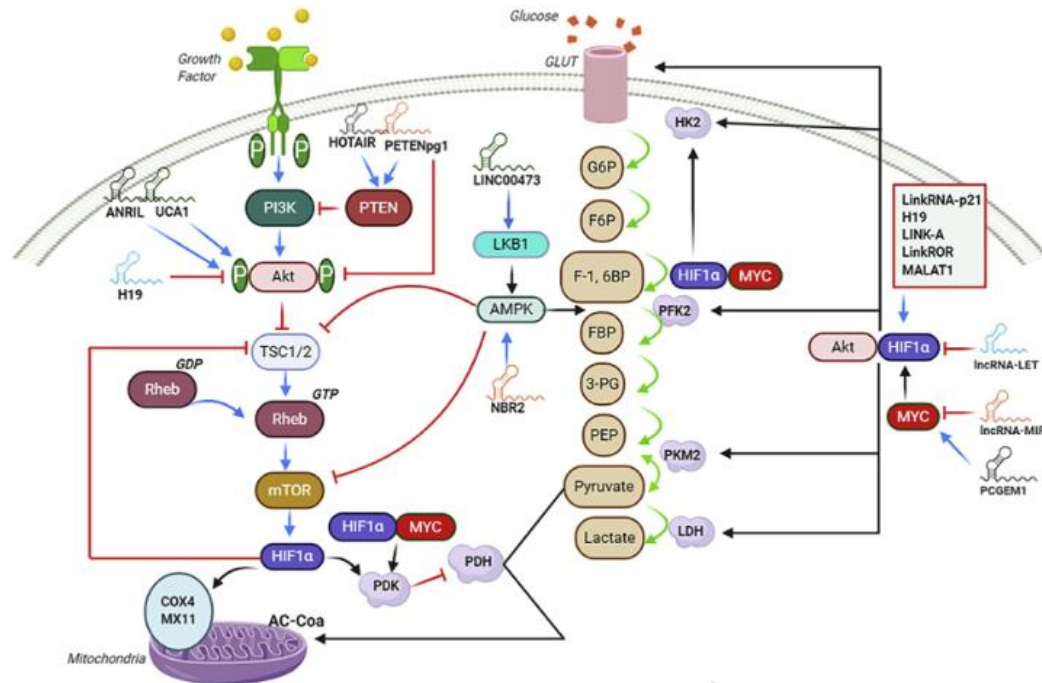


Figure 34 : Les différentes voies impliquées dans le métabolisme du glucose. MYC et HIF1 α sont impliqués dans le métabolisme du glucose par leur action directe sur des enzymes de la glycolyse (HK2, PFK3, PKM2 et LDH) et de la mitochondrie (PDH et COX4) ou par leur action indirecte via les voies PI3K, AMPK et AKT (Mirzaei and Hamblin, 2020).

MYC est une famille de proto-oncogène connue pour être à l'origine de nombreux cancers. Sa surexpression favorise la prolifération, la croissance des cellules tumorales et est associée, dans certains cancers, à l'acquisition de propriétés souches (Dang, 2012). On connaît également le rôle de la surexpression de *MYC* dans la reprogrammation du métabolisme cellulaire. Dans le gliome, *MYC* provoque une augmentation de l'expression du gène *PKM2* (David et al., 2010; Luan et al., 2015). Dans le foie de souris, la surexpression *Myc* induit également une expression du gène de la glutaminolyse *Gls1*. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'augmentation de la glutaminolyse est un phénomène d'anaplérose de la glutamine (Yuneva et al., 2012). Sa suractivation dans les fibroblastes de rat est également associée à une augmentation de *Glut1* et des enzymes de la glycolyse *Pfk*, *Gapdh*, *Gpi*, *Pgm* ainsi que l'énolase (Osthus et al., 2000).

HIF1 α est un facteur de transcription dépendant de la concentration en O₂ de l'environnement. Son activation, consécutive à une diminution de l'O₂, favorise le métabolisme glucidique par

augmentation de l'expression des *GLUT1/3* mais aussi des gènes de la glycolyse comme *HK1/2* et *LDHA*. Des analyses d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) dans des cellules confirment que les facteurs HIF1 et HIF2 contrôlent les gènes de la glycolyse dans les lignées cellulaires leucémiques et les cellules primaires d'AML (Wierenga et al., 2019). Li et ses collaborateurs démontrent également que la surexpression de HIF1 α provoque, via l'augmentation de l'enzyme de ramification du glycogène (GBE1), un switch vers la glycolyse anaérobie et une entrée plus importante de glucose dans des cellules tumorales pulmonaires en condition d'hypoxie (L. Li et al., 2020). Dans le cancer, HIF1 α n'est cependant pas toujours activé par un environnement hypoxique. HIF1 α peut ainsi être activé par une activation de mTOR, une production de ROS consécutive à une dysfonction mitochondriale ou encore une augmentation d'oxyde d'azote (NO) (Semenza, 2010). Nous pouvons également noter que HIF1 α et MYC peuvent agir de concert pour activer les gènes *HK2* et le gène de la pyruvate déshydrogénase kinase (*PDK1*) qui augmentent respectivement la glycolyse et inactivent la décarboxylation du pyruvate dans les mitochondries (Kim et al., 2007). Dans le carcinome rénal, HIF1 α inhibe la respiration cellulaire via l'inhibition de PGC1 β , cible de MYC (Zhang et al., 2007).

La protéine p53 est considérée, en condition physiologique, comme suppresseur de tumeur. Elle joue un rôle important dans la réponse aux stress des cellules, en induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire. Dans le cas de dommages cellulaires irréversibles pouvant causer l'apparition de cellules tumorales, p53 induit également l'apoptose et la sénescence des cellules (Bensaad et al., 2006). On connaît également le rôle de p53 dans la reprogrammation métabolique. Un gène cible de p53, la protéine régulatrice de la glycolyse et de l'apoptose induite par TP53 (*TIGAR*), inhibe la glycolyse au profit de la voie PPP. La protéine p53 provoque également une augmentation de l'O₂PHOS par la production de la protéine de synthèse de la cytochrome C oxydase (*SCO2*) qui participe à l'assemblage des protéines cytochrome C oxydases (COX) des mitochondries. Les effets de *TIGAR*, médié par p53, ont pour effet de protéger les cellules en rechargeant le pool de GSH par production de NADPH par la voie PPP (Green and Chipuk, 2006). Une autre étude sur des cellules HCT116 vient corroborer le rôle de p53 sur *SCO2*. Matoba et son équipe démontrent que p53 agit sur *SCO2* et que les mutations de *TP53* provoquent un switch métabolique vers la glycolyse (Matoba et al., 2006). Ainsi, l'acquisition de mutation *TP53* provoque également une reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses. L'étude de Schwartzenberg-Bar-Yoseph et ses collaborateurs corrobore l'effet de p53 sur la glycolyse en

démontrant qu'il agit en inhibant la transcription des gènes *GLUT1/4* dans l'ostéosarcome. Ils démontrent également dans leur étude que la mutation *TP53* réactive la transcription des gènes *GLUT1/4*. D'autre part, on remarque également chez la souris *Tp53* muté, une induction du gène *Glut1* et un effet Warburg plus important dans les cellules de poumon *in vitro* et *in vivo* (Zhang et al., 2013). Enfin, il est intéressant de remarquer que p53 est également lié aux facteurs HIF1 α et MYC précédemment décrits. Une étude de Zawacka-Pankau met en lumière la triade de régulation du métabolisme joué par p53, HIF1 α et MYC dans l'inhibition de la glycolyse (Zawacka-Pankau et al., 2011). Finalement, les mutations de *TP53* jouent un rôle essentiel dans le switch métabolique vers la production de lactate dans les cellules cancéreuses.

Les voies de signalisation importantes dans l'effet Warburg sont la voie AMPK et la voie PI3K. Leur activation provoque un shift métabolique. L'AMPK est une sérine/thréonine kinase dépendante de la production d'ATP. L'AMPK possède une sous-unité γ contenant 2 sites qui sont réservés à l'ATP et à l'AMP. En condition pauvre en ATP, les sites sont occupés par l'AMP ce qui provoque l'activation d'AMPK. AMPK active la β -oxydation des acides gras par phosphorylation de l'ACACA, enzyme qui catalyse la production de malonyl-CoA, principal inhibiteur du transporteur CPT1. Cette activation de l'oxydation des acides gras diminue les voies de synthèse des lipides notamment par inhibition de FASN (Ronnelt et al., 2006). L'activation d'AMPK augmente également l'expression des transporteurs GLUT. Dans le cancer, il a été démontré que l'activation d'AMPK diminue l'effet Warburg et que son inhibition augmente l'action de MYC et HIF1, engendrant ainsi un métabolisme glycolytique par production de lactate (Faubert et al., 2013; Hardie, 2011). L'AMPK peut notamment être inhibée par PI3K, ce qui provoque la répression des gènes *Aco2*, *Pdhb*, *Idh3a*, *Cs*, *Dld* et *Sdha* du cycle TCA et *Nd1*, *Cytb*, *Cox2* et *Atp6* de l'OXPPOS (Arciuch et al., 2013). L'activation de la voie PI3K/AKT provoque également une augmentation du gène *HIF1 α* contribuant également à l'augmentation de l'activité glycolytique (Abraham, 2004; Pore et al., 2006). En outre, l'activation de AKT est décrite comme suffisante pour induire un switch vers la glycolyse dans le cancer (Elstrom et al., 2004).

2. Les autres voies métaboliques

On retrouve dans certains types de tumeurs, des cellules qui sont dépendantes d'autres voies métaboliques que la glycolyse. On peut citer les acides aminés, les acides gras et même le lactate produit par d'autres cellules.

Tout d'abord, la glutaminolyse est augmentée dans certaines tumeurs du poumon mutées *Kras* avec une perte de fonction de la protéine 1 associée à l'ECH de type Kelch (*Keap1*) (Romero et al., 2017). Cette mutation est associée à l'hyper activation du gène *Nfe2l2* qui joue un rôle majeur dans la réponse anti-oxydante. Dans ce contexte, la glutaminolyse est une voie judicieuse pour les cellules cancéreuses et les CSC qui rechargent ainsi leur pool d'antioxydants GSH (Babu et al., 2001). De plus, la glutaminolyse apporte des substrats au cycle TCA et permet la synthèse d'acides aminés, de nucléotides et d'acides gras nécessaires à la prolifération des cellules cancéreuses (Altman et al., 2016). L'inhibition de cette voie a par ailleurs démontré son efficacité dans le traitement des CSC (Li et al., 2019, 2015). Enfin, la glutaminolyse est fréquemment augmentée dans les cellules cancéreuses produisant beaucoup de lactate. En effet, le pyruvate, ressource principale du cycle TCA, est transformé en lactate empêchant ainsi son entrée dans la mitochondrie. Il va y avoir anaplérose de la glutamine pour alimenter le cycle TCA en remplacement du pyruvate (DeBerardinis et al., 2007).

Les acides gras sont une autre source d'énergie pour les cellules cancéreuses. On retrouve par exemple une augmentation de certains marqueurs comme CD36, impliqué dans l'entrée des acides gras dans les cellules, dans certains cancers (Hale et al., 2014; Koundouros and Poulgiannis, 2020; Liang et al., 2018). Ainsi, Chen et son équipe postulent que l'entrée des acides gras dans les cellules initiatrices de tumeur (TIC) entraîne une augmentation de l'oxydation des acides gras. Cette β -oxydation accrue pourrait jouer de différente manière sur la capacité d'autorenouvellement des TICs : le détournement des acides gras à chaîne longue destinés à la synthèse des lipides, la régulation négative des ROS par la production de NADPH et la réduction de la résistance métabolique aux chimiothérapies (Chen et al., 2016). Dans des cellules cancéreuses gastriques, l'équipe de Choi montre que les CSC OXPHOS produisent, par le biais de l'oxydation des acides gras, du NADPH qui limite l'accumulation de ROS (Choi et al., 2020). D'autres études mettent également en lumière le rôle de l'augmentation de l'entrée des acides gras, de la lipogenèse *de novo* et de la synthèse des acides gras dans la synthèse des membranes, cruciale pour la croissance et la prolifération des cellules. La lipogenèse *de novo* a un rôle protecteur contre les ROS en augmentant la saturation des membranes cellulaires (Rysman et al., 2010). L'altération de la synthèse des acides gras peut également activer différents mécanismes comme l'apoptose médiée par les cardiolipines, l'acétylation des protéines comme WNT/ β -caténine, l'activation d'AKT ou encore la régulation de l'inflammation via la prostaglandine E2 (PGE2) (Röhrig and Schulze, 2016). Les cellules peuvent aussi stocker les acides gras sous forme de gouttelettes lipidiques. Ces gouttelettes

servent de future source d'énergie et protègent les cellules de la peroxydation lipidique par emprisonnement des acides gras polyinsaturés très sensibles aux ROS (Welte and Gould, 2017). À noter que dans le microenvironnement, la présence de corps cétoniques peut également servir comme énergie pour les CSC (Bonuccelli et al., 2010).

L'utilisation du lactate du microenvironnement comme source d'énergie pour les cellules est un concept plus récent. Le lactate, considéré pendant longtemps comme un déchet de la cellule, semble permettre la croissance des cellules par son utilisation dans le cycle TCA (Faubert et al., 2017; Martinez-Outschoorn et al., 2011). De manière intéressante, il a été montré un échange de lactate entre des CSC et des non-CSC dans des organoïdes de cancer colorectal. Cet échange promeut l'OXPPOS dans les CSC et les ROS ainsi générés par la chaîne respiratoire permettent la croissance des CSC par l'activation de la voie AKT-WNT/ β -caténine (Zhao et al., 2020). Le lactate est en outre profitable pour la cellule cancéreuse. La transformation de l'acide lactique en ion lactate va prendre en charge les ROS préservant les acides gras de la peroxydation (Groussard et al., 2000).

Finalement, le métabolisme comme marqueur de la cancérogenèse et des CSC est maintenant largement admis. Cependant, les études ont montré qu'il existe une grande complexité du métabolisme avec une production d'énergie par différentes voies métaboliques. L'enjeu est donc désormais la recherche de biomarqueurs comme cible thérapeutique avec deux objectifs : éradiquer les CSC et prévenir les effets de différenciation/rétrodifférenciation contribuant à la résistance dans la tumeur.

V. La famille PPAR

Notre équipe s'intéresse à la reprogrammation des cellules tumorales hépatiques lors des processus de différenciation/rétrodifférenciation. Les analyses transcriptomiques réalisées sur la lignée HepaRG, nous ont permis de montrer une diminution de l'activité du TCA et de l'OXPPOS dans les cellules immatures. Nous avons également identifié PPAR γ comme un possible régulateur de cette reprogrammation métabolique (Fekir et al., 2019).

Les PPARs sont une famille de récepteurs nucléaires comprenant trois isoformes PPAR α , PPAR δ/β et PPAR γ ($\gamma 1$ et $\gamma 2$) respectivement nommées sous-familles des récepteurs nucléaires C1 *NRC1C1*, *NRC1C2* et *NRC1C3*. Les PPARs sont activées par un grand nombre d'acides gras et de dérivés d'acides gras parmi lesquels les prostaglandines et les eicosanoïdes. Les PPARs ont une expression différentielle selon les tissus. PPAR α est présent au niveau du foie,

du cœur, des muscles squelettiques, du tissu adipeux brun, de l'intestin et des reins. L'expression de PPAR γ est élevée dans le tissu adipeux blanc, les muscles squelettiques, l'intestin et les cellules immunitaires. Enfin, PPAR δ a une expression ubiquitaire (Christofides et al., 2021).

A. Structure

La structure des PPAR est composée de 6 régions réparties dans 4 grands domaines annotés A/B, C, D et E/F (Figure 35). Ces domaines sont les suivants : un domaine terminal NH₂ ; un domaine de transactivation indépendant du ligand (A/B) ; un domaine C de liaison à l'ADN de 70 acides aminés (DBD) possédant 2 motifs en doigt de zinc très conservé ; un domaine D qui sert à l'ancrage de cofacteurs et permet la liaison entre le domaine de liaison au ligand (LBD) et le DBD et qui contient la séquence d'adressage nucléaire (NLS) ; le domaine E/F ou LBD qui permet la liaison du ligand ; enfin, il y a deux domaines de transactivation (AF). AF-1 (amino-terminal) indépendant du ligand et AF-2 (carboxy-terminal) dépendant du ligand. Ils sont contenus respectivement dans les domaines A/B et E/F.

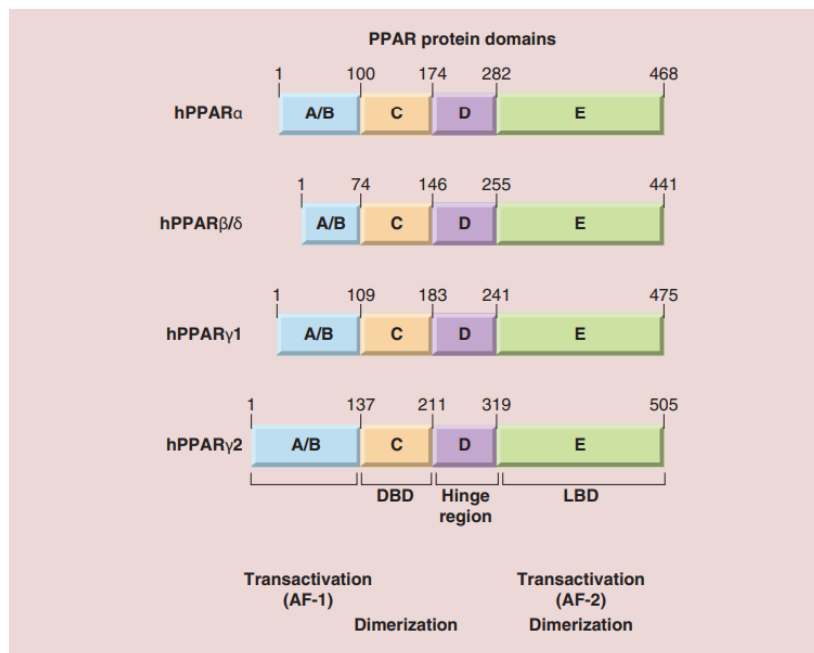


Figure 35 : Principaux domaines des PPARs. La structure des PPARs est composée de cinq domaines principaux : AF-1, un domaine d'activation indépendant du ligand dans la région A/B ; un domaine C de liaison à l'ADN (DBD) ; la région charnière ; un domaine de liaison au ligand (LBD) et un domaine d'activation AF-2 dépendant du ligand (Han et al., 2017a).

La région N-terminale AF-1 a une longueur et une conservation qui varie selon les PPARs. Cela participe notamment à la spécificité de transcriptions des PPARs. Ce domaine est également la cible de modifications post-traductionnelles. Le domaine AF-1 peut être activé seul, mais son

activation combinée avec AF-2 va permettre une transcription plus forte des gènes cibles des PPAR (Azhar, 2010). Le domaine AF-2 correspond à la poche de liaison du ligand dans le LBD. Il participe à la liaison des ligands et des coactivateurs. La poche de liaison de la famille des récepteurs PPARs possède une taille unique par rapport aux autres familles de récepteurs nucléaires. Sa taille est environ 3-4 fois plus grande lui conférant la possibilité de se lier à de nombreux acides lipophiles, synthétiques ou naturels, de tailles différentes (Han et al., 2017a, 2017b).

B. Mécanisme d'activation des PPAR

Grâce à leur signal de localisation nucléaire, les PPARs sont transloqués dans le noyau. Ils se fixent via leur domaine DBD sur des éléments de réponse appelés « Peroxisome proliferator element » (PPRE) (Berger and Moller, 2002). Structurellement, les PPRE sont constitués d'éléments répétitifs directs (DR-1) de deux hexanucléotides AGGTCA, séparés par une paire de bases (Kota et al., 2005). La fixation au PPRE est facilitée par son hétérodimérisation avec les récepteurs de faible affinité de l'acide rétinoïque (RXR), permise par le domaine LBD. En absence de ligand, PPAR/RXR est maintenu inactif par un complexe corépresseur possédant une activité histone déacétylase. L'ADN est alors compacté ce qui ne permet pas la transcription des gènes cibles. Après stimulation par un ligand des PPARs, l'hétérodimère recrute différents coactivateurs incluant des protéines avec activité histone acétylase. L'ADN se décompacte et la transcription des gènes cibles débute (Figure 36) (Berger and Moller, 2002; Han et al., 2017a, 2017b).

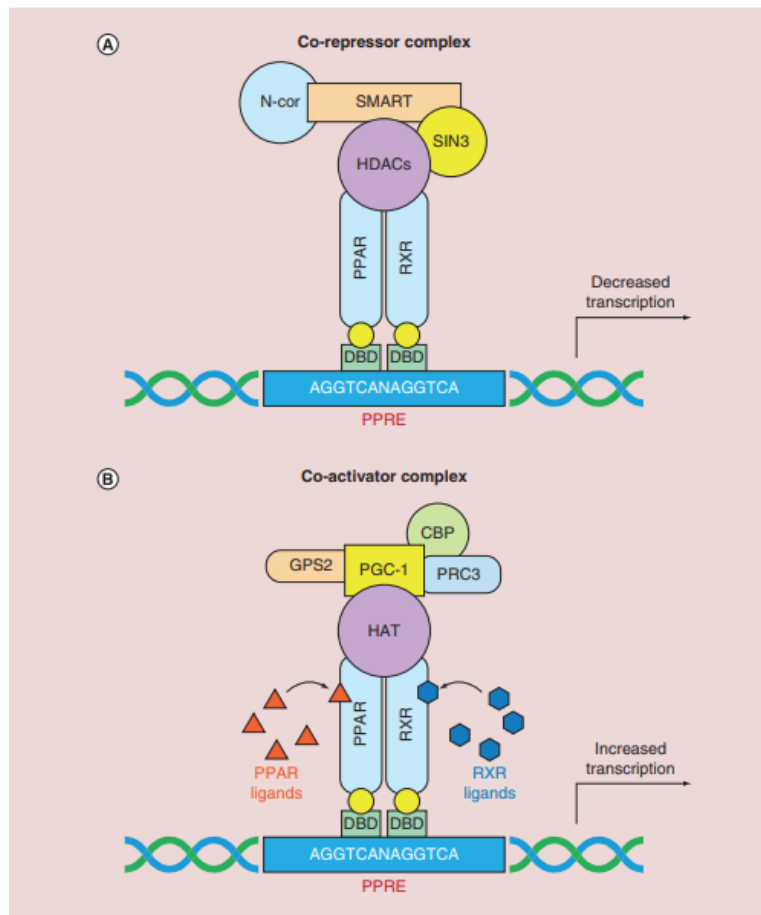


Figure 36 : Mécanisme d'action génétique des PPARs. (A) En absence de ligand, l'hétérodimère PPAR/RXR est lié à un complexe répresseurs possédant une activité histone désacétylase, inhibant la transcription des gènes. (B) La liaison d'un ligand aux PPARs ou au RXR provoque le désencrage du complexe répresseurs et le recrutement d'un complexe coactivateurs permettant une activation transcriptionnelle (Han et al., 2017a).

C. Ligands

Il existe de nombreux ligands des PPARs (Figure 37). La plupart des ligands naturels de PPAR sont produits par le métabolisme des lipides et sont nommés « lipid sensors ». Parmi les plus connus, on retrouve les acides gras insaturés comme l'acide arachidonique (C20:4), oléique (C18:1), linoléique (C18:2), stéarique (C18:0), palmitique (C16:0), rétinoïque (action sur RXR) ou pristanique. Les métabolites de l'acide arachidonique peuvent également activer les PPAR ; ils sont appelés eicosanoïdes et comprennent les prostaglandines et les leucotriènes (Forman et al., 1995; Krey et al., 1997; Moon et al., 2014).

Des agonistes ou antagonistes synthétiques ont été développés. Ils peuvent être spécifiques d'une isoforme ou agir sur plusieurs isoformes. On peut citer pour PPAR α , la famille des fibrates avec le clofibrate et le fénofibrate. Pour PPAR γ , il existe la famille des thiazolidinediones avec la rosiglitazone, la troglitazone, la pioglitazone ou encore la ciglitazone. Pour PPAR β/δ , des études ont montré que le bésafibrate était un bon agoniste, mais le

GW501516 est plus spécifique (Grygiel-Górniak, 2014). Enfin, on peut citer le ragaglitazar ou le rarglitazar qui activent PPAR α et PPAR γ . Plusieurs antagonistes des PPAR ont également été synthétisés. On peut citer GSK0660 (Hack et al., 2012) pour PPAR β/δ , GW6471 pour PPAR α (Chen et al., 2010) et T0070907 pour PPAR γ (Zaytseva et al., 2011).

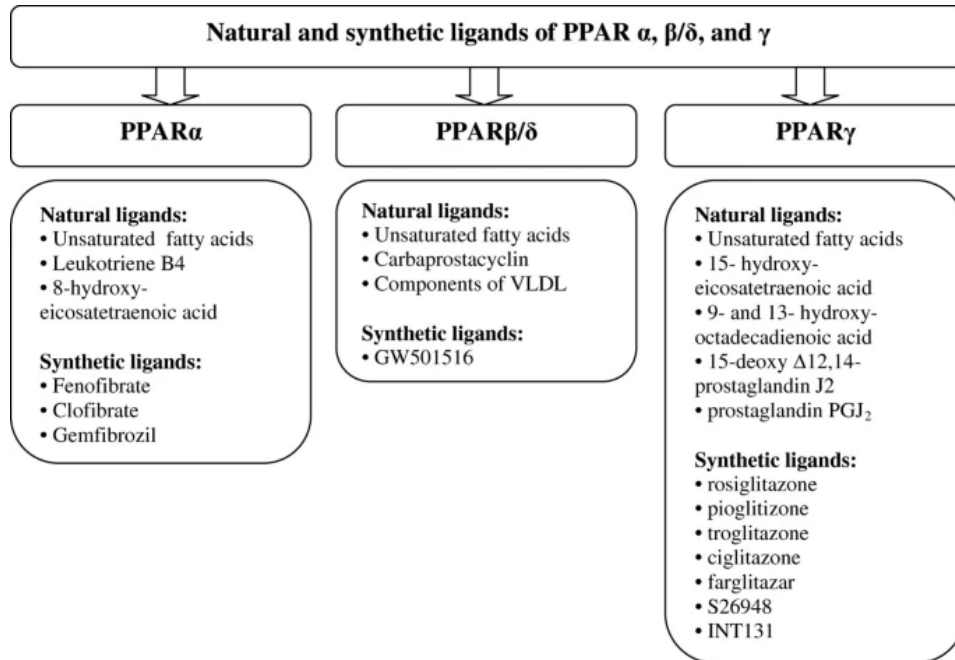


Figure 37 : Ligands des PPARs. Il existe plusieurs ligands naturels et synthétiques spécifiques ou non des différentes isoformes (Grygiel-Górniak, 2014).

D. Fonctions

Les PPAR sont connus pour leur implication dans l'inflammation, la différenciation, la prolifération cellulaire ainsi que dans l'homéostasie du glucose et des lipides. On notera cependant qu'il existe certains mécanismes spécifiques de l'isoforme et du tissu.

1. Inflammation

Le rôle des PPAR dans l'inflammation est intrinsèquement lié à leurs implications dans les phénomènes de différenciation cellulaire. En effet, les PPARs conditionnent la différenciation et le devenir de nombreuses cellules de l'immunité. Globalement, ils agissent sur la polarisation des macrophages et la différenciation des lymphocytes T. Ainsi, cette action contribue à la sécrétion de cytokines anti- ou pro-inflammatoires. Pour les macrophages, il a été démontré que l'induction de cytokines inflammatoires telles que IL-4 provoque l'induction de PPAR γ dans ces cellules menant à la polarisation des macrophages (Daniel et al., 2018; Szanto et al., 2010). Il existe deux types de macrophages : les macrophages M1 ont un fort potentiel inflammatoire et microbicide et les macrophages M2 modulent la réponse immunitaire (Mege and Capo, 2010).

L'activation de PPAR γ permet notamment de diminuer la proportion de la sous-population de macrophages M1 et d'augmenter la population M2 (Stafeev et al., 2018). Cette balance en faveur des M2 est également observée avec PPAR α et conduit pareillement à une diminution de médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) (Penas et al., 2015). La fonction de PPAR β/δ dans l'activation des macrophages est moins connue. Dans la différenciation des macrophages en M2, PPAR β/δ induit une oxydation des acides gras et une sensibilité à l'insuline via une libération des cytokines IL-4 et IL-13 (Desvergne, 2008; Kang et al., 2008; Odegaard et al., 2008). Cependant, des études sur des souris ont montré une diminution de la production de cytokines dans le cas d'une extinction complète de cette isoforme. De plus, PPAR β/δ semble jouer un rôle dans la désactivation des macrophages (Chawla, 2010). Dans le cas des lymphocytes T, les PPARs permettent la différenciation et l'orientation des lymphocytes T helpers (Th) CD4⁺ et cytotoxiques CD8⁺. Les lymphocytes T helpers CD4⁺ sont subdivisés en plusieurs groupes : les Th1 sont impliqués dans la réponse contre les pathogènes intracellulaires, les Th2/Th17 sont plutôt impliqués dans la réponse aux pathogènes extracellulaires et les T régulateurs (Treg) dans la reconnaissance du soi. Les PPAR diminuent les Th1/Th17 et augmentent les Th2. Ils augmentent également la proportion de cellules Treg (Cipolletta et al., 2012; Dunn et al., 2007; Kanakasabai et al., 2011).

Les PPARs sont pareillement décrits dans le foie pour leur rôle anti-inflammatoire. PPAR α agit dans la réponse pendant la phase aiguë de l'inflammation. Mansouri et son équipe montrent que Ppar α prévient l'inflammation induite par du LPS par l'inhibition de l'expression des protéines inflammatoires circulantes Tnf α , Il-6 et Il-1. La diminution de ces cytokines réduit l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire (Icam) et vasculaire (Vcam) protégeant les souris de l'athérosclérose. Dans ce modèle murin, Ppar α atténue, via un contrôle spécifique du foie, l'inflammation de façon systémique et vasculaire (Mansouri et al., 2008). L'activation de PPAR α , par des fibrates, augmente également la réponse anti-inflammatoire par une augmentation de l'inhibiteur de NF- κ B (IkB) et une répression du gène de la protéine C-réactive (CRP) (Kleemann et al., 2003). PPAR γ est aussi impliqué dans la diminution de la réponse inflammatoire. L'activation de PPAR γ par du 15-déoxy- Δ 12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) provoque une inhibition de la translocation de NF- κ B dans le noyau résultant en une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (Chen et al., 2014). Dans la fibrose hépatique, l'activation de Ppar γ par la rosiglitazone diminue l'activation des cellules hépatiques stellaires. La réduction de l'activation des cellules stellaires hépatiques se traduit par une réduction de l'actine musculaire lisse α (α -Sma) et des inhibiteurs de métalloprotéinases (Timps) (Yu et al.,

2010b). Plus récemment, PPAR γ a été montré comme crucial dans la diminution de la fibrose par l'acide docosahexaénoïque (He et al., 2019). Tout comme les deux isoformes précédentes, PPAR β/δ est connu pour son action anti-inflammatoire. Dans un modèle murin CCL₄, l'induction du gène de l'enzyme antioxydante paraoxonase-1 (*Pon1*), par Ppar β/δ , est corrélée à un rôle protecteur contre l'inflammation et la fibrose (Marsillach et al., 2009). Chez la souris infectée à l'HBV, Ppar β/δ inhibe la stéatose, l'inflammation et promeut l'apoptose (Balandaram et al., 2016).

2. Différenciation

La différenciation cellulaire est un mécanisme qui est largement associé aux PPARs. La famille des PPAR induit la différenciation de cellules de l'immunité. Cependant, la différenciation des adipocytes est la plus abondamment décrite dans la littérature. L'isoforme majoritaire induisant la différenciation dans les adipocytes est PPAR γ suivie de PPAR α . Quant à PPAR β/δ , sa stimulation au niveau des adipocytes n'induit pas la différenciation (Brun et al., 1996; Moseti et al., 2016). La différenciation fait appel à PPAR γ en association avec « CCAAT/enhancer binding protein α » (C/EBP), facteur de transcription impliqué dans la différenciation. Leur expression conjointe, tout d'abord faible dans le préadipocyte augmente au cours de la différenciation adipocytaire, ce qui conduit à l'arrêt de la croissance et la différenciation cellulaire (Gregoire et al., 1998). Les kératinocytes subissent également une différenciation qui peut être médiée par les trois isoformes bien que PPAR β/δ soit plus spécifique (Kim et al., 2006; Mao-Qiang et al., 2004; Schmuth et al., 2004; Westergaard et al., 2001). PPAR β/δ induit également la différenciation des oligodendrocytes (Saluja et al., 2001). De manière intéressante, il existe une balance entre PPAR β/δ et PPAR γ dans la régulation des ostéoblastes et des ostéoclastes via l'activation de la voie WNT (Scholtysek et al., 2013). Dans les cellules souches neuronales, PPAR γ joue un rôle critique dans la prolifération et la différenciation des cellules en neurones (Wada et al., 2006).

3. Métabolisme

La famille des PPARs régule le métabolisme des glucides et des lipides dans de nombreux tissus (Figure 38). Nous nous focaliserons dans cette partie sur l'action des PPARs sur le métabolisme hépatique.

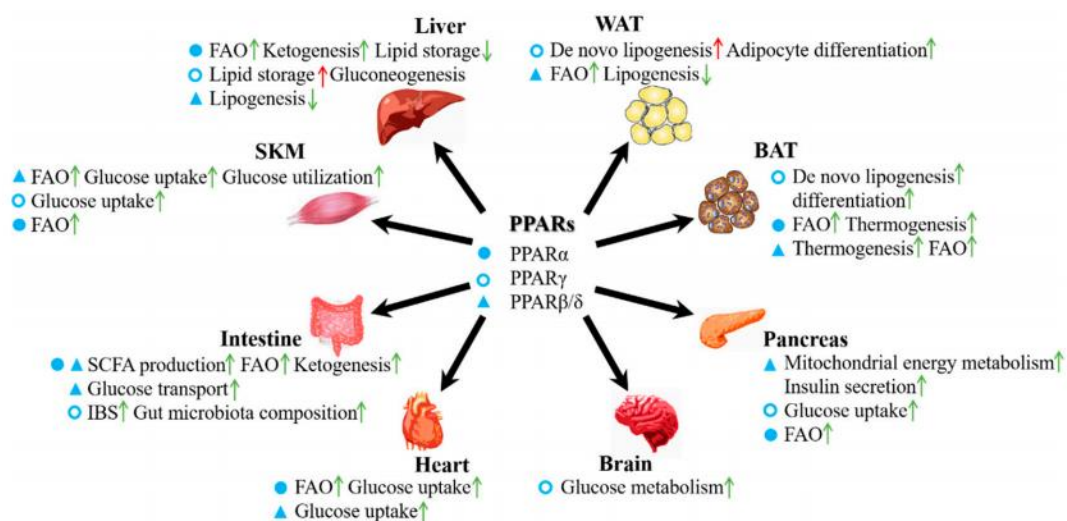


Figure 38 : Rôles des PPARs dans le métabolisme énergétique de divers organes. Les trois types de PPARs sont largement exprimés dans divers organes, notamment le foie, les tissus adipeux blanc et brun, le pancréas, le cœur, l'intestin, et les muscles squelettiques. Les différences de régulation de ces PPARs dans les différents tissus sont indiquées et le premier élément de chaque liste représente l'isoforme PPAR. Le cercle rempli représente PPAR α ; le cercle vide représente PPAR γ ; le triangle représente PPAR β/δ ; la flèche verte représente l'augmentation des voies ; la flèche rouge représente un effet inhibiteur. Dans le foie, PPAR α est le régulateur principal. Il augmente la cétogenèse et l'oxydation des acides gras tout en diminuant le stockage des lipides. PPAR γ augmente quant à lui le stockage des lipides et PPAR β/δ la lipogenèse de *novo* (Hong et al., 2019).

Au niveau hépatique, l'isoforme la plus exprimée est PPAR α . Des expériences sur des souris Ppara^{-/-} montrent que Ppara est crucial dans la régulation des gènes du catabolisme des lipides. La perte de son activité diminue l'expression des protéines acyl-CoA synthétases des acides gras à courte (Schad), longue (Lcad) et très longue chaîne (Vlcad). Les acyl-CoA synthétases catalysent la production d'acyl-CoA utilisé dans la β -oxydation, la baisse de leur expression provoque donc une diminution de l'oxydation des acides gras (Aoyama et al., 1998). L'activation de PPAR α induit également l'expression de CPT1A et PDK4, respectivement impliqués dans la β -oxydation et l'inhibition de la décarboxylation du pyruvate (Rakhshandehroo et al., 2009). Ainsi, PPAR α inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle TCA au profit des acétyl-CoA de la β -oxydation. Paradoxalement à son rôle dans l'activation de la β -oxydation, PPAR α est très important pour l'entrée et la synthèse des lipides dans les hépatocytes. Chez la souris, l'activation de Ppara par le clofibrate augmente également l'expression des gènes d'import des acides gras Fat/cd36 et Fatp (Motojima et al., 1998). De plus l'extinction de Ppara dans des souris provoque une accumulation de lipides dans le foie, une hyperglycémie et une hypothermie (Kersten et al., 1999). Enfin, dans la stéatose hépatique,

l'inhibition de la voie PPAR α par un ARN circulaire permet de reverser la stéatose (X.-Y. Guo et al., 2018).

Bien que moins exprimée dans le foie, on retrouve également l'isoforme PPAR γ . PPAR γ joue un rôle important dans l'inhibition des voies de synthèses et de sécrétions des acides gras. L'inhibition de Ppar γ , dans le foie de souris, réduit la stéatose hépatique et la sécrétion de triglycérides en association avec l'inhibition des gènes de la lipogenèse *de novo* et de la désaturation des acides gras comme *Fas*, *Acaca* et la stérol-CoA désaturase 1 (*Scd1*) (Gavrilova et al., 2003). Ces résultats sont corroborés aux expériences dans des souris *ob/ob* où la déficience en Ppar γ diminue les enzymes de la lipogenèse *de novo* et le contenu en triglycérides (Matsusue et al., 2003). De plus, on associe PPAR γ à la stéatose, car l'augmentation de son expression induit une accumulation de lipides. Chez la souris, l'activation de Ppar γ induit les gènes *Fat/cd36*, *Fabp4* et N-acétylglucosaminyltransférase (*Mgat1*) impliqués dans l'entrée, le transport et l'accumulation des lipides (Y. J. Lee et al., 2012). Dans des cellules Huh7, l'activation de PGC1 α , par du palmitate, induit l'expression de PPAR γ . La même étude démontre que Pgc1 α et Ppar γ sont fortement exprimés dans les foies stéatosés de souris, suggérant un effet sur la NAFLD (Maruyama et al., 2016). PPAR γ est aussi reconnu pour son action sur le métabolisme du glucose. Chez les diabétiques de type II, Kim et Ahn ont découvert un élément PPRE présent au niveau du promoteur des gènes de *GLUT2* et de la glucokinase du foie (*LGK*). Ils montrent également que PPAR γ active la transcription de ces gènes, démontrant son rôle dans le métabolisme glycolytique (Kim and Ahn, 2004; Kim et al., 2004). Dans des souris *Pten*^{-/-}, Panasyuk et son équipe montrent que Ppar γ se fixe au promoteur des gènes *Hk2* et *Pkm2* induisant une glycolyse accrue (Panasyuk et al., 2012). Enfin, Sikder et son équipe décrivent le rôle de Ppar γ dans l'activation de la β -oxydation et de la cétogenèse dans des souris nourries avec un régime riche en lipides. Ppar γ induit ces voies par une induction de l'expression des enzymes *Hmgcs2*, *Bdh1* et *Pdk4* (Sikder et al., 2018).

Les fonctions de PPAR β/δ dans le foie sont moins connues. Des expérimentations sur des foies de souris *Ppar β/δ* ^{-/-} montrent un rôle de PPAR β/δ dans la régulation du glucose et le métabolisme des lipoprotéines (Sanderson et al., 2009). Dans le modèle murin *db/db*, l'utilisation d'un agoniste de PPAR β/δ augmente la consommation de glucose, active la voie des PPP et promeut la synthèse des acides gras. De plus, une délétion du gène *Ppar β/δ* chez la souris provoque une intolérance au glucose (C.-H. Lee et al., 2006). Liu et son équipe montrent également que PPAR β/δ peut, conjointement avec son cofacteur PGC1 β , réguler la production

de glucose hépatique et protéger le foie de la lipotoxicité (Liu et al., 2011). L'utilisation de l'agoniste de Ppar β/δ , le GW501516, induit une β -oxydation des acides gras par son action sur l'axe Pgc1 α /Lipin1/Ppar α . De plus, Ppar β/δ augmente la synthèse du ligand endogène de Ppar α , le 16:0/18:1-phosphatidilcholine (Barroso et al., 2011).

E. PPARs et cancer

1. PPAR et CSC

Les fonctions des PPARs dans la prolifération et le cycle cellulaire ont rapidement mené à l'investigation de son rôle dans les CSC. L'isoforme PPAR γ est la plus décrite pour son rôle dans les cellules souches bien que des études démontrent également l'implication de PPAR β/δ (Ito et al., 2012) et de PPAR α (Pérez-Martín et al., 2016).

PPAR γ est notamment connu comme régulateur négatif de la voie WNT, voie retrouvée dans les processus des cellules souches (Katoh and Katoh, 2007). Une autre étude sur des ES de souris démontre l'implication de PPAR γ dans l'activation de la voie LIF décrite précédemment dans les cellules souches (Rajasingh and Bright, 2006). L'activation de PPAR γ est notamment décrite comme contribuant à l'arrêt de la différenciation et au maintien du phénotype souche dans les cellules souches hématopoïétiques et dans les cellules souches neurales (B. Guo et al., 2018; Wada et al., 2006). Dans les cellules épithéliales intestinales, l'activation de PPAR γ est comparée aux effets de TGF β et provoque une EMT des cellules par la voie ERK1/2 (Chen et al., 2006). En outre, l'utilisation d'agonistes de PPAR γ provoque l'arrêt de la croissance cellulaire, la diminution de la formation des sphères et l'apoptose de cellules souches de tumeur du cerveau (BTSC) (Chearwae and Bright, 2008). Cette étude est corroborée par d'autres travaux qui relèvent une régulation des marqueurs souches par l'activation de PPAR γ (Pestereva et al., 2012). Une étude intéressante sur des cellules de cancer colorectal traitées avec de l'acide linoléique (C18:2) conjugué ou non décrit que l'activation de PPAR γ provoque des effets différents à court et long terme. Dans l'activation à court terme, des effets anticancéreux sont observés alors qu'à long terme les cellules entrent dans un stade de quiescence proche des CSC (Kuniyasu, 2008). On peut faire le lien entre les conclusions de l'activation à long terme et les effets observés dans des cellules souches de cancer du sein qui sont traitées avec deux antagonistes de PPAR γ . Les antagonistes ont provoqué la diminution cellules souches en augmentant la production de ROS et en altérant le profil lipogénique et les gènes souches (X. Wang et al., 2013).

Ainsi, on observe que selon la localisation tissulaire, l'effet des PPAR et plus particulièrement de PPAR γ , conditionne le caractère souche des cellules. Une étude dans des cellules de CHC propose un double ciblage des PPARs et de la voie β -caténine dans le but d'éliminer les CSC hépatiques. Le ciblage des PPARs montre un effet bénéfique sur le traitement du CHC en combinaison du sorafénib (Galuppo et al., 2014).

2. PPAR et CHC

Dans la progression tumorale du CHC, la question du rôle des PPARs est complexe et sujette à débat. Xiao et ses collaborateurs en 2018 associent l'expression de PPAR α dans le cytoplasme à un bon pronostic du patient. La forte expression de PPAR α dans le cytoplasme est corrélée à une régression de la taille des tumeurs, de l'invasion vasculaire et d'involucrum. De même, une expression nucléaire de PPAR α est également associée à une meilleure survie du patient (Xiao et al., 2018). L'expression ectopique de PPAR α dans le CHC induit l'inhibition de la prolifération et l'apoptose des cellules via l'inhibition de la voie NF- κ B. Les souris *Ppara*^{-/-} sont ainsi plus susceptibles au CHC induit par le diéthylnitrosamine (DEN) (N. Zhang et al., 2014). Cependant, une autre étude sur des souris *Ppara*^{+/+} démontre que PPAR α est un acteur de l'hépatocarcinogénèse de CHC sur fond d'infection à l'hépatite C ce qui contraste les résultats précédents (Tanaka et al., 2008). Il peut également exister des effets sur le CHC qui sont dépendant du contexte nutritionnel du patient (Ruppert et al., 2019) et de la zonation de la tumeur (Berndt et al., 2019). De manière intéressante, il apparaît qu'un certain nombre d'études souligne le rôle de l'isoforme non majoritaire PPAR γ dans le CHC. Dans le même modèle de souris dont le CHC a été induit par du DEN, des expériences d'inactivation de PPAR γ augmentent la croissance tumorale, démontrant son rôle de gène suppresseur de tumeurs (Yu et al., 2010a). Le traitement à la troglitazone, agoniste de PPAR γ , provoque un arrêt de la croissance tumorale dans des lignées de CHC et une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (Yu et al., 2006). Ces résultats sont corroborés par Shen et ses collaborateurs qui mettent en évidence l'arrêt de la migration, de l'invasion et de la dissémination métastatique (Shen et al., 2012). L'induction de PPAR γ , suite au traitement du CHC à l'avicularin, provoque une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire, suggérant un effet antinéoplasique via l'isoforme γ (Wang et al., 2019). On constate cependant que comme PPAR α , le rôle de PPAR γ est ambigu. L'inhibition de l'axe HIF-1 α /PPAR γ /Pyruvate kinase 2 (PKM2) dans des cellules de CHC a permis de resensibiliser les cellules au sorafénib (Feng et al., 2020). De même, Patitucci et ses collaborateurs démontrent une relation entre Hnf1 α , Akt2 et Ppar γ dans les phénomènes de tumorigénèse et soulignent l'intérêt thérapeutique de cibler

PPAR γ dans le CHC (Patitucci et al., 2017). En outre, il a été démontré que l'utilisation d'ARN long non-codant dans le CHC augmente la progression tumorale avec promotion de la glycolyse aérobie par la surexpression de PPAR γ . Le lncRNA *FTX* interagit ainsi avec le promoteur de PPAR γ et augmente son expression (Li et al., 2018). Dans une cohorte de 584 CHC de patient chinois, les chercheurs de l'équipe de Zhang ont démontré que le polymorphisme de PPAR γ conditionne le risque du CHC. Ils indiquent que le polymorphisme « *PPARG* rs1801282 C>G » diminue le risque de CHC alors que le polymorphisme « *PPARG* rs3856806 C>T » est un facteur de risque de survenue de CHC (Sheng Zhang et al., 2018). Ainsi, dans certains contextes, PPAR γ favorise la progression tumorale dans le CHC. Les discordances rapportées dans la littérature sur l'effet des PPARs dans le CHC pourraient provenir de l'hétérogénéité de cette pathologie ou de l'absence d'informations sur l'isoforme étudiées dans certains travaux.

Contexte du projet et objectifs

Le cancer primitif du foie est le 6^e cancer le plus fréquent et le 2^e en ce qui concerne la mortalité par cancer. En 2020, 905.677 nouveaux cas et 830.180 décès ont été dénombrés dans le monde (Global Cancer Observatory, 2020). Parmi les cancers primitifs du foie, le CHC représente 75-85% des cas.

L'origine des CHC a longtemps été attribuée à des altérations génétiques subies par des hépatocytes différenciés (J.-S. Lee et al., 2006a). Cependant, les travaux de Holczbauer et al. (2013) ont démontré que toutes les cellules du lignage hépatique (hépatocytes, hépatoblastes et cellules souches/progénitrices) peuvent être impliquées dans l'émergence des CHC (Holczbauer et al., 2013). Des études transcriptomiques ont montré que les CHC les plus agressifs possèdent des marqueurs de CS/P, suggérant que des CSC contribuent à leur développement (J.-S. Lee et al., 2006a). D'autre part, la capacité des hépatocytes tumoraux à se rétrodifférencier en cellules CS/P, notamment sous l'influence de signaux inflammatoires (Cerec et al., 2007; Dubois Pot Schneider et al., 2014a; Holczbauer et al., 2013), contribue à réalimenter le contingent de CSC.

Ce projet s'intègre dans la recherche de nouvelles thérapies du cancer du foie en ciblant plus particulièrement les CSC. Ces cellules possèdent des propriétés similaires aux cellules souches incluant la résistance à l'apoptose, une forte activité télomérase, une activité d'efflux de drogues ou encore un état de quiescence. Il est désormais établi que les CSC sont impliquées dans de nombreux processus cancéreux et participent à la chimiorésistance et la récurrence tumorale (De Francesco et al., 2018).

Dans ce contexte, notre équipe cherche à comprendre les phénomènes de différenciation/rétrodifférenciation des cellules tumorales hépatiques afin d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques complémentaires aux chimiothérapies actuelles. Nous avons récemment établi à l'aide de modèles *in vitro*, notamment la lignée d'hépatome HepaRG, que le processus de rétrodifférenciation s'accompagne d'une reprogrammation métabolique et contribue à la chimiorésistance des CHC (Fekir et al., 2019). Nous avons notamment démontré l'implication des protéines « Pyruvate déshydrogénase kinase 4 » (PDK4) et « Angiopoietin like 4 » (ANGPTL4) dans la reprogrammation métabolique des CHC. L'ANGPTL4 module notamment l'expression de PDK4, une enzyme qui phosphoryle le complexe PDH, empêchant la décarboxylation du pyruvate dans la mitochondrie. Nous avons de plus montré qu'un inhibiteur de PDK4, le dichloroacétate (DCA), restaure la sensibilité de différentes lignées d'hépatomes (HepaRG, BC2, Huh7, HepG2) au cisplatine et au sorafénib.

Mon projet s'inscrit dans la continuité de ces travaux et vise à caractériser la reprogrammation métabolique en fonction de l'état de différenciation/rétrodifférenciation d'hépatocytes tumoraux, afin de mieux comprendre le lien entre métabolisme et chimiorésistance. Dans ce travail, j'ai utilisé des lignées cellulaires hépatiques HepaRG, BC2, HepG2, Huh-6 et Huh-7 qui ont une plasticité cellulaire différente. La multiplication des modèles vise à mieux représenter l'hétérogénéité des CHC. Elle prend notamment en compte les différentes mutations qui peuvent être impliquées dans le métabolisme (p53 et β -caténine). La lignée HepaRG reste le modèle privilégié de cette étude, car cette lignée possède la plus grande plasticité cellulaire. Elle paraît ainsi la plus pertinente pour mimer les processus différenciation/rétrodifférenciation qui interviennent notamment dans les CHC de mauvais pronostic.

Notre étude vise à :

- Caractériser le métabolisme des cellules de CHC en lien avec la plasticité cellulaire ;
- Identifier des modulateurs impliqués dans la reprogrammation métabolique ;
- Évaluer la pertinence de ces marqueurs comme cible thérapeutique.

Ce travail doit permettre de mieux comprendre l'influence des processus de différenciation/rétrodifférenciation dans l'hétérogénéité tumorale des CHC, incluant la composante métabolique. L'identification de molécules impliquées dans le métabolisme et/ou la plasticité cellulaire devrait permettre de définir des marqueurs d'intérêt clinique et contribuer au développement de thérapies ciblées adjuvantes aux chimiothérapies.

Modèles cellulaires

Les différentes lignées utilisées dans le projet proviennent de CHC (HepaRG, BC2 et Huh-7) et d'hépatoblastomes (Huh-6 et HepG2). Ces lignées cellulaires possèdent des mutations (p53 ou β -caténine) susceptibles de modifier le métabolisme cellulaire.

I. HepaRG

La lignée HepaRG a été isolée en 2002 à partir d'un CHC différencié de grade 1 selon la classification d'Edmondson et Steiner, consécutif à une infection au virus de l'hépatite C (Gripon et al., 2002). La tumeur présentait des caractéristiques de cirrhose macronodulaire avec des septaux épais et fibreux. Une prolifération de néoductules et de capillaires a été observée dans les zones fibrotiques. Les cellules HepaRG possèdent des structures ductulaires avec une expression de CK18 et CK19. Les structures hépatocytaires expriment quant à elles un marquage CK18. Les cellules HepaRG dérivent donc de structures ductulaires et non d'hépatocytes, de cellules d'hépatome ou encore du canal biliaire (Parent et al., 2004). À noter que les cellules HepaRG ne présentent pas de mutations *TP53* et *CTNNB1*, fréquentes dans les CHC.

Le caryotype de la lignée HepaRG montre une pseudodiploïde (Gripon et al., 2002). On note la présence d'une monosomie 12p constante, associée à une translocation impliquant les chromosomes 12 et 22, à l'origine d'un dérivé der(12,22). Une trisomie 7 est présente dans 70% des cellules, et une trisomie 2 dans 20% (Figure 39).

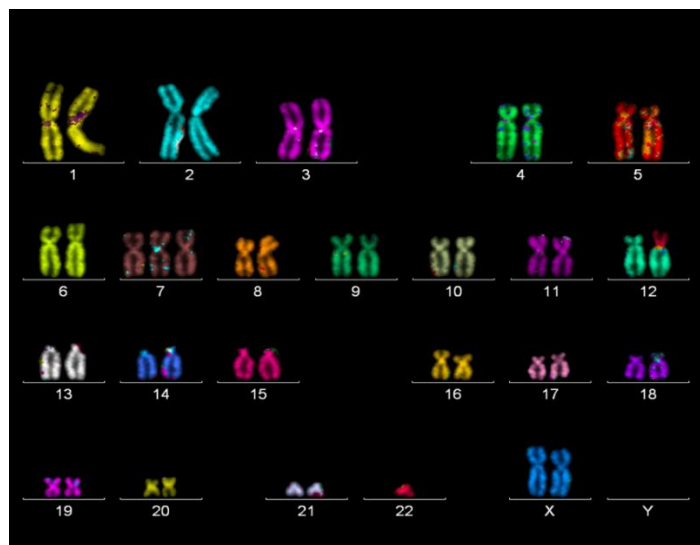


Figure 39 : Caryotype pseudo-diploïde de la lignée HepaRG. On note la présence d'une monosomie 12p constante, associée à une translocation impliquant les chromosomes 12 et 22, à l'origine d'un dérivé der(12,22). Une trisomie 7 ainsi qu'une trisomie 2 sont présentes dans certains cas (M-FISH)

Les cellules HepaRG sont mises en culture à une faible densité cellulaire ($2.7 \times 10^4/\text{cm}^2$) en présence d'insuline et d'hydrocortisone ce qui permet une prolifération active des cellules. Une fois les cellules à confluence, vers 15 jours de culture, la différenciation débute avec apparition de cellules « hépatocyte-like » et « cholangiocyte-like ». Pour potentialiser la différenciation, l'ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO) à hauteur de 2% est nécessaire. La différenciation se poursuit pendant 15 jours supplémentaires (Figure 40) (Cerec et al., 2007).

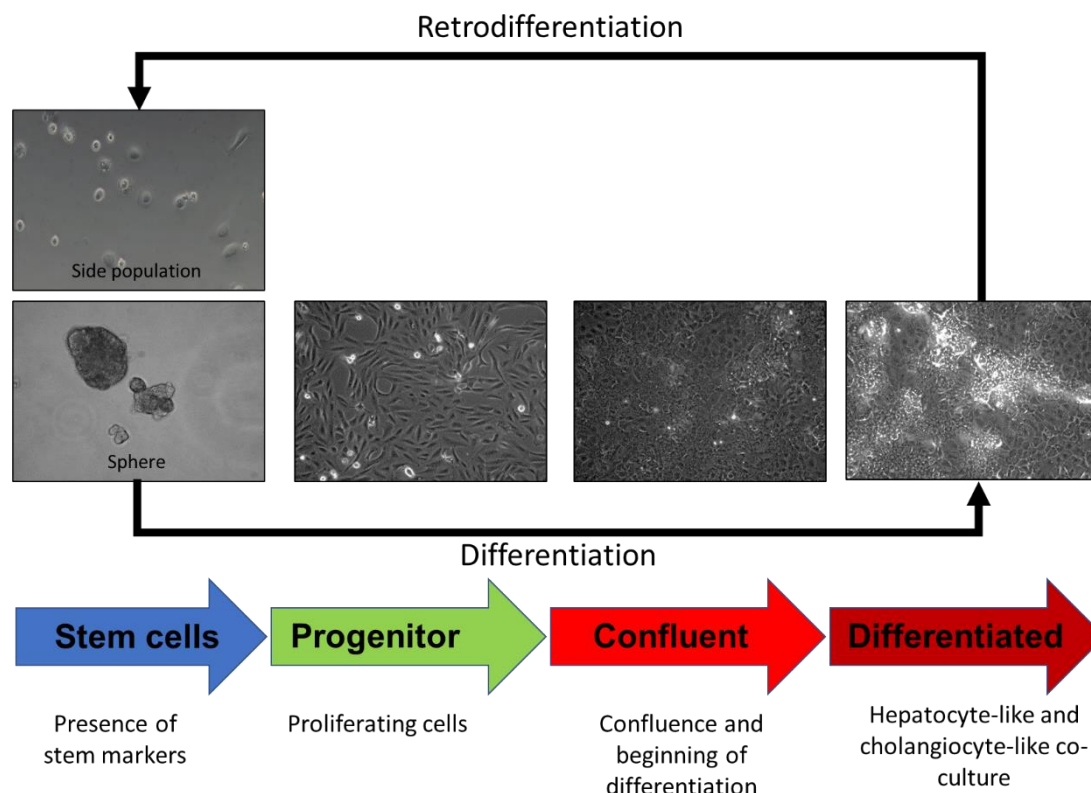


Figure 40 : Lignée cellulaire HepaRG au cours des processus de différenciation et rétrodifférenciation cellulaire. La side population (isolation après tri cellulaire) et les sphères (condition non adhérente) correspondent au stade souche de la lignée HepaRG. Au cours de la culture des cellules HepaRG, on distingue le stade progéniteur (J4) dit « bipotent » qui va, une fois arrivé à confluence (J15), se différencier en hépatocyte et cholangiocyte (J30).

Les cellules progénitrices bipotentes expriment des marqueurs de cellules ovales comme la molécule d'adhésion des cellules neurales (NCAM), ABCG2, CK18 et CK19 ainsi que des marqueurs de HSC CD34, CD90, FLT3, C-KIT, le récepteur à l'interleukine 3 α (IL-3R α) et LIF-R. Au cours de la différenciation, il y a perte de certains de ces marqueurs et une induction de marqueurs de cellules hépatocytaires et biliaires comme CK19 et CYP3A4. Les hépatocytes, proches morphologiquement des hépatocytes humains, expriment également des marqueurs hépatocytaires spécifiques comme des CYP450, des glutathion S-transférase (GST), de

l'albumine ou encore de l'aldolase B (Aninat et al., 2006; Cerec et al., 2007). En l'absence de quantité suffisante d'hépatocytes humains, le modèle HepaRG est intéressant pour les études *in vitro* de métabolisation hépatique des xénobiotiques (Guillouzo et al., 2007).

Les cellules HepaRG peuvent également réagir aux signaux du microenvironnement. Les cellules HepaRG différenciées peuvent se rétrodifférencier en cellules progénitrices sous l'influence de signaux pro-inflammatoires (TGF β , TNF α et IL-6) (Dubois Pot Schneider et al., 2014a). Récemment, nous avons démontré que les cellules HepaRG possèdent un pool de CSC qui contribue à leur résistance aux chimiothérapies (Fekir et al., 2019).

II. HBG-BC2

La lignée HBG-BC2, plus communément nommée BC2 (Figure 41), est une lignée cellulaire provenant d'un patient de 61 ans ayant développé une cirrhose alcoolique et une hépatomégalie. Les analyses histopathologiques ont démontré la présence d'un CHC siégeant dans le lobe droit. Les cellules BC2 possèdent une mutation H214R du gène *TP53* et S45A du gène *CTNNB1* (Cavard, communication personnelle). Les cellules possèdent également une pseudotriploïdie avec de nombreuses aberrations chromosomiques. On peut citer une polysomie du chromosome 7, une perte du chromosome Y, une trisomie 1p31-qter, une monosomie du chromosome 9 et deux délétions del(4) (p15-pter) et del(17) (p12-pter).

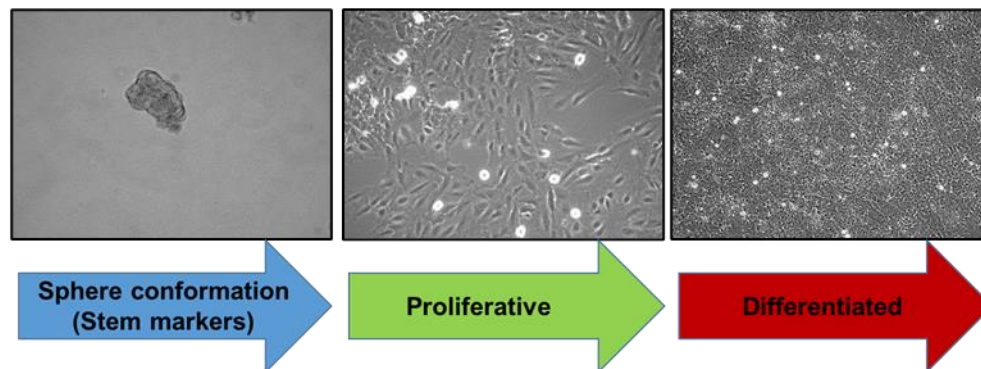


Figure 41 : Lignée cellulaire HBG-BC2. La lignée cellulaire BC2 se caractérise par trois stades que sont les sphères (condition non adhérente), les cellules prolifératives (J4) et les cellules différenciées (J15 après confluence).

L'intérêt de cette lignée réside également dans sa capacité à passer d'un état prolifératif à un état différencié. Après 2 semaines de culture, on observe des changements morphologiques parmi lesquels l'acquisition d'un noyau rond, d'un ou deux nucléoles denses et d'un cytoplasme dense. D'un point de vue moléculaire, la différenciation s'accompagne d'une augmentation des

ARN de l'albumine (*ALB*) et de *PKL* (Glaise et al., 1998). Cette lignée est décrite comme un modèle intéressant pour des études de toxicité (Fabre et al., 2003)

III. Huh-7

La lignée Huh-7 constitue la 3^e lignée de CHC que nous avons utilisée (Figure 42). Elle provient d'un patient japonais de 57 ans ayant développé un CHC bien différencié. Au niveau chromosomique, cette lignée comporte entre 50 et 63 chromosomes. Le caryotype montre de multiples anomalies chromosomiques sur tous les chromosomes, excepté le chromosome 21. L'analyse par hybridation in situ en fluorescence multiplexe (M-FISH) révèle 32 anomalies consistant en des trisomies, la perte du Y, six pertes ou gains intrachromosomiques partiels et 24 réarrangements intrachromosomiques (Kasai et al., 2018). La lignée Huh-7 possède une mutation du gène *TP53* à l'origine d'une substitution de l'acide aminé en position 220 (Y220C) (Hsu et al., 1993; Nakabayashi et al., 1982; Cavard, communication personnelle).

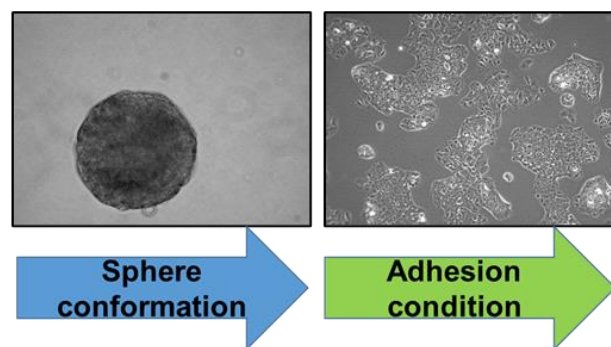


Figure 42: Lignée cellulaire Huh-7. Les cellules Huh-7 se caractérisent par les conditions sphère (non adhérente) et proliférative (J4).

Huh-7 est capable de produire des protéines plasmatiques comme l'albumine, la fibronectine ou les lipoprotéines. Elle possède également une activité de métabolisation des carbohydrates, avec une activité élevée de HK2 et une plus faible activité de la glucose-6-phosphatase (G6P) et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) comparée à la tumeur d'origine (Nakabayashi et al., 1982).

IV. Huh-6

Huh-6 provient d'un patient japonais de 1 an. Contrairement à Huh-7, cette lignée clonée correspond à des cellules épithéliales d'hépatoblastome (Figure 43). Elle produit de l'AFP et de l'albumine (Doi, 1976). Huh-6 possède de 82 à 86 chromosomes avec présence de trisomies et de quadrisomies (Waldherr et al., 2018). Huh-6 possède une mutation activatrice G34V du

gène codant la β -caténine menant à l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme et le noyau (Coste et al., 1998), mais pas de mutation *TP53* (Hsu et al., 1993).

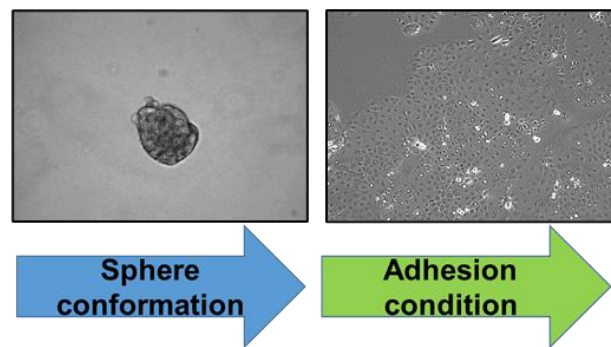


Figure 43 : Lignée cellulaire Huh-6. Les cellules Huh-6 se caractérisent par les conditions sphère (non adhérente) et proliférative (J4).

V. HepG2

La lignée HepG2 est probablement la lignée d'hépatome la plus connue (Figure 44). Elle provient d'un patient caucasien argentin de 15 ans souffrant d'un CHC (Aden et al., 1979). Le caryotype d'HepG2 montre de 52 à 78 chromosomes avec de nombreuses anomalies comme des gains sur les chromosomes 2, 14 et 20, des délétions et des réarrangements chromosomiques (Wong, 2000). Elle est capable de produire de nombreuses protéines plasmatiques comme l'AFP, l'albumine, le fibrinogène ou le plasminogène (Knowles et al., 1980). Tout comme Huh-6, la lignée HepG2 ne possède pas de mutation du gène *TP53*, mais est mutée *CTNNB1* et *N-RAS* (Coste et al., 1998; Hsu et al., 1993). Plus récemment, HepG2 a été reclassifiée en lignée cellulaire d'hépatoblastome en raison de son histologie et de son profil génétique proche des hépatoblastomes (López-Terrada et al., 2009).

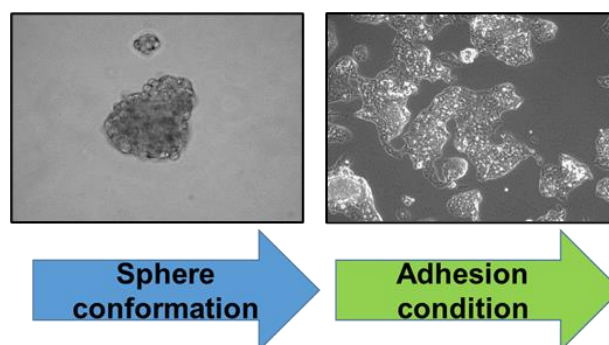


Figure 44 : Lignée cellulaire HepG2. Les cellules HepG2 se caractérisent par les conditions sphère (non adhérente) et proliférative (J4).

VI. La side population

Au cours d'expérimentations visant à ségréguer les HSC proliférantes des HSC quiescentes, Goodell et ses collaborateurs ont mis en évidence une sous-population de cellules se situant en phase G0-G1 ou en S-G2M du cycle cellulaire. Cette sous-population cellulaire exprime des marqueurs souches, possède la capacité de reconstituer le pool de HSC après irradiation, ainsi qu'une forte capacité d'efflux. Cette capacité d'efflux peut être mise à profit pour identifier et trier ces cellules en cytométrie en flux.

Le principe est le suivant : on bloque les transporteurs membranaires par du vérapamil, empêchant ainsi l'efflux du Hoechst 33342. La fluorescence émise par les cellules permet de définir une fenêtre dans laquelle se situeraient des cellules non incubées en présence de vérapamil et capables d'effluer la quasi-totalité du Hoechst 33342 (Figure 45). Du fait de sa position atypique sur les cytogrammes, cette population a été nommée « Side population » (SP) (Goodell et al., 1996).

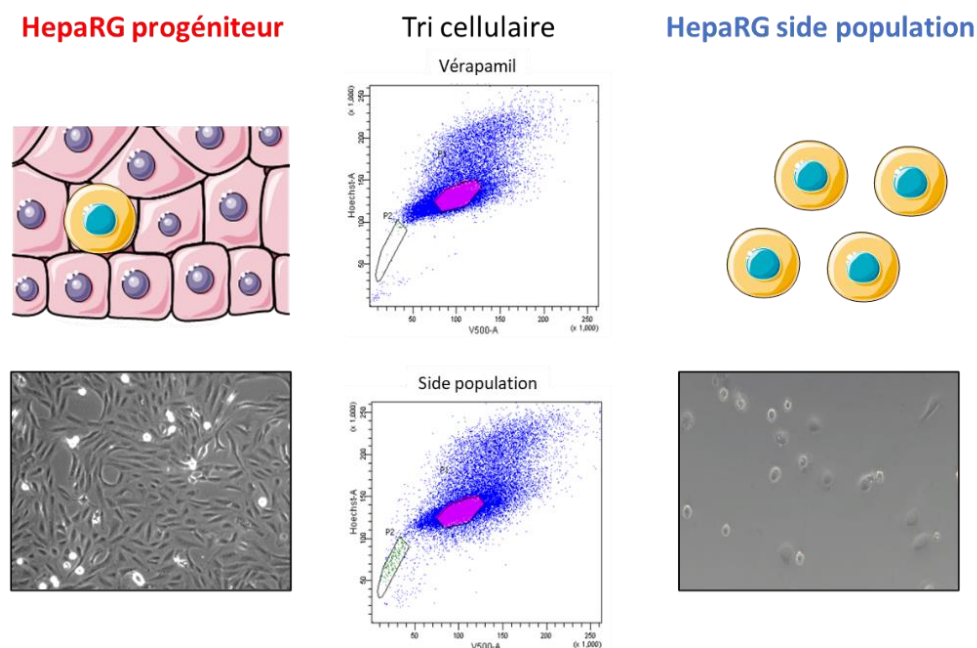


Figure 45 : Tri de la side population (SP) de la lignée cellulaire HepaRG. Les cellules SP sont triées à partir du stade progéniteur de la lignée HepaRG. Le tri des SP utilise les capacités d'efflux du Hoechst 33342 des cellules souches. Dans la cytogramme du trieur en haut de l'image, on bloque les transporteurs membranaires par du vérapamil, empêchant ainsi l'efflux du Hoechst 33342. La fluorescence émise par les cellules permet de définir une fenêtre dans laquelle se situeraient les SP non incubées en présence de vérapamil et capables d'effluer le Hoechst 33342. On distingue sur le cytogramme du bas, un faible nombre de cellules (en rouge) dans la fenêtre correspond aux SP.

Les cellules SP ont été décrites dans de nombreux tissus comme le foie, les reins, le cœur ou encore les muscles. Les SP seraient déjà engagées dans un lignage spécifique après migration de la moelle osseuse vers le tissu cible. La quantité de cellules SP chez l'Homme varie de 0.05% à 3% selon les tissus (Challen and Little, 2006). Dans notre étude sur les CSC hépatiques, nous avons déterminé que les cellules SP représentent respectivement 0.6% des cellules HepaRG, 0.04% pour HepG2 et 0.01% pour Huh-7. Ces cellules présentent des propriétés et une signature souche et sont associées à un mauvais pronostic chez le patient ayant un CHC (Fekir et al., 2019). Dans le cadre de notre projet sur la caractérisation du métabolisme au cours des processus de différenciation/rétrodifférenciation, nous nous sommes intéressés à l'étude des cellules HepaRG-SP.

Résultat

**Metabolic reprogramming, stemness
and chemoresistance in HCC:
Involvement of the PPAR γ /PDK4 axis**

Introduction :

La reprogrammation métabolique est attestée dans de nombreux cancers. Elle est souvent associée à une plasticité cellulaire rendant les stratégies thérapeutiques conventionnelles inefficaces. Ces phénomènes existent dans le CHC et participent à l'hétérogénéité tumorale. Notre équipe a récemment établi, à l'aide de modèles *in vitro*, que le processus de rétrodifférenciation s'accompagne d'une reprogrammation métabolique et génère une chimiorésistance. Nous avons notamment mis en évidence la surexpression de la « Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 » (PDK4) et de l'« Angiopoietin Like 4 » (ANGPTL4), dans les CSC hépatiques. L'ANGPTL4 est impliquée dans la tumorigenèse, l'angiogenèse ainsi que le potentiel invasif. Nous avons démontré que l'ANGPTL4 module l'expression de PDK4, une enzyme qui phosphoryle la pyruvate déshydrogénase empêchant ainsi la décarboxylation du pyruvate, étape importante dans son passage dans le cycle TCA et la chaîne respiratoire. L'utilisation du dichloroacétate, un inhibiteur de PDK4, a permis de sensibiliser les cellules souches d'hépatomes au cisplatine et au sorafénib. Notre hypothèse est que les cellules opéreraient, au cours de la dédifférenciation en CSC, un shift du métabolisme mitochondrial vers une glycolyse par production de lactate. Ce shift métabolique associé à la rétrodifférenciation des cellules cancéreuses agit comme un mécanisme de défense contre les effets délétères des chimiothérapies sur le métabolisme mitochondrial. Ainsi, après l'arrêt des traitements, les CSC se différencient en cellules cancéreuses et reconstituent la tumeur. Il apparaît alors prometteur de cibler des marqueurs impliqués dans le métabolisme afin de sensibiliser les CSC aux chimiothérapies, mais également prévenir les processus de différenciation/ rétrodifférenciation.

Notre intérêt s'est porté sur la famille de récepteurs nucléaires PPAR, précédemment retrouvée comme surexprimée dans les CSC en analyse transcriptomique. Nous avons montré que la famille PPAR et notamment les isoformes PPAR γ et PPAR α contribuent à l'homéostasie métabolique et la différenciation cellulaire dans les lignées cellulaires de CHC.

Les objectifs que nous avons fixés lors de ce projet sont les suivants : (i) caractériser le métabolisme au cours des phénomènes de différenciation et de rétrodifférenciation des cellules hépatiques (ii) cibler les isoformes de la famille PPAR, plus spécifiquement PPAR α et γ , afin d'éradiquer les cellules tumorales.

Résultats :

Mes travaux ont permis de montrer que les cellules hépatiques tumorales possèdent un métabolisme distinct selon leur état de différenciation. Les CSC ont un métabolisme glycolytique, caractérisé par une production accrue de lactate et une diminution des voies métaboliques associées aux mitochondries. Le processus de différenciation provoque une augmentation de l'expression du coactivateur de la biogenèse mitochondriale PGC1 α et une augmentation de la masse mitochondriale. Il s'accompagne également d'une modification de l'organisation du réseau mitochondrial. Le nombre de branchements est augmenté, permettant d'optimiser la production d'énergie. Les cellules acquièrent progressivement, durant la différenciation cellulaire, un phénotype OXPHOS-dépendant avec augmentation des différentes voies métaboliques associées à la mitochondrie comme la β -oxydation des acides gras, la lipogénèse *de novo*, l'élongation des acides gras, la glutaminolyse et l'OXPHOS. De manière intéressante, la quantification des lipides au moyen du Nile red et de la spectrométrie de masse montrent une accumulation d'acides gras dans les CSC. Compte-tenu de la faible lipogénèse *de novo* et de la forte expression du transporteur membranaire d'acides gras FAT/CD36, cette accumulation résulte d'une augmentation de l'entrée des acides gras dans la cellule. Ces acides gras ne sont pas adressés aux mitochondries, mais mis en réserve dans des gouttelettes lipidiques pour une utilisation ultérieurement, quand les besoins énergétiques de la cellule ne seront plus couverts. Les analyses transcriptomiques réalisées sur les cellules HepaRG nous ont permis d'identifier les membres de la famille PPAR comme des régulateurs importants de la différenciation/rétrodifférenciation et de leur reprogrammation métabolique. L'analyse de cohortes de patients atteints de CHC montre que PPAR α et PPAR γ sont respectivement associés à un bon et à un mauvais pronostic. PPAR γ est davantage exprimé dans les CHC avec une signature « souche » tandis que PPAR α est retrouvé dans les CHC de signature « périportale/périveineux ». Dans nos études *in vitro*, nous constatons également une surexpression de PPAR γ dans les CSC des lignées cellulaires HepaRG et BC2. Au cours la différenciation cellulaire, l'expression de PPAR γ diminue tandis que celle de PPAR α augmente. En plus de son rôle dans la différenciation cellulaire, cette balance d'expression des PPAR modifie le métabolisme des cellules. Il existe donc une balance d'expression entre les deux isoformes dans les modèles de CHC possédant une forte plasticité associée à une reprogrammation métabolique. Nous montrons que l'activation de PPAR γ par la rosiglitazone favorise la rétrodifférenciation en augmentant les marqueurs associés aux cellules souches et à

l'EMT et en diminuant la prolifération cellulaire. L'activation de PPAR γ diminue également la longueur et le branchement du réseau mitochondrial résultant en une baisse de la respiration mitochondriale. Au contraire, l'inhibition de PPAR γ provoque une augmentation de la longueur et du branchement du réseau mitochondrial, de la respiration basale et de la fuite de proton. Ainsi, l'inhibition de PPAR γ réactive les mitochondries qui produisent une forte quantité de ROS provoquant une apoptose des cellules. Nous démontrons également que l'activation de PPAR α par le clofibrate en combinaison avec du DCA provoque une baisse importante de la viabilité des CSC. Ainsi, nos résultats donnent de premiers arguments sur l'intérêt du ciblage de PPAR γ et PPAR α . Pour le traitement des CHC en complément des chimiothérapies.

Manuscrit en préparation : « **Metabolic reprogramming, stemness and chemoresistance in HCC: Involvement of the PPAR γ /PDK4 axis** »

Metabolic reprogramming, stemness and chemoresistance in HCC: Involvement of the PPARG/PDK4 axis

Yoann Daniel¹, Claudine Rauch¹, Karim Fekir^{1,2}, Luis Cano¹, Lise Desquilles¹, Daniel Catheline¹, Agnès Burel³, Camille Savary¹, Claude Bendavid^{1,4}, Bruno Clément¹, Vincent Rioux¹, Orlando Musso¹, Bernard Fromenty¹, Florian Cabillic^{1,4*} and Anne Corlu^{1*}

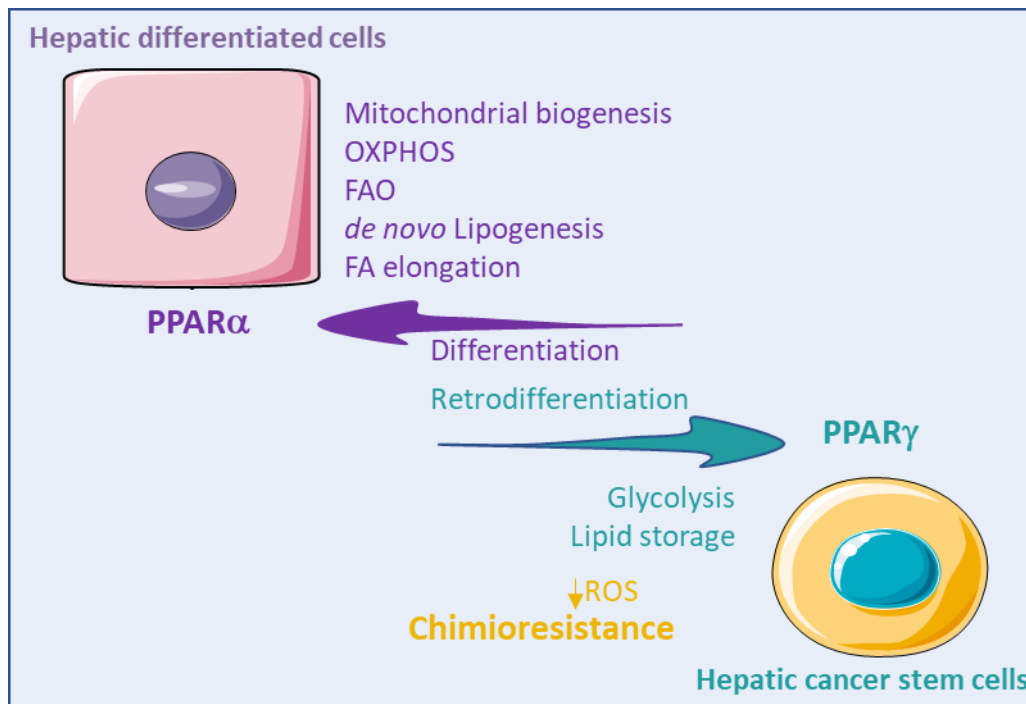
1 Inserm, University of Rennes, INRAE, NuMeCan Institute (Nutrition, metabolisms and cancer), Rennes, France

2 Division of trauma and orthopaedic surgery, University of Cambridge, Addenbrooke's hospital, Hills road, Cambridge CB2 0QQ, UK

3 MRic-TEM platform, UMS CNRS 3480 - INSERM 018, Rennes, France

4 CHU of Rennes, Pontchaillou site, Rennes, France

* co-last authors



Retrodifferentiation of tumor hepatocytes induces a decrease in FAO, OXPPOS and lipogenesis

Liver CSC are characterized by glycolysis and excessive fatty acids storage

PPAR γ /PPAR α balance determines the metabolic shift and outcome of HCC patients.

Targeting PPARG improves OXPPOS and restored sensitivity to chemotherapy in liver CSC

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) represents a major health challenge. Phenotypic and functional heterogeneity, one of the most relevant features of liver cancer cells, hampers identification of effective therapeutic strategies. Tumor cells have high plasticity potential and can acquire cancer stem cells (CSC) features leading to metabolic reprogramming, metastatic dissemination and chemoresistance. The interplay between tumor cell plasticity and metabolic reprogramming needs to be further investigated. Here, we showed that metabolic reprogramming in hepatic cancer stem cells (CSCs) is associated with decreased mitochondrial biogenesis and respiration, reduced de novo lipogenesis and fatty acid oxidation while glycolysis and lipid uptake and storage are enhanced. The gene signature of this metabolic profile is correlated with the stem HCC subclass and inversely correlated to periportal and perivenous HCC subclasses. We highlighted a balanced expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma and alpha throughout the differentiation/retrodifferentiation process of hepatic tumor cells. PPAR γ is expressed in hepatic CSCs and associated with poor prognosis in three HCC cohorts whereas PPAR α , whose expression increases during cell differentiation, is a good prognostic factor. High expression of PPAR γ and its target gene pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), which plays a pivotal role in metabolism flexibility, contribute to metabolic and phenotypic changes in HCC. Therefore, PPAR γ silencing or PDK4 inhibition induces reactivation of mitochondrial biogenesis and respiration, increasing the production of reactive oxygen species that sensitizes hepatic CSC to chemotherapy. Altogether, the results show the pro-tumoral role of PPAR γ /PDK4 axis as a regulator of the liver cell plasticity associated to metabolic reprogramming and chemoresistance.

INTRODUCTION

Over the past two decades, large-scale genome sequencing studies have helped decipher the heterogeneity of hepatocellular carcinoma (HCC) and have led to the proposal of various molecular classifications of HCC (Boyault et al., 2007; Chiang et al., 2008; Hoshida et al., 2009; Lee et al., 2006). HCC with stem/progenitor cell phenotypic features constitute a subclass of therapeutically challenging cancers that are associated with a particularly poor prognosis (Thorgeirsson, 2017). Importantly, any cell in the liver/hepatic lineage can be retrodifferentiated into cancer stem cells (CSCs) and this high plasticity potential contributes to both intra- and inter-tumoral heterogeneity of HCC (Schneller and Angel, 2019; Thorgeirsson, 2017). This makes it difficult to eradicate the whole tumor with single-agent therapy and standard chemotherapies that do not address quiescent or slow-proliferating CSCs (Turdo et al., 2019).

The tumor microenvironment may cause tumor cells to retrodifferentiate into CSCs (Cabillic and Corlu, 2016; Dubois Pot Schneider et al., 2014) and recently, it has become clear that this phenotypic conversion was accompanied by metabolic changes (De Francesco et al., 2018). Consistent with these observations, two recent classifications integrate cell metabolism as a discriminant parameter among HCC. Désert et al. proposed four HCC subclasses distributed according to a cellular differentiation axis and an orthogonal metabolic axis that follows the periportal to perivenous zonation of the liver (Désert et al., 2017). As well, on the basis of the expression profiles of metabolic genes, Yang et al. identified three HCC subclasses with low, intermediated and high metabolic activity, resulting in distinct prognosis for the patients (Yang et al., 2020). The low and intermediate metabolic subclasses have worst prognosis and match with the poorly differentiated S1 and S2 subclasses of Hoshida and the ECM/STEM subclasses of Désert (Désert et al., 2017; Hoshida et al., 2009; Yang et al., 2020). Finally, β -catenin-activated HCC has recently been proven addicted to fatty acids (Senni et al., 2019) whereas

others are glucose- or glutamine-dependent (Cabillic and Corlu, 2016; Dubois Pot Schneider et al., 2014). Therefore, identifying and targeting cancer-specific metabolism appears to be a promising strategy for improving HCC therapy. Several works focus on the metabolic characteristic of tumor cells and CSCs, but few deals with metabolic reprogramming associated with tumor cell plasticity.

Interplays between metabolism reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) are beginning to be deciphered. Although, it is not easy to formally determine which one governs the other, the metabostemness theory proposes that metabolism rewiring triggers EMT and acquisition of stemness traits (Menendez et al., 2014). In a previous work, we reported that an upregulated expression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), which prevents the glycolytic end-product pyruvate from feeding the tricarboxylic acid (TCA) cycle, is associated with the expression of stem cell markers in human HCC and that the PDK4 inhibitor dichloroacetate (DCA) improves the efficacy of chemotherapies against hepatic CSCs (Fekir et al., 2019). Our transcriptomic analyses also revealed that immature hepatic tumor cells have an increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), known as a positive regulator of PDK4. PPARs are nuclear receptors and transcriptional modulators. PPAR γ is a master regulator of adipocyte differentiation through the control of lipid uptake, synthesis and storage as well as glucose uptake (Hong et al., 2019; Rosen et al., 1999). Expression of PPAR γ is uncommon in the liver, but in some pathophysiological conditions, it mediates anti-inflammatory and anti-fibrotic functions, and maintains lipid/glucose homeostasis and insulin sensitivity (Mello et al., 2016). PPAR α is the predominant isoform in the liver, where it plays a crucial role in the maintenance of energy balance. PPAR α is mainly proposed as a positive prognosis marker for HCC (Xiao et al., 2018), whereas the role of PPAR γ in HCC outcome remains unclear. PPAR γ was shown to inhibit HCC metastases *in vitro* and in mice (Shen et al., 2012; To et al., 2020; Yu et al., 2010, 2006) but, two groups reported pro-

tumorigenic effects (Li et al., 2018; Patitucci et al., 2017a). In this context, we sought to characterize the metabolic reprogramming that takes place during the differentiation/retrodifferentiation of tumor hepatocytes and specify the role of PPAR γ in the metabolic adaptation of HCC. Using the HepaRG and HBG-BC2 cell lines, both characterized by high plasticity potential (Cerec et al., 2007; Dubois Pot Schneider et al., 2014; Fekir et al., 2019; Glaise et al., 1998), we show that hepatic CSCs have reduced mitochondrial biogenesis and cell respiration. At the same time, they adopt a glycolytic profile and store lipids into droplets until they leave their slow-proliferating state and commit to a differentiation program. Interestingly, we highlight a balanced expression of PPAR α and PPAR γ along the differentiation/retrodifferentiation process. We also find a role not yet revealed of PPAR γ in hepatic tumor cell retrodifferentiation and CSC chemoresistance. Consistent with this role, we provide evidence that PPAR γ expression is correlated with a poor prognosis in three independent HCC cohorts. Furthermore PPAR γ inhibition synergizes with standard chemotherapies by limiting PDK4 expression and reactivating the mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS).

RESULTS

Retrodifferentiation of HepaRG cells alters both the expression of mitochondria-related genes and the mitochondrial network

To characterize phenotypical and functional changes in mitochondria during the differentiation/retrodifferentiation process, we used the HepaRG cell line (Cerec et al., 2007; Dubois-Pot-Schneider et al., 2014). Retrodifferentiated stem cells i.e. Sphere-forming cells (sphere) and side population (SP), which display gene expression signatures matching with aggressive HCC subclasses (Fekir et al., 2019), were referred as immature cells. They were compared with a group of differentiating cells: progenitor (D4), committed/confluent (D15) and

differentiated (D30) HepaRG cells (Fig. S1A). We identified 6115 differentially expressed genes (DEG) between the two groups (one-way ANOVA test, fold change > 1.5, $p < 0.05$) (Table S1). Unsupervised gene set enrichment analysis (GSEA) revealed that signature related to immature HepaRG cells was negatively correlated with oxidative phosphorylation (OXPHOS), TCA cycle and pyruvate metabolism (Fig. S1B). Accordingly, supervised GSEA showed a negative correlation with the Mitocarta gene list, which includes a compendium of 1136 human genes encoding proteins localized in the mitochondria (Fig. 1A). These mitochondria-related genes account for 7.7% of the DEG (Table S2). Specifically, 160 Mitocarta genes were up-regulated in immature HepaRG cells (Fig. 1A) while 311 genes, involved in the top three pathways (TCA cycle, mitochondrial respiratory chain and ATP synthesis), were downregulated (Fig. 1B). Next, we integrated the 471 Mitocarta DEG with the 550 genes that define the four HCC subclasses (perivenous, periportal, extracellular matrix, stem) described by Désert et al. (Désert et al., 2017). We showed that the genes downregulated in immature HepaRG cells were also downregulated in the stem subclass while expressed in the periportal and perivenous subclasses (Fig. 1C). This prompted us to study the consequences of transcriptional changes on mitochondria number and network organization. Electron microscopy confirmed a reduced number of mitochondria in immature HepaRG cells compared with differentiated cells (Fig. 1D). This result was supported by both the quantification of mitochondrial DNA content and mitochondrial mass (Fig. 1E). Accordingly, the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), a master regulator of mitochondrial biogenesis, was low in immature HepaRG cells and gradually increased during proliferation/commitment of HepaRG cells (Fig. 1E). In addition, confocal microscopy analyses revealed that immature HepaRG harbored a mitochondrial network with significantly less branch points (Fig. 2A).

Immature HepaRG cells rewire their metabolism and slow down their proliferation rate

A mitochondrial network with high-branched morphology is thought to improve functional cooperation between mitochondria, resulting in increased OXPHOS efficiency and energy supply (Rossignol et al., 2004). This prompted us to study the metabolism of HepaRG cells during the differentiation/retrodifferentiation process. Immature HepaRG cells adopted a glycolytic profile with both high glycolysis level (Fig. 2B) and increased lactate production (Fig. 2C). Conversely, a lower mitochondrial respiration was observed in immature compared with differentiated HepaRG cells (Fig. 2B). Moreover, fatty acid oxidation (FAO) (Fig. 2C) and glutaminolysis (Fig. S1C) were low in immature HepaRG cells. In keeping with the reduced FAO, low β -hydroxybutyrate levels (Fig. 2C) suggested a decrease of ketogenesis. In addition, accumulation of neutral lipids was observed in sphere (Fig. 2C) and in SP (Fekir et al., 2019). HepaRG cells. This accumulation probably resulted from increased FA uptake through increased expression of the FA transporter FAT/CD36 rather than from *de novo* lipogenesis, which is very low in immature HepaRG cells (Fig. 2C). It should be noted that HepaRG-sphere and -SP, although both immature cells, displayed some specific metabolic features. Notably, mitochondrial respiration and FAO were higher in HepaRG-SP. These differences are likely to be related to the resting state or cell cycle rate of the cells. Indeed, HepaRG-sphere expressed high levels of early G1 and G1 phase markers (JUN, CDKN1A, CDK4, and CCND1) but not the S and M phase markers CDK1 and CCNB1, showing that they are stalled in G1 (Fig. S1D). HepaRG-SP expressed high levels of early G1 and G1 phase markers (JUN, FOS, CDK4, CDKN1B) but also intermediate levels of CDK1 and CCNB1, disclosing a slow-cycling phenotype. As expected, progenitors are active proliferating cells, expressing high levels of S and M phase markers whereas confluent and differentiated HepaRG cells barely expressed these markers (Fig. S1D).

HCC cell lines adopt distinct metabolisms according to their plasticity potential and proliferation rate

We completed our study by exploring metabolism of other HCC cell lines (Fig. S2A). Like HepaRG, HBG-BC2 (hereafter referred to as BC2) showed strong potential for plasticity and differentiation, as evidenced by the inverse expression profile of stemness (CD44) and differentiation (aldolase B) markers in spheres and 15-day-old confluent cells (Fig. 3A). Noteworthy, both HepaRG and BC2 immature cells formed small spheres (Fig. S2A). They had a low PGC1 α expression (Fig. S2B) and adopted a similar metabolism i.e., a glycolytic profile with high lactate production, low mitochondrial respiration and *de novo* lipogenesis, lipid droplet accumulation and higher CD36 expression than their differentiated counterparts (Fig. 3B-C). Of note, FAO and β -hydroxybutyrate levels were very low even in differentiated BC2 cells compared to differentiated HepaRG cells. Consistent with the high expression of FAT/CD36 and lipid accumulation in HepaRG and BC2 spheres, analysis of lipid content showed higher amounts of free FAs, triglycerides and cholesterol esters (Fig. 3D). In addition, HepaRG and BC2 spheres were characterized by higher saturated/unsaturated FA ratio and phospholipid content compared with differentiated cells (Fig. 3D). In contrast to HepaRG and BC2, three other cell lines, Huh6, Huh7 and HepG2, had reduced plasticity and formed spheres that contained proliferative rather than immature cells (Fig. 3A). Mitochondrial respiration was high in spheres derived from Huh6, Huh7 and HepG2 cell lines, whereas adherent cells mainly relied on glycolysis. In addition, only slight changes in FAO, FAT/CD36 expression and neutral lipid accumulation were apparent when comparing spheres and adherent proliferative Huh6, Huh7 and HepG2 cells (Fig. 3B-C).

PPAR γ favors stemness in hepatic tumor cells by rewiring their metabolism

Changes in lipid metabolism and up-regulated transcription of *PPARG* (Fekir et al., 2019) in immature HepaRG prompted us to further investigate the role of PPAR family members, known as key regulators of cell metabolism. Expression of *PPARG* was high in immature HepaRG and BC2 cells. It decreased throughout the differentiation process, whereas *PPARA* expression went the opposite way and *PPARD* was fairly stable (Fig. 4A). Interestingly, Kaplan-Meier survival analyses for Roessler (Fig. 4B), ICGC and TCGA (Fig. S2C-D) cohorts revealed that patients with high *PPARG* expression had worse overall survival than patients with low *PPARG* expression. In contrast, *PPARA* was associated with better prognosis in ICGC and TCGA cohorts. Moreover, *PPARG* and *PPARA* were positively and negatively correlated, respectively with alpha-fetoprotein (AFP), a commonly used marker of aggressiveness in HCC, both in Roessler and TCGA cohorts (Fig. 4C, Fig. S2E). In addition, we showed that high *PPARG* expression matched with the poor outcome stem subclass of the metabolic/differentiation-based classification proposed by Désert et al., whereas high *PPARA* expression was found in perivenous and periportal subclasses, known to have better prognosis (Fig. 4D). Importantly, immunohistochemistry analysis of undifferentiated HCC revealed nuclear localization of *PPAR γ* in scattered cells and in nodules within fibrous nest (Fig. 4E).

To get more insight into the role of *PPAR γ* in HCC metabolism, we carried out silencing experiments or agonist treatments using HepaRG and BC2 spheres, which highly express *PPARG*. Inhibiting *PPARG* expression by siRNA transfection drastically reduced the sphere number and caused significant cell death (Fig. 5A) whereas treatment with the *PPAR γ* agonist rosiglitazone induced little changes in cell viability (Fig. 5B). Furthermore, we used proliferative HepaRG progenitors and BC2 cells that still express *PPARG* at significant levels. Treatment with rosiglitazone slowed down cell proliferation, thus leading to empty areas in the culture plates and reduced ATP levels unrelated to apoptosis induction (Fig. 5C-E). Treatment also increased the expression of known *PPAR γ* target genes such as *PDK4*, *FAT/CD36* and

perilipin2 (PLIN2), which contributes to the formation and stability of lipid droplets (Fig. 6A). Interestingly, rosiglitazone treatment resulted in a decreased expression of the epithelial marker E-cadherin associated with increased expression of the transcription factor SNAIL and the stem cell marker KLF4, suggesting that cells committed to EMT and stemness (Fig. 6A). Consistent with rosiglitazone-induced retrodifferentiation, cells had a less extensive and branched mitochondrial network (Fig. 6B, Fig. S3A) as well as lower mitochondrial respiration (Fig. 6C). Conversely, attenuation of PPARG expression by siRNA (Fig. 7A, Fig. S3B) induced a decreased expression of PDK4 and PLIN2 (Fig. 7A). This decrease was associated with increased respiratory capacities and proton leak reflecting suboptimal efficacy of the respiratory chain (Fig. 7B). In addition, PPARG-invalidated cells contained an increased level of mitochondrial DNA and exhibited extensive and high-branched mitochondrial network (Fig. 6B, Fig. S3A).

PPAR targeting improves efficacy of HCC therapies

We previously showed the benefit of combining standard HCC chemotherapies (cisplatin or sorafenib) with the PDK4 inhibitor dichloroacetate (DCA) against immature HCC cells (Fekir et al., 2019). Here, we showed that DCA reactivated mitochondrial respiration (Fig. 8A) and increased the production of ROS (peroxide and superoxide anions) (Fig. 8B) that hepatic CSCs fail to scavenge, unlike differentiated cells (Fig. S3C). Since PDK4 is a PPARG target, we sought to assess the effects of PPARG invalidation. Like DCA treatment, siPPARG transfection induced increased mitochondrial respiration, proton leak (Fig. 7B) and ROS production (Fig. 8C). The viability of HepaRG progenitors and BC2 cells was decreased when siPPARG was used alone or combined with cisplatin or sorafenib (Fig. 8D). Interestingly, dual inhibition of PPAR γ by siRNA transfection and PDK4 by DCA reduced cell viability (Fig. 8D).

Considering a high PPAR α expression is associated with better patient outcomes in the TCGA and ICGC cohorts, an alternative strategy to eliminate CSCs could be based on PPAR α activation by agonists, which should promote mitochondrial activity. Treatment of HepaRG-sphere with the PPAR α agonist, clofibrate, alone did not reduce cell viability and slightly increased mitochondrial network length (Fig. 8E, Fig. S3D). However, the combination of clofibrate and DCA reduced cell viability more than DCA alone (Fig. 8E).

DISCUSSION

Inter- and intra-tumoral heterogeneity of HCCs contributes to the lack of effective treatments (Chan et al., 2021). Increasing evidence indicates that tumor cell plasticity is a key determinant of tumor heterogeneity (Meacham and Morrison, 2013). Using several HCC cell lines, including HepaRG and BC2 cells that exhibit well-characterized differentiation/retrodifferentiation potential (Cerec et al., 2007; Dubois Pot Schneider et al., 2014; Fekir et al., 2019; Glaise et al., 1998), we showed that retrodifferentiated cells adopt a specific metabolic profile associated with chemoresistance. Although oxidative metabolism is critical for differentiated tumor-derived hepatocytes, hepatic CSCs are characterized by low OXPHOS, mitochondrial FAO and *de novo* lipogenesis, but high glycolytic activity. Hepatic CSCs also accumulate lipid droplets, whose triglycerides can be mobilized in case of increased energy needs. Of note, this metabolic phenotype results from reversible and non-genomic process. Indeed, HepaRG cells are mutated in the hTERT promoter (Nault et al., 2013) whereas BC2 cells are mutated in both TP53 (H214R substitution associated with second allele loss) and CTNB1 (S45A substitution associated with second allele loss) (Glaise et al., 1998, Zucman-Rossi J and Cavard C, personal communication).

Metabolic reprogramming gives hepatic cells the ability to adapt their metabolism to energy requirements as well as environmental constraints. Hepatic CSCs exhibit reduced mitochondria

biogenesis and harbor a mitochondrial network with fewer branch points than differentiated hepatic cells. Such fragmented network would favor the adoption of a glycolytic profile and self-renewal properties of stem cells rather than commitment in cell differentiation (Chen and Chan, 2017). Notably, a glycolytic phenotype allows the cells to produce enough energy to maintain their functions while reducing ROS production and associated oxidative damages (Chen et al., 2016; Dong et al., 2013; Gammon et al., 2013; Kobayashi and Suda, 2012; Simsek et al., 2010). In contrast, while enabling cells with efficient energy supply, the mitochondrial respiratory chain generates ROS that can oxidatively damage lipids, proteins and nucleic acids, especially when the cellular antioxidant defenses are overwhelmed (Juan et al., 2021). Therefore, to avoid oxidative stress, cancer cells can either develop a proficient ROS scavenging system or undergo metabolic reprogramming to curb ROS production. Unlike many types of stem cells that produce antioxidants and/or express antioxidant enzymes (Wang et al., 2013), hepatic CSCs have little antioxidant machinery and thus these cells can only rely on their metabolic state to control ROS production. Indeed, we have recently shown that HepaRG CSCs express low level of anti-oxidant enzymes (Fekir et al., 2019), while in the present study recovery of mitochondrial respiration led to increased ROS production and cell death, in both HepaRG and BC2 CSCs. Hepatic CSCs also express PDK4 that inhibits the conversion of pyruvate into acetyl-CoA, thus reducing TCA cycle activity. Moreover, PDK4 restrains ferroptosis, a form of cell death driven by iron-dependent phospholipid peroxidation mainly occurring when the TCA cycle is functional (Jiang et al., 2021; Song et al., 2021). Therefore, glycolytic reprogramming and high expression of PDK4 in hepatic CSCs likely contribute to limit ROS production. This is in line with our data showing that treatment of hepatic CSCs with DCA, a PDK4 inhibitor, restores ROS production and induces cell death.

Besides this glycolytic phenotype, hepatic CSCs also present an altered lipid metabolism which might prevent oxidative damages. Indeed, hepatic CSCs store more saturated than unsaturated

lipids, which are prone to peroxidative attack (Giampietri et al., 2017; Visweswaran et al., 2020). Moreover, high level of saturated FAs is thought to decrease lipid peroxidation and subsequent ROS-induced damages, by diluting polyunsaturated FAs in cell membranes (Rysman et al., 2010). It is tempting to speculate that reduced *de novo* synthesis of unsaturated lipids and low desaturase activity in hepatic CSCs could explain the difference with ovarian CSCs, which were found enriched in unsaturated FAs (Li et al., 2017; Wang et al., 2020). Low *de novo* lipogenesis in hepatic CSCs might force these cells to use extracellular fatty acids, in particular through increased expression of the membrane transporter FAT/CD36. Once taken up by hepatic CSCs, lipids are not shuttled into mitochondria to produce energy, but rather stored in lipid droplets, mainly in the form of triglycerides. Consistent with these observations, accumulation of lipid droplets has been associated to stemness in various cancer including ovarian, colorectal and breast cancers (Hershey et al., 2020; Li et al., 2017; Tirinato et al., 2015). By sequestering lipids, the lipid droplet core provides a protective environment limiting lipid oxidation and thus oxidative stress (Bailey et al., 2015), and might also mitigate the deleterious effects of endoplasmic reticulum stress. Indeed, high levels of FAs in the endoplasmic reticulum membranes, especially saturated FAs, can trigger the unfolded protein response (UPR) by a process that does not require the unfolded-protein sensing domains of IRE1 and PERK (Volmer et al., 2013). Thus, the build-up of lipid droplets in hepatic CSCs may prevent UPR-induced apoptosis (Welte and Gould, 2017).

In addition, lipid storage is likely to provide a source of energy which can be quickly mobilized to meet energy requirements during cell proliferation or differentiation. Accordingly, a decrease in lipid content is observed in hepatic proliferating and differentiating cells, while FAO is restored. HepaRG-spheres are arrested in G1 phase of the cell cycle and harbor more lipid droplets than HepaRG-SP (Fekir et al., 2019), which express low level of the S and M phase marker, CDK1. Interestingly, the phenotype of HepaRG-SP displays similarities with hepatic

tumor-initiating stem-like cells described by Chen et al, which have self-renewal ability, low OXPHOS but active FAO (Chen et al., 2016). Of note, the transcription factor Nanog that represses OXPHOS and mitochondrial ROS production in these hepatic tumor-initiating cells is also expressed in HepaRG retrodifferentiated cells (Dubois Pot Schneider et al., 2014; Fekir et al., 2019). In addition, HepaRG and BC2 CSCs express the stem cell marker KLF4, a well-known transcription factor that drives a stemness phenotype during somatic cell reprogramming. KLF4 was recently shown to modulate stemness and phenotypic shift in hepatic non-stem cells (induction of EPCAM and CD133 in Huh7 cells) and to restore the tumorigenic potential of non-stem cells (Firtina Karagonlar et al., 2020). Thus, the retrodifferentiation process leads hepatic CSCs to adopt a specific phenotype characterized by low proliferation rate, energy metabolism limiting ROS production and lipid storage for future needs.

The nuclear receptors PPARs orchestrate lipid and glucose metabolism and emerging evidence indicates a complex relationship between PPARs and HCC development. However, whether PPARs promote or suppress liver cancer growth remains controversial. We previously identified PPARG and PGC1a as negative regulators of numerous genes involved in the TCA cycle and OXPHOS. Here, we demonstrate that the differentiation/retrodifferentiation process in HCC is modulated by a balanced expression of PPARA/G isotypes. PPARA, the main isotype expressed in the liver, is found in differentiated HCC cells. High PPARA expression is associated with favorable outcome in HCC in both the TCGA and ICGC cohorts, whereas its expression fails to discriminate patients in the Roessler cohort. The difference may result from the ethnicity of the patients included in the cohorts. In addition, the cellular localization of PPARA should be considered for the stratification within the cohorts because patients with reduced nuclear localization of PPARA have a poorer prognosis (Xiao et al., 2018). On the other hand, PPARG which is not expressed in the basal state in differentiated hepatocytes is

found in steatotic liver (Mello et al., 2016). This likely results from the negative regulation of PPARG expression by the hepatocyte nuclear factor 1α , a transcription factor crucial for hepatocyte differentiation and steatosis-associated cancers (Patitucci et al., 2017). Interestingly, we found that PPARG is unexpectedly overexpressed in hepatic CSCs. Regarding its impact on HCC prognosis, high PPARG expression is associated with poor overall survival in three independent HCC cohorts (TCGA, ICGC and Roessler). Yu et al previously demonstrated that PPARG limits tumor cell proliferation and growth (Yu et al., 2010, 2006). Consistent with this data, our results show that PPARG activation by the agonist rosiglitazone reduces hepatic CSC proliferation, thereby reducing the probability of HCC recurrence from CSCs. However, PPARG also participates in a metabolism rewiring associated with acquisition of stemness features, increased invasion potential and chemoresistance of HCC cells (Fekir et al., 2019). Indeed, PPARG knockdown leads to mitochondrial biogenesis, increased respiration potential and ROS production, resulting in cell death. These observations are discrepant with recent work showing that PPARG is required for PGC1 α -induced inhibition of Wnt/ β catenin/PDK1 axis and metastasis in HCCs (Zuo et al., 2021). This discrepancy might be related to the high expression of PPARG and the low expression of PGC1 α in hepatic CSCs. Alternatively, Zuo and collaborators might have overlooked the importance of the balance between PPARA and PPARG (Zuo et al., 2021). Importantly, our work provides new insights into PPARG activation at the molecular level. Indeed, we show that PPARG activation in HCC 1) induces the expression of the stem cell marker KLF4, 2) modulates the expression of the EMT markers SNAIL and E-Cadherin, 3) increases the expression of the fatty acid transporter FAT/CD36 and PLIN2, a lipid droplet-stabilizing protein, 4) enhances the expression of PDK4, a pivotal actor of metabolic flexibility and 5) alters the mitochondrial network and respiration capacity.

In conclusion, we show the influence of tumor cell plasticity in metabolic reprogramming and chemotherapy resistance of HCC. We demonstrate that PPARG regulates the proliferation,

invasion, metabolism and chemoresistance of hepatic CSCs. The balance between PPAR isoforms modulates the metabolic reprogramming of these cells, while the PPAR target gene *PDK4* is pivotal for controlling their metabolic flexibility. This underestimated function of PPARG in hepatic differentiation/retrodifferentiation process and chemoresistance of hepatic CSCs could pave the way for new therapeutic options in HCC.

MATERIALS&METHODS

Cell culture

HepaRG cells were cultured as described by Gripon et al. (Gripon et al., 2002). Cells were seeded at 2.7×10^4 cells/cm² and maintained for 2 weeks in William's E medium (Gibco, 22511-022) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (50/50 mix of Hyclone and Eurobio serum), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco, 15070-063), 5 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich, I5500), 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate (Upjohn, Serb) and 2 mM glutamine (Gibco, 25030-024). After 2 weeks, cells were passed in the same medium with 2% DMSO (Sigma-Aldrich, D4540) for 2 additional weeks to enhance the differentiation. HBG-BC2 cell line (Glaise et al., 1998) were cultured in HepaRG medium without DMSO and maintained 2 weeks at confluency to reach differentiation. HepG2, Huh6 and Huh7 were cultured in DMEM medium (Sigma-Aldrich, M2279) supplemented with 10% FCS, 4 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. For sphere culture, cells were seeded in William's E medium with 2% FBS and 50-fold reduced concentration of insulin and hydrocortisone hemisuccinate, for 5 days. Then, cells were seeded in ultra-low attachment plates in DMEM/F12 medium (Gibco, 11330-032) supplemented with 20% knockout serum replacement (Gibco, 10828-028), 1 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acids (Gibco, 11140050), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Gibco, 31350010), and 4 ng/ml fibroblast growth factor 2 (FGF2, Miltenyi Biotec, 130-093-840) for 5 more days. Medium was renewed at day 1 and 3.

HepaRG side population was obtained as described by Fekir et al. (Fekir et al., 2019). After 4 days of culture, cells were suspended at 1×10^6 cells/mL in Hank's balanced salt solution supplemented with 3% FCS and 10 mmol/L HEPES, and incubated for 90 min with 20 mg/mL Hoechst 33342 (ThermoFisher, 62249), with or without the P-glycoprotein inhibitor verapamil (50 mM, Sigma-Aldrich). Cell analysis and sorting were performed using Becton Dickinson

FACSAria III. Fluorescence emission of Hoechst 33342 was measured through 450DF20 BP (Hoechst blue) and 675DF20 BP (Hoechst red) optical filters. Culture of SP cells was done in HepaRG medium without DMSO. Experiments on SP cells were performed within 24 hours after seeding to limit cell proliferation and differentiation. For RNA, DNA and protein extraction, SP cells were centrifuged and the pellet was frozen directly after cell sorting. Note that some experiments were performed only with HepaRG-Spheres, but not with HepaRG-SP, because of the small amount of SP available.

Drug treatments

Adherent cells or spheres were cultured for 3 days in the presence of cisplatin (Mylan 1 mg/ml), sorafenib (Interchim, CJ592), dichloroacetate (Sigma-Aldrich, 347795-10G), clofibrate (Sigma Aldrich, C6643-5G) or rosiglitazone (Sigma-Aldrich, C6643-5G) at the indicated concentration.

Microarray analysis

Datas of microarray were provided by experiments previously performed in the laboratory (Fekir et al., 2019). mRNAs were obtained from biological replicates (n=4) of HepaRG-SP, HepaRG-spheres, and HepaRG cells recovered 4 (HepaRG-D4), 15 (HepaRG-D15) and 30 (HepaRG-D30+DMSO) days. RNA purity and integrity were evaluated with an Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies). Genome-wide expression profiling was performed using the low-input Quick-Amp Labeling Kit and human SurePrint G3 8×60K pangenomic microarrays (Agilent Technologies). Gene expression data were processed using Feature Extraction and GeneSpring software (Agilent Technologies).

The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through Series accession numbers GSE75752 and GSE112123

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE75752>;

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE112123>).

To determine genes significantly deregulated between immature (spheres and SP) and differentiated (D4, D15 and D30+DMSO) cells, a one-way ANOVA was performed with a p-value < 0.05 and a fold change >1.5. A list of 6115 genes was established.

Gene set enrichment analysis

Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to compare the 6115 genes differentially expressed (DEG) between immature and differentiating HepaRG cells with the Mitocarta 3.0 Gene Set (1136 genes) (Calvo et al., 2016). Analysis was performed using the Java-tool developed at the Broad Institute (Cambridge, MA). 311 down-regulated genes in stem HepaRG were integrated into Enrichr website (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>).

HCC patient cohorts

Three HCC cohorts were used in this study: the Roessler's cohort (GEO Series accession number GSE14520; 238 HCCs), the Cancer Genome Atlas Liver Hepatocellular Carcinoma cohort (TCGA-LIHC; 370 HCCs) and the International Cancer Genome Consortium cohort (ICGC, 232 HCCs).

Real-time PCR

Total RNA extraction and purification were performed using NucleoSpin RNA® Kit (Macherey-Nagel, 740955). Retrotranscription of RNA to cDNA was realized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814). Total DNA extraction and purification were performed by DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69504). Real-time qPCR was performed with Thermocycler StepOnePlus™ device (Applied

Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4309155). Gene expression was normalized by housekeeping gene Tata Binding Protein for (TBP) cDNA and Ribosomal Protein S6 (RPS6) for DNA. The primer sequences are listed in the following table.

Primer	Gene name	Forward	Reverse
TBP	TATA-Box Binding Protein	5'-ACT-CCA-CTG-TAT-CCC-TCC-CC-3'	5'-CAG-CAA-ACC-GCT-TGG-GAT-TA-3'
ALB	Albumin	5'-TGCTTGAATGTGCTGATGACAGG-3'	5'-AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTCATC -3'
CD44	CD44 Molecule	5'-GGC-TTT-CAA-TAG-CAC-CTT-GC-3'	5'-CAC-GTG-CCC-TTC-TAT-GAA-CC-3'
FAT/CD36	Fatty Acid Translocase	5'-GCC-AGG-TAT-TGC-AGT-TCT-TTT-C-3'	5'-TGT-CTG-GGT-TTT-CAA-CTG-GAG-3'
PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma	5'-AAG-GCC-ATT-TTC-TCA-AAC-GA-3'	5'-AGG-AGT-GGG-AGT-GGT-CTT-CC-3'
PPARA	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha	5'-GTT-CTG-GAA-GCT-TTG-GCT-TTA-C-3'	5'-GAA-AGC-GTG-TCC-GTG-ATG-A-3'
PPARD	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta	5'-AGC-ATC-CTC-ACC-GGC-AAA-G-3'	5'-CCA-CAA-TGT-CTC-GAT-GGC-AGG-CG-3'
PLIN2	Perilipin 2	5'-GCT-CCA-TTC-TAG-TGT-TCA-CCT-G-3'	5'-CTC-CTT-TTC-CAC-TCT-ACC-CAT-G-3'
PDK4	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4	5'-CTCGCGCTAGAGCCCG-3'	5'-GCATTTTCTGAACCAAAGTCCAG-3'
ANGPTL4	Angiopietin Like 4	5'-GACCAAGGGGCATGGAGCTT-3'	5'-CAGGGGACCTACACACAACAG-3'
KLF4	Kruppel Like Factor 4	5'-GAC-GCT-GCT-GAG-TGG-AAG-AG-3'	5'-AGA-CAA-TCA-GCA-AGG-CGA-GT-3'
CDH1	Cadherin 1	5'-AGT-GGG-CAG-AGA-TGG-TGT-GA-3'	5'-TAG-GTG-GAG-TCC-CAG-GCG-TA-3'
RPS6	Ribosomal Protein S6	5'-TGA-TGT-CCG-CCA-GTA-TGT-TG-3'	5'-TCT-TGG-TAC-GCT-GCT-TCT-TC-3'
MT-CO1	Human cytochrome c oxidase subunit 1	5'- TAC-GTT-GTA-GCC-CAC-TTC-CAC-T -3'	5'- AGT-AAC-GTC-GGG-GCA-TTC-CG-3'
SNAIL	Snail Family Transcriptional Repressor 1	5'- TCA-ACT-GCA-AAT-ACT-GCA-AC-3'	5'- CTT-GAC-ATC-TGA-GTG-GGT-CT-3'

Protein extraction and Western blot analysis

Cells were lysed in ice-cold RIPA buffer containing phosphatase and protease inhibitors from Roche Applied Science (Penzberg, Germany). Protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23227) and equal amounts of protein were diluted with NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, NP0007). Samples

were then separated by SDS-PAGE using iD PAGE Gel 4–12% (Eurogentec, ID-PA4121-012). Proteins were transferred with iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Life Technologies, IB301001). Membranes were blocked in 3% BSA in TBST (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.02% Tween 20) for 1h at room temperature and incubated overnight at 4 C with antibodies against PPAR γ (Santa Cruz, 7196), or HSC70 (Santa Cruz, sc-7298), (dilution 1:1000). Membranes were washed with TBST, incubated for 1h at room temperature with appropriate HRP secondary antibodies (Dako P0447 and P0448, respective dilutions 1:5000 and 1:10,000), washed with TBST, and then visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo Fisher Scientific) using Fusion FX imaging system (Vilber Lourmat). Protein content was quantified by densitometry with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Mitochondrial mass by flow cytometry

Cells were incubated with 100 nM of MitoTracker® Green FM (ThermoFisher Scientific, M7514) for 30 min in Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, 14175095). Cells were then washed in HBSS, detached with 0.05% trypsin (Gibco 25300-054), resuspended in HBSS and ran through the LSR Fortessa X-20 flow cytometer.

Oxygen consumption and glycolysis measurements

Respiration and glycolysis were measured by Seahorse XFe Analyzer device (Agilent). Respiration was assessed by successive injections of oligomycin (2 μ M), carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) (1 μ M) and the combination of antimycin A/rotenone (1 μ M) into the culture medium (Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit, Agilent Technologies, 103015-100). Glycolysis was assessed by injection of glucose (10 mM), oligomycin (1 μ M) and 2-deoxy-D-glucose (2-DG) (50 mM) (Seahorse Glycolysis Stress Test

Kit, Agilent Technologies, 103020-100). Analyses were performed with Wave software version 2.3.0. Plates were fixed with 4% paraformaldehyde (ThermoScientific, 28908) and then labeled with Hoechst 33342 to assess the number of nuclei and normalize the results to cell number. Fluorescence measurement was performed at 460 nm on a POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech).

Assessment of FAO with [U-14C]palmitic acid

FAO was assessed by measuring the acid-soluble radiolabeled metabolites resulting from the mitochondrial oxidation of [U-14C]palmitic acid as previously described (Allard et al., 2020; Anthérieu et al., 2011). Briefly, culture medium was removed and cells were washed with warm PBS before addition of phenol red-free William's E medium (Gibco, A1217601) containing 1% fatty acid-free BSA (Sigma-Aldrich, A8806), [U-14C]palmitic acid (Perkin Elmer, NEC534050UC), 100 μ M cold palmitic acid (Sigma-Aldrich, P5585), 1 mM L-carnitine (Sigma-Aldrich, C0283). After 3 hours of incubation at 37°C, perchloric acid (final concentration, 6%) (Fisher Scientific, 12993564) was added and plates were centrifuged at 2,000g for 10 min, and supernatant was counted for [14C]-labeled acid-soluble β -oxidation products using a Tri-Carb 4910TR liquid scintillation counter (PerkinElmer). Results were normalized to cell number obtained by fluorescence intensity of Hoechst 33342 correlated with nucleus count performed at 460 nm on a POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech).

Assessment of DNL from [2-14C]acetic acid

De novo lipogenesis was assessed by measuring newly synthesized radiolabeled lipids from [2-14C]acetic acid, using a protocol from Byrne et al. (Allard et al., 2020; Byrne et al., 2014). Briefly, culture medium was removed and cells were washed with warm PBS. Next, cells were incubated for 3 hours with phenol red-free William's E medium containing 1% fatty acid-free

BSA, [2-14C]acetic acid (Perkin Elmer, NEC553050UC) and 50 μ M cold acetic acid (Sigma-Aldrich, S5636). Medium was then gently removed and cells were washed with warm PBS before adding a mix of hexane/isopropanol (3V/2V) (Sigma-Aldrich, 139386 and I9516). Cell culture plates were sealed and incubated for 1 hour at room temperature for lipid extraction. After transfer of the plate content in 200 μ l microtubes, hexane and PBS were added to have a hexane/isopropanol/PBS ratio of 6V/2V/3V. Microtubes were then centrifuged at 1000g for 5 min and radiolabeled lipids were counted in the upper phase with a Tri-Carb 4910TR liquid scintillation counter (PerkinElmer). Results were normalized to cell number obtained by fluorescence intensity of Hoechst 33342 correlated with nucleus count performed at 460 nm on a POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech).

Measurement of reactive oxygen species

Cells were incubated with 5 μ M MitoSox (ThermoFisher Scientific, M36008) or 2 μ M H2DCFDA (Molecular Probes, D399) in warm HBSS for 30 min at 37°C and 5% CO₂ in the dark. The medium was removed and the cells were washed with warm HBSS and the fluorescence intensity was measured by the POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech). Two measurements were performed for each well with the two required wavelength pairs for MitoSox (ex520/em590) and DFCDA (ex485/em520). For probe control, specific wells containing cells were treated with 60 mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich, H1009) for 1 hour before probe incubation to validate probe activation.

Dosage of pyruvic and lactic acid

Supernatants of culture were collected and put into a tube containing 2 ml of perchloric acid. The medium had been renewed 24 hours before this sampling. Pyruvic acid and lactic acid

determinations were performed by photometry using a COBAS c111 (ROCHE) in the biochemistry/toxicology laboratory of the University Hospital of Rennes.

Electron microscopy

Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, G7526) and treated by 1% osmium (Electron Microscope Sciences, 19150) in 0.2M sodium cacodylate buffer pH=7.2 (Electron Microscope Sciences, 11650). The dehydration was carried out by successive alcohol baths (increasing alcohol content: 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) followed by twice impregnation with an Epon / DMP30 mixture (Sigma-Aldrich, 45348) and placed at 37°C. The next day, capsules were inserted into the same resin and the plates were placed at 37°C. Two days later, the capsules were filled with an Epon/DMP30 mixture and placed in an oven at 60°C to polymerize for 24 hours. The capsules were detached from the plates and cut with an ultra-microtome (UC7, Leica). Sections were stained with uranyl acetate and the images acquired with a Gatan Orius SC1000 wide angle camera on a JEOL JEM-1400 electron microscope. For each cell type, the TEM experiments were carried out at least twice. At least two capsules were cut by experiment and for each section examined by TEM, 4 different fields were investigated in order to overview the cells layer.

Assessment of neutral lipids with Nile Red

Cells were washed with PBS, fixed and stained with PBS containing 4% formaldehyde and 10 µg/mL Hoechst 33342 dye for 30 min and washed 3 times with PBS. Cells were then incubated with PBS containing 0.1 µg/ml Nile Red for 30 min and washed once. Fluorescence intensity was measured by the POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech). Neutral lipids were then normalized per number of nuclei and expressed relative to control cells.

Lipid extraction, lipid species separation and fatty acid analysis

Total lipids were extracted twice from cells with hexane/isopropanol (3/2 v/v), after acidification with HCl 3M, as previously described (Drouin et al., 2019). Lipid species were then separated by thin-layer chromatography (TLC) using silica gel H plates (0.5 mm thickness) and a mixture of hexane:diethylether:acetic acid (85:15:1 v/v/v) for development, after addition of internal standards (diheptadecanoylphosphatidylcholine, heptadecanoic acid, triheptadecanoylglycerol and cholesteryl heptadecanoate) (Garcia et al., 2018). Phospholipids (PL), free fatty acids (FFA), triglycerides (TG) and cholesterol esters (CE) were scraped off the plates and extracted with 2 mL of methanol. Total lipids and lipid species were converted to Fatty Acid Methyl Esters (FAMES), by successive saponification (1 mL of 0.5 M NaOH in methanol at 70°C for 30 min) and methylation (1 mL of BF₃ 14% in methanol at 70°C for 30 min) (Guillocheau et al., 2019). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of FAMES was subsequently performed using an Agilent Technologies 7890A GC system (Agilent, Les Ulis, France) with a bonded silica capillary column (BPX 70, 60 m × 0.25 mm; SGE, Melbourne, Australia) containing a polar stationary phase of 70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane (0.25 µm film thickness). Helium was used as carrier gas (average velocity 24 cm/s). The column temperature program started at 150°C and gradually increased at 4°C/min to 250°C, and held at 250°C for 10 min. Mass spectra were recorded with an Agilent Technologies 5975C inert MSD with triple axis detector (Rioux et al., 2013). The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Data were obtained in the full scan mode with a mass range of m/z 50–550 atomic mass units (amu). Peak integration was performed with MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.07.00 for Windows (Agilent Technologies). Identification of the FAMES was based upon retention times (Rt) obtained for methyl ester of authentic standards, when available. The National Institute of Standards and Technology database (NIST version 2.2) was used to identify unknown fatty acids. All

identified fatty acids with a signal/noise above 10 were considered in the analysis. Results were expressed as the mass of identified fatty acids/cell number.

Confocal microscopy

HepaRG cell line was cultured in compartmented slats Lab-Tek™. After culture, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (ThermoScientific, 28908) and permeabilized by PBS with 1% BSA (Sigma-Aldrich, A2153) and 0.5% saponin (Sigma-Aldrich, 47036) for 1h at room temperature. First incubation was done with antibody against mitochondrial import receptor subunit (TOM22) at 1/5000 (Abcam ab57523) in PBS with 1% BSA and 0.5% saponin overnight at 4°C. Next day, compartmented slats were washed with PBS and secondary anti-mouse antibody coupled with green FITC (Jackson ImmunoResearch, 115-095-003) for 1h at room temperature, followed by PBS washing and Hoescht 33342 labelling for 15 min. The cells were observed with a LEICA DMI 6000 CS confocal microscope. The acquisition of images was performed with the LAS AF software. Image analysis was performed with ImageJ software, based on the work of Koopman et al. (Koopman et al., 2005).

siRNA transfection

The validated siRNA (LQ-003436-00-0002, On-TARGETplus Human PPARG 5468 siRNA – Set of 4, 2 nmol, Dharmacon) was used for knocking down the expression of PPARG. The ON-TARGETplus Non-targeting siRNA (D-001810-01-20, Dharmacon) was used as control. Transfection was performed using lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, 13778-075). Briefly, one day after cell seeding, cells were incubated overnight with the liposome-DNA mix (1.5 µl RNAiMAX/25 pmoles DNA/105 cells) in Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco, 31985-070). Expression of PPARG was analyzed 48 and 72 hours after transfection by

RT-qPCR. Knock down of PPARG in HepaRG sphere was performed by electroporation. Treatments with drugs were performed 48h after transfection for 48 hours.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assays were performed using CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G7571). Luminescence was measured by POLARstar Omega plate reader (BMG Labtech).

Statistical analysis

Results are expressed as means±SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism software (Version 7.0; GraphPad, San Diego, CA). Significance was assessed by parametric (Student t-test, One-way Anova or Two-way Anova) and nonparametric (Mann-Whitney test or Kuskall-wallis test) methods according to the results of the normality test.

FIGURE LEGEND

Fig. 1: Immature HepaRG cells downregulate the expression of mitochondria-related genes

(A) Gene set enrichment analysis (GSEA) plot for mitochondria-related genes referenced in Mitocarta 3.0; NES, normalized enrichment score. The left pie chart shows the percentage of mitochondria-related genes among total differentially expressed genes (DEG) between the groups of immature and differentiating HepaRG cell; the right pie chart shows the Mitocarta 3.0 genes that are upregulated (dark grey) or downregulated (white) in immature HepaRG cells. (B) Reactome pathways related to DEG in immature HepaRG cells. (C) Biplot showing the distribution of the 471 DEG belonging to Mitocarta 3.0 among periportal (PP), perivenous (PV), extracellular matrix (ECM) and stem subclasses of HCCs proposed by Désert et al. (D) Electron microscopy of HepaRG cells: sphere (1), SP (2), progenitor (3), committed/confluent (4) and differentiated (5) HepaRG cells. Black arrows point out mitochondria; N, nucleus. (E) Mitochondrial DNA content assessed by RT-qPCR ($n \geq 4$). Results are expressed as relative to HepaRG progenitors, arbitrary set to 1. Mitochondrial mass evaluated by flow cytometry using the fluorescent *mitochondrial* stain probe Mitotracker Green® ($n \geq 6$). Expression of PGC1A (from the genome-wide expression profiling). Results are expressed as relative to HepaRG progenitors, arbitrary set to 1 ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fig. 2: Differentiation/retrodifferentiation process in HepaRG cells are related to metabolic reprogramming

(A) Immunostaining of the mitochondrial protein TOM22 in SP, progenitor, confluent and differentiated HepaRG cells; Bar=5 μ m. Image acquisition was performed by confocal microscopy. Mitochondrial network length and branching were analyzed using ImageJ software ($n=3$). (B) Representative glycolytic (extracellular acidification rate, ECAR) and mitochondrial

respiration (oxygen consumption rate, OCR) profiles obtained with Seahorse analyzer for sphere, side population (SP), progenitor, committed/confluent and differentiated HepaRG cells. Glycolysis, glycolytic capacity, basal and maximal respiration for sphere, SP, progenitor, committed/confluent and differentiated HepaRG cells ($n \geq 5$). (C) Dosage of lactate and β -hydroxybutyrate in culture supernatant by absorption spectrophotometry ($n \geq 3$). Fatty acid oxidation and *de novo* lipogenesis assessed by quantifying the radioactivity subsequent to ^{14}C -palmitate and ^{14}C -acetate incorporation, respectively ($n \geq 4$). FAT/CD36 expression obtained from transcriptomic analyses. Results are expressed as relative to HepaRG progenitors, arbitrary set to 1 ($n=4$). Neutral lipid content assessed by the fluorescent dye Nile red ($n \geq 5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fig. 3: Metabolism rewiring in HCC cell lines

(A) Albumin (left y-axis) and CD44 (right y-axis) expression assessed by RT-qPCR, throughout the culture of HepaRG, BC2, Huh7, HepG2 and Huh6 cell lines. Results are expressed as relative to progenitors for HepaRG cell line or relative to proliferative cells for BC2, Huh7, HepG2 and Huh6 cell lines, arbitrary set to 1, ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in comparison with sphere condition. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ in comparison with side population condition. (B) Glycolysis, glycolytic capacity, basal and maximal respiration assessed with Seahorse analyzer for HepaRG, BC2, Huh7, HepG2 and Huh6 cell lines ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Dosage of lactate and β -hydroxybutyrate in culture supernatants by absorption spectrophotometry ($n \geq 3$). Fatty acid oxidation and *de novo* lipogenesis assessed by quantifying the radioactivity subsequent to ^{14}C -palmitate and ^{14}C -acetate incorporation, respectively ($n \geq 3$). FAT/CD36 RNA expression assessed by RT-qPCR. Results are expressed as relative to progenitors, arbitrary set to 1 for HepaRG cell line, and relative to proliferative cells, arbitrary set to 1 for BC2, Huh7, HepG2 and Huh6 cell lines

(n \geq 3). Neutral lipid content assessed by the fluorescent dye Nile red (n \geq 3). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (D) Quantification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of fatty acids from cell total lipids (total FAs), fatty acids from triglycerides, phospholipids, cholesterol esters and free fatty acids in HepaRG and BC2 cell lines at different stages of differentiation. The saturated/unsaturated FA ratio is calculated from data obtained with the total lipid pool. Results are normalized by the number of cells (n \geq 3). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Fig. 4: PPAR γ expression is associated with poor prognosis in HCC

(A) Expression of PPAR gene family members assessed by RT-qPCR throughout the differentiation process of HepaRG and BC2 cell lines. Results are expressed as relative to HepaRG progenitors or BC2 proliferative cells, arbitrary set to 1 (n \geq 3). \$ p<0.05; **, \$\$, ##, p<0.01; ***, \$\$\$, ### p<0.001; all compared with spheres. (B) Overall survivals according to the expression of PPARG and PPARG in the TCGA-LIHC cohort. (C) Correlation between PPARG and PPARG expression and AFP level in the TCGA-LIHC cohort. (D) PPARG and PPARG expression in the four subclasses of HCC proposed by Désert et al. Results are expressed as relative to the level of PPARG and PPARG in the periportal subclass, arbitrary set to 1. *** p<0.001. (E) Immunostaining of PPAR γ in two poorly differentiated HCC samples. Black arrows indicate a nuclear localization of PPAR γ .

Fig. 5: PPAR γ agonist rosiglitazone triggers retrodifferentiation and metabolic switch in HepaRG and BC2 cells

(A) Left panel: PPARG RNA expression assessed by RT-qPCR, 48h after transfection of HepaRG spheres with siNon-targeting (siNT) and siPPARG (n = 3). Middle panel: Sphere number 48h after seeding the transfected HepaRG cells in sphere culture medium. Results are

expressed as relative to siNT-HepaRG sphere, arbitrary set to 100% (n=3). Right panel: ATP viability assay of HepaRG sphere 48h after transfection. Results are expressed as relative to siNT HepaRG, arbitrary set to 100% (n=3). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (B) ATP viability assay of HepaRG and BC2 cells in sphere conformation was performed after treatment with 50 μ M or 100 μ M rosiglitazone during 72h. Results are expressed as relative to the untreated condition arbitrary set to 100% (n=4). (C) Phase-contrast microscopy of HepaRG progenitors and BC2 proliferative cells treated with 50 μ M or 100 μ M rosiglitazone during 72h. Bar=50 μ m. (D) ATP viability assay of HepaRG progenitors and BC2 proliferative cells after treatment with 50 μ M or 100 μ M rosiglitazone during 72h. Results are expressed as relative to the untreated condition, arbitrary set to 100% (n=3). *** $p < 0.001$. (E) HepaRG and BC2 proliferation assessed by quantifying empty areas three days after seeding. Image analysis was performed using ImageJ software (n=3). *** $p < 0.001$.

Fig. 6: PPAR γ reduces mitochondrial network and OXPHOS

(A) Expression of perilipin2 (PLIN2), fatty acid transporter FAT/CD36, stem-related marker KLF4, E-cadherin, pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) and EMT-inducing transcription factor Snail in HepaRG progenitors and BC2 proliferative cells after treatment with rosiglitazone during 72h. Results are expressed as relative to the untreated cells, arbitrary set to 1 (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Immunostaining of the mitochondrial protein TOM22 in HepaRG progenitors 48h after treatment with 50 μ M rosiglitazone or transfection with siPPARG. Image acquisition was performed by confocal microscopy. Bar=5 μ m. Mitochondrial network length and branching were analyzed using ImageJ software (n=3). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Mitochondrial DNA levels assessed by RT-qPCR, 24h, 48h and 72h after transfection of HepaRG progenitors with siPPARG (n=4). Results are expressed as relative to the siNT-HepaRG progenitors arbitrary set to 1. (C) Basal respiration, maximal respiration,

spare respiratory capacity, ATP production, assessed with Seahorse analyzer in HepaRG progenitors treated by rosiglitazone during 48h. Results are expressed as relative to untreated HepaRG progenitors, arbitrary set to 100% (n=3). * p<0.05.

Fig. 7: PPAR γ inhibition or agonist-mediated activation of PPAR α improves the efficacy of standard HCC chemotherapies

(A) Phase-contrast microscopy of HepaRG progenitors and BC2 proliferative cells 48h after transfection with siPPARG. Bar=50 μ m. (B) Expression of PPARG, PDK4 and PLIN2, 48h and 72h after transfection of siPPARG in HepaRG progenitors and BC2 proliferative cells (n=3). Results are expressed as relative to the siNT condition arbitrary set to 1. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (C) Basal respiration, maximal respiration, spare respiratory capacity, proton leak, ATP production and non-mitochondrial oxygen consumption, assessed with Seahorse analyzer in HepaRG progenitors, 48h after transfection of siPPARG. Results are expressed as relative to the siNT condition, arbitrary set to 100% (n=3). * p<0.05.

Fig. 8: Involvement of PPARG inhibition in reversal of chemoresistance and evidence for a role of PPARG/PPARA balance in cellular plasticity

(A) Production of peroxide and superoxide anions (reactive oxygen species) by HepaRG progenitors after transfection with siPPARG or by HepaRG spheres after DCA treatment during 12h, 24h, 48h and 72h, assessed using H2DCFDA or MitoSox®, respectively (n=4). * p<0.05. (B) Viability of HepaRG progenitors and BC2 proliferative cells transfected with siPPARG and treated with cisplatin (10 μ g/ml for HepaRG; 20 μ g/ml for BC2) or sorafenib (2.5 μ M for HepaRG; 15 μ M for BC2) or 50mM dichloroacetate, during 72h. Results are expressed as relative to untransfected/untreated cells, arbitrary set to 100% (n=4 for HepaRG and n=3 for BC2). * p<0.05 in comparison to the siNT condition. # p<0.05 in comparison to the untreated siNT

condition and \$ $p < 0.05$ in comparison to untreated siPPARG condition. (C) Basal respiration, maximal respiration and proton leak assessed with Seahorse analyzer in HepaRG spheres treated by DCA during 4h. Results are expressed as relative to untreated HepaRG spheres, arbitrary set to 100% ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Viability of HepaRG and BC2 spheres treated with clofibrate (500 μ M) and dichloroacetate (50mM) alone and in combination. Results are expressed as relative to untreated cells, arbitrary set to 100% ($n=4$ for HepaRG and $n=3$ for BC2).

Fig. S1

(A) Phase-contrast microscopy of HepaRG cells during differentiation/retrodifferentiation. Bar=50 μ m. (B) Non-supervised gene set enrichment analysis (GSEA) plot from KEGG gene set database performed using the differentially expressed genes (DEG) between immature and differentiating HepaRG cell groups. (C) Basal and maximal respiration assessed with Seahorse analyzer. HepaRG were treated 24h with a glutamine antagonist (DON) or cultured in medium without glutamine ($n=3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in comparison with the sphere condition; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ in comparison with the progenitor condition. (D) Expression of JUN, FOS, CDKN1A, CDKN1B, CDK4, CCND1, CDK1 and CCNB1 (data obtained from the genome-wide expression profiling). Results are expressed as relative to HepaRG progenitors, arbitrary set to 1 ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fig. S2

Phase-contrast microscopy of BC2, Huh7, HepG2 and Huh6 in proliferative or differentiated stages (lower panel) and sphere conformation (upper panel); Bar=50 μ m. (B) PGC1A RNA expression assessed by RT-qPCR for HepaRG, BC2, Huh-7, HepG2 and Huh-6 cells at proliferative/differentiated stages or in sphere conformation. Results are expressed as relative

to differentiated cells for HepaRG and BC2 cell lines or relative to proliferative cells for Huh7, HepG2 and Huh6 cell lines, arbitrary set to 1 (n = 3). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (C) Overall survivals according PPARG/PPARA expression in the ICGC and Roessler cohorts (D) Correlation between PPARG/PPARA expression and AFP levels in the Roessler cohort.

Fig. S3

(A) Sphere number 72h after seeding of HepaRG cells transfected with siPPARG in sphere medium. Results are expressed as relative to siNon-targeting (siNT) HepaRG arbitrary set to 100% (n=3). * p<0.05. (B) Immunostaining of the mitochondrial protein TOM22 in HepaRG progenitors 72h after treatment with 50µM rosiglitazone or transfection by siPPARG. Image acquisition was performed by confocal microscopy. Bar=5µm. Mitochondrial network length and branching were analyzed using ImageJ software (n=3). *** p<0.001. (C) Left panel: PPAR γ expression assessed by western blot 24, 48 or 72h after transfection of HepaRG progenitors by 4 different siPPARG Right panel: PPAR γ expression assessed by western blot 72h after transfection of HepaRG progenitors by siPPARG-4(n=3). HSC70 protein was used as normalization protein. (D) Left panel: Phase-contrast microscopy of differentiated HepaRG cells; Right panel: production of peroxide and superoxide anion (reactive oxygen species) by differentiated HepaRG cells after DCA treatment during 2h, 24h, 48h and 72h, assessed using H2DCFDA or MitoSox®, respectively (n=3). * p<0.05, ** p<0.01. (E) Immunostaining of the mitochondrial protein TOM22 in HepaRG progenitors 48h and 72h after treatment with 100µM clofibrate. Image acquisition was performed by confocal microscopy. Bar=5µm. Mitochondrial network length and branching were analyzed using ImageJ software (n=3). * p<0.05.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Drs. L. Sulpice and D. Bergeat, Rennes University Hospital, for patient data, Drs. Mireille Desille and Bruno Turlin, CRB-Santé, Biosit, Biogenouest, Rennes, France. The authors also thank the “Genomique Santé”, “ImPACcell”, “flow cytometry”, “H2P2” Core facilities from Biogenouest, SFR Biosit, University of Rennes1.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Rennes 1, the «Ligue contre le cancer - Comités d'Ille-et-Vilaine, des Côtes d'Armor, de Loire Atlantique et de Vendée», and Institut National du Cancer (Grant n°12688).

References

- Allard, J., Bucher, S., Massart, J., Ferron, P.-J., Le Guillou, D., Loyant, R., Daniel, Y., Launay, Y., Buron, N., Begriche, K., Borgne-Sanchez, A., Fromenty, B., 2020. Drug-induced hepatic steatosis in absence of severe mitochondrial dysfunction in HepaRG cells: proof of multiple mechanism-based toxicity. *Cell Biol Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09537-1>
- Anthérieu, S., Rogue, A., Fromenty, B., Guillouzo, A., Robin, M.-A., 2011. Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in heparg cells. *Hepatology* 53, 1895–1905. <https://doi.org/10.1002/hep.24290>
- Bailey, A.P., Koster, G., Guillermier, C., Hirst, E.M.A., MacRae, J.I., Lechene, C.P., Postle, A.D., Gould, A.P., 2015. Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* 163, 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020>
- Boyault, S., Rickman, D.S., Reyniès, A. de, Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Hérault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., Bioulac-Sage, P., Laurent-Puig, P., Zucman-Rossi, J., 2007. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45, 42–52. <https://doi.org/10.1002/hep.21467>
- Byrne, F.L., Poon, I.K.H., Modesitt, S.C., Tomsig, J.L., Chow, J.D.Y., Healy, M.E., Baker, W.D., Atkins, K.A., Lancaster, J.M., Marchion, D.C., Moley, K.H., Ravichandran, K.S., Slack-Davis, J.K., Hoehn, K.L., 2014. Metabolic Vulnerabilities in Endometrial Cancer. *Cancer Res* 74, 5832–5845. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0254>
- Cabillic, F., Corlu, A., 2016. Regulation of Transdifferentiation and Retrodifferentiation by Inflammatory Cytokines in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 151, 607–615. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.052>
- Calvo, S.E., Clauser, K.R., Mootha, V.K., 2016. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research* 44, D1251–D1257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003>

Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A., 2007. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 45, 957–967. <https://doi.org/10.1002/hep.21536>

Chan, L.-K., Tsui, Y.-M., Ho, D.W.-H., Ng, I.O.-L., 2021. Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.02.015>

Chen, C.-L., Uthaya Kumar, D.B., Punj, V., Xu, J., Sher, L., Tahara, S.M., Hess, S., Machida, K., 2016. NANOG metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism. *Cell Metab* 23, 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.004>

Chen, H., Chan, D.C., 2017. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metabolism* 26, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.016>

Chiang, D.Y., Villanueva, A., Hoshida, Y., Peix, J., Newell, P., Minguez, B., LeBlanc, A.C., Donovan, D.J., Thung, S.N., Solé, M., Tovar, V., Alsinet, C., Ramos, A.H., Barretina, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Waxman, S., Bruix, J., Mazzaferro, V., Ligon, A.H., Najfeld, V., Friedman, S.L., Sellers, W.R., Meyerson, M., Llovet, J.M., 2008. Focal Gains of VEGFA and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 68, 6779–6788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0742>

De Francesco, E.M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2018. Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication. *Biochem J* 475, 1611–1634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170164>

Désert, R., Rohart, F., Canal, F., Sicard, M., Desille, M., Renaud, S., Turlin, B., Bellaud, P., Perret, C., Clément, B., Cao, K.-A.L., Musso, O., 2017. Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection. *Hepatology* 66, 1502–1518. <https://doi.org/10.1002/hep.29254>

Dong, C., Yuan, T., Wu, Y., Wang, Y., Fan, T.W.M., Miriyala, S., Lin, Y., Yao, J., Shi, J., Kang, T., Lorkiewicz, P., St Clair, D., Hung, M.-C., Evers, B.M., Zhou, B.P., 2013. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 23, 316–331. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.022>

Drouin, G., Catheline, D., Guillocheau, E., Gueret, P., Baudry, C., Le Ruyet, P., Rioux, V., Legrand, P., 2019. Comparative effects of dietary n-3 docosapentaenoic acid (DPA), DHA and EPA on plasma lipid parameters, oxidative status and fatty acid tissue composition. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 63, 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.029>

Dubois Pot Schneider, H., Fekir, K., Coulouarn, C., Glaise, D., Aninat, C., Jarnouen, K., Guével, R.L., Kubo, T., Ishida, S., Morel, F., Corlu, A., 2014. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology* 60, 2077–2090. <https://doi.org/10.1002/hep.27353>

Fekir, K., Dubois-Pot-Schneider, H., Désert, R., Daniel, Y., Glaise, D., Rauch, C., Morel, F., Fromenty, B., Musso, O., Cabillic, F., Corlu, A., 2019. Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance. *Cancer Res* 79, 1869–1883. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2110>

Firtina Karagonlar, Z., Akbari, S., Karabicici, M., Sahin, E., Tercan Avci, S., Ersoy, N., Eren Ates, K., Balli, T., Karacicek, B., Kaplan, K.N., Celiker, C., Atabey, N., Erdal, E., 2020. A Novel Function for KLF4 in Modulating the De-Differentiation of EpCAM⁻/CD133⁻ nonStem Cells into EpCAM⁺/CD133⁺ Liver Cancer Stem Cells in HCC Cell Line HuH7. *Cells* 9, 1198. <https://doi.org/10.3390/cells9051198>

Gammon, L., Biddle, A., Heywood, H.K., Johannessen, A.C., Mackenzie, I.C., 2013. Sub-Sets of Cancer Stem Cells Differ Intrinsically in Their Patterns of Oxygen Metabolism. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062493>

Garcia, C., Guillocheau, E., Richard, L., Drouin, G., Catheline, D., Legrand, P., Rioux, V., 2018. Conversion of dietary trans-vaccenic acid to trans11,cis13-conjugated linoleic acid in the rat lactating mammary gland by Fatty Acid Desaturase 3-catalyzed methyl-end Δ 13-desaturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 505, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.132>

Giampietri, C., Petrunaro, S., Cordella, M., Tabolacci, C., Tomaipitnca, L., Facchiano, A., Eramo, A., Filippini, A., Facchiano, F., Ziparo, E., 2017. Lipid Storage and Autophagy in Melanoma Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1271. <https://doi.org/10.3390/ijms18061271>

Glaise, D., Ilyin, G.P., Loyer, P., Cariou, S., Bilodeau, M., Lucas, J., Puisieux, A., Ozturk, M., Guguen-Guillouzo, C., 1998. Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell lines. *Cell Growth & Differentiation* 9, 165.

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Seyec, J.L., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *PNAS* 99, 15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>

Guillocheau, E., Garcia, C., Drouin, G., Richard, L., Catheline, D., Legrand, P., Rioux, V., 2019. Retroconversion of dietary trans-vaccenic (trans-C18:1 n-7) acid to trans-palmitoleic acid (trans-C16:1 n-7): proof of concept and quantification in both cultured rat hepatocytes and pregnant rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 63, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.010>

Hershey, B.J., Vazzana, R., Joppi, D.L., Havas, K.M., 2020. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. *Journal of Clinical Medicine* 9, 87. <https://doi.org/10.3390/jcm9010087>

Hong, F., Pan, S., Guo, Y., Xu, P., Zhai, Y., 2019. PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* 24, 2545. <https://doi.org/10.3390/molecules24142545>

Hoshida, Y., Nijman, S.M.B., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.-P., Chiang, D.Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Gabriel, S., Friedman, S.L., Kumada, H., Llovet, J.M., Golub, T.R., 2009. Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 69, 7385–7392. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1089>

Jiang, X., Stockwell, B.R., Conrad, M., 2021. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 266–282. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>

Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E., 2021. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci* 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>

Kobayashi, C.I., Suda, T., 2012. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *Journal of Cellular Physiology* 227, 421–430. <https://doi.org/10.1002/jcp.22764>

Koopman, W.J.H., Verkaart, S., Visch, H.-J., Westhuizen, F.H. van der, Murphy, M.P., Heuvel, L.W.P.J. van den, Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2005. Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂^{•-}-mediated mitochondrial outgrowth. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 288, C1440–C1450. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00607.2004>

Lee, J.-S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I.-S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D.F., Mikaelyan, A., Roberts, L.R., Demetris, A.J., Sun, Z., Nevens, F., Roskams, T., Thorgeirsson, S.S., 2006. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nature Medicine* 12, 410–416. <https://doi.org/10.1038/nm1377>

Li, J., Condello, S., Thomes-Pepin, J., Ma, X., Xia, Y., Hurley, T.D., Matei, D., Cheng, J.-X., 2017. Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell* 20, 303-314.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.004>

Li, X., Zhao, Q., Qi, J., Wang, W., Zhang, D., Li, Z., Qin, C., 2018. lncRNA Ftx promotes aerobic glycolysis and tumor progression through the PPAR γ pathway in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 53, 551–566. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4418>

Meacham, C.E., Morrison, S.J., 2013. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328–337. <https://doi.org/10.1038/nature12624>

Mello, T., Materozzi, M., Galli, A., 2016. PPARs and Mitochondrial Metabolism: From NAFLD to HCC. *PPAR Research* 2016, e7403230. <https://doi.org/10.1155/2016/7403230>

Menendez, J.A., Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., Alarcón, T., 2014. Metabostemness: Metaboloepigenetic reprogramming of cancer stem-cell functions. *Oncoscience* 1, 803–806.

Nault, J.C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., Zucman-Rossi, J., 2013. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* 4, 2218. <https://doi.org/10.1038/ncomms3218>

Patitucci, C., Couchy, G., Bagattin, A., Cañeque, T., de Reyniès, A., Scoazec, J.-Y., Rodriguez, R., Pontoglio, M., Zucman-Rossi, J., Pende, M., Panasyuk, G., 2017a. Hepatocyte nuclear factor 1 α suppresses steatosis-associated liver cancer by inhibiting PPAR γ transcription. *J Clin Invest* 127, 1873–1888. <https://doi.org/10.1172/JCI90327>

Patitucci, C., Couchy, G., Bagattin, A., Cañeque, T., de Reyniès, A., Scoazec, J.-Y., Rodriguez, R., Pontoglio, M., Zucman-Rossi, J., Pende, M., Panasyuk, G., 2017b. Hepatocyte nuclear factor 1 α suppresses steatosis-associated liver cancer by inhibiting PPAR γ transcription. *J Clin Invest* 127, 1873–1888. <https://doi.org/10.1172/JCI90327>

Rioux, V., Pédrone, F., Blanchard, H., Duby, C., Boulier-Monthéan, N., Bernard, L., Beauchamp, E., Catheline, D., Legrand, P., 2013. Trans-vaccenate is Δ 13-desaturated by FADS3 in rodents. *Journal of Lipid Research* 54, 3438–3452. <https://doi.org/10.1194/jlr.M042572>

Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., Mortensen, R.M., 1999. PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell* 4, 611–617. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80211-7)

Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., Capaldi, R.A., 2004. Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Res* 64, 985–993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1101>

Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Veldhoven, P.P.V., Waltregny, D., Daniëls, V.W., Machiels, J., Vanderhoydonc, F., Smans, K., Waelkens, E., Verhoeven, G., Swinnen, J.V., 2010. De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res* 70, 8117–8126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3871>

Schneller, D., Angel, P., 2019. Cellular Origin of Hepatocellular Carcinoma, in: Tirnitz-Parker, J.E.E. (Ed.), *Hepatocellular Carcinoma*. Codon Publications, Brisbane (AU).

Senni, N., Savall, M., Granados, D.C., Alves-Guerra, M.-C., Sartor, C., Lagoutte, I., Gougelet, A., Terris, B., Gilgenkrantz, H., Perret, C., Colnot, S., Bossard, P., 2019. β -catenin-activated hepatocellular carcinomas are addicted to fatty acids. *Gut* 68, 322–334. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315448>

Shen, B., Chu, E.S.H., Zhao, G., Man, K., Wu, C.-W., Cheng, J.T.Y., Li, G., Nie, Y., Lo, C.M., Teoh, N., Farrell, G.C., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2012. PPAR γ inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. *Br J Cancer* 106, 1486–1494. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.130>

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., Sadek, H.A., 2010. The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell* 7, 380–390. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.011>

Song, X., Liu, J., Kuang, F., Chen, X., Zeh, H.J., Kang, R., Kroemer, G., Xie, Y., Tang, D., 2021. PDK4 dictates metabolic resistance to ferroptosis by suppressing pyruvate oxidation and fatty acid synthesis. *Cell Reports* 34. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108767>

Thorgeirsson, S.S., 2017. Stemness in Liver Cancer. *DDI* 35, 387–389. <https://doi.org/10.1159/000456592>

Tirinato, L., Liberale, C., Di Franco, S., Candeloro, P., Benfante, A., La Rocca, R., Potze, L., Marotta, R., Ruffilli, R., Rajamanickam, V.P., Malerba, M., De Angelis, F., Falqui, A., Carbone, E., Todaro, M., Medema, J.P., Stassi, G., Di Fabrizio, E., 2015. Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells Unveiled by Spectroscopic Imaging. *Stem Cells* 33, 35–44. <https://doi.org/10.1002/stem.1837>

To, J.C., Chiu, A.P., Tschida, B.R., Lo, L.H., Chiu, C.H., Li, X.-X., Kuka, T.P., Linden, M.A., Amin, K., Chan, W.-C., Bell, J.B., Moriarity, B.S., Largaespada, D.A., Keng, V.W., 2020. ZBTB20 regulates WNT/CTNNB1 signalling pathway by suppressing PPARG during hepatocellular carcinoma tumourigenesis. *JHEP Rep* 3, 100223. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100223>

Turdo, A., Veschi, V., Gaggianesi, M., Chinnici, A., Bianca, P., Todaro, M., Stassi, G., 2019. Meeting the Challenge of Targeting Cancer Stem Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00016>

Visweswaran, M., Arfuso, F., Warriar, S., Dharmarajan, A., 2020. Aberrant lipid metabolism as an emerging therapeutic strategy to target cancer stem cells. *STEM CELLS* 38, 6–14. <https://doi.org/10.1002/stem.3101>

Volmer, R., van der Ploeg, K., Ron, D., 2013. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4628–4633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217611110>

- Wang, K., Zhang, T., Dong, Q., Nice, E.C., Huang, C., Wei, Y., 2013. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death Dis* 4, e537–e537. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.50>
- Wang, Z., Park, H.G., Wang, D.H., Kitano, R., Kothapalli, K.S.D., Brenna, J.T., 2020. Fatty acid desaturase 2 (FADS2) but not FADS1 desaturates branched chain and odd chain saturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865, 158572. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158572>
- Welte, M.A., Gould, A.P., 2017. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Recent Advances in Lipid Droplet Biology* 1862, 1260–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006>
- Xiao, Y., Cai, S., Liu, L., Yang, X., Yun, J., 2018. Decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha indicates unfavorable outcomes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res* 10, 1781–1789. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S166971>
- Yang, C., Huang, X., Liu, Z., Qin, W., Wang, C., 2020. Metabolism-associated molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Mol Oncol* 14, 896–913. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12639>
- Yu, J., Qiao, L., Zimmermann, L., Ebert, M.P.A., Zhang, H., Lin, W., Röcken, C., Malfertheiner, P., Farrell, G.C., 2006. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Hepatology* 43, 134–143. <https://doi.org/10.1002/hep.20994>
- Yu, J., Shen, B., Chu, E.S.H., Teoh, N., Cheung, K.-F., Wu, C.-W., Wang, S., Lam, C.N.Y., Feng, H., Zhao, J., Cheng, A.S.L., To, K.-F., Chan, H.L.Y., Sung, J.J.Y., 2010. Inhibitory role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro. *Hepatology* 51, 2008–2019. <https://doi.org/10.1002/hep.23550>
- Zuo, Q., He, J., Zhang, S., Wang, H., Jin, G., Jin, H., Cheng, Z., Tao, X., Yu, C., Li, B., Yang, C., Wang, S., Lv, Y., Zhao, F., Yao, M., Cong, W., Wang, C., Qin, W., 2021. PPAR γ

Coactivator-1 α Suppresses Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting Warburg Effect by PPAR γ -Dependent WNT/ β -Catenin/Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isozyme 1 Axis. *Hepatology* 73, 644–660. <https://doi.org/10.1002/hep.31280>

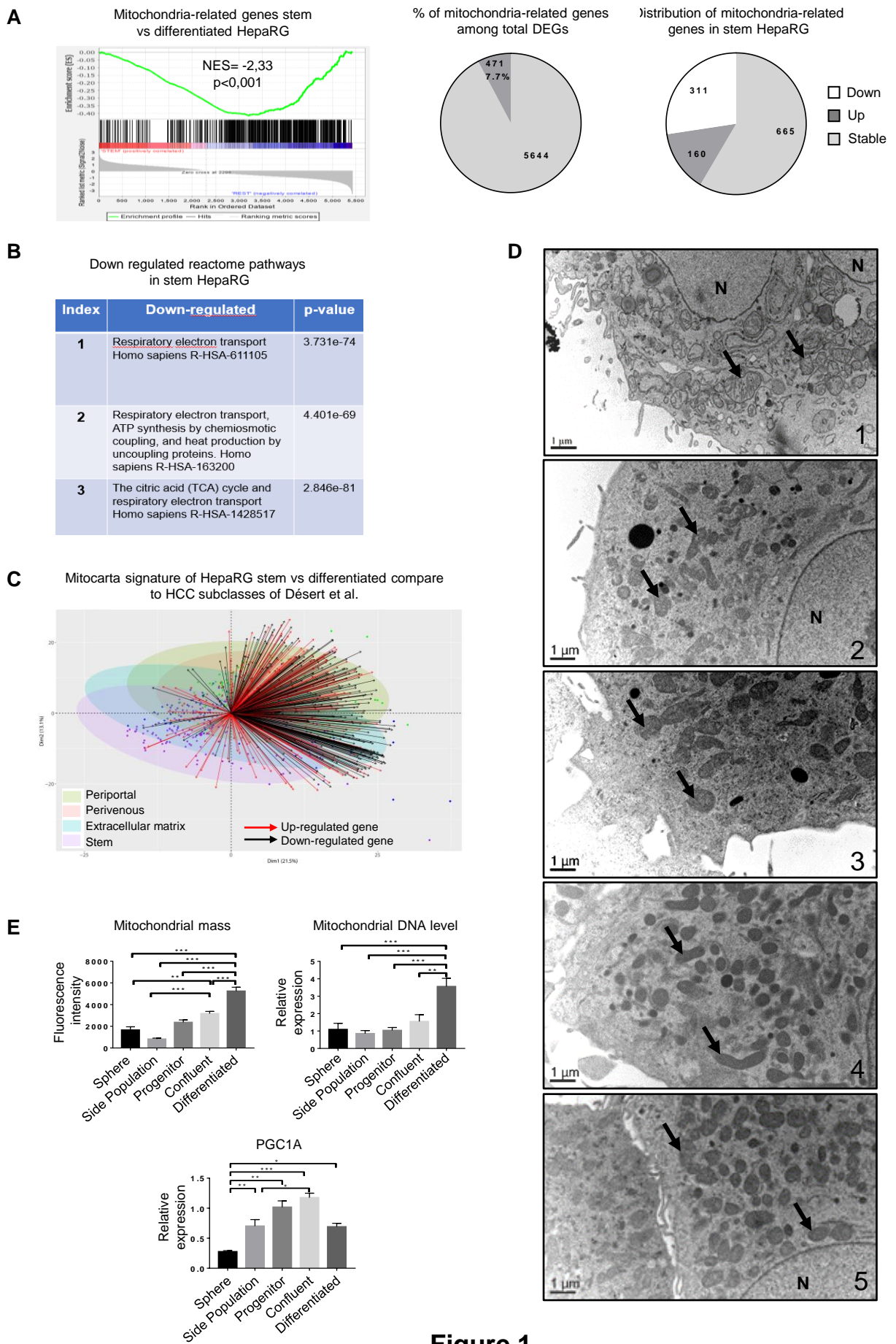


Figure 1

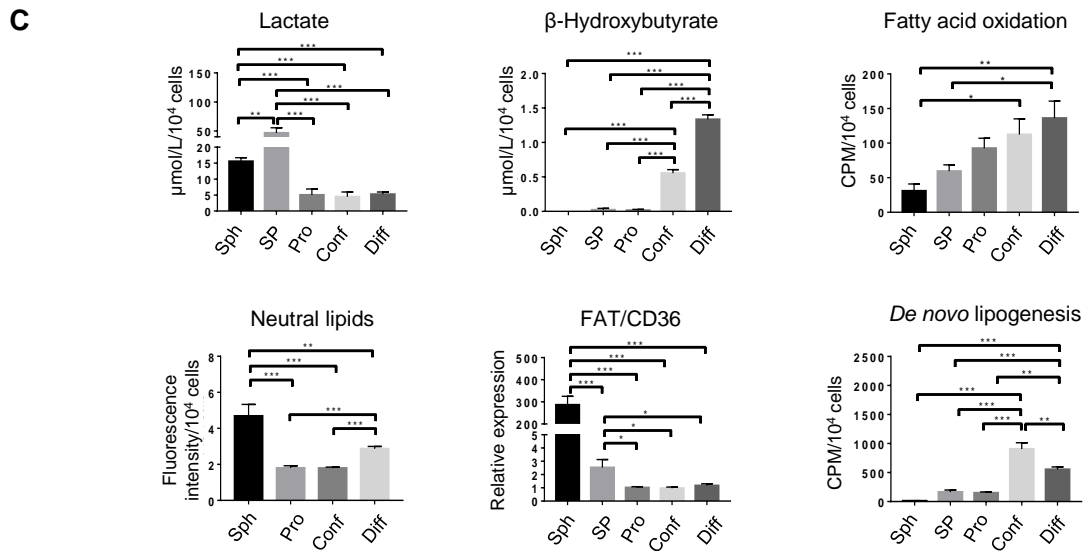
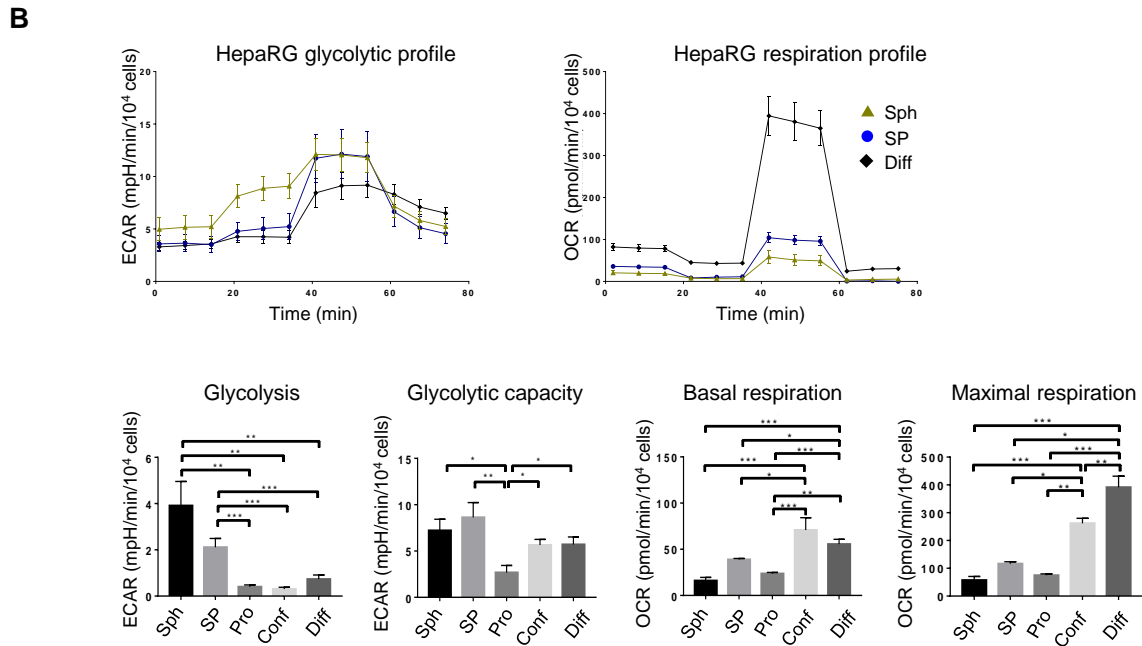
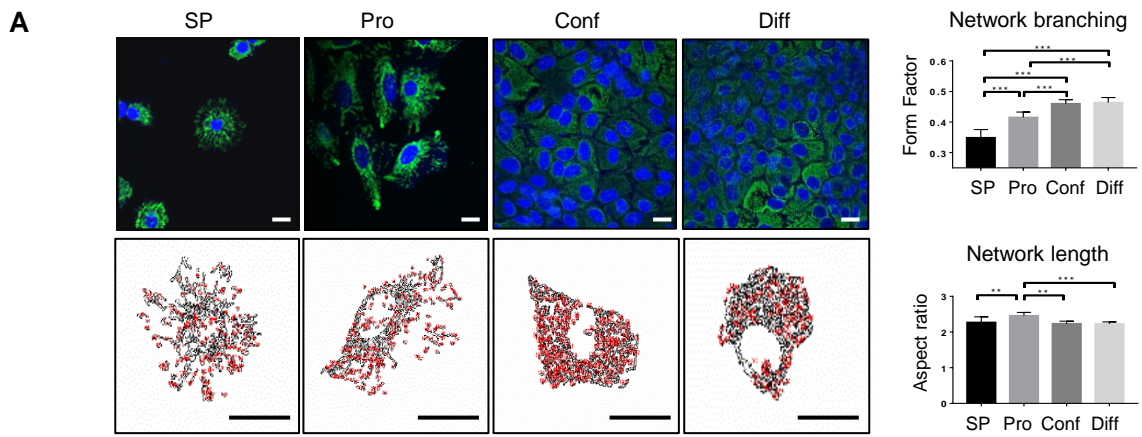


Figure 2

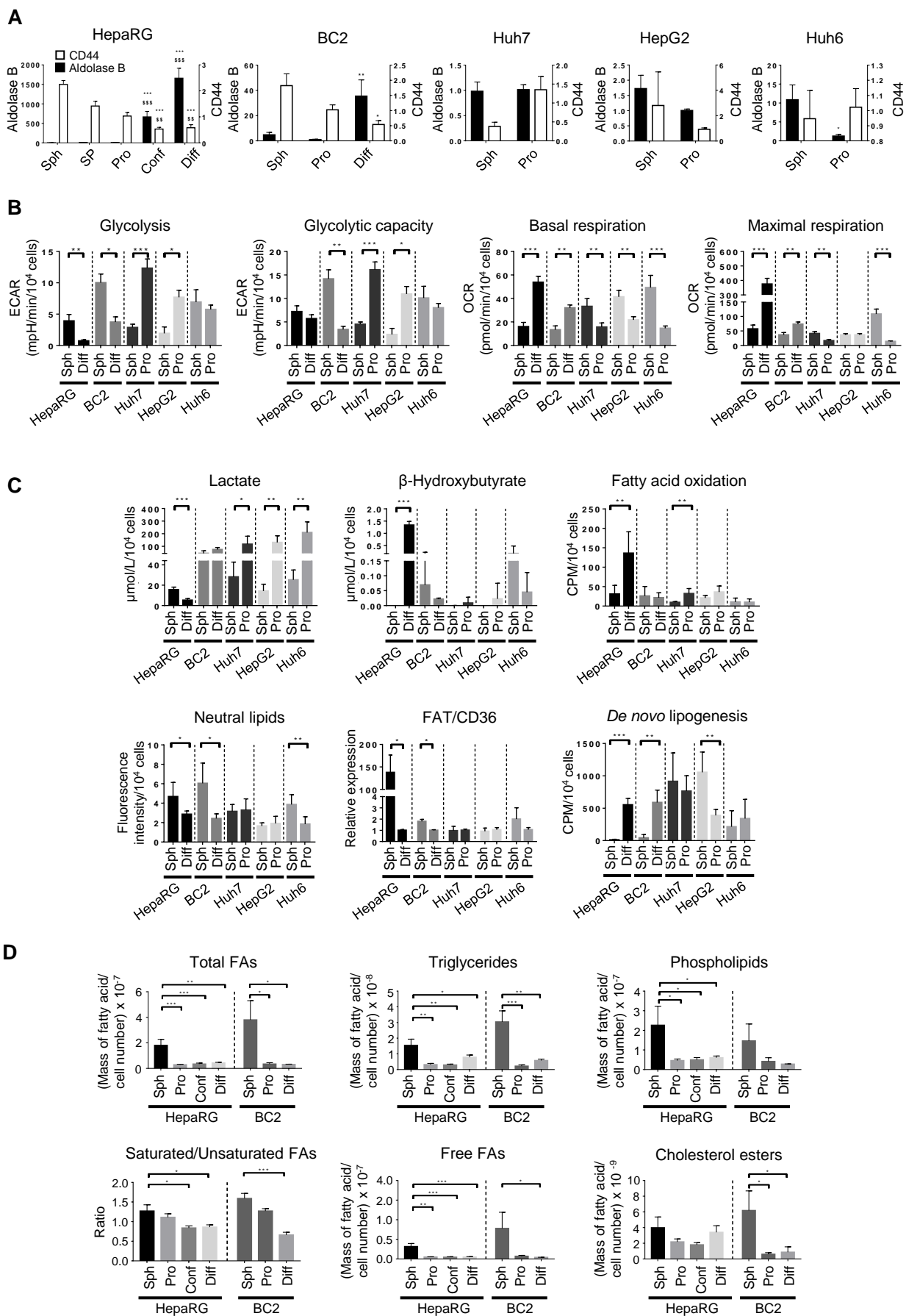


Figure 3

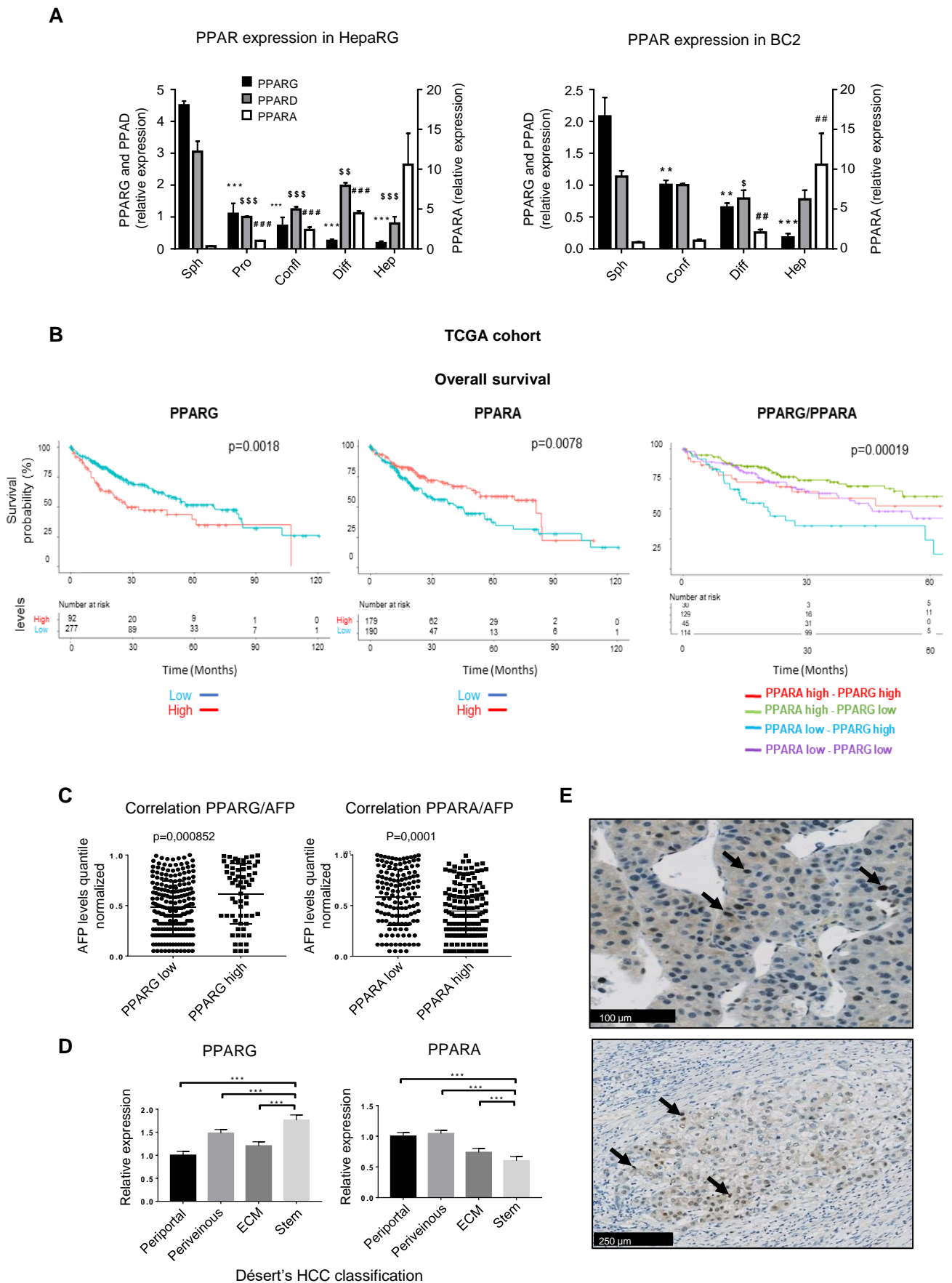


Figure 4

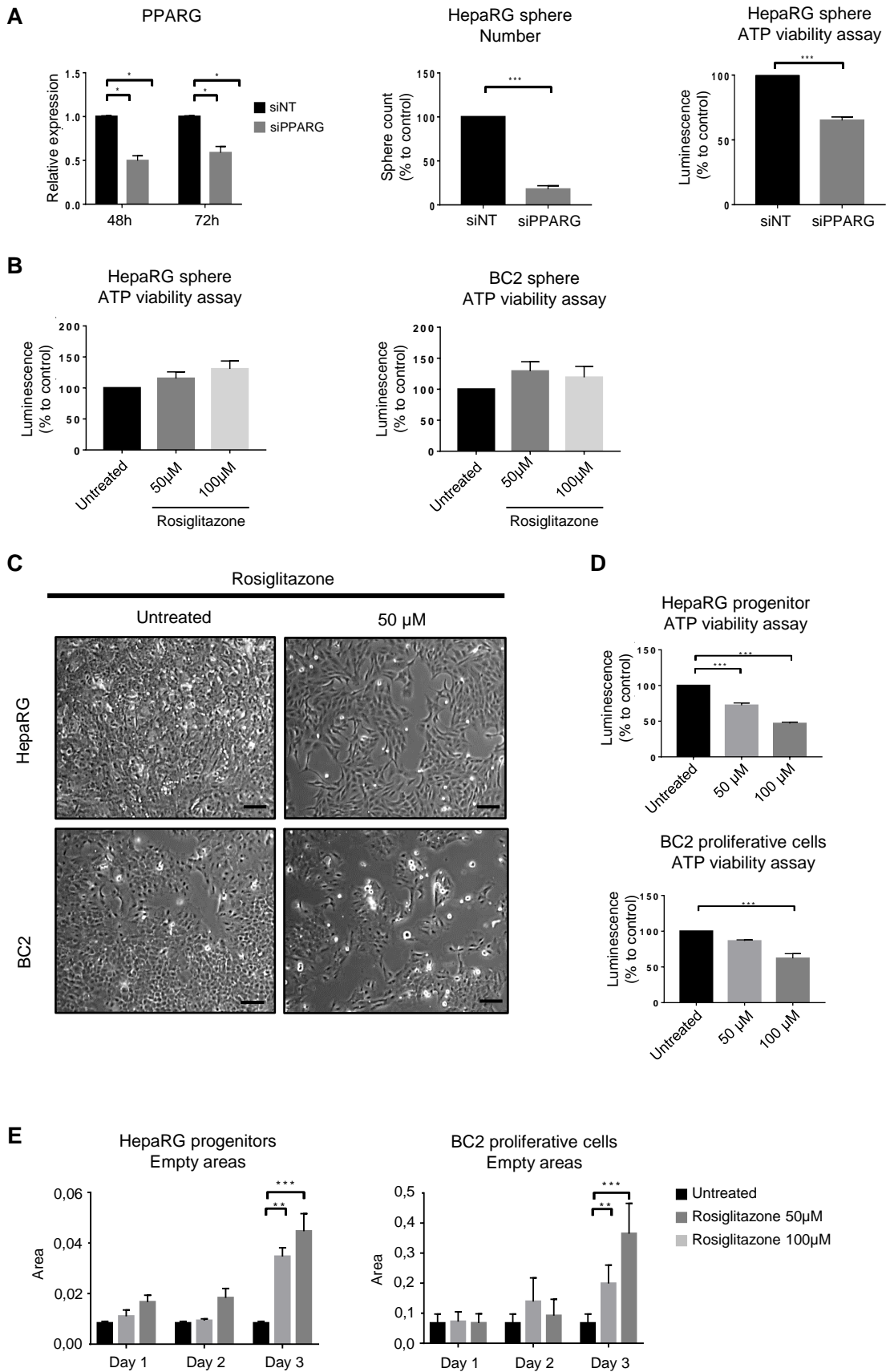


Figure 5

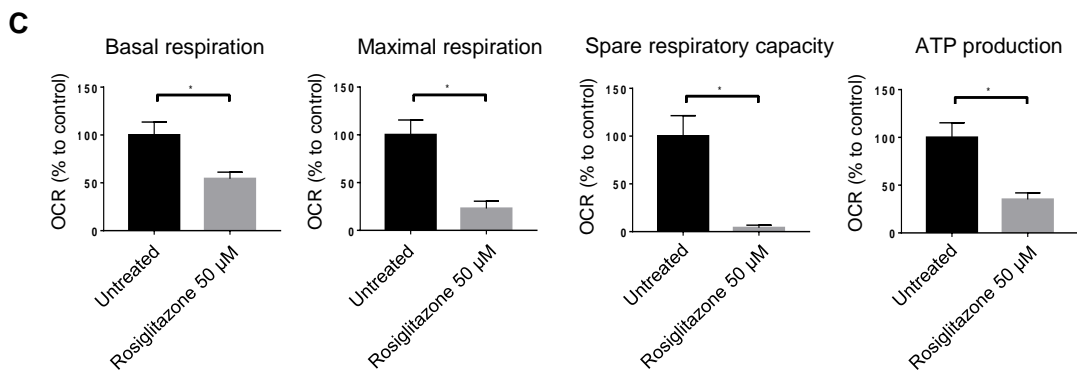
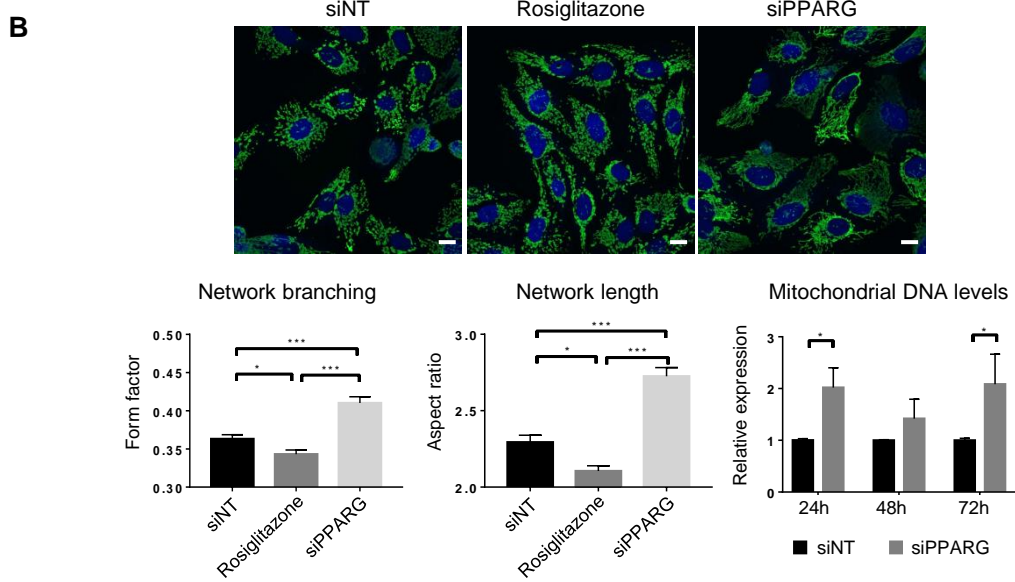
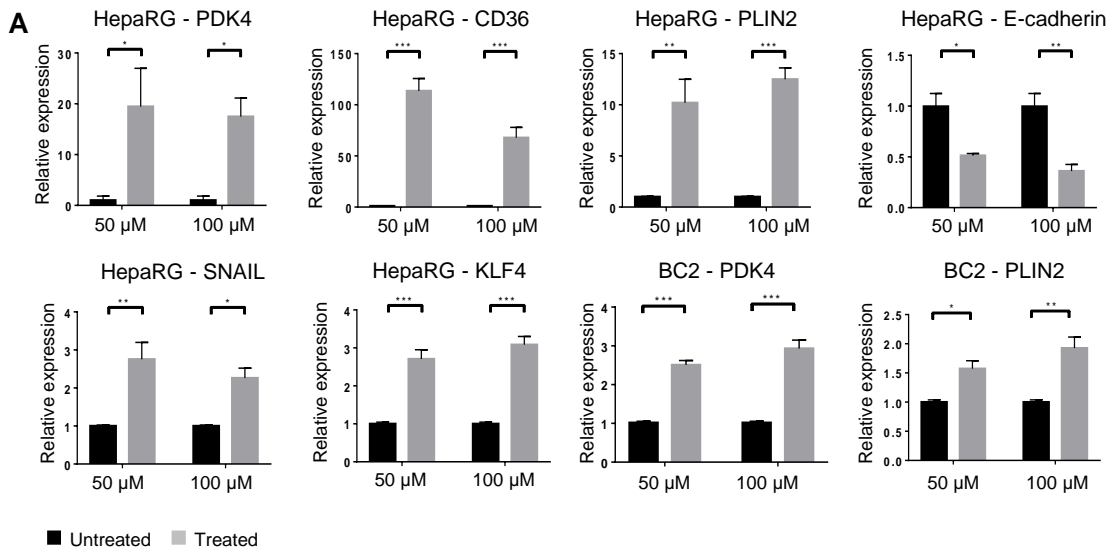


Figure 6

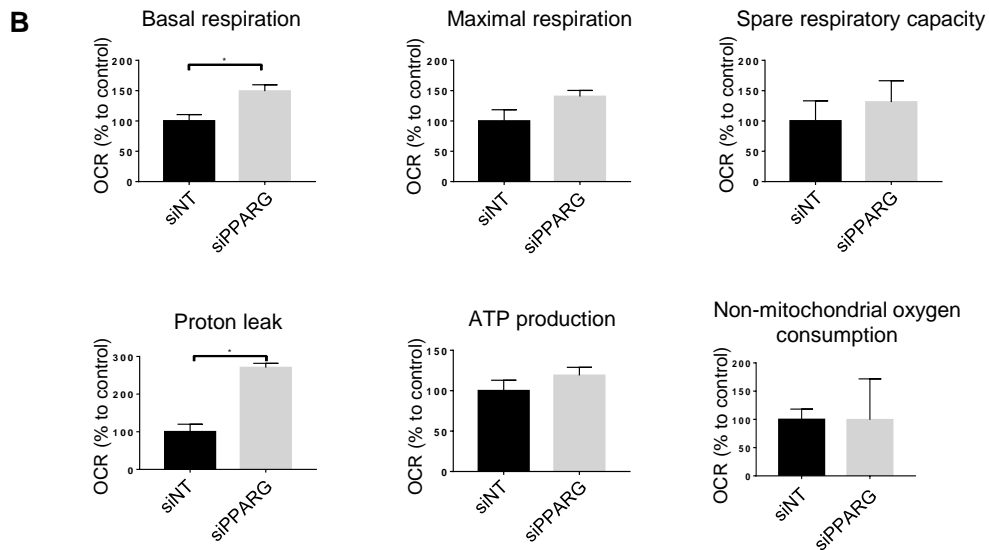
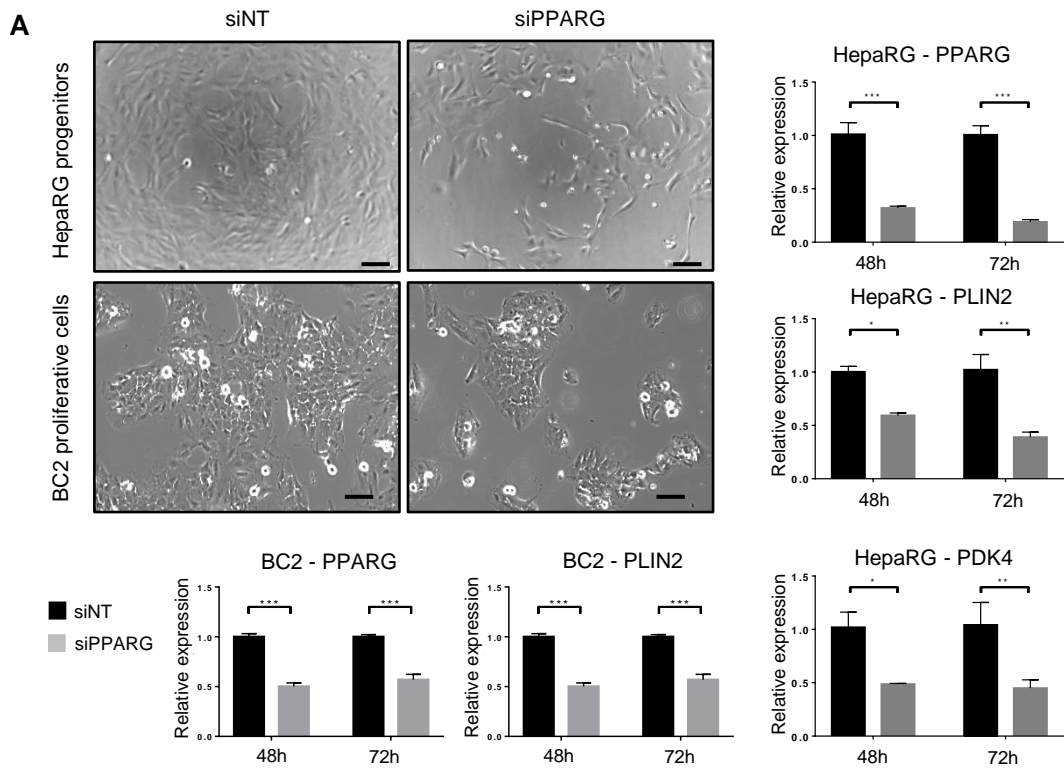


Figure 7

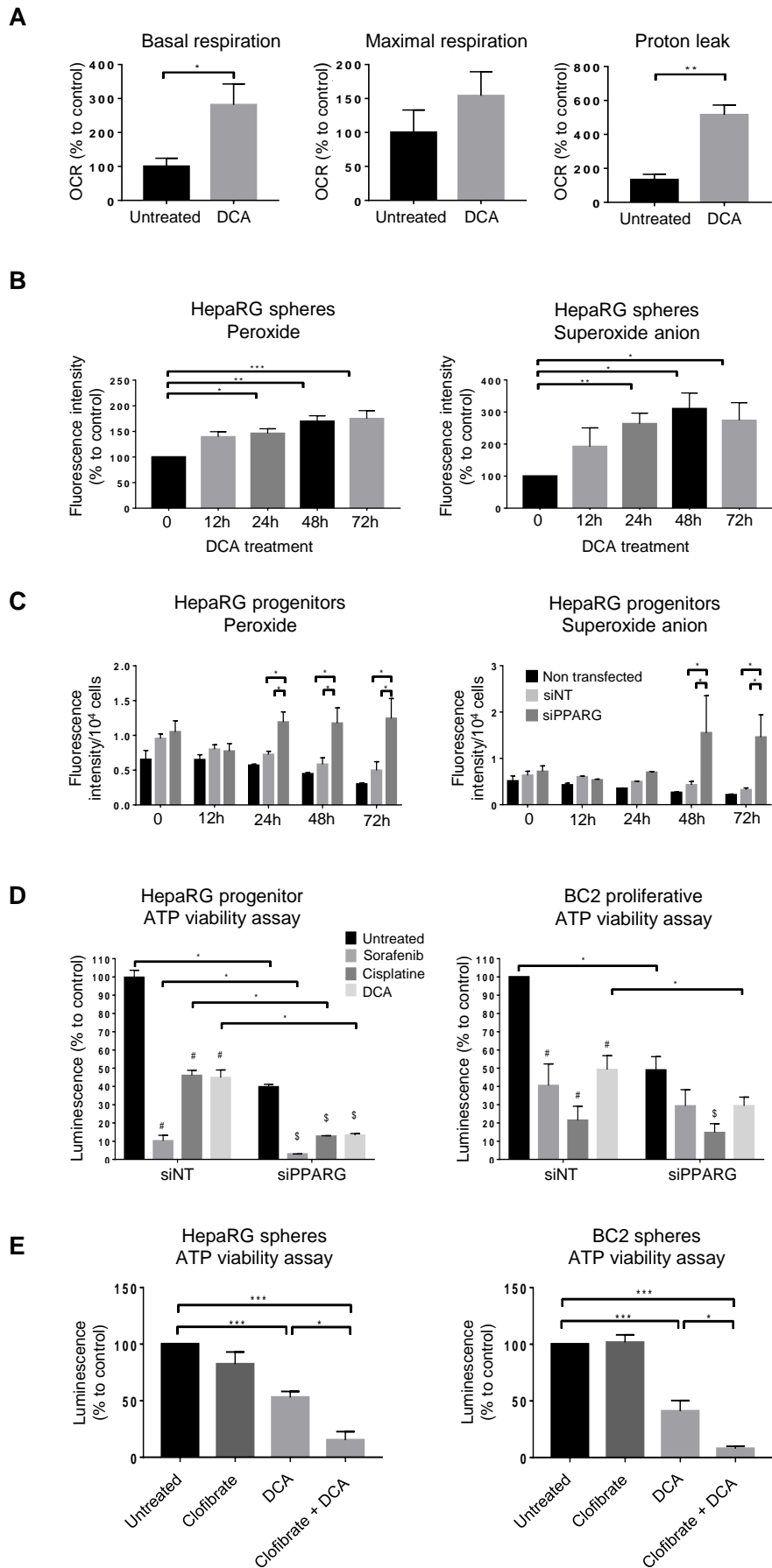
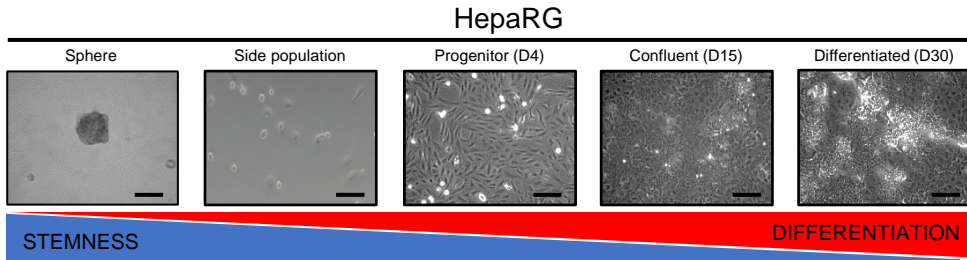
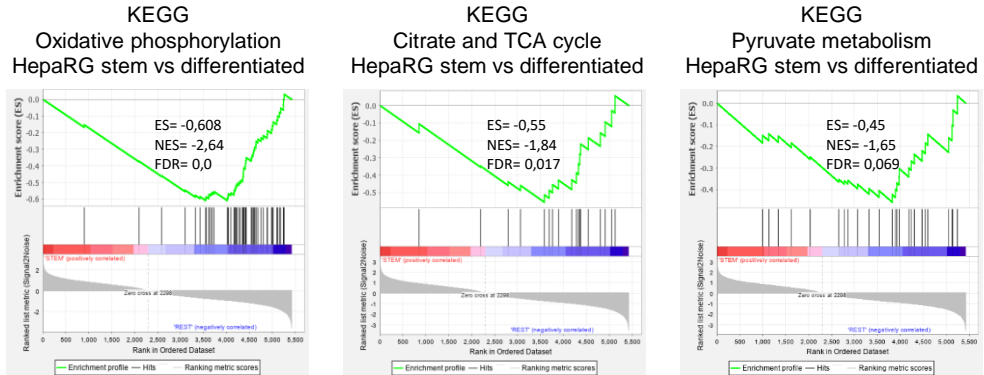


Figure 8

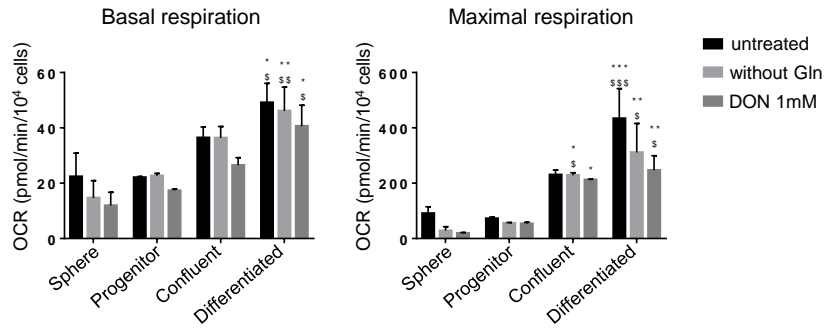
A



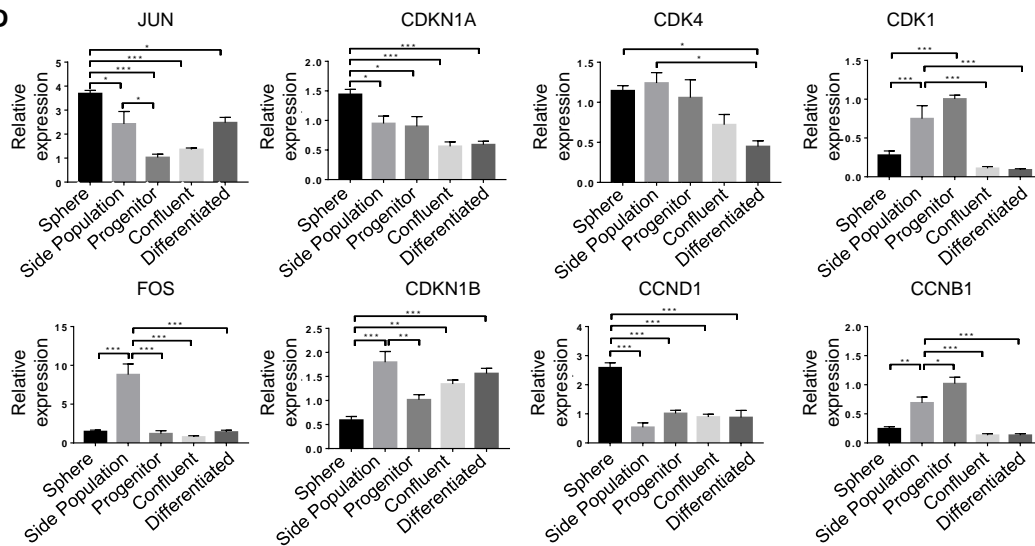
B



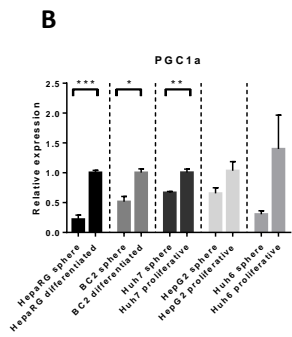
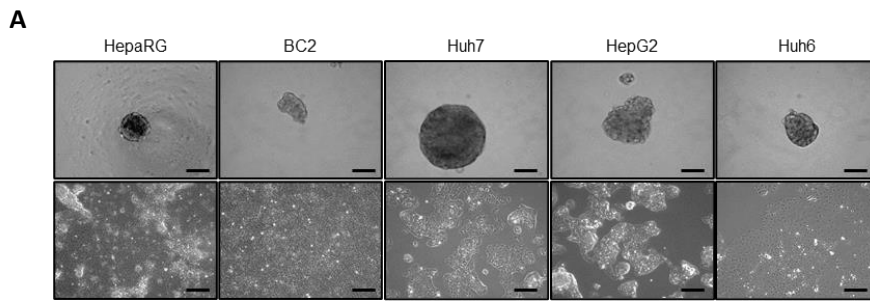
C



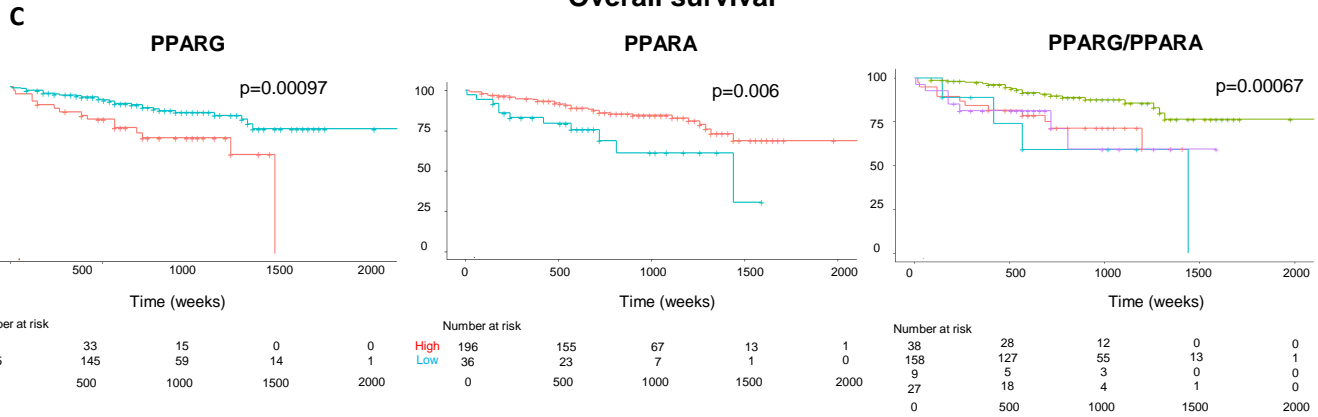
D



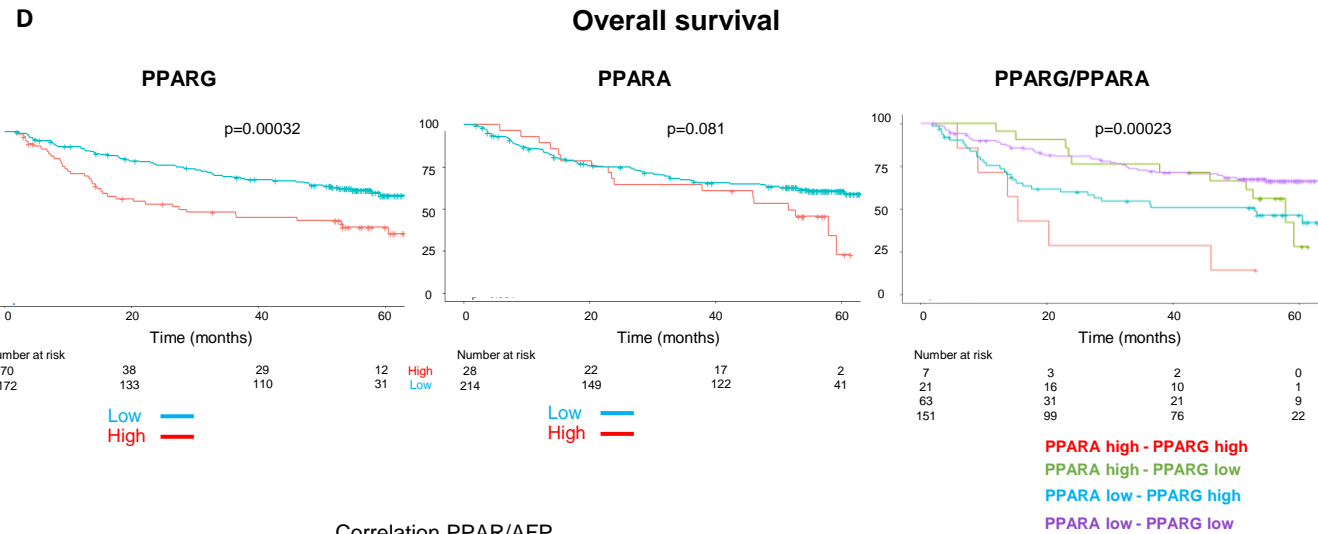
Supporting Figure 1



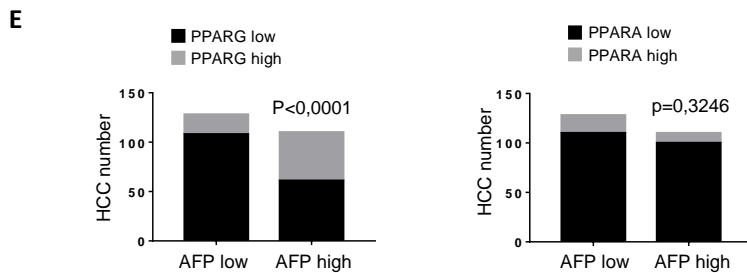
ICGC Overall survival

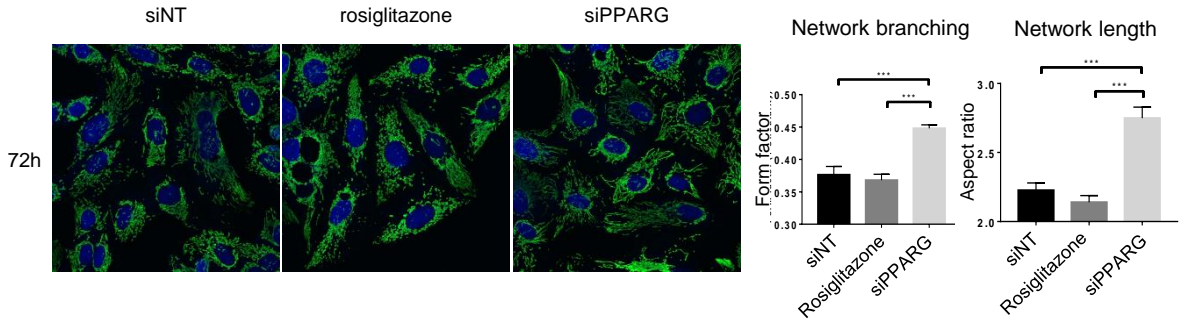
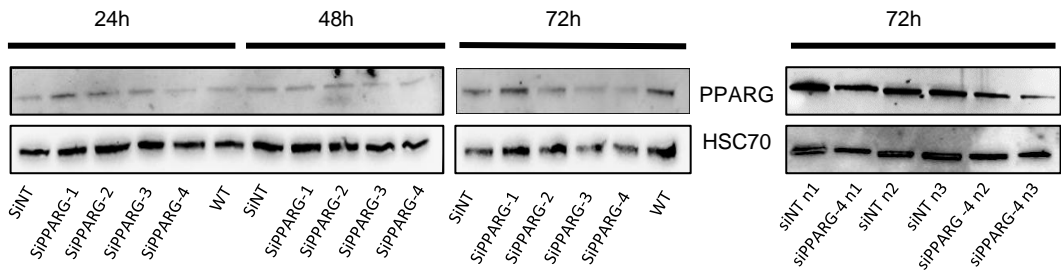
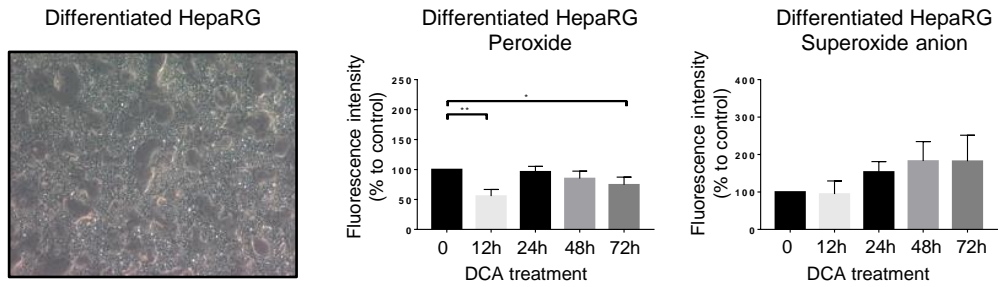
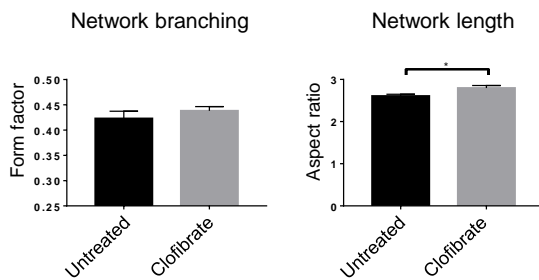


Roessler Overall survival



Correlation PPAR/AFP



A**B****C****D****Supporting Figure 3**

Supporting Table 2:

List of 471 mitocarta 3.0 genes significantly deregulated between Stem HepaRG cells and Differentiated HepaRG

Gene Symbol	GeneName	FC ([D4] vs [STEM])	FC ([D15] vs [STEM])	FC ([D30] vs [STEM])
AARS2	alanyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	-1,58	-2,04	-2,42
AASS	aminoadipate-semialdehyde synthase	1,66	4,08	13,74
ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	1,33	9,19	22,99
ABCA9	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9	-3,46	-2,80	-2,76
ABCB10	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10	1,24	1,25	1,68
ACAA1	acetyl-CoA acyltransferase 1	1,27	3,20	8,00
ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	-1,43	1,48	2,33
ACACB	acetyl-CoA carboxylase beta	-1,11	3,33	4,70
ACAD10	acyl-CoA dehydrogenase family, member 10	1,94	2,45	2,95
ACAD11	acyl-CoA dehydrogenase family, member 11	-1,73	2,40	2,90
ACADL	acyl-CoA dehydrogenase, long chain	2,40	6,68	4,63
ACADM	acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	-1,01	1,69	1,75
ACADSB	acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain	1,65	4,05	4,23
ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	-2,06	-1,30	-1,27
ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	-1,04	1,67	2,52
ACLY	ATP citrate lyase	-1,51	-2,36	-2,26
ACO2	aconitase 2, mitochondrial	1,72	2,47	1,82
ACOT13	acyl-CoA thioesterase 13	1,45	1,63	2,01
ACOT9	acyl-CoA thioesterase 9	1,14	-1,42	-1,93
ACSF2	acyl-CoA synthetase family member 2	1,08	3,08	1,53
ACSM2B	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2B	-1,31	24,23	398,07
ACSM3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	-1,43	4,30	4,18
ACSM5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5	1,33	3,88	5,89
ACSS1	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	3,90	29,42	11,23
ADHFE1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	-1,30	3,77	4,60
AGMAT	agmatine ureohydrolase (agmatinase)	-1,70	2,12	2,38
AGPAT4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4	-1,26	-3,17	-5,97
AGXT	alanine-glyoxylate aminotransferase	-3,72	16,74	128,50
AGXT2	alanine--glyoxylate aminotransferase 2	-1,84	40,46	121,84
AIFM1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1	1,33	2,19	2,47
AIFM2	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2	1,49	1,63	1,15
AK2	adenylate kinase 2	1,20	1,58	3,03
AK3	adenylate kinase 3	1,22	1,86	1,98
AK4	adenylate kinase 4	-1,00	1,20	2,22

AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	-3,25	-1,79	-1,14
AKR7A2	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)	1,51	1,65	2,72
ALDH1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	1,75	8,02	23,00
ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	-2,44	2,01	6,03
ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	-1,36	-1,27	1,71
ALDH4A1	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1	1,48	3,77	4,36
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	1,19	2,89	5,88
ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	-1,02	4,88	9,43
ALDH7A1	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	3,88	3,94	5,73
ALDH9A1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	1,27	1,71	2,22
ALKBH7	alkB, alkylation repair homolog 7 (E. coli)	1,63	1,78	1,57
AMACR	alpha-methylacyl-CoA racemase	-1,08	1,24	2,29
APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	-1,10	-1,11	-1,75
APOO	apolipoprotein O	1,48	1,57	1,13
APOOL	apolipoprotein O-like	1,52	1,46	1,90
ARF5	ADP-ribosylation factor 5	1,36	1,30	1,71
ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B	-2,00	-2,20	-2,93
ATPAF2	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	-1,09	1,10	1,77
AUH	AU RNA binding protein/enoyl-CoA hydratase	1,24	2,27	2,91
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	1,29	1,14	-1,71
BAX	BCL2-associated X protein	1,24	-1,49	-2,93
BBC3	BCL2 binding component 3	-1,07	-1,26	-1,90
BCAT2	branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial	1,31	2,20	3,03
BCKDHA	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	1,12	1,88	1,74
BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	-1,07	1,81	2,80
BCL2L1	BCL2-like 1	-1,09	-1,56	-2,45
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-1,34	1,44	2,25
BCL2L2	BCL2-like 2	-1,45	-1,63	-1,73
BCO2	beta-carotene oxygenase 2	-1,36	5,91	3,60
BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	-13,91	13,61	43,51
BID	BH3 interacting domain death agonist	-1,01	-1,30	-2,50
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	1,37	1,98	2,71
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	-1,35	-1,71	-1,22
BOLA1	bolA family member 1	1,27	1,79	1,69
BPHL	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase)	-1,47	1,55	1,78
C15orf61	chromosome 15 open reading frame 61	2,22	2,34	2,29
C2orf69	chromosome 2 open reading frame 69	1,26	1,25	2,19
C5orf63	chromosome 5 open reading frame 63	-1,79	-2,23	1,15

C6orf13 6	chromosome 6 open reading frame 136	1,20	1,78	1,56
C8orf82	chromosome 8 open reading frame 82	1,33	1,53	-1,06
CARS2	cysteinyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)	1,55	1,30	1,00
CAT	catalase	-1,93	1,17	3,27
CBR4	carbonyl reductase 4	1,02	2,01	2,65
CCDC5 1	coiled-coil domain containing 51	1,59	1,37	-1,31
CHCH D10	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	1,36	2,12	1,30
CHCH D4	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4	1,81	1,88	1,43
CHCH D7	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7	2,01	1,48	2,69
CHDH	choline dehydrogenase	-2,66	-1,26	1,27
CHPT1	choline phosphotransferase 1	1,57	1,96	4,65
CISD1	CDGSH iron sulfur domain 1	1,70	1,89	1,50
CKMT1 A	creatine kinase, mitochondrial 1A	1,60	1,81	-2,94
CLPB	ClpB caseinolytic peptidase B homolog (E. coli)	-1,56	-1,45	1,04
CLYBL	citrate lyase beta like	1,05	2,13	3,02
CMC1	C-x(9)-C motif containing 1	1,75	2,07	1,45
CMC4	C-x(9)-C motif containing 4	1,09	1,69	1,81
COA3	cytochrome c oxidase assembly factor 3	1,09	1,81	1,76
COA4	cytochrome c oxidase assembly factor 4 homolog (S. cerevisiae)	1,23	1,80	1,64
COA5	cytochrome c oxidase assembly factor 5	-1,06	1,06	1,65
COMT D1	catechol-O-methyltransferase domain containing 1	1,30	1,35	-1,90
COQ10 A	coenzyme Q10 homolog A (S. cerevisiae)	1,60	1,93	1,49
COQ5	coenzyme Q5 homolog, methyltransferase (S. cerevisiae)	-1,13	1,18	1,80
COQ9	coenzyme Q9	1,07	1,76	1,49
COX11	COX11 cytochrome c oxidase copper chaperone	1,41	1,30	1,76
COX14	COX14 cytochrome c oxidase assembly factor	1,47	2,04	2,46
COX20	COX20 cytochrome c oxidase assembly factor	1,85	2,07	1,47
COX5A	cytochrome c oxidase subunit Va	2,67	2,94	2,03
COX5B	cytochrome c oxidase subunit Vb	1,98	2,62	1,83
COX6A 1	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1	1,61	1,97	2,04
COX6A 2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2	-1,29	2,83	4,06
COX6B 1	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 (ubiquitous)	1,72	2,07	1,42
COX6B 2	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 2 (testis)	2,25	2,43	2,48
COX6C	cytochrome c oxidase subunit VIc	1,76	2,35	2,09
COX7A 2	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)	1,59	1,90	1,65
COX7C	cytochrome c oxidase subunit VIIc	1,96	2,31	2,04
COX8A	cytochrome c oxidase subunit VIIIA (ubiquitous)	1,62	1,85	1,56
CPS1	carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial	-1,79	9,96	5,34
CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	-2,45	-1,76	-1,77
CPT2	carnitine palmitoyltransferase 2	-1,22	1,59	2,13

CRAT	carnitine O-acetyltransferase	1,25	2,26	2,79
CRLS1	cardiolipin synthase 1	1,15	1,76	2,42
CRYZ	crystallin, zeta (quinone reductase)	-1,75	1,79	2,00
CS	citrate synthase	2,14	2,38	1,18
CYB5R3	cytochrome b5 reductase 3	1,55	1,64	1,79
CYC1	cytochrome c-1	1,73	2,20	1,72
CYCS	cytochrome c, somatic	2,01	1,56	1,14
CYP27A1	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1	1,80	2,90	4,52
D2HGDH	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	-1,58	-1,23	1,03
DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-CoA binding protein)	2,02	2,48	2,93
DBT	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	1,01	2,37	3,06
DCXR	dicarbonyl/L-xylulose reductase	1,37	4,34	17,84
DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	1,33	2,50	3,26
DHODH	dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	-1,51	1,47	1,18
DHRS1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	-1,31	1,09	1,76
DHRS4	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	1,22	1,51	2,43
DHTKD1	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	1,16	3,01	7,40
DIABLO	diablo, IAP-binding mitochondrial protein	1,36	1,68	1,99
DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	1,75	2,10	1,52
DMGDH	dimethylglycine dehydrogenase	-1,45	3,83	9,35
DNAJC19	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19	1,41	2,40	2,49
DNAJC30	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 30	1,17	1,60	1,72
DNAJC4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	1,63	2,07	1,60
DNLZ	DNL-type zinc finger	1,01	-1,16	-1,68
DTYMK	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	1,64	-1,50	-1,44
DUT	deoxyuridine triphosphatase	-1,00	-1,65	-1,81
ECHDC1	ethylmalonyl-CoA decarboxylase 1	1,71	2,14	1,79
ECHDC2	enoyl CoA hydratase domain containing 2	-1,12	3,05	9,00
ECHDC3	enoyl CoA hydratase domain containing 3	1,03	2,35	2,97
ECHS1	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	1,14	1,76	3,13
ECI1	enoyl-CoA delta isomerase 1	1,75	2,76	3,24
ECI2	enoyl-CoA delta isomerase 2	1,31	1,75	2,24
EHHA1	enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	-1,61	2,30	6,51
ENDOG	endonuclease G	1,60	1,95	1,77
EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	-1,07	4,66	8,36
ETFA	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	-1,83	-1,35	1,18
ETFB	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	-1,03	1,60	2,03
ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	-1,30	1,36	2,41

ETHE1	ethylmalonic encephalopathy 1	1,17	1,40	1,83
FABP1	fatty acid binding protein 1, liver	-14,94	8,49	37,85
FAHD1	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	1,43	1,66	2,31
FAHD2 A	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A	1,12	1,46	1,70
FAM13 6A	family with sequence similarity 136, member A	1,57	1,49	-1,16
FAM16 2A	family with sequence similarity 162, member A	1,67	2,18	2,39
FASN	fatty acid synthase	2,29	2,71	4,10
FASTK D1	FAST kinase domains 1	1,42	1,10	-1,50
FDPS	farnesyl diphosphate synthase	1,70	1,70	2,53
FDX1	ferredoxin 1	1,42	2,30	2,38
FDXR	ferredoxin reductase	1,63	1,32	-2,01
FH	fumarate hydratase	1,22	1,59	1,58
FPGS	folylpolyglutamate synthase	-1,24	-1,43	-1,88
FUNDC 2	FUN14 domain containing 2	-1,03	-1,13	-1,73
FXN	frataxin	1,77	1,69	1,52
GATM	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	-1,55	11,78	21,28
GCDH	glutaryl-CoA dehydrogenase	-1,36	1,25	4,85
GCSH	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	1,69	1,79	2,02
GFER	growth factor, augments liver regeneration	1,70	1,60	1,86
GFM2	G elongation factor, mitochondrial 2	1,51	1,44	1,65
GHITM	growth hormone inducible transmembrane protein	1,21	1,47	1,62
GLDC	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	1,22	6,36	17,25
GLOD4	glyoxalase domain containing 4	-1,03	1,18	1,57
GLRX5	glutaredoxin 5	1,74	2,40	2,57
GLS	glutaminase	-1,16	-1,55	-1,80
GLS2	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)	-1,29	1,21	10,65
GLUD1	glutamate dehydrogenase 1	-1,29	1,24	2,78
GLUD2	glutamate dehydrogenase 2	-1,14	1,34	3,18
GLYAT	glycine-N-acyltransferase	-1,48	50,84	227,32
GLYCT K	glycerate kinase	1,03	9,12	13,76
GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	1,47	-1,40	-2,17
GPX1	glutathione peroxidase 1	1,70	1,63	1,26
GPX4	glutathione peroxidase 4	-1,07	1,22	1,84
GRHPR	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	1,52	3,49	4,60
GRPEL 2	GrpE-like 2, mitochondrial (E. coli)	-1,03	-1,45	-1,96
GSTK1	glutathione S-transferase kappa 1	1,28	1,92	2,25
GSTZ1	glutathione S-transferase zeta 1	1,01	1,33	2,61
HADH	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	1,14	1,28	2,65
HAGH	hydroxyacylglutathione hydrolase	1,13	2,03	6,26
HAO2	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	-2,22	38,70	53,28
HCCS	holocytochrome c synthase	1,21	-1,05	-1,61
HEBP1	heme binding protein 1	1,82	2,54	2,55

HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	-1,11	1,12	1,65
HIGD1 A	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 1A	1,78	1,86	2,47
HINT2	histidine triad nucleotide binding protein 2	1,27	2,15	2,15
HMGC L	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyase	-1,50	1,89	3,16
HMGC S2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial)	-19,08	4,52	5,20
HOGA1	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1	11,54	36,94	24,51
HSD17 B10	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	1,11	1,52	1,95
HSD17 B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	-1,14	1,50	1,84
HSD17 B8	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8	1,22	2,42	2,23
HSPE1	heat shock 10kDa protein 1	1,45	1,53	1,38
IDE	insulin-degrading enzyme	-1,20	-1,55	-1,62
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	1,14	1,28	-1,90
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	1,57	-1,20	-2,27
ISCA2	iron-sulfur cluster assembly 2	1,84	2,17	2,26
ISCU	iron-sulfur cluster assembly enzyme	1,31	1,56	1,48
IVD	isovaleryl-CoA dehydrogenase	1,45	2,54	4,41
L2HGD H	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	-3,76	-2,50	-1,82
LACTB 2	lactamase, beta 2	1,87	1,70	1,36
LAP3	leucine aminopeptidase 3	1,35	1,45	1,91
LDHB	lactate dehydrogenase B	-2,06	1,07	-1,74
LDHD	lactate dehydrogenase D	1,57	6,70	7,90
LETM1	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	1,10	-1,24	-1,59
LETM D1	LETM1 domain containing 1	1,09	1,84	1,48
LIPT2	lipoyl(octanoyl) transferase 2 (putative)	1,35	1,11	2,31
LYPLA L1	lysophospholipase-like 1	-1,12	1,58	2,17
LYRM9	LYR motif containing 9	1,84	3,65	6,69
MAOA	monoamine oxidase A	5,45	10,38	9,60
MAOB	monoamine oxidase B	-1,28	1,93	2,64
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein	1,47	1,60	1,70
MCCC1	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 (alpha)	1,12	2,35	1,68
MCCC2	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 2 (beta)	-1,55	-1,02	1,35
MCEE	methylmalonyl CoA epimerase	-1,11	2,11	2,50
MCUR 1	mitochondrial calcium uniporter regulator 1	1,38	1,39	1,63
ME3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	1,16	-1,05	-1,59
METTL 15	methyltransferase like 15	1,24	1,46	1,92
METTL 8	methyltransferase like 8	1,18	-1,06	-1,71
MFF	mitochondrial fission factor	1,74	1,73	1,53
MFN1	mitofusin 1	1,20	1,35	1,62
MFN2	mitofusin 2	1,57	1,59	1,48
MGME 1	mitochondrial genome maintenance exonuclease 1	1,23	-1,51	-2,16

MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	1,06	1,39	2,46
MIEF1	mitochondrial elongation factor 1	1,51	1,72	2,02
MLYC D	malonyl-CoA decarboxylase	1,70	1,69	2,24
MMAA	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblA type	-1,31	1,67	2,77
MMAB	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type	1,54	1,98	4,66
MOCS1	molybdenum cofactor synthesis 1	1,16	2,86	3,60
MPC1	mitochondrial pyruvate carrier 1	2,52	3,69	3,63
MPC2	mitochondrial pyruvate carrier 2	1,32	2,11	2,88
MPST	mercaptopyruvate sulfurtransferase	-1,24	1,66	2,54
MPV17	MpV17 mitochondrial inner membrane protein	1,04	1,10	-1,51
MPV17 L2	MPV17 mitochondrial membrane protein-like 2	1,39	1,12	1,60
MRPL1 5	mitochondrial ribosomal protein L15	1,96	2,14	1,23
MRPL1 6	mitochondrial ribosomal protein L16	1,59	2,15	2,36
MRPL1 7	mitochondrial ribosomal protein L17	1,56	1,27	-1,13
MRPL1 9	mitochondrial ribosomal protein L19	1,34	1,33	1,90
MRPL2 0	mitochondrial ribosomal protein L20	1,51	1,51	1,70
MRPL2 1	mitochondrial ribosomal protein L21	1,59	1,67	1,40
MRPL2 3	mitochondrial ribosomal protein L23	1,18	2,38	27,92
MRPL3	mitochondrial ribosomal protein L3	1,53	1,43	1,34
MRPL3 0	mitochondrial ribosomal protein L30	1,50	1,37	1,71
MRPL3 2	mitochondrial ribosomal protein L32	1,44	1,57	1,45
MRPL3 3	mitochondrial ribosomal protein L33	1,86	1,21	-1,17
MRPL3 4	mitochondrial ribosomal protein L34	1,29	1,61	1,58
MRPL4	mitochondrial ribosomal protein L4	1,71	1,97	1,58
MRPL4 0	mitochondrial ribosomal protein L40	1,50	1,97	1,86
MRPL4 1	mitochondrial ribosomal protein L41	1,29	1,97	1,93
MRPL4 7	mitochondrial ribosomal protein L47	1,64	1,52	1,03
MRPL5 2	mitochondrial ribosomal protein L52	-1,12	-1,43	-2,85
MRPL5 3	mitochondrial ribosomal protein L53	1,50	1,51	1,63
MRPL5 7	mitochondrial ribosomal protein L57	-1,59	-1,45	-2,19
MRPS1 2	mitochondrial ribosomal protein S12	1,97	2,60	1,60
MRPS1 4	mitochondrial ribosomal protein S14	1,43	1,23	1,72
MRPS1 8B	mitochondrial ribosomal protein S18B	1,32	1,91	1,55
MRPS1 8C	mitochondrial ribosomal protein S18C	1,51	1,41	1,71
MRPS2 1	mitochondrial ribosomal protein S21	1,53	1,48	1,07

MRPS2 2	mitochondrial ribosomal protein S22	1,56	1,84	1,78
MRPS2 4	mitochondrial ribosomal protein S24	1,86	1,83	1,29
MRPS2 6	mitochondrial ribosomal protein S26	1,45	1,73	1,84
MRPS2 8	mitochondrial ribosomal protein S28	1,29	1,28	1,53
MRPS3 1	mitochondrial ribosomal protein S31	1,11	1,14	1,55
MRPS3 6	mitochondrial ribosomal protein S36	2,55	3,04	2,74
MRPS9	mitochondrial ribosomal protein S9	1,41	1,60	1,42
MRS2	MRS2 magnesium transporter	2,37	2,20	1,34
MSRA	methionine sulfoxide reductase A	1,03	1,22	2,14
MSRB2	methionine sulfoxide reductase B2	1,08	1,65	2,37
MSRB3	methionine sulfoxide reductase B3	1,87	1,70	1,11
MTCH2	mitochondrial carrier 2	-1,14	1,23	1,76
MTERF 4	mitochondrial transcription termination factor 4	1,23	1,28	1,58
MTFR1 L	mitochondrial fission regulator 1-like	1,78	2,38	2,00
MTFR2	mitochondrial fission regulator 2	2,05	-2,84	-3,87
MTHF D1L	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	-1,45	-3,40	-10,15
MTHFS	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5- formyltetrahydrofolate cyclo-ligase)	-1,13	1,33	2,54
MTRF1 L	mitochondrial translational release factor 1-like	1,03	-1,22	-1,58
MYO19	myosin XIX	1,27	-1,22	-3,82
NBR1	neighbor of BRCA1 gene 1	1,09	1,17	1,57
NDUF A1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa	1,70	1,77	1,67
NDUF A11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 11, 14.7kDa	1,72	1,50	1,35
NDUF A12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	1,82	1,97	1,63
NDUF A2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa	1,55	2,02	2,44
NDUF A3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3, 9kDa	1,44	1,49	2,29
NDUF A5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5	1,45	1,84	1,90
NDUF A6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa	1,93	2,10	1,84
NDUF A7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 7, 14.5kDa	1,62	1,65	1,73
NDUF A8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa	2,17	2,43	1,72
NDUF AB1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa	1,40	1,72	1,89
NDUF AF1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 1	-1,09	1,24	1,96
NDUF AF2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 2	-1,32	-1,70	-1,85
NDUF AF3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 3	1,70	1,49	1,86
NDUF AF4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 4	1,61	1,34	-1,21
NDUF AF6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 6	1,64	2,08	1,71

NDUFB1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa	1,70	2,11	2,25
NDUFB10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa	2,04	2,51	2,19
NDUFB2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2, 8kDa	1,67	1,69	1,65
NDUFB3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3, 12kDa	1,79	1,94	1,64
NDUFB4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4, 15kDa	1,85	2,09	1,95
NDUFB5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa	1,61	2,33	1,63
NDUFB6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	1,58	1,76	1,95
NDUFB7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7, 18kDa	1,41	1,65	1,51
NDUFB8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa	1,52	1,50	1,31
NDUFB9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9, 22kDa	1,22	1,68	1,14
NDUFC1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1, 6kDa	1,27	1,55	1,51
NDUFC2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	1,45	2,08	2,05
NDUFS3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	1,43	1,74	1,37
NDUFS5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	1,69	1,33	1,32
NDUFS6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	1,86	1,62	1,60
NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa	1,13	1,43	1,67
NDUFV3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, 10kDa	1,14	1,41	1,75
NFS1	NFS1 cysteine desulfurase	1,04	1,46	1,67
NGRN	neugrin, neurite outgrowth associated	-1,96	-1,83	-1,65
NIPSNAP1	nipsnap homolog 1 (C. elegans)	-1,06	1,73	2,78
NIT1	nitrilase 1	-1,30	1,36	1,96
NIT2	nitrilase family, member 2	1,31	1,77	2,61
NLRX1	NLR family member X1	1,05	1,21	1,78
NME3	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 3	-1,07	1,41	1,54
NME4	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 4	1,07	-1,37	-3,00
NSUN4	NOP2/Sun domain family, member 4	-1,61	-1,51	-1,24
NT5M	5',3'-nucleotidase, mitochondrial	2,02	3,02	1,75
NUDT8	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 8	1,36	2,34	2,89
NUDT9	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9	1,13	1,36	2,10
OGDHL	oxoglutarate dehydrogenase-like	2,06	5,03	3,80
OMA1	OMA1 zinc metallopeptidase	-1,58	-1,17	1,07
OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A	2,65	3,54	3,02
OSGEP1L1	O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1	1,04	1,25	1,70
OTC	ornithine carbamoyltransferase	-5,49	13,70	102,10
OXLD1	oxidoreductase-like domain containing 1	1,42	1,79	1,77
OXSM	3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial	1,81	2,32	2,34
PANK2	pantothenate kinase 2	-1,35	-1,65	-1,46

PARS2	prolyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)	1,30	1,79	1,74
PC	pyruvate carboxylase	-1,06	2,00	2,69
PCBD2	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha (TCF1) 2	1,02	1,08	1,78
PCCA	propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide	-1,70	1,83	3,07
PCCB	propionyl CoA carboxylase, beta polypeptide	-1,28	1,25	2,26
PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	-2,48	2,64	9,72
PDE12	phosphodiesterase 12	1,58	1,40	1,69
PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	1,67	1,87	1,41
PDHB	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	1,67	1,84	2,14
PDK2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	-1,23	1,93	1,59
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	-11,04	-5,64	-2,75
PDP2	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2	1,23	1,25	1,88
PDPR	pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit	-1,38	-1,29	-1,69
PDSS1	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 1	1,73	1,42	-1,57
PDSS2	prenyl (decaprenyl) diphosphate synthase, subunit 2	-1,33	1,27	1,51
PEX11 B	peroxisomal biogenesis factor 11 beta	1,65	1,77	2,05
PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	1,08	1,42	2,29
PIF1	PIF1 5'-to-3' DNA helicase	3,65	-2,10	-2,05
PINK1	PTEN induced putative kinase 1	-1,19	-1,25	1,87
PITRM 1	pitrilysin metalloproteinase 1	-1,99	-1,91	-2,26
PMAIP 1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	-2,79	-10,12	-12,66
PNKD	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia	1,62	1,63	1,38
PNPO	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	1,50	1,71	2,44
PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	1,11	-1,35	-1,71
POLD1 P2	polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2	1,18	1,65	2,14
PPA2	pyrophosphatase (inorganic) 2	1,41	1,62	1,87
PPIF	peptidylprolyl isomerase F	1,73	1,68	1,69
PRDX5	peroxiredoxin 5	-1,07	1,11	-1,56
PRDX6	peroxiredoxin 6	1,69	2,56	2,99
PRELI D1	PRELI domain containing 1	1,31	1,58	1,64
PRODH	proline dehydrogenase (oxidase) 1	2,92	9,91	8,48
PRODH 2	proline dehydrogenase (oxidase) 2	-10,50	2,55	4,93
PUSL1	pseudouridylyl synthase-like 1	1,52	1,54	1,07
PXMP2	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa	1,90	6,14	6,74
PXMP4	peroxisomal membrane protein 4, 24kDa	2,07	2,04	2,06
PYCR2	pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2	1,47	1,52	1,49
QDPR	quinoid dihydropteridine reductase	1,26	1,74	4,99
RARS2	arginyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	1,81	1,43	1,26
RBFA	ribosome binding factor A (putative)	1,56	1,28	1,19
RDH14	retinol dehydrogenase 14 (all-trans/9-cis/11-cis)	1,32	1,44	1,66
REXO2	RNA exonuclease 2	1,68	1,19	-1,05
RMDN 1	regulator of microtubule dynamics 1	1,48	1,96	2,04

RMDN3	regulator of microtubule dynamics 3	-1,07	-1,07	1,69
RPIA	ribose 5-phosphate isomerase A	1,40	-1,10	-1,57
SAMM50	SAMM50 sorting and assembly machinery component	1,57	1,76	1,19
SARDH	sarcosine dehydrogenase	-1,69	1,33	1,47
SARS2	seryl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	-1,04	-1,06	-1,59
SCP2	sterol carrier protein 2	-1,23	2,45	14,38
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	1,39	1,79	1,59
SDHC	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa	2,07	2,42	2,93
SDHD	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	1,51	2,33	2,40
SDR39U1	short chain dehydrogenase/reductase family 39U, member 1	1,05	1,27	1,72
SFXN2	sideroflexin 2	1,36	2,02	2,85
SFXN4	sideroflexin 4	1,19	1,56	-1,26
SFXN5	sideroflexin 5	2,63	2,38	2,95
SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	-1,29	1,14	1,93
SIRT3	sirtuin 3	1,21	2,28	2,79
SIRT5	sirtuin 5	1,10	1,57	1,03
SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	1,10	1,96	2,87
SLC25A10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10	1,34	1,85	2,72
SLC25A11	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11	1,64	2,42	2,20
SLC25A13	solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 13	1,06	1,13	1,98
SLC25A15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	1,32	1,81	1,85
SLC25A16	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 16	-3,13	-2,81	-1,91
SLC25A18	solute carrier family 25 (glutamate carrier), member 18	-1,90	1,18	-1,33
SLC25A20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	-1,05	1,83	2,29
SLC25A22	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22	1,55	2,15	1,81
SLC25A24	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24	1,87	1,44	1,30
SLC25A25	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	-1,09	-1,16	3,09
SLC25A29	solute carrier family 25 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier), member 29	-1,60	-1,42	-1,34
SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	1,61	1,78	1,33
SLC25A30	solute carrier family 25, member 30	1,40	1,50	2,18
SLC25A32	solute carrier family 25 (mitochondrial folate carrier), member 32	1,73	1,22	1,13
SLC25A33	solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 33	-1,07	1,32	4,17
SLC25A38	solute carrier family 25, member 38	1,44	1,57	2,62
SLC25A39	solute carrier family 25, member 39	-1,92	-1,55	-1,65
SLC25A4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4	1,26	2,94	2,65

SLC25 A42	solute carrier family 25, member 42	-1,26	2,04	4,01
SLC25 A44	solute carrier family 25, member 44	1,43	1,20	2,52
SLC25 A5	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	2,15	2,36	1,53
SLC25 A51	solute carrier family 25, member 51	-3,22	-2,97	-2,24
SLC25 A6	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	1,65	1,51	-1,45
SLIRP	SRA stem-loop interacting RNA binding protein	1,63	1,58	1,31
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	1,17	1,23	1,66
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	-1,99	1,04	-2,97
SPG7	spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)	-1,88	-1,92	-1,39
SPHK2	sphingosine kinase 2	1,36	1,56	1,36
SPRYD 4	SPRY domain containing 4	1,01	1,48	1,78
SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial	1,65	1,33	1,21
SUCLG 1	succinate-CoA ligase, alpha subunit	1,70	2,39	1,96
SUCLG 2	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit	1,08	1,44	2,04
SUOX	sulfite oxidase	-1,21	1,65	2,48
SURF1	surfeit 1	1,29	2,06	2,96
TACO1	translational activator of mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I	1,26	2,10	2,55
TAMM 41	TAM41, mitochondrial translocator assembly and maintenance protein, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	1,50	1,15	1,35
TCAIM	T cell activation inhibitor, mitochondrial	1,16	1,44	1,83
TIMM1 0	translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog (yeast)	1,54	1,51	1,43
TIMM1 0B	translocase of inner mitochondrial membrane 10 homolog B (yeast)	1,56	1,97	1,73
TIMM1 7A	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	1,66	1,20	1,15
TIMM8 A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	1,65	1,69	1,39
TIMM8 B	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)	1,74	1,67	2,08
TK2	thymidine kinase 2, mitochondrial	1,12	1,76	2,74
TMEM 11	transmembrane protein 11	1,52	1,38	1,41
TMEM 143	transmembrane protein 143	1,21	1,70	1,74
TMEM 14C	transmembrane protein 14C	1,64	1,28	1,14
TMEM 177	transmembrane protein 177	1,38	1,74	2,02
TMEM 186	transmembrane protein 186	1,25	1,77	1,57
TMEM 205	transmembrane protein 205	-1,59	1,68	2,20
TOMM 20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	1,75	1,64	1,04
TOMM 22	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	1,67	1,34	1,11
TOMM 7	translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)	1,25	1,37	1,56
TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	-1,71	-1,29	-1,49
TRIAP1	TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1	1,57	1,07	1,01

TRMT1	tRNA methyltransferase 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,29	-1,57	-2,18
TRMT1 0C	tRNA methyltransferase 10 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)	1,85	1,64	1,57
TSMF	Ts translation elongation factor, mitochondrial	1,31	1,31	1,66
TSPO	translocator protein (18kDa)	1,31	1,02	-1,70
TST	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	-1,23	2,91	5,67
TTC19	tetratricopeptide repeat domain 19	1,09	1,25	1,94
TXNR D1	thioredoxin reductase 1	1,79	1,01	1,05
UCP3	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	3,06	3,48	4,13
UQCC2	ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 2	-1,22	-1,66	-1,43
UQCR1 0	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X	1,49	2,21	1,28
UQCR1 1	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit XI	1,45	1,74	1,76
UQCR B	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	2,06	2,37	1,85
UQCR C2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	1,84	2,46	1,51
UQCRF S1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	2,29	2,51	2,23
UQCR H	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	1,94	1,98	1,40
UQCR Q	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa	1,35	1,84	2,20
VAR2	valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	1,04	1,63	1,60
VDAC2	voltage-dependent anion channel 2	1,59	1,50	1,10
YBEY	ybeY metallopeptidase (putative)	1,04	1,52	1,49

Résultats complémentaires

Introduction :

La caractérisation du métabolisme en lien avec la plasticité cellulaire nous a menés à étudier différentes pistes qui pourront faire l'objet de publications ultérieures. Parmi ces pistes, nous avons exploré : (i) la différence métabolique qui pourrait exister entre le modèle HepaRG, avec et sans décollement sélectif, et les hépatocytes humains en culture primaire afin de renforcer la robustesse de notre modèle (ii) l'impact précis du DCA sur le métabolisme dans le but d'accroître les connaissances sur cette molécule prometteuse (iii) l'action d'un antagoniste de PPAR γ dans le cadre du développement d'une stratégie thérapeutique (iv) l'implication de la biosynthèse des acides gras au cours de la différenciation/rétrodifférenciation des cellules de manière en vue de trouver des biomarqueurs lipidiques associés à un mauvais pronostic dans le CHC.

Résultats :

Les résultats sont présentés dans les pages suivantes.

Résultat 1

La lignée cellulaire HepaRG présente des similarités métaboliques avec les hépatocytes humains

Au stade différencié, la lignée HepaRG comporte deux types cellulaires distincts, les hépatocytes et les cholangiocytes. Il est possible de décoller sélectivement ces deux populations cellulaires afin d'étudier leurs propriétés respectives et ainsi connaître la contribution métabolique de chaque type cellulaire. Les observations effectuées par microscopie électronique montrent que le nombre et l'aspect des mitochondries diffèrent entre les deux types cellulaires. Les cholangiocytes possèdent un grand nombre de petites mitochondries allongées alors que les hépatocytes contiennent un nombre plus faible de larges mitochondries arrondies (Figure 1A). L'analyse du métabolisme ne montre cependant pas de différence significative entre les deux types cellulaires pour ce qui concerne la glycolyse basale, la réserve glycolytique, la capacité glycolytique, l'acidification non glycolytique, les respirations basale et maximale, la fuite de proton, la production d'ATP, la respiration non-mitochondriale et la capacité respiratoire de réserve (Figure 1B). De même, nous n'avons pas mis en évidence de différence en ce qui concerne le métabolisme des acides gras incluant l'oxydation des acides gras, la lipogenèse *de novo* et les réactions d'élongation et de désaturation (Figure 2C). Malgré des mitochondries différentes, les hépatocytes et les cholangiocytes de la lignée HepaRG présentent donc des caractéristiques métaboliques voisines sur les paramètres que nous avons étudiés. Lorsque l'on compare les cellules HepaRG en condition standard, c'est-à-dire en situation de coculture, aux hépatocytes et cholangiocytes seuls, on constate que la respiration cellulaire est augmentée, sans modification de la glycolyse ni du métabolisme des acides gras (Figure 1B et 1C).

En comparant les cellules HepaRG différenciées et les hépatocytes humains en culture primaire, nous n'avons observé aucune différence pour les paramètres glycolytiques (glycolyse basale,

réserve glycolytique, capacité glycolytique, acidification non glycolytique) et le métabolisme des acides gras (oxydation des acides gras, contenu lipidique et lipogenèse *de novo*) (Figure 1B et 1C). Cependant, certains paramètres de respiration incluant la respiration maximale, la capacité respiratoire de réserve et la fuite de protons sont plus élevés pour les cellules HepaRG, mais cette différence n'est pas retrouvée si l'on considère les hépatocytes HepaRG isolément. Ces données sur le métabolisme des hépatocytes sont à interpréter avec précaution, car probablement influencées par les conditions de culture. Cassim et ses collaborateurs soulignent que l'isolement et la culture *ex-vivo* des hépatocytes modifient leur capacité métabolique et provoquent notamment une diminution de l'activité du cycle TCA et de l'OXPPOS sans pour autant diminuer la production d'ATP liée à la chaîne respiratoire (Cassim et al., 2017).

Résultats 2

L'antagoniste PPAR γ T0070907 n'induit pas de modifications du métabolisme

Nous avons tenté de déterminer l'action de l'antagoniste PPAR γ T0070907 sur le métabolisme des cellules HepaRG. Les résultats de RT-qPCR confirment une diminution de l'expression des gènes *PDK4*, *FAT/CD36* et *PLIN2* directement régulés par PPAR γ . Ces résultats confirment l'action du T0070907 sur les cellules aux deux concentrations choisies (100 nM et 1 μ M). Nous observons également une diminution de l'expression d'ANGPTL4 connue pour moduler l'expression de PDK4 (Figure 2A) (Fekir et al., 2019). On peut donc envisager que PPAR γ exerce une action directe, mais aussi indirecte via ANGPTL4, sur PDK4. L'ANGPTL4, dont l'expression est régulée par la famille PPAR, est notamment connue pour être associée au mauvais pronostic du patient dans différents types de tumeurs solides (La Paglia et al., 2017). Le traitement des cellules HepaRG progéniteurs par 1 μ M de T0070907 ne modifie pas les différents paramètres de respiration mitochondriale (respirations basale et maximale, fuite de protons, production d'ATP et la capacité de réserve des cellules) ainsi que la respiration non-mitochondriale (Figure 2B). Nous n'avons observé aucun changement dans l'oxydation des acides gras. Du côté de la lipogenèse *de novo*, nous avons noté une légère diminution de l'activité de synthèse des acides gras (Figure 2C). Les tests de viabilité cellulaire sur les progéniteurs HepaRG n'ont pas montré de diminution significative de la viabilité cellulaire à 24, 48 et 72h aux différentes concentrations utilisées (1 nM, 5nM, 10 nM, 1 μ M et 10 μ M) (Figure 2E). La concentration de 1 μ M n'entraîne pas non plus de diminution de la viabilité des HBG-BC2 et HepaRG en sphère, que le T0070907 soit utilisé seul ou associé au sorafenib ou au cisplatine (Figure 2F).

Finalement, ces expériences démontrent seulement un effet du T0070907 sur PPAR γ et certaines de ses cibles et non sur le métabolisme. L'absence d'effet sur les sphères peut être dû à une mauvaise pénétration de l'antagoniste. Il a précédemment été montré que l'action du

T0070907 provoque une diminution dose dépendante de la phosphorylation et de la liaison de PPAR γ à l'ADN, dans le cancer du sein (Zaytseva et al., 2011). L'inhibition de l'action de PPAR γ provoque une diminution de la prolifération des cellules et des métastases. Dans cette étude, les auteurs utilisent une large gamme de concentrations (de 0.1 à 20 μ M) et observent des effets antiprolifératifs à partir de 10 μ M. Une autre étude sur le foie montre que l'utilisation du T0070907 à une concentration de 50 μ M provoque une apoptose par anoikis chez des cellules HepG2 et Hep3B (Schaefer et al., 2005). Il est donc possible que l'utilisation de concentrations supérieures de T0070907 dans notre étude aurait permis d'obtenir un effet sur le métabolisme des cellules. Cependant, il a été montré qu'une trop forte concentration de T0070907 peut également provoquer une mortalité cellulaire indépendamment de l'inhibition de PPAR γ . D'autres inhibiteurs pourraient être utilisés comme le SR2595 dont l'effet a été montré *in vivo* (Patituci et al 2017). Cependant, nous avons préféré poursuivre nos études sur l'influence sur le métabolisme d'une inhibition de PPAR γ en utilisant un siRNA dirigé contre le gène PPAR γ .

Résultats 3

Le dichloroacétate induit une réactivation mitochondriale délétère pour les cellules immatures

Les études menées précédemment au laboratoire ont permis de mettre en évidence que le DCA, un inhibiteur de PDK4, reverse la chimiorésistance des CSC hépatiques. L'effet du DCA passe par la réactivation de la fonction mitochondriale des CSC (Fekir et al., 2019). J'ai souhaité poursuivre cette étude en analysant l'effet du DCA sur le métabolisme des lignées hépatiques. Le traitement des cellules HepaRG, HBG-BC2 et Huh-7 en conformation sphère par le DCA provoque une diminution de la capacité glycolytique associée à une diminution de la libération de lactate dans les surnageants de culture (Figure 3B et C). Cette diminution de la capacité glycolytique s'accompagne d'augmentation de la fuite de protons au niveau des mitochondries. Cette fuite de proton pourrait traduire un défaut des mitochondries à répondre à l'activation de l'OXPPOS, consécutive à l'augmentation de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie (Figure 3B). La lipogenèse *de novo* n'est pas impactée par le traitement au DCA. L'oxydation des acides gras est par contre augmentée dans les cellules HepaRG en sphère et dans la side population (SP), probablement en conséquence de la réactivation mitochondriale. L'augmentation de l'oxydation des acides gras n'est pas observée dans les autres lignées cellulaires, ce qui pourrait s'expliquer par leur faible capacité à oxyder les acides gras même dans les conditions où les cellules sont adhérentes (Figure 3D). La réactivation mitochondriale est confirmée par la mesure des ROS dans les cellules HepaRG en sphère. Les ROS, et plus spécifiquement les ROS mitochondriaux (évalués par le MitoSox®), augmentent au cours du temps pour les sphères traitées au DCA. Dans les cellules différenciées, les ROS totaux n'augmentent pas. On constate même une diminution des ions peroxydes (Figure 3E). Cette différence pourrait s'expliquer par les capacités anti-oxydantes supérieures des cellules différenciées par rapport aux CSC. Ces

résultats sont corrélés à une diminution de la viabilité cellulaire des lignées cellulaires HepaRG, HBG-BC2, Huh-6, Huh-7 et HepG2 en sphère (Figure 3F).

L'action pro-apoptotique du DCA sur les cellules tumorales a déjà été décrite. Le DCA augmente la dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial, la production de ROS et le relargage de cytochrome c dans les cellules tumorales sans affecter les cellules non tumorales (Michelakis et al., 2008).

Résultats 4

Le caractère souche des cellules hépatiques est associé à une réduction de l'élongation des acides gras et à une augmentation du stockage lipidique

L'extraction des lipides des lignées cellulaires HepaRG, HBG-BC2, Huh-6, Huh-7 et HepG2 à différents stades de différenciation a permis d'analyser les voies de biosynthèse et d'élongation des lipides. L'acquisition du caractère souche des cellules HepaRG et HBG-BC2 s'accompagne d'une accumulation des lipides totaux. Cette accumulation est également significative dans les lignées Huh-6, Huh-7 et HepG2 cultivées en sphère même si elles expriment peu de marqueurs de cellules souches. L'analyse des sous-classes de lipides révèle une accumulation de triglycérides dans les sphères de toutes lignées hépatiques. On note également une augmentation des concentrations d'acides gras libres dans les sphères HepaRG, HBG-BC2 et HepG2, des esters de cholestérol dans les sphères HBG-BC2, Huh-7 et HepG2 et des phospholipides dans les sphères HepaRG (Figure 4A). Le ratio des acides gras saturés sur les acides gras insaturés démontre une balance en faveur des acides gras saturés dans les sphères HepaRG et HBG-BC2 (Figure 4B). Nous avons de plus analysé les voies d'élongation des acides gras sur la base des pourcentages d'acides gras des voies n-7, n-9, n-6 et n-3. La voie n-7 est diminuée dans les sphères de toutes les lignées. La voie n-6 est diminuée dans les sphères HepaRG, HBG-BC2 et Huh-7. La voie n-9 est diminuée dans les sphères HBG-BC2 et augmentée dans les sphères HepG2. La voie n-3 est diminuée dans les sphères HepaRG alors qu'elle est augmentée dans les sphères Huh-6, Huh-7 et HepG2 (Figure 4C). Nous voulions également déterminer si les différences que nous observions entre les sphères HepaRG et les autres stades de différenciation étaient spécifiques des sphères ou constituaient une caractéristique des cellules immatures. Nous avons effectué pour cela une extraction de lipides dans l'autre population souche du modèle HepaRG, la side population (SP). Nous avons fait en parallèle une extraction lipidique de cellules progénitrices et différenciées afin de comparer

avec des stades plus différenciés. Nos résultats préliminaires montrent que le contenu total en lipides est augmenté dans les SP HepaRG comparé aux cellules D4 et D30. Au niveau des voies d'élongation, les pourcentages d'acide gras des voies n-7, n-6 et n-3 sont diminués dans les SP par rapport aux autres stades de différenciation d'HepaRG. On retrouve également un ratio acides gras saturés sur acides gras insaturés plus élevé dans les SP. Les résultats de l'expérience sur les SP sont similaires aux sphères HepaRG et confortent l'accumulation de lipides et la diminution des voies n-7, n-6 et n-3 dans les cellules immatures HepaRG (Figure 4D). Les cellules HepaRG et HBG-BC2 ont une quantité réduite des produits C16:1 n-7, C18:1 n-7 et C22:6 n-3. Cette diminution provoque une diminution du ratio de l'élongase associée à la désaturase 9 ($\Delta 9$) et du ratio de la désaturase 6 ($\Delta 6$), par rapport aux cellules différenciées. Le ratio de l'élongase associée à la désaturase 9 ($\Delta 9$) est également diminué dans les sphères HepG2. Le ratio de la désaturase 6 ($\Delta 6$) est quant à lui diminué dans les sphères Huh-7 (Figure 4E). Les résultats préliminaires des SP pour ces ratios démontrent comme précédemment des similarités avec les sphères HepaRG par une baisse des ratios d'élongase associée à la désaturase 9 ($\Delta 9$) et de désaturase 6 ($\Delta 6$) (Figure 4F).

Figure 1 : Caractérisation du métabolisme des hépatocytes et cholangiocytes HepaRG et des hépatocytes humains

(A) Les images des hépatocytes HepaRG (1, 2, 3 et 4) et cholangiocytes HepaRG (5, 6, 7 et 8) ont été réalisées en microscopie électronique. Les flèches noires indiquent les mitochondries. Barre=2µm (1, 3, 5 et 7) et 1µm (2, 4, 6 et 8) (B) La respiration cellulaire et la glycolyse des hépatocytes HepaRG et cholangiocytes HepaRG, et des hépatocytes humains ont été analysées à l'aide d'un Seahorse (n≥3). (C) La β-oxydation des acides gras et la lipogenèse *de novo* ont été mesurées après incubation des cellules avec respectivement de l'acide palmitique et de l'acide acétique radiomarqués au carbone 14 [C14]. (D) La composition lipidique de la lignée HepaRG et des hépatocytes humains a été étudiée par spectrométrie de masse GC/MS et analysée par le logiciel Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00. n≥3, excepté pour les hépatocytes humains n=1. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 2 : Métabolisme d'HepaRG après inhibition de PPARγ par l'antagoniste T0070907

(A) L'expression relative des gènes *PDK4*, *ANGPTL4*, *FAT/CD36* et *PLIN2* dans les cellules HepaRG progénitrices a été obtenue par RT-qPCR. Les cellules ont été traitées ou non au T0070907 à 100 nM et 1 µM pendant 24h et 48h. Les résultats ont été rapportés sur la condition non traitée arbitrairement fixée à 1. (B) La respiration cellulaire des cellules HepaRG-D4 traitées ou non au T0070907 à 1µM pendant 48h a été évaluée au Seahorse. (D) La β-oxydation des acides gras et la lipogenèse *de novo* ont été évaluées sur des cellules HepaRG-D4 traitées ou non au T0070907 à 1 µM pendant 48h par incubation avec respectivement de l'acide palmitique et de l'acide acétique radiomarqués au carbone 14 [C14]. (E) La viabilité cellulaire des cellules HepaRG progénitrices a été évaluée à l'aide d'un kit ATP. Les cellules ont été traitées ou non à différentes concentrations de T0070907 (1 nM, 5 nM, 10 nM, 1 µM et 10 µM) pendant 24h, 48h ou 72h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle

lui-même ramené à 100%. (F) La viabilité cellulaire des cellules HepaRG et HBG-BC2 en sphère a été évaluée grâce à un kit ATP. Les cellules ont été traitées ou non au T0070907 à 1 μ M en combinaison ou non avec du sorafénib ou du cisplatine pendant 48h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle lui-même ramené à 100%. ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3 : Métabolisme des lignées cellulaires après utilisation du DCA

(A) Les photos des lignées cellulaires HepaRG, HBG-BC2 et Huh7 en conformation sphère ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique, Barre=50 μ m. (B) La respiration basale, la fuite de protons et la capacité glycolytique des sphères HepaRG, HBG-BC2 et Huh7 ont été mesurées au Seahorse. Les cellules ont été traitées ou non au DCA à 50 mM pendant 4h ($n \geq 3$). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle lui-même ramené à 100%. (C) Le dosage du lactate a été effectué dans les surnageants de culture, prélevés 24h après incubation des cellules en présence de 50 mM DCA. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle lui-même ramené à 100%. (D) La β -oxydation des acides gras et la lipogénèse *de novo* ont été évaluées sur les sphères HepaRG, HBG-BC2 et Huh7 ainsi que sur les SP par incubation d'acide palmitique et d'acide acétique radiomarqué [C^{14}] après incubation de 50 mM de DCA pendant 4h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle lui-même ramené à 100%. (E) La mesure des ROS a été réalisée après incubation des cellules différenciées ou des sphères avec des sondes H2DCFDA (ion peroxyde) et MitoSox® (anion superoxyde). Les mesures ont été effectuées entre 30min et 72h après ajout de 50 mM de DCA. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle lui-même ramené à 100% (F) La viabilité cellulaire des HepaRG, HBG-BC2, Huh-6, Huh-7 et HepG2 en sphère a été évaluée grâce à un kit ATP. Les cellules ont été traitées ou non au DCA 50 mM en combinaison ou non avec du sorafénib ou du cisplatine pendant 48h. Les résultats

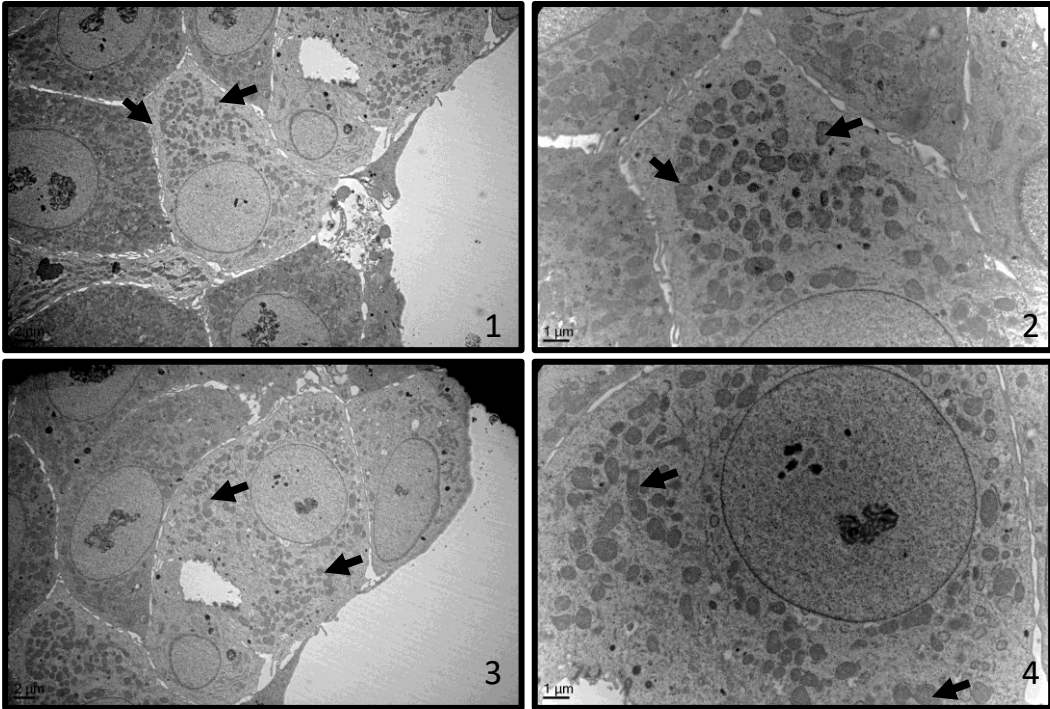
sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle lui-même ramené à 100%. $n \geq 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 4 : Synthèse des lipides au cours de la différenciation/rétrodifférenciation cellulaire

(A) Les quantités d'acides gras des différentes sous-classes et des acides gras totaux ont été évaluées dans les lignées cellulaires HepaRG, HBG-BC2, Huh-6, Huh-7 et HepG2 par spectrométrie de masse GC/MS et analysées par le logiciel Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00. (B) Le ratio acides gras saturés sur acides gras insaturés a été calculé à partir des pourcentages d'acides gras de chaque échantillon. (C) Les pourcentages des voies omega-7, 9, 6 et 3 ont été obtenus par calcul de la somme de chaque acide gras de la voie concernée. (D) Les lipides totaux, le ratio acides gras saturés sur acides gras insaturés et les pourcentages des voies omega-7, 9, 6 et 3 ont été établis pour la side population et les stades progéniteur et différencié de la lignée HepaRG. (E et F) Les pourcentages des acides gras C16:0, C16:1 n-7, C18:1 n-7, C22:5 n-3 et C22:6 n-3 ont permis le calcul des ratios de l'élongase couplée à la désaturase $\Delta 9$ et le ratio de la $\Delta 6$. $n \geq 3$ (excepté pour la side population $n=1$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A

Hepatocyte HepaRG



Cholangiocyte HepaRG

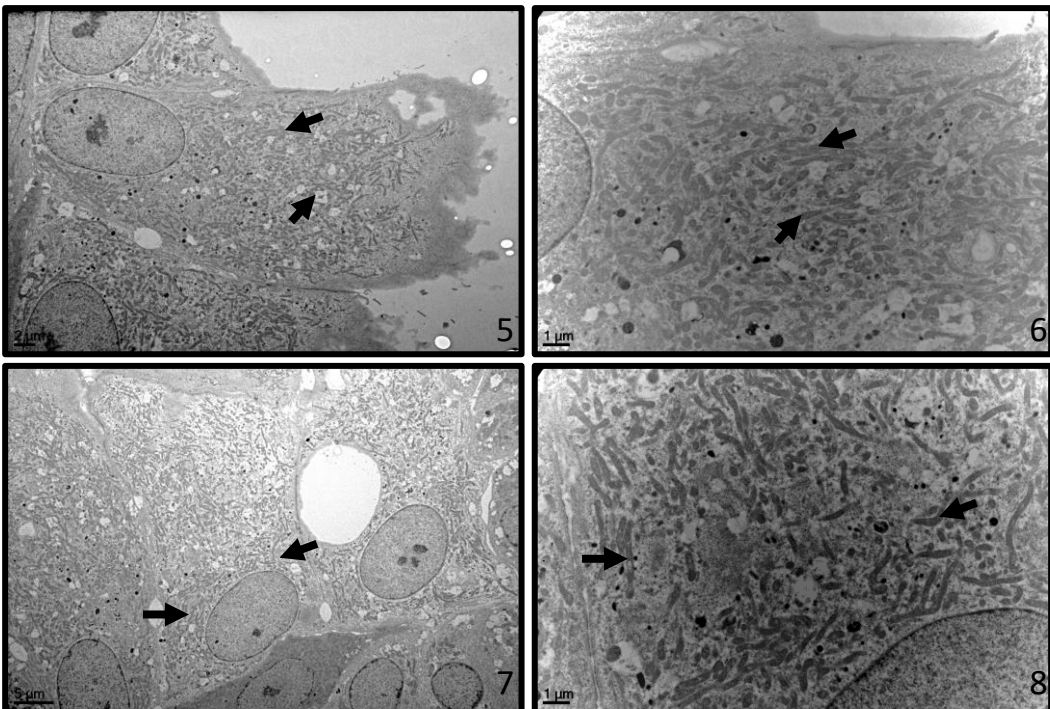
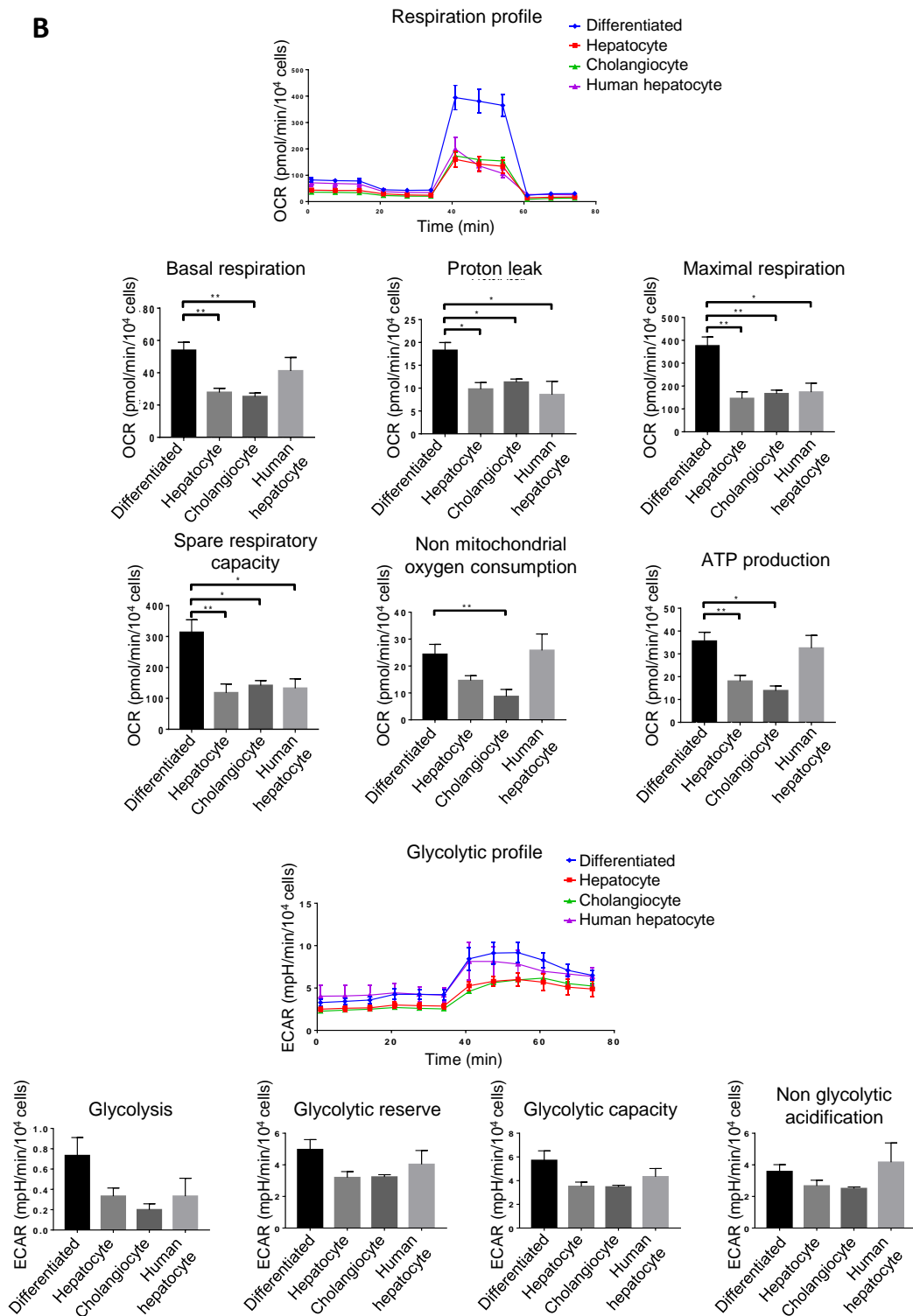
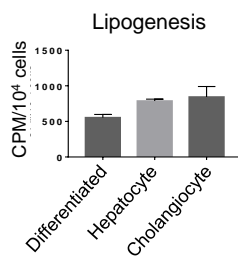
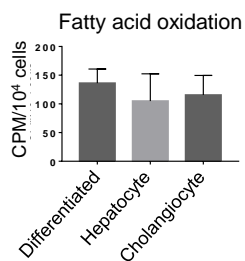
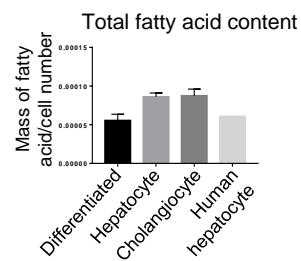
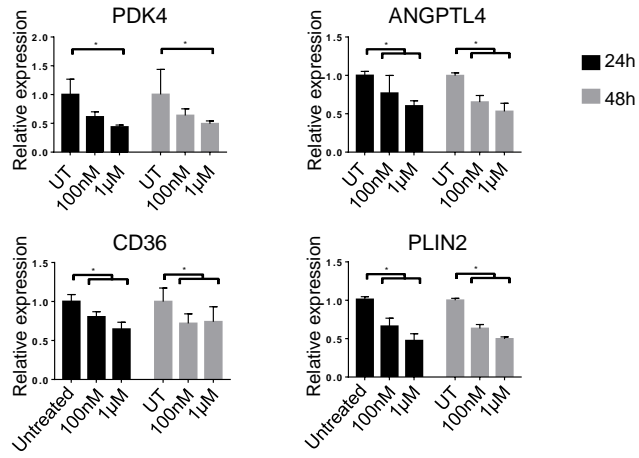
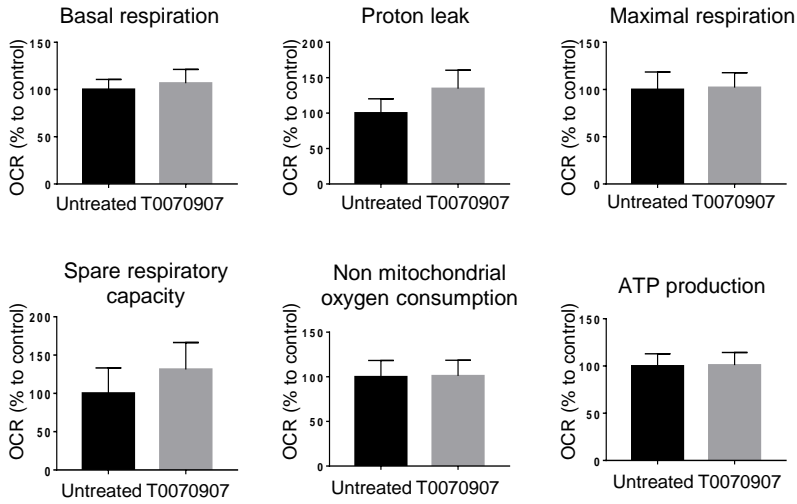
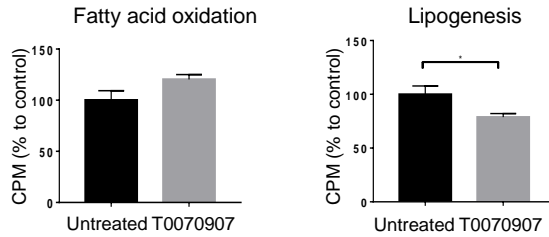
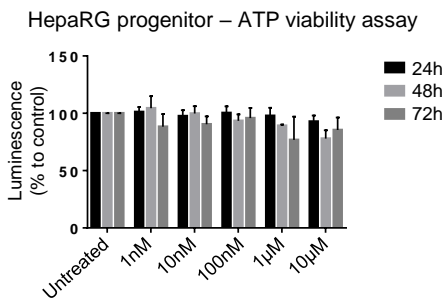
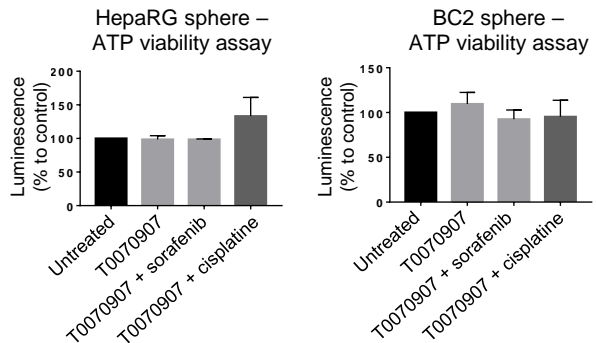
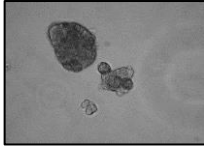
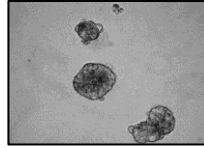
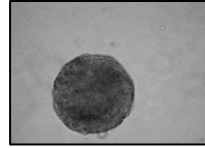


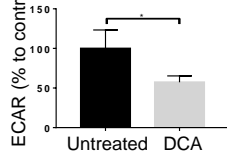
Figure 1

B**C****D****Figure 1**

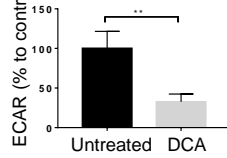
A**B****D****E****F****Figure 2**

A HepaRG sphere**BC2 sphere****Huh7 sphere****B**

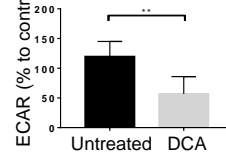
HepaRG sphere – Glycolytic capacity



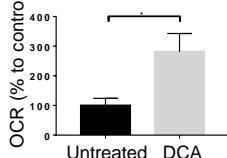
BC2 sphere – Glycolytic capacity



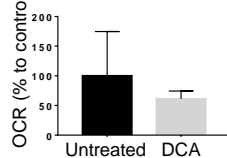
Huh7 sphere – Glycolytic capacity



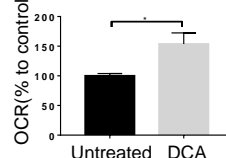
HepaRG sphere – Basal respiration



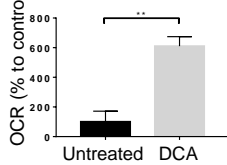
BC2 sphere – Basal respiration



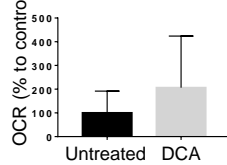
Huh7 sphere – Basal respiration



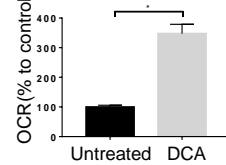
HepaRG sphere – Proton leak



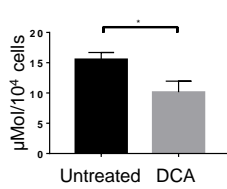
BC2 sphere – Proton leak



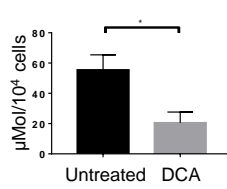
Huh7 sphere – Proton leak

**C**

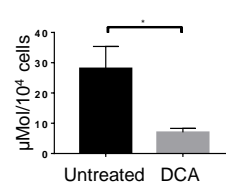
HepaRG sphere – Lactate



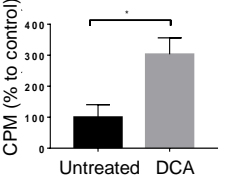
BC2 sphere – Lactate



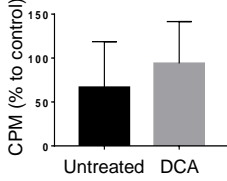
Huh7 sphere – Lactate

**D**

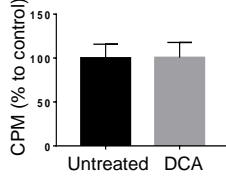
HepaRG sphere – Fatty acid oxidation



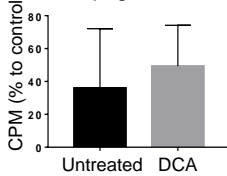
BC2 sphere – Fatty acid oxidation



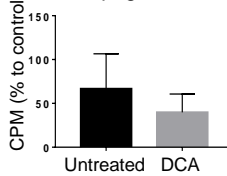
Huh7 sphere – Fatty acid oxidation



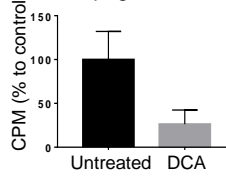
HepaRG sphere – Lipogenesis

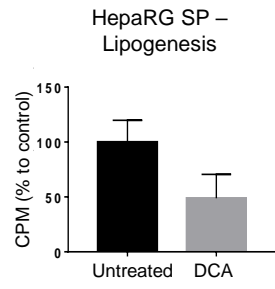
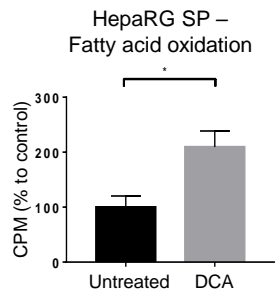


BC2 sphere – Lipogenesis

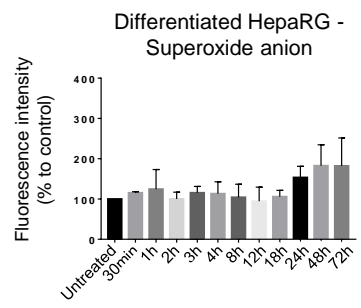
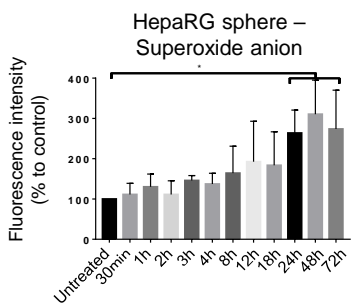
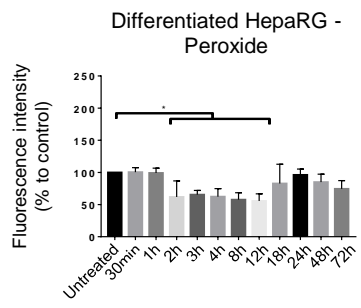
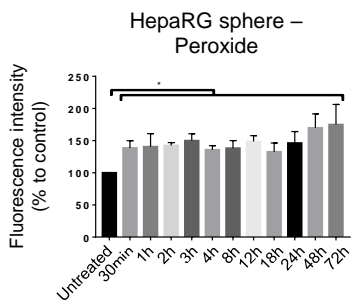


Huh7 sphere – Lipogenesis

**Figure 3**



E



F

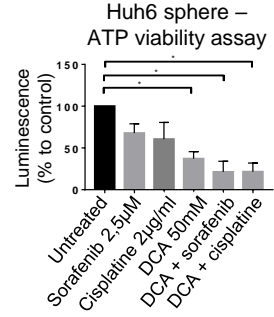
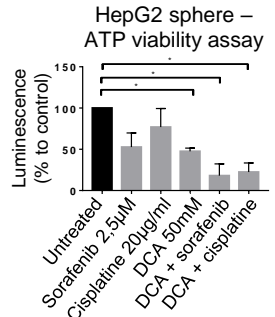
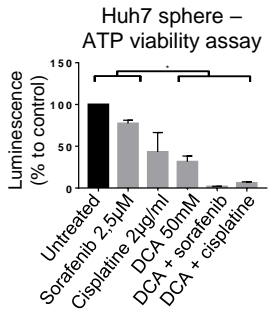
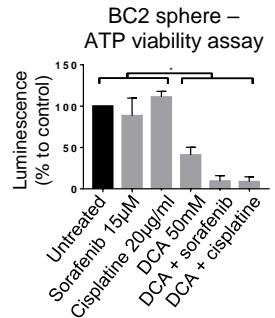
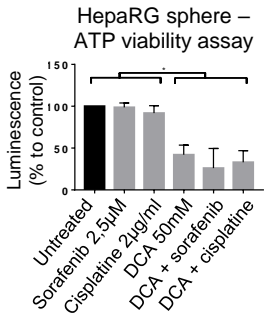
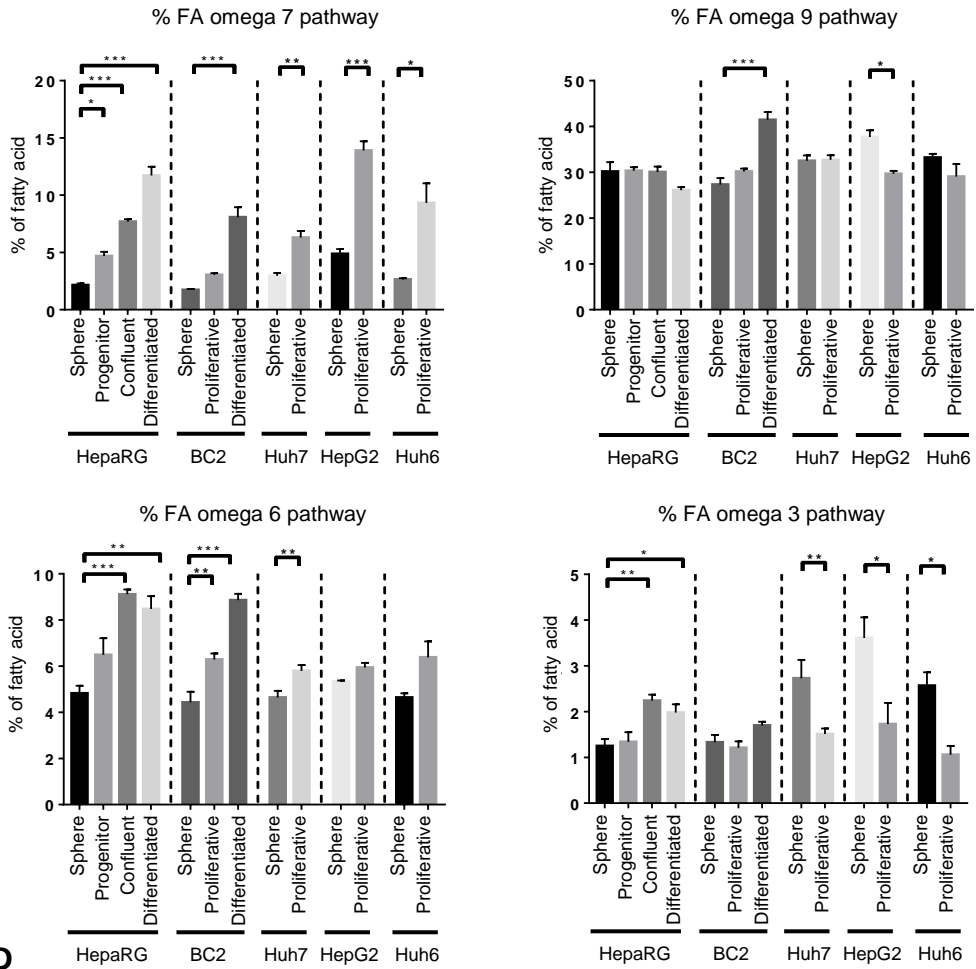


Figure 3

C



D

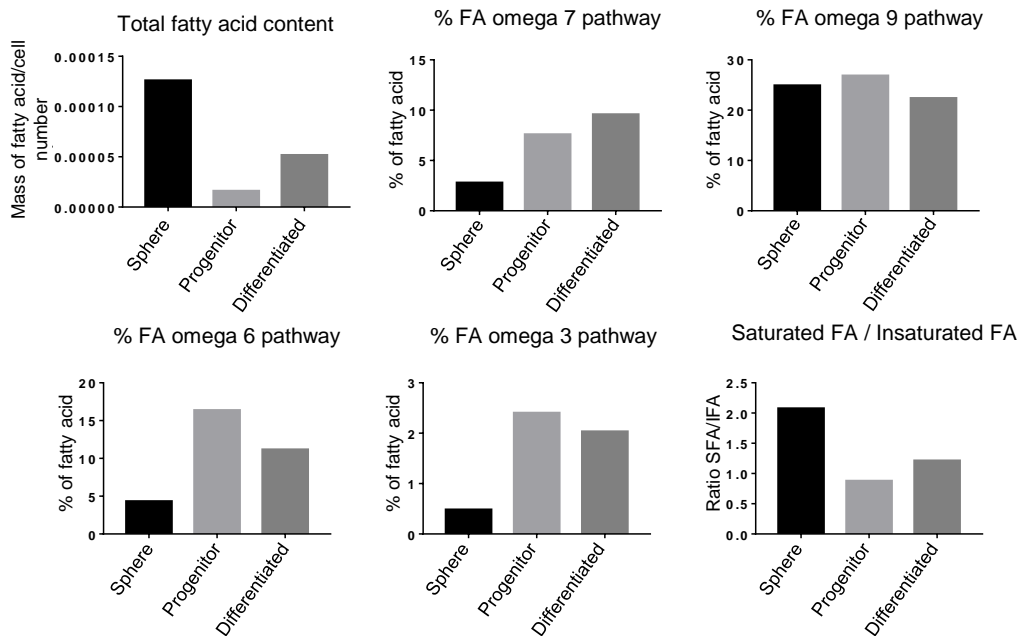


Figure 4

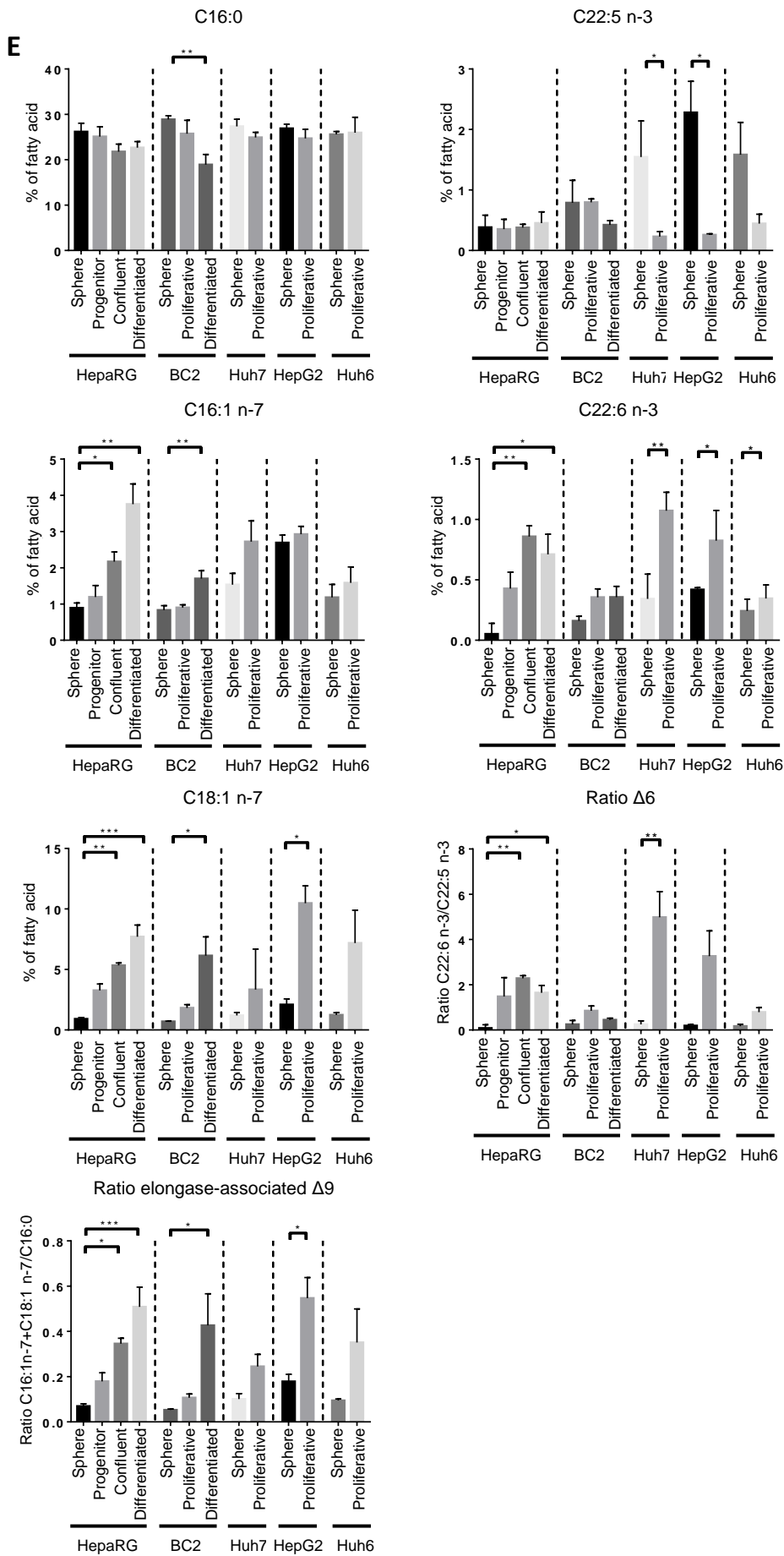
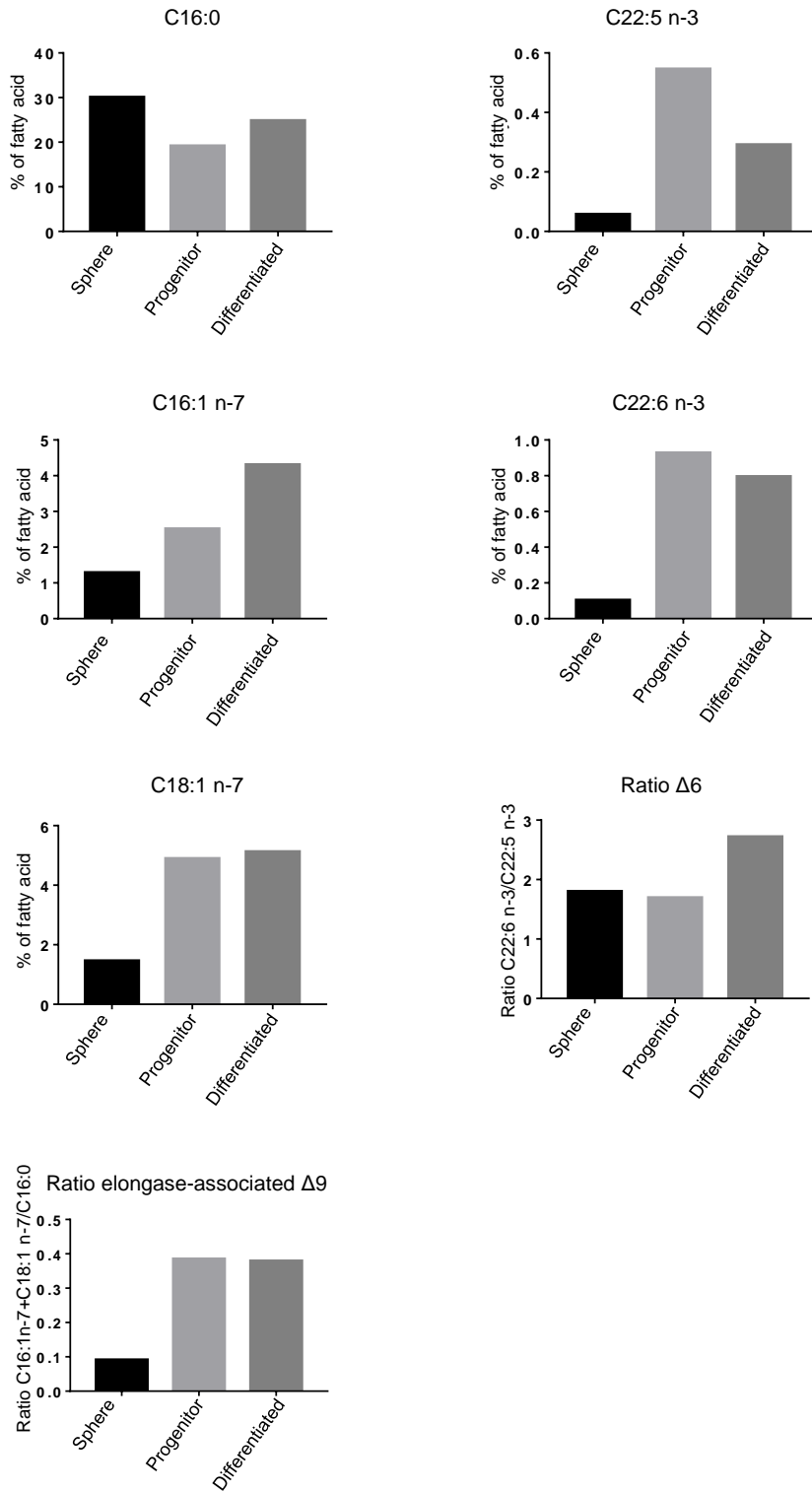


Figure 4

F**Figure 4**

Discussion générale et perspectives

Plasticité cellulaire et métabolisme :

La plasticité cellulaire est un processus physiologique normal que l'on retrouve dans la régénération du foie au cours de l'homéostasie hépatique ou suite à des lésions. En cas de développement d'un CHC, ce processus cause une hétérogénéité cellulaire intratumorale qui contribue à la résistance aux chimiothérapies (Carloni et al., 2014; Rombouts and Carloni, 2013). Cette capacité des cellules à alterner entre stade différencié et indifférencié est en partie dictée par le microenvironnement tumoral. Le microenvironnement est composé de matrices extracellulaires et de nombreux types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires. Les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement promeuvent la prolifération, la dédifférenciation et la dissémination métastatique des CHC via la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (Cabillic and Corlu, 2016; Wu et al., 2012). Nous avons mis en évidence l'effet de cytokines pro-inflammatoires dans la rétrodifférenciation des cellules HepaRG. En effet, nous avons démontré que le TGF β induit des marqueurs d'EMT et que le TNF α , via la voie NF- κ B, active l'IL-6 entraînant la diminution des marqueurs hépatiques. Nous avons également montré que ces cytokines interagissent entre elles de manière coordonnée pour induire la rétrodifférenciation hépatique (Dubois Pot Schneider et al., 2014a). Le microenvironnement inflammatoire pourrait induire la rétrodifférenciation par des changements épigénétiques. Une étude de 2019 montre que le traitement de la lignée HepaRG par du GSK-J4, inhibiteur de l'activité des lysine déméthylases 6A (UTX) et 6B (JMJD3), provoque la diminution des marqueurs de différenciation des hépatocytes et induit la prolifération des cellules HepaRG. Elle démontre que GSK-J4 est capable de stimuler la survie et l'inflammation. Les auteurs discutent également du rôle des voies inflammatoires de l'IL-6 et du TNF α qui pourraient être induites par le GSK-J4 (Pediconi et al., 2019).

Les cytokines sécrétées dans le microenvironnement modifient également les propriétés métaboliques des cellules. L'IL-6 augmente la glycolyse par l'induction des gènes *HK2* et 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (*PFKFB3*) (Ando et al., 2010) et le TGF β diminue l'expression des gènes associés au métabolisme des lipides et des acides aminés (Han et al., 2020). Des analyses protéomiques ont également mis en évidence une zonation du métabolisme dans les CHC, les cellules en périphérie de la tumeur possédant plus de mitochondries que les cellules tumorales (Buczak et al., 2018). Désert et ses collaborateurs ont établi une classification des CHC incluant le profil métabolique, la localisation

(périveineux/périportale) et l'état de différenciation (hépatocyte/progéniteur) des cellules (Désert et al., 2017, 2018). L'intégration des données transcriptomiques du modèle HepaRG au cours de la différenciation avec la classification des CHC de Désert révèle de nombreuses similitudes. On constate en effet un enrichissement de la signature des HepaRG souches (SP et sphère) avec la signature souche de la classification de Désert. De même, il existe un enrichissement du profil transcriptionnel des HepaRG différenciées avec les signatures périportal/périveineux. En 2019, une étude utilisant de la modélisation à grande échelle a comparé le modèle HepaRG à 3 jours (stade progéniteur) et à 30 jours (stade différencié). Cette étude a mis en évidence, par combinaison des données transcriptomiques et métabolomiques, des voies métaboliques spécifiques selon le stade de différenciation. Ainsi, les cellules différenciées sont associées à une augmentation du métabolisme des CYP, de la synthèse des acides biliaires, de la biotine, du tryptophane et des acides gras ainsi qu'une augmentation de la β -oxydation peroxysomale (Poupin et al., 2018). Ces données, couplées à l'enrichissement des signatures de la lignée cellulaire HepaRG dans la classification de Désert, positionnent le modèle HepaRG comme un modèle pertinent pour l'étude du métabolisme en lien avec la plasticité cellulaire.

Notre équipe cherche à caractériser les mécanismes impliqués dans l'acquisition et le maintien des propriétés souches lors du processus de rétrodifférenciation. Nous avons récemment précisé le rôle des protéines ANGPTL4 et PDK4 dans la reprogrammation du métabolisme des cellules CS/P et l'induction d'une résistance aux traitements. L'utilisation du DCA, un inhibiteur de PDK4, permet de réverser la chimiorésistance des cellules hépatiques immatures aux traitements. Il est ressorti de l'étude que les CSC pouvaient adopter d'un métabolisme plus glycolytique. L'analyse transcriptomique a mis en évidence une dysfonction mitochondriale mais des analyses fonctionnelles sont nécessaires pour valider cette hypothèse. Pour ce faire, nous avons tout d'abord caractérisé la dynamique mitochondriale au cours de la différenciation/rétrodifférenciation. Nous notons que l'expression des gènes de la biogenèse mitochondriale diminue au cours de la rétrodifférenciation, notamment *PGC1 α* , coactivateur transcriptionnel associé aux PPARs, qui permet la synthèse des constituants mitochondriaux. Il est intéressant de noter qu'une diminution du gène *PGC1 α* est observée au cours de la dédifférenciation de fibroblastes en iPS (Prigione and Adjaye, 2010) alors que son augmentation induit une augmentation du nombre de copies d'ADNmt dans l'AML (Chaudhary et al., 2021) tout comme dans nos cellules HepaRG au cours de la différenciation. Dans le cas de nos CSC hépatiques, il serait intéressant d'induire l'expression de *PGC1 α* . La surexpression

de PGC1 α pourrait favoriser la différenciation des cellules et l'induction de l'OXPPOS avec pour conséquence une augmentation de la production de ROS menant à la mort cellulaire et de plus sensibiliser les cellules aux chimiothérapies. Ceci confirmerait les résultats obtenus par le traitement avec le DCA et le clofibrate.

La diminution de la biogenèse mitochondriale dans notre modèle HepaRG est progressive au cours de la rétrodifférenciation et induit une diminution de la masse mitochondriale, du nombre de copies d'ADNmt et du nombre de branchements des mitochondries. La diminution de la fusion des mitochondries ainsi que la masse mitochondriale est associée à un arrêt du cycle cellulaire, à la progression tumorale ainsi qu'à une diminution du stress oxydatif (Apostolova et al., 2010; Rehman et al., 2012; Zhao et al., 2013). Les CSC entrent ainsi dans un mécanisme qui s'apparente à une quiescence. Les CSC en quiescence se caractérisent par un blocage en phase G0-G1 du cycle cellulaire. Ces cellules possèdent un faible pouvoir prolifératif, mais peuvent toutefois acquérir des mutations somatiques qui contribuent à la progression de la maladie et l'échappement au système immunitaire. En cas de dommages, ces CSC ont un fort potentiel de prolifération et de migration et sont associées généralement à un mauvais pronostic (Santos-de-Frutos and Djouder, 2021). Les cellules HepaRG immatures expriment des marqueurs précoces de phase G1 et peu ou pas de marqueurs de phase S et M. De plus, des immuno-marquages sur coupes de CHC montrent que les cellules PDK4 ou ANGPTL4 peuvent être localisées soit ponctuellement au sein de la tumeur, soit à la lisière ou au centre des nids fibreux (fekir et al, 2019), suggérant que ces cellules pourraient être quiescentes ou à prolifération lente avec un fort potentiel migratoire.

Nous avons également mis en évidence dans les modèles de CSC HepaRG que celles-ci privilégient la production d'énergie par une conversion du pyruvate en lactate, associée à une diminution de l'activité mitochondriale. Nous retrouvons dans ces CSC un profil métabolique qui semble correspondre à l'effet Warburg. Les mitochondries sont cependant fonctionnelles, mais les CSC ne privilégient pas la respiration mitochondriale pour la production de leur énergie. Ces observations rappellent les travaux de Crabtree sur les niveaux de respiration au sein des tumeurs. La forte appétence des CSC pour le glucose pourrait être à l'origine de l'inhibition de l'OXPPOS au profit de la glycolyse, résultant en une faible activité mitochondriale. Cette faible activité des mitochondries se manifeste par une diminution des voies cataboliques telles que l'oxydation des acides gras et la glutaminolyse, mais aussi des voies anaboliques comme la lipogenèse *de novo* et l'élongation des acides gras. Durant la phase

de différenciation, la synthèse énergétique des mitochondries prend le relai de la conversion du pyruvate en lactate. Nous observons alors une augmentation de toutes les voies décrites précédemment. Il est de plus intéressant de noter que les cellules BC2, qui possèdent les mutations *TP53* et *CTNNB1*, se rapprochent du phénotype métabolique des cellules HepaRG. Cette similitude pourrait provenir de leur potentiel de différenciation qui est certes moindre, mais supérieur à celui des autres lignées que nous avons étudiées (Glaise et al., 1998). Effectivement, dans les lignées Huh-6, Huh-7 et HepG2, nous n'observons pas de forte capacité de plasticité cellulaire. Les lignées semblent plutôt avoir une forte capacité de prolifération en condition sphère. Cette prolifération est couplée à une expression non différentielle de marqueurs souches avec les conditions en 2D et pour certaines cellules, une induction de marqueurs de différenciation indique que ces sphères ne possèdent pas de caractéristiques souches. Les lignées cellules Huh-6, Huh-7 et HepG2 ne constituent donc pas des modèles de CSC hépatiques. En conséquence, notre étude s'est concentrée sur les lignées BC2 et HepaRG afin d'étudier le métabolisme associé à la plasticité cellulaire. Au regard des résultats que nous avons obtenus, il nous apparaît que nos CSC sont quiescentes ou à prolifération lente et glycolyse-dépendante. Il faut de plus garder à l'esprit que le lactate produit peut être capté par d'autres cellules et utilisé comme substrat énergétique (Faubert et al., 2017; Martinez-Outschoorn et al., 2011).

En comparant les résultats obtenus dans nos CSC avec les cellules souches initiant les tumeurs (TIC) de Chen et son équipe, nous constatons quelques similitudes. Chen utilise un modèle murin infecté par le virus de l'hépatite C et qui a subi un régime d'alcool de 12 mois. Ce modèle possède ainsi une expression ectopique du « Toll-like receptor 4 » (Tlr4) dans les hépatocytes/hépatoblastes. Tlr4 provoque une induction du facteur Nanog qui impacte le métabolisme des TICs (Chen et al, 2017). L'impact de Nanog se traduit par une inhibition de l'OXPPOS et de l'élongation des acides gras dans les TICs. La diminution de l'activité OXPPOS provoque ainsi une diminution des ROS entraînant une augmentation de l'autorenouvellement et de la chimiorésistance des cellules. Ces résultats sont en adéquation avec ceux que nous obtenons dans nos CSC hépatiques sans infection à l'hépatite C. Les CSC ne privilégient pas l'OXPPOS qui est une source trop importante de ROS, délétères pour ces cellules qui ne disposent pas d'un pool antioxydants suffisant. Cependant, Chen décrit que le métabolisme des TICs passe par l'induction de l'oxydation des acides gras. Ces résultats sont difficiles à interpréter, car le produit de l'oxydation des acides gras est l'acétyl-CoA, élément essentiel du cycle TCA qui alimente ensuite la chaîne respiratoire. De ce fait, la production

d'acétyl-CoA devrait être associée à une OXPHOS, même faible. Dans nos modèles cellulaires, la β -oxydation des acides gras est diminuée et associée à une faible respiration au stade immature. Au cours des phases de prolifération et de différenciation, nous observons une augmentation progressive de l'activité d'oxydation des acides gras, probablement due à l'activation des mitochondries et l'augmentation de l'OXPHOS. Les résultats obtenus par Chen et son équipe sur l'oxydation des acides gras peuvent éventuellement s'expliquer par le fait qu'ils ont mené leurs expériences sur un modèle murin qui possède un microenvironnement complexe. Ainsi, il est possible que les acétyl-CoA des TICs servent de source d'énergie pour d'autres cellules et inversement que des substrats de cellules voisines alimentent le métabolisme des TICs. Il peut être également envisagé que le phénotype dépend de l'activité de prolifération des cellules. En effet, dans notre modèle, nous observons que les progéniteurs, qui présentent une prolifération active, ont une respiration mitochondriale très faible alors que l'activité d'oxydation des acides gras est augmentée.

Nous constatons également que la side population, sous-population souche de la lignée HepaRG, possède un phénotype intermédiaire entre les progéniteurs et les sphères concernant la respiration et l'oxydation des acides gras. Les marqueurs du cycle, notamment de la phase S et M, montrent que cette side population exprime certains marqueurs de prolifération, suggérant une prolifération lente contrairement aux sphères. Bien que la side population garde un phénotype plus orienté vers la production d'énergie par la glycolyse et la conversion du pyruvate en lactate, nous observons une plus forte respiration mitochondriale comparée aux sphères. Les sous-populations souches sont donc dynamiques et possèdent une hétérogénéité métabolique. Nous retrouvons cette hétérogénéité métabolique dans les travaux de Gammon et son équipe. Ils démontrent l'existence de deux types de CSC CD44^{high} provenant de cellules épithéliales de carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HNSCC). La première fraction est CD44^{high}/ESA^{high} possède des marqueurs épithéliaux alors que la deuxième fraction CD44^{high}/ESA^{low} développe, en condition hypoxique, une EMT favorisant leur agrégation en sphères. De plus, cette EMT des CSC CD44^{high}/ESA^{low} provoque une augmentation des gènes de la glycolyse *PDK1*, *HK2* et *LDHA* ainsi qu'une diminution de la masse mitochondriale, de la consommation d'oxygène et de la production de ROS (Gammon et al., 2013). Ainsi, on pourrait avoir, dans notre modèle de CSC, trois phénotypes distincts avec des cellules différenciées OXPHOS, des cellules souches « quiescentes » glycolytiques et des cellules souches « prolifératives » glycolytiques/OXPHOS (Figure 46).

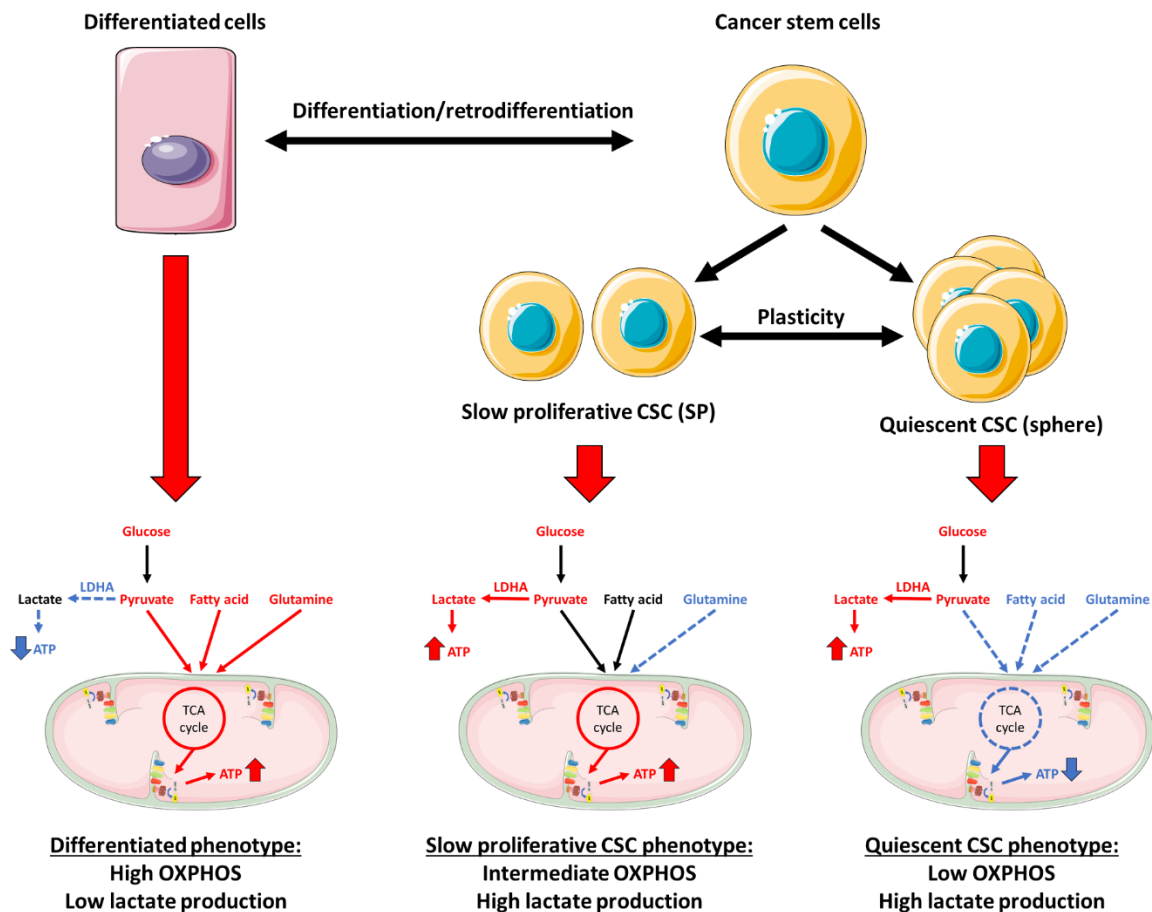


Figure 46 : Profil métabolique des CSC et des cellules différenciées dans les modèles de CHC *in vitro*. La lignée cellulaire HepaRG possède plusieurs phénotypes : un phénotype différencié et deux phénotypes de cellules souches cancéreuses que sont les phénotypes de faible prolifération et quiescent. Les cellules différenciées sont pourvues d'un fort métabolisme mitochondrial produisant de l'énergie pour la cellule. Dans le cas des cellules souches cancéreuses, il existe une forte plasticité. Le phénotype de faible prolifération se caractérise par une forte production de lactate et une OXPHOS intermédiaire. Dans le cas du phénotype quiescent, les cellules produisent leur énergie par une forte production de lactate. Flèche noire : voie non modifiée ; flèche bleu pointillée : voie diminuée ; flèche rouge : voie augmentée.

Le métabolisme lipidique et la famille PPAR

Dans les modèles de CSC que nous avons étudiés, nous avons relevé différents points importants au niveau du métabolisme lipidique. La quantification des lipidiqes, au cours de la différenciation/rétrodifférenciation, par des incubations de Nile red et des analyses en spectrométrie de masse démontre une accumulation de lipides dans les sphères et les SP. Cette accumulation avait été précédemment montrée par microscopie avec marquage des CSC à l'huile rouge (Fekir et al., 2019). La lipogenèse *de novo* étant diminuée, nous avons émis l'hypothèse d'une entrée et d'un stockage accrus de lipides. Cette hypothèse semble cohérente

avec la littérature qui démontre le rôle bénéfique des lipides dans les cellules souches. Dans le cancer du sein, l'accumulation de lipides est caractéristique d'une sous-population de CSC (Hershey et al., 2020). Chez la drosophile, l'accumulation de gouttelettes lipidiques participe à la défense anti-oxydante en limitant le niveau de ROS et la peroxydation lipidique dans les niches et les cellules souches neuronales (Bailey et al., 2015). Cette hypothèse a été confirmée par l'expression de *FAT/CD36* qui est un transporteur des acides gras important dans les hépatocytes. En plus d'être un transporteur, *FAT/CD36* est considéré dans les adipocytes comme un marqueur souche associé à l'accumulation de triglycérides (Gao et al., 2017) et comme un facteur prométastatique dans les cancers gastriques et cervicaux (Deng et al., 2019; Wang et al., 2020).

L'accumulation d'acide gras a été confirmée par les expériences d'extraction lipidique et les analyses de GC/MS qui ont mis en évidence une augmentation des lipides totaux dans les sphères. Des résultats préliminaires (n=1) sur les SP suggèrent également le même phénomène. La séparation des lipides totaux permet d'identifier 4 sous-classes de lipides : les phospholipides, les triglycérides, les AGL et les esters de cholestérol. Ces différentes classes sont augmentées dans les sphères HepaRG et BC2. Il est intéressant de noter que dans les phénomènes d'ischémie, les AGL sont associés à la dysfonction mitochondriale par leur action, entre autres, sur la structure membranaire des mitochondries et sur le découplage de l'OXPPOS (Feldkamp et al., 2006). Cette accumulation d'AGL dans les cellules souches pourrait être due à l'activité des récepteurs de la famille des PPARs. Dans des cellules d'îlots de Langherans, l'activation de $PPAR\gamma$ par la rosiglitazone provoque une surexpression du récepteur des AGL *Ffar1* (*Gpr40*), conduisant à une augmentation de la sécrétion d'insuline, de la voie intracellulaire du calcium et de l'expression de *Glut2* (Kim et al., 2013). Les mêmes observations ont été faites chez des patients diabétiques, avec un lien entre la voie insulinique dépendante de $PPAR\gamma$ et *FFAR1* (Wagner et al., 2014). L'accumulation de triglycérides et d'esters de cholestérol est rapportée dans l'hépatosplénomégalie chez l'enfant et est associée à une déficience en lipase A (LAL) (Beaudet et al., 1977). La LAL est également caractéristique de la NAFLD et est régulée par les PPARs. Chez des patients atteints de NAFLD, on observe un taux sanguin de LAL très réduit. L'utilisation d'un agoniste $PPAR\alpha$ sur la lignée HepG2 a permis de réinduire l'expression de LAL et l'oxydation des acides gras (Gomaschi et al., 2019). Chez la souris, l'axe $Ppar\gamma/mTor$ semble aussi jouer un rôle dans l'entrée et le stockage des acides gras et agit sur la LAL (Zhao et al., 2015). L'augmentation du stockage lipidique se

traduit également par l'augmentation du contenu en phospholipides qui jouent un rôle important dans la composition des membranes (Penno et al., 2013).

Enfin, nous avons mis en évidence un ratio acides gras saturés/acides gras insaturés (AGS/AGI) plus élevé dans les CSC que dans les cellules différenciées. De façon intéressante, il a été suggéré que des quantités importantes d'acides gras saturés pourraient induire l'expression de marqueurs de CSC et une activation de la voie NF- κ B dans des lignées d'hépatome (Chong et al., 2015). Un taux élevé d'AGS au niveau des membranes du RE favorise le déclenchement de la réponse protéique dépliée (unfolded protein response, UPR) en cas de stress du RE. L'activation de la réponse UPR passerait par les protéines IRE1 et PERK indépendamment de leur domaine luminal de détection du stress du RE (Volmer et al., 2013; Welte and Gould, 2017). De plus, un taux élevé d'AGI est décrite comme pro-inflammatoire (Czamara et al., 2017). La modulation du ratio AGS/AGI mériterait d'être approfondie dans le cadre des CSC afin de déterminer le rôle des acides gras saturés et insaturés dans la réponse au stress du RE et la réponse inflammatoire. Enfin, il a été observé dans des cellules souches de cancer des ovaires une accumulation d'AGI. Ce résultat diffère de celui que nous obtenons dans les CSC hépatiques. Les auteurs expliquent que dans leurs tumeurs, les cellules possèdent une forte expression de la désaturase *SCD1* ($\Delta 9$). Ainsi, l'enzyme SCD1 est capable, par son activité de désaturation, d'augmenter le taux d'AGI (Li et al., 2017). Dans nos CSC hépatiques, nous notons une diminution de l'activité de désaturation, de la synthèse des acides gras et une entrée importante de lipides. Les lipides entrant dans les CSC hépatiques ne seraient pas désaturés ce qui peut expliquer que nos cellules possèdent une proportion plus importante d'AGS (Li et al., 2017). Afin d'enrichir nos données sur le métabolisme des lipides, nous avons analysé l'élongation et la désaturation des acides gras (Résultats partie II – résultat 4). Nous avons mis en évidence une augmentation progressive des capacités d'élongation et de désaturation des acides gras dans les cellules au cours de la différenciation. Comme évoqué dans la partie « résultats complémentaires », l'augmentation des voies de synthèse des acides gras et notamment l'expression des désaturases *Scd1*, *Scd2* et *Fads2* ($\Delta 9$, $\Delta 6$ et $\Delta 5$) et des élongases *Elovl1*, *Elovl3*, *Elovl5* et *Elovl6*, peut être liée à l'activité de Ppar α (Guillou et al., 2002; Jakobsson et al., 2006; Mandard et al., 2004; Martin et al., 2007). De plus, PPAR γ intervient dans la synthèse, l'entrée et l'accumulation des acides gras. Son inactivation permet de réduire la stéatose et l'accumulation de lipides dans les cellules hépatiques (Gavrilova et al., 2003; Matsusue et al., 2003).

Finally, the evidence of the involvement of PPARs in lipid homeostasis is numerous and questions the role of this family in metabolic reprogramming. We have observed a modulation of the expression of PPAR α and PPAR γ during the phenomena of differentiation and dedifferentiation of liver tumor cells. The PPAR γ isoform is elevated in CSC, while the PPAR α isoform is decreased. This profile is reversed during the differentiation of liver CSC. Histological sections of poorly differentiated CHC show a nuclear localization of PPAR γ in isolated cells. These cells could correspond to CSC or to cells in the process of dedifferentiation. Cohort analyses of patients with CHC that we have performed show that PPAR γ is associated with a poor prognosis and a high recurrence rate. In the case of PPAR α , its expression level does not modify the prognosis. It is noted that tumors expressing a high level of PPAR γ also show a high level of AFP, a serological marker correlated with a poor prognosis for the patient. Finally, PPAR γ is associated with the « stem » subgroup of the classification of Désert et al. (Désert et al., 2017), while PPAR α is associated with the « periportal/perivascular » subgroups. These results reinforce our interest in studying the role of PPAR γ in liver CSC. We show that the activation of PPAR γ causes dedifferentiation of cells with a decrease in the network and mitochondrial metabolism. Conversely, the inhibition of PPAR γ by siRNA causes mitochondrial fusion, an increase in the production of ROS, a decrease in the expression of stem markers and a decrease in the cellular viability of CSC. In addition, *PDK4* is a target gene of PPAR γ . The inhibitory effect of PPAR γ on OXPHOS could therefore be the direct consequence of the action of PPAR γ on the *PDK4* gene (Pettersen et al., 2019; Strand et al., 2012). It is also possible that the induction of *PDK4* expression is indirect and occurs via an increase in the expression of ANGPTL4 (La Paglia et al., 2017). ANGPTL4 is a circulating protein produced by the liver and adipocytes, which is associated in CHC with tumor progression, metastatic ability and a poor prognosis for the patient (El-Shal et al., 2017; Li et al., 2011). In our study, we have demonstrated that ANGPTL4 activates the ERK and PI3K pathways leading to an increase in tumor invasion and angiogenesis by activation of genes of metalloproteinases *MMP-2* and *MMP-13* and the factor *VEGF-A*. ANGPTL4 also contributes to the maintenance of CSC by its action on metabolism via the induction of *PDK4* expression (Fekir et al., 2019).

The PPAR family seems to have an ambivalent role in the development of CHC. PPAR α and PPAR γ are presented both as markers of good prognosis and both as markers of poor prognosis.

marqueurs de mauvais pronostic (Li et al., 2018; Shen et al., 2012; Tanaka et al., 2008; Xiao et al., 2018). L'activation de PPAR γ par la troglitazone dans des modèles de CHC *in vitro* et *in vivo* provoque un arrêt en phase G0-G1 du cycle cellulaire et diminue la croissance tumorale (Yu et al., 2006). Par la suite, Yu et ses collaborateurs démontrent également que la perte d'un allèle *PPAR γ* est suffisante pour augmenter la susceptibilité des modèles murins à développer un CHC (Yu et al., 2010a). Très récemment, il a été montré que le gène « zinc finger and BTB domain containing 20 » (*Zbtb20*), induit la progression du CHC en inhibant l'expression de *Ppar γ* (To et al., 2020). Cependant, certaines études décrivent l'intérêt thérapeutique de cibler PPAR γ dans le CHC. Feng et son équipe montrent ainsi que la simvastatine resensibilise la lignée cellulaire de CHC LM3 au sorafénib par une inhibition de l'axe Hif1 α /Ppar γ /Pkm2 (Feng et al., 2020). L'étude de Patitucci démontre également, dans un modèle murin, que l'inhibition d'Hnf1 α par la phosphorylation d'Akt augmente *Ppar γ* qui promeut la tumorigenèse (Patitucci et al., 2017). Plus récemment, une étude décrit le rôle de PPAR γ dans la progression tumorale du CHC par l'induction de la transcription des gènes de la lipogénèse *ACLY* et *ACC* (Ning et al., 2020). Le rôle de PPAR γ peut également varier selon l'isoforme impliquée. L'isoforme PPAR γ 1 contribuerait à diminuer la différenciation des cellules épithéliales de la prostate. Elle provoquerait une diminution des désaturases et une augmentation de la tumorigenèse. PPAR γ 2 aurait l'effet inverse (Strand et al., 2012). Dans notre modèle hépatique HepaRG, les résultats préliminaires montrent que l'isoforme PPAR γ 1 est majoritaire. Les effets observés sont cohérents avec ceux décrits par Strand dans les cellules épithéliales de la prostate. Enfin, il serait intéressant de surexprimer et/ou d'inhiber l'expression de ces deux isoformes dans notre modèle, afin de déterminer leur implication respective au cours de la différenciation/rétrodifférenciation des cellules tumorales hépatiques.

Le rôle de PPAR α dans le CHC est également ambigu. Son inactivation favorise la viabilité cellulaire, la migration et l'invasion dans des cellules *in vitro* (Cai et al., 2019; Drakaki et al., 2015). La diminution de son expression dans le CHC est également associée à un pronostic défavorable du patient (Xiao et al., 2018). Dans un modèle murin d'*Apc*^{TumLIV}, Senni et son équipe montrent que la déplétion du gène de *Ppara* contribue à diminuer l'initiation et la progression du CHC (Senni et al., 2019). Cependant, dans un modèle murin d'infection à l'hépatite C, l'induction du gène *Ppara* est décrite comme essentielle dans le développement du CHC (Tanaka et al., 2008). De plus, l'étude de Chen et son équipe montre que l'activation de *Ppara* par l'acide 4-phénylbutyrique (4-PBA) augmente l'hépatocarcinogénèse (Chen et al., 2021). L'utilisation du 4-PBA, un agoniste de *Ppara* ajouté dans la nourriture des souris, active

la voie Wnt5b et induit l'apparition de CSC. Ces résultats sont en contradiction avec nos résultats qui montrent que PPAR α est un marqueur de différenciation et associé à un bon pronostic dans le CHC humain. Il est cependant possible que l'activation de la voie Wnt5b par le 4-PBA soit indépendante de son effet agoniste sur PPAR α . Samid et son équipe rapportent que le 4-PBA est également un agoniste de PPAR γ (Samid et al., 2000). Il semble donc important de prendre en considération à la fois PPAR α et PPAR γ . En effet, dans la cohorte Roessler, des taux élevés des deux isoformes PPAR γ et PPAR α sont corrélés au pronostic le plus sombre. Ce résultat n'est cependant pas retrouvé dans les cohortes TCGA et ICGC (Figure 47), pour lesquelles c'est la forte expression de PPAR γ qui est corrélée au plus mauvais pronostic. À noter toutefois que dans la cohorte Roessler, l'expression de PPAR γ est associée à un mauvais pronostic et que dans toutes les cohortes, une forte expression de PPAR α est associée à une meilleure survie quand l'expression de PPAR γ est faible. Il est possible que la différence provienne de l'étiologie des CHC puisque la cohorte Roessler est constituée de patients d'origine asiatique et contient essentiellement des CHC provoqués par le virus de l'hépatite B. Une étude très récente démontre, dans des tumeurs d'intestin, que l'activation conjointe de Ppar α/δ provoque une induction de l'oxydation des acides, d'un profil souche et d'une augmentation de la tumorigenèse. L'étude conclut que le ciblage de l'oxydation des acides gras par un inhibiteur de Cpt1a peut être une stratégie thérapeutique prometteuse pour contrer les effets du régime riche en lipides (HFD) sur les cellules souches intestinales (Mana et al., 2021). Les résultats de cette étude corroborent nos résultats sur l'augmentation de PPAR α au cours de la différenciation et son lien avec l'induction de la voie d'oxydation des acides gras.

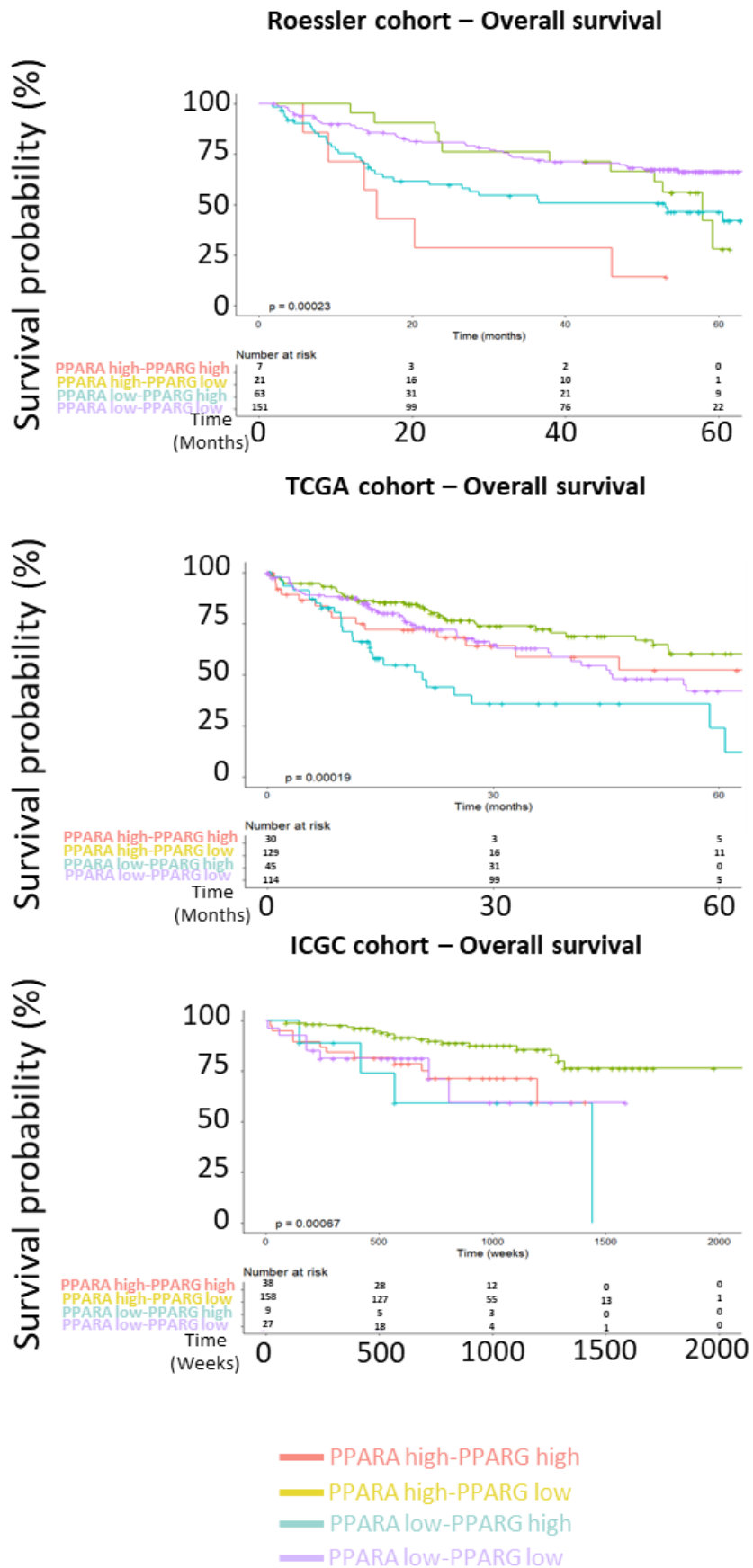


Figure 47 : Courbes de survie Kaplan-Meier dans les cohortes Roessler, TCGA et ICGC. Différentes combinaisons d'expression de PPAR α et PPAR γ ont été corrélées à la survie globale des patients atteints de CHC.

Enfin, nous avons déterminé que la balance entre PPAR α et PPAR γ module la différenciation/rétrodifférenciation et le métabolisme des cellules. Dans nos travaux, l'expression de l'isoforme PPAR γ est associée à un phénotype souche, un métabolisme glycolytique, une accumulation de lipides et un mauvais pronostic du patient. L'expression de PPAR α est quant à elle liée à un phénotype différencié, un métabolisme mitochondrial, une synthèse des acides gras et un bon pronostic du patient. Agir sur les deux isoformes PPAR α et PPAR γ pourrait ainsi être une stratégie intéressante dans certains CHC pour empêcher la plasticité cellulaire et la réémergence de la tumeur par les CSC.

Métabolisme et résistance aux traitements

Le métabolisme est considéré aujourd'hui comme un des marqueurs du cancer (Pavlova and Thompson, 2016). Il apparaît important d'identifier et de cibler des marqueurs du métabolisme dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans nos études, nous avons tout d'abord identifié l'implication de PDK4 et ANGPTL4 dans la résistance aux traitements des CSC hépatiques. Nous avons traité ces cellules par du DCA, un inhibiteur de la famille PDK, pour réactiver la décarboxylation du pyruvate et l'OXPLOS. Ce traitement s'avère efficace pour inverser la chimiorésistance (Fekir et al, 2019). Cependant, les mécanismes du DCA restaient peu connus. L'hypothèse émise dans notre précédente étude était que le DCA provoquait une réactivation des mitochondries et une génération de ROS délétères pour les CS/P qui disposent d'un pool antioxydant faible (Fekir et al., 2019). Nous avons cherché à confirmer cette hypothèse. Nous montrons que le DCA provoque une diminution de la production de lactate ainsi qu'une augmentation de la respiration basale, de la fuite de protons, de l'oxydation des acides gras et de la production de ROS (Résultats complémentaires – Résultats 3). Le DCA a fait l'objet d'une étude clinique de phase I dans le traitement de tumeurs cérébrales qui valide l'absence de toxicité de cette molécule (Dunbar et al., 2014). Une autre étude préclinique a montré une biodisponibilité du DCA de 100% lors d'administration orale et mis en évidence des effets bénéfiques sur les maladies musculaires en condition hypoxique (Parolin et al., 2000). Cependant, des symptômes comme de la fatigue, des vomissements et des neuropathies ont été observés chez certains patients (Chu et al., 2015; Stacpoole et al., 2019). Ces symptômes seraient cependant dépendants de la voie d'administration du DCA. Les études se poursuivent afin de préciser l'intérêt du DCA dans le traitement de certains cancers.

Nous avons inhibé la production du lactate de façon indirecte par le traitement au DCA. Cependant, la présence de lactate, produit ou importé dans la cellule, peut servir d'antioxydant et de source d'énergie pour les CSC. Il serait donc intéressant de cibler spécifiquement la production ou le transport du lactate. En effet, des études montrent que le ciblage des transporteurs monocarboxyliques du lactate (MCT) inhibe la prolifération lymphocytaire. Le ciblage de la LDHA, enzyme de conversion du pyruvate en lactate, a permis la régression de tumeurs par déplétion du contenu en ATP et augmentation du stress oxydatif (Le et al., 2010). L'investigation de ces ciblages dans les CSC hépatiques qui ont une forte production de lactate pourrait fournir une stratégie thérapeutique.

Concernant les molécules ciblant la famille PPAR, nous avons testé l'effet d'un antagoniste de PPAR γ , le T0070907, sur nos lignées cellulaires de CHC. Aux concentrations utilisées, il n'a pas produit d'effet sur le métabolisme. L'utilisation de concentrations plus élevées, comme suggéré dans la partie résultats complémentaires, pourrait permettre d'obtenir un effet sur le métabolisme des cellules. Il faut cependant garder en tête que les fortes concentrations du T0070907 peuvent avoir des effets non dépendant de PPAR γ . Nous avons également testé un agoniste spécifique de PPAR α , le clofibrate, en combinaison avec le DCA dans le but de réactiver la respiration mitochondriale. L'effet combiné du clofibrate et du DCA provoque une baisse drastique de la viabilité cellulaire. Les fibrates sont des molécules déjà utilisées chez l'Homme dans le cadre de traitement de la NAFLD. Des études cliniques ont mis en évidence la sécurité de ce traitement chez les patients avec une diminution des triglycérides, de l'insulino-résistance et du glucose (Fernández-Miranda et al., 2008). On peut envisager que la diminution de ces paramètres soit la conséquence d'une réactivation métabolique. Cibler les deux isoformes PPARs pourrait également être pertinent. Le saroglitazar est un agoniste PPAR γ/α , qui possède une affinité supérieure pour PPAR α . Il réduit la stéatose hépatique, l'inflammation et la fibrose dans la NAFLD (Jain et al., 2018; Kumar et al., 2020). Cette molécule a récemment fait l'objet d'une étude clinique de phase II sur des patients atteints de NAFLD. L'étude conclut à la bonne tolérance du saroglitazar avec amélioration de l'insulino-résistance et de la dyslipidémie (Gawrieh et al., 2021).

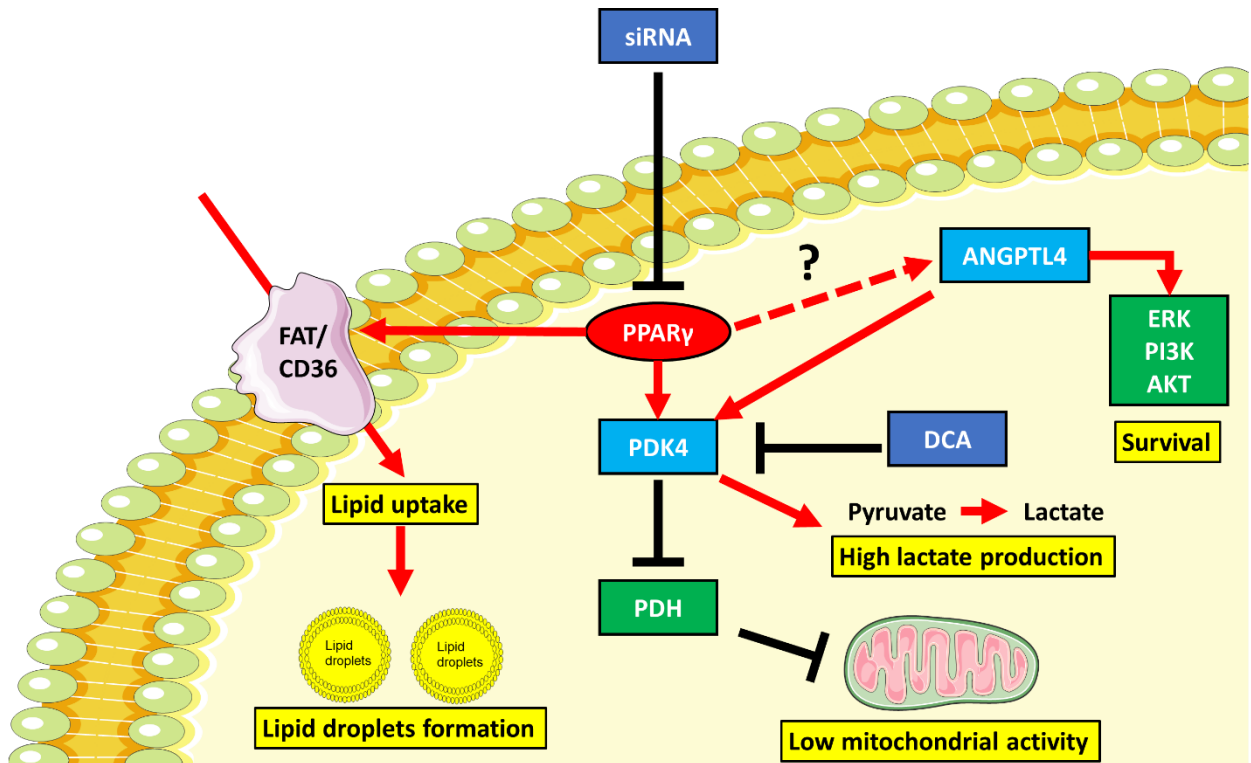
Nous avons évoqué le phénotype intermédiaire des SP. En plus des CSC quiescentes, il pourrait ainsi être intéressant de cibler les CSC prolifératives qui recourent à la glycolyse et à l'OXPPOS. Une étude préclinique a étudié différentes combinaisons comprenant des

inhibiteurs du métabolisme (metformine et 2-deoxy glucose) et un agoniste de la voie Ampk (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide, AICAR) dans des xéno greffes de souris. Cette étude montre une inhibition de la croissance tumorale (Cheong et al., 2011). Il pourrait donc être intéressant d'associer un inhibiteur de la glycolyse (2-déoxy glucose, 2-DG) à un inhibiteur de la chaîne respiratoire (metformine) afin de maximiser le potentiel thérapeutique. La metformine possède, comme le DCA, plusieurs cibles dont la plus connue est le complexe I de la chaîne respiratoire. Elle inhibe également l'enzyme mitochondriale glycérophosphate déshydrogénase (mGPD) qui provoque un défaut de réoxydation du NADH cytoplasmique et une augmentation du ratio lactate/pyruvate (Rena et al., 2017). La metformine a par ailleurs démontré une bonne efficacité dans le traitement des CSC (Bao et al., 2012; Shank et al., 2012). De plus, une étude clinique de phase II dans le cancer du sein démontre une diminution des tumeurs associée à une diminution des CSC ALDH⁺ /CD133⁺.

Étude des MAMs au cours de la reprogrammation métabolique associée à la plasticité cellulaire :

Lors des observations ces cellules HepaRG par microscopie électronique, nous avons remarqué que l'association de la membrane du RE et celles des mitochondries (MAM) diffère entre les CSC et les cellules différenciées. Un lien entre l'expression de certaines protéines clés des MAMs et de l'acquisition de marqueurs souches a déjà été établi. En 2017, une étude originale décrit une nouvelle famille d'ATPase « ATPase family AAA domain containing 3A » (ATAD3) impliquée dans les MAMs au cours de l'embryogenèse. Cette étude démontre qu'une expression élevée d'ATAD3B, protéine réexprimée dans le cancer et plus particulièrement dans les CSC, inhibe une autre protéine de la même famille ATAD3A, provoquant une diminution de la biogenèse mitochondriale et une fragmentation du réseau (Baudier, 2018). Cette étude rapporte également l'importance de la mitophagie dans le maintien de l'intégrité cellulaire. La mitophagie peut être utilisée par les CSC pour détruire les mitochondries en sénescence afin de réduire le niveau de ROS et limiter les dommages à l'ADN (Liu et al., 2017).

Schéma de nos travaux :



STEM	ECM	Periportal/Periveinous	
Stem markers	ECM markers	Cytokines	Differentiated markers
Nanog Oct4 KLF4	SNAIL E-cadherin	IL-6 TNFα TGFβ	Aldolase B Albumine CYP3A4
PPARγ		PPARα	

Conclusion

Notre étude a permis de mettre en lumière le métabolisme particulier des CSC dans le CHC. Il se caractérise par une glycolyse accrue avec conversion du pyruvate en lactate et une accumulation de gouttelettes lipidiques. Nous avons établi que ce phénotype métabolique est induit par une expression élevée de PPAR γ dans les CSC. Au cours de la différenciation, PPAR α prend le relais et induit un shift métabolique activant les voies métaboliques associées à l'O₂PHOS. L'idée d'une balance entre PPAR γ et PPAR α est nouvelle et l'étude de sa régulation devra être approfondie. Finalement, le métabolisme des lipides, régulé par les PPARs, est important dans le développement des CHC. Les premières analyses sur des prélèvements de patients atteints de CHC suggèrent une modulation des lipides entre les zones tumorales et non-tumorales chez un même patient. Ce travail apporte des données nouvelles sur les mécanismes de la reprogrammation métabolique au cours des processus de différenciation/rétrodifférenciation des CHC et fournit de nouveaux arguments sur l'intérêt de cibler le métabolisme des CSC hépatiques pour éviter la récurrence des CHC.

Bibliographie

- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver Anatomy. *Surg Clin North Am* 90, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Abraham, R.T., 2004. mTOR as a positive regulator of tumor cell responses to hypoxia. *Curr Top Microbiol Immunol* 279, 299–319. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18930-2_18
- Achyut, B.R., Yang, L., 2011. Transforming Growth Factor- β in the Gastrointestinal and Hepatic Tumor Microenvironment. *Gastroenterology* 141, 1167–1178. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.048>
- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B., 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615–616. <https://doi.org/10.1038/282615a0>
- Adeva-Andany, M.M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., Pazos-García, C., 2016. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep* 36. <https://doi.org/10.1042/BSR20160385>
- Albini, A., Bruno, A., Gallo, C., Pajardi, G., Noonan, D.M., Dallaglio, K., 2015. Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity. *Connective Tissue Research* 56, 414–425. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1066780>
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F., 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Allard, J., Bucher, S., Massart, J., Ferron, P.-J., Le Guillou, D., Loyant, R., Daniel, Y., Launay, Y., Buron, N., Begriche, K., Borgne-Sanchez, A., Fromenty, B., 2020. Drug-induced hepatic steatosis in absence of severe mitochondrial dysfunction in HepaRG cells: proof of multiple mechanism-based toxicity. *Cell Biol Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09537-1>
- Altman, B.J., Stine, Z.E., Dang, C.V., 2016. From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* 16, 619–634. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>
- Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E., 2017. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Amann, T., Maegdefrau, U., Hartmann, A., Agaimy, A., Marienhagen, J., Weiss, T.S., Stoeltzing, O., Warnecke, C., Schölmerich, J., Oefner, P.J., Kreutz, M., Bosserhoff, A.K., Hellerbrand, C., 2009. GLUT1 Expression Is Increased in Hepatocellular Carcinoma and Promotes Tumorigenesis. *Am J Pathol* 174, 1544–1552. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080596>
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., Zaidi, N., 2014. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 63, 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>
- Anderson, N.M., Mucka, P., Kern, J.G., Feng, H., 2018. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell* 9, 216–237. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0451-1>
- Ando, M., Uehara, I., Kogure, K., Asano, Y., Nakajima, W., Abe, Y., Kawauchi, K., Tanaka, N., 2010. Interleukin 6 Enhances Glycolysis through Expression of the Glycolytic Enzymes Hexokinase 2 and 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase-3. *Journal of Nippon Medical School* 77, 97–105. <https://doi.org/10.1272/jnms.77.97>
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Charpentier, T.L., Langouët, S., Morel, F., Guiguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 2006. EXPRESSION OF CYTOCHROMES P450, CONJUGATING ENZYMES AND NUCLEAR RECEPTORS IN HUMAN HEPATOMA HepaRG CELLS. *Drug Metab Dispos* 34, 75–83. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.006759>
- Anthérieu, S., Rogue, A., Fromenty, B., Guillouzo, A., Robin, M.-A., 2011. Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of

- lipogenic genes in heparg cells. *Hepatology* 53, 1895–1905. <https://doi.org/10.1002/hep.24290>
- Aoyama, T., Peters, J.M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., Gonzalez, F.J., 1998. Altered Constitutive Expression of Fatty Acid-metabolizing Enzymes in Mice Lacking the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) *. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5678–5684. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5678>
- Apostolova, N., Gomez-Sucerquia, L.J., Moran, A., Alvarez, A., Blas-Garcia, A., Esplugues, J.V., 2010. Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during Efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. *British Journal of Pharmacology* 160, 2069–2084. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00866.x>
- Arciuch, V.G.A., Russo, M.A., Kang, K.S., Cristofano, A.D., 2013. Inhibition of AMPK and Krebs Cycle Gene Expression Drives Metabolic Remodeling of Pten-Deficient Preneoplastic Thyroid Cells. *Cancer Res* 73, 5459–5472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1429>
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17, 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Ayuso, C., Rimola, J., Vilana, R., Burrel, M., Darnell, A., García-Criado, Á., Bianchi, L., Belmonte, E., Caparroz, C., Barrufet, M., Bruix, J., Brú, C., 2018. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines. *European Journal of Radiology* 101, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.01.025>
- Azhar, S., 2010. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiol* 6, 657–691. <https://doi.org/10.2217/fca.10.86>
- Babu, R., Eaton, S., Drake, D.P., Spitz, L., Pierro, A., 2001. Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *Journal of Pediatric Surgery* 36, 282–286. <https://doi.org/10.1053/jpsu.2001.20690>
- Bailey, A.P., Koster, G., Guillemier, C., Hirst, E.M.A., MacRae, J.I., Lechene, C.P., Postle, A.D., Gould, A.P., 2015. Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* 163, 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020>
- Bajaj, J., Diaz, E., Reya, T., 2019. Stem cells in cancer initiation and progression. *J Cell Biol* 219. <https://doi.org/10.1083/jcb.201911053>
- Baker, M.J., Frazier, A.E., Gulbis, J.M., Ryan, M.T., 2007. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends in Cell Biology* 17, 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.010>
- Balandaram, G., Kramer, L.R., Kang, B.-H., Murray, I.A., Perdew, G.H., Gonzalez, F.J., Peters, J.M., 2016. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ suppresses liver tumorigenesis in hepatitis B transgenic mice. *Toxicology* 363–364, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.010>
- Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Ahmad, A., Azmi, A.S., Sarkar, S.H., Banerjee, S., Kong, D., Li, Y., Thakur, S., Sarkar, F.H., 2012. Metformin Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion by Attenuating CSC Function Mediated by Deregulating miRNAs in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Prev Res* 5, 355–364. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0299>
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., Clevers, H., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449, 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Barroso, E., Rodríguez-Calvo, R., Serrano-Marco, L., Astudillo, A.M., Balsinde, J., Palomer, X., Vázquez-Carrera, M., 2011. The PPAR β/δ Activator GW501516 Prevents the Down-Regulation of AMPK Caused by a High-Fat Diet in Liver and Amplifies the

- PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α Pathway Leading to Increased Fatty Acid Oxidation. *Endocrinology* 152, 1848–1859. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1468>
- Baudier, J., 2018. ATAD3 proteins: brokers of a mitochondria–endoplasmic reticulum connection in mammalian cells. *Biological Reviews* 93, 827–844. <https://doi.org/10.1111/brv.12373>
- Beaudet, A.L., Ferry, G.D., Nichols, B.L., Rosenberg, H.S., 1977. Cholesterol ester storage disease: Clinical, biochemical, and pathological studies. *The Journal of Pediatrics* 90, 910–914. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(77\)80557-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(77)80557-X)
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., Rossignol, R., 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of Cell Science* 120, 838–848. <https://doi.org/10.1242/jcs.03381>
- Bender, T., Pena, G., Martinou, J.-C., 2015. Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. *The EMBO Journal* 34, 911–924. <https://doi.org/10.15252/embj.201490197>
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., Vousden, K.H., 2006. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* 126, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036>
- Bensard, C.L., Wisidagama, D.R., Olson, K.A., Berg, J.A., Krah, N.M., Schell, J.C., Nowinski, S.M., Fogarty, S., Bott, A.J., Wei, P., Dove, K.K., Tanner, J.M., Panic, V., Cluntun, A., Lettlova, S., Earl, C.S., Namnath, D.F., Vázquez-Arreguín, K., Villanueva, C.J., Tantin, D., Murtaugh, L.C., Evason, K.J., Ducker, G.S., Thummel, C.S., Rutter, J., 2020. Regulation of Tumor Initiation by the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Cell Metabolism* 31, 284-300.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.002>
- Berger, J., Moller, D.E., 2002. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>
- Berndt, N., Eckstein, J., Heucke, N., Gajowski, R., Stockmann, M., Meierhofer, D., Holzhütter, H.-G., 2019. Characterization of Lipid and Lipid Droplet Metabolism in Human HCC. *Cells* 8, 512. <https://doi.org/10.3390/cells8050512>
- Bettermann, K., Hohensee, T., Haybaeck, J., 2014. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. *Int J Mol Sci* 15, 9924–9944. <https://doi.org/10.3390/ijms15069924>
- Bhutia, Y.D., Babu, E., Ramachandran, S., Ganapathy, V., 2015. Amino Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to “Glutamine Addiction”: Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs. *Cancer Res* 75, 1782–1788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3745>
- Biddle, A., Mackenzie, I.C., 2012. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 31, 285–293. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9345-0>
- Bigas, A., Espinosa, L., 2012. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood* 119, 3226–3235. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-355826>
- Blanco, A., Blanco, G., 2017. Chapter 16 - Amino Acid Metabolism, in: Blanco, A., Blanco, G. (Eds.), *Medical Biochemistry*. Academic Press, pp. 367–399. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00016-1>
- Blouin, A., Bolender, R.P., Weibel, E.R., 1977. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *Journal of Cell Biology* 72, 441–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.72.2.441>
- Bocci, F., Gearhart-Serna, L., Boareto, M., Ribeiro, M., Ben-Jacob, E., Devi, G.R., Levine, H., Onuchic, J.N., Jolly, M.K., 2019. Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 148–157. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815345116>

- Bonnet, D., Dick, J.E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 3, 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Bonuccelli, G., Tsirigos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R.G., Chiavarina, B., Frank, P.G., Flomenberg, N., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2010. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* 9, 3506–3514. <https://doi.org/10.4161/cc.9.17.12731>
- Bos, R., van der Hoeven, J.J.M., van der Wall, E., van der Groep, P., van Diest, P.J., Comans, E.F.I., Joshi, U., Semenza, G.L., Hoekstra, O.S., Lammertsma, A.A., Molthoff, C.F.M., 2002. Biologic Correlates of 18Fluorodeoxyglucose Uptake in Human Breast Cancer Measured by Positron Emission Tomography. *JCO* 20, 379–387. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.2.379>
- Boyault, S., Rickman, D.S., Reyniès, A. de, Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Hérault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., Bioulac-Sage, P., Laurent-Puig, P., Zucman-Rossi, J., 2007. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 45, 42–52. <https://doi.org/10.1002/hep.21467>
- Bralet, M.-P., Régimbeau, J.-M., Pineau, P., Dubois, S., Loas, G., Degos, F., Valla, D., Belghiti, J., Degott, C., Terris, B., 2000. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: Epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology* 32, 200–204. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.9033>
- Bruce, W.R., Van Der Gaag, H., 1963. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells capable of Proliferation in vivo. *Nature* 199, 79–80. <https://doi.org/10.1038/199079a0>
- Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y.-H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P.J., Song, T., Bronowicki, J.-P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A.-L., Llovet, J.M., Finn, R.S., LeBerre, M.-A., Baumhauer, A., Meinhardt, G., Han, G., 2017. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 389, 56–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32453-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32453-9)
- Brun, R.P., Tontonoz, P., Forman, B.M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R.M., Spiegelman, B.M., 1996. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 10, 974–984. <https://doi.org/10.1101/gad.10.8.974>
- Buczak, K., Ori, A., Kirkpatrick, J.M., Holzer, K., Dauch, D., Roessler, S., Endris, V., Lasitschka, F., Parca, L., Schmidt, A., Zender, L., Schirmacher, P., Krijgsveld, J., Singer, S., Beck, M., 2018. Spatial Tissue Proteomics Quantifies Inter- and Intratumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma (HCC)*. *Molecular & Cellular Proteomics* 17, 810–825. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000189>
- Byrne, F.L., Poon, I.K.H., Modesitt, S.C., Tomsig, J.L., Chow, J.D.Y., Healy, M.E., Baker, W.D., Atkins, K.A., Lancaster, J.M., Marchion, D.C., Moley, K.H., Ravichandran, K.S., Slack-Davis, J.K., Hoehn, K.L., 2014. Metabolic Vulnerabilities in Endometrial Cancer. *Cancer Res* 74, 5832–5845. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0254>
- Cabillic, F., Corlu, A., 2016. Regulation of Transdifferentiation and Retrodifferentiation by Inflammatory Cytokines in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 151, 607–615. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.052>
- Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., Ye, F., Song, Z., Qin, H., Meng, S., Chen, Y., Zhou, R., Song, X., Guo, Y., Ding, M., Deng, H., 2007. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45, 1229–1239. <https://doi.org/10.1002/hep.21582>

- Cai, K., Li, T., Guo, L., Guo, H., Zhu, W., Yan, L., Li, F., 2019. Long non-coding RNA LINC00467 regulates hepatocellular carcinoma progression by modulating miR-9-5p/PPARA expression. *Open Biology* 9, 190074. <https://doi.org/10.1098/rsob.190074>
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A., Gilbertson, R.J., 2007. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* 11, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.020>
- Calon, A., Tauriello, D.V.F., Batlle, E., 2014. TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Seminars in Cancer Biology, Cancer-associated fibroblasts* 25, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.008>
- Calvo, S.E., Clauser, K.R., Mootha, V.K., 2016. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research* 44, D1251–D1257. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003>
- Cancer today [WWW Document], 2020. URL <http://gco.iarc.fr/today/home> (accessed 6.15.21).
- Carloni, V., Luong, T.V., Rombouts, K., 2014. Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: more complicated than ever. *Liver International* 34, 834–843. <https://doi.org/10.1111/liv.12465>
- Carracedo, A., Cantley, L.C., Pandolfi, P.P., 2013. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 13, 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., Dalton, S., 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885–896. <https://doi.org/10.1242/dev.01670>
- Caruso, S., Calatayud, A.-L., Pilet, J., Bella, T.L., Rekik, S., Imbeaud, S., Letouzé, E., Meunier, L., Bayard, Q., Rohr-Udilova, N., Péneau, C., Grasl-Kraupp, B., Koning, L. de, Ouine, B., Bioulac-Sage, P., Couchy, G., Calderaro, J., Nault, J.-C., Zucman-Rossi, J., Rebouissou, S., 2019. Analysis of Liver Cancer Cell Lines Identifies Agents With Likely Efficacy Against Hepatocellular Carcinoma and Markers of Response. *Gastroenterology* 157, 760–776. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.05.001>
- Cassim, S., Raymond, V.-A., Lapierre, P., Bilodeau, M., 2017. From in vivo to in vitro: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation. *PLOS ONE* 12, e0190366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190366>
- Cerec et al, 2017. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor - Cerec - 2007 - *Hepatology* - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.21536/abstract> (accessed 5.20.17).
- Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A., 2007. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 45, 957–967. <https://doi.org/10.1002/hep.21536>
- Challen, G.A., Little, M.H., 2006. A Side Order of Stem Cells: The SP Phenotype. *STEM CELLS* 24, 3–12. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0116>
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113, 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- Chan, L.-K., Tsui, Y.-M., Ho, D.W.-H., Ng, I.O.-L., 2021. Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.02.015>
- Chance, B., Williams, G.R., 1956. RESPIRATORY ENZYMES IN OXIDATIVE PHOSPHORYLATION: VI. THE EFFECTS OF ADENOSINE DIPHOSPHATE ON

- AZIDE-TREATED MITOCHONDRIA. *Journal of Biological Chemistry* 221, 477–489. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65266-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65266-4)
- Chang, C.-R., Blackstone, C., 2010. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 34–39. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05629.x>
- Chaudhary, S., Ganguly, S., Palanichamy, J.K., Singh, A., Bakhshi, R., Jain, A., Chopra, A., Bakhshi, S., 2021. PGC1A driven enhanced mitochondrial DNA copy number predicts outcome in pediatric acute myeloid leukemia. *Mitochondrion* 58, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.03.013>
- Chawla, A., 2010. Control of Macrophage Activation and Function by PPARs. *Circulation Research* 106, 1559–1569. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216523>
- Chearwae, W., Bright, J.J., 2008. PPAR γ agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells. *Br J Cancer* 99, 2044–2053. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604786>
- Chen, C.-L., Uthaya Kumar, D.B., Punj, V., Xu, J., Sher, L., Tahara, S.M., Hess, S., Machida, K., 2016. NANOG metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism. *Cell Metab* 23, 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.004>
- Chen et al, 2017. NANOG metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4715587/> (accessed 5.20.17).
- Chen, H., Chan, D.C., 2017. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metabolism* 26, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.016>
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., Chan, D.C., 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *Journal of Cell Biology* 160, 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>
- Chen, K., Li, J., Wang, J., Xia, Y., Dai, W., Wang, F., Shen, M., Cheng, P., Zhang, Y., Wang, C., Yang, J., Zhu, R., Zhang, H., Zheng, Y., Lu, J., Fan, Z., Zhou, Y., Guo, C., 2014. 15-Deoxy- γ 12,14-prostaglandin J2 Reduces Liver Impairment in a Model of ConA-Induced Acute Hepatic Inflammation by Activation of PPAR γ and Reduction in NF- κ B Activity. *PPAR Res* 2014, 215631. <https://doi.org/10.1155/2014/215631>
- Chen, L., Necela, B.M., Su, W., Yanagisawa, M., Anastasiadis, P.Z., Fields, A.P., Thompson, E.A., 2006. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Promotes Epithelial to Mesenchymal Transformation by Rho GTPase-dependent Activation of ERK1/2*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24575–24587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604147200>
- Chen, L.-R., Lee, S.-C., Lin, Y.-P., Hsieh, Y.-L., Chen, Y.-L., Yang, J.-R., Liou, J.-F., Chen, C.-F., Lee, Y.-P., Shiue, Y.-L., 2010. Prostaglandin-D synthetase induces transcription of the LH beta subunit in the primary culture of chicken anterior pituitary cells via the PPAR signaling pathway. *Theriogenology* 73, 367–382. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.020>
- Chen, S.-Z., Ling, Y., Yu, L.-X., Song, Y.-T., Chen, X.-F., Cao, Q.-Q., Yu, H., Chen, C., Tang, J.-J., Fan, Z.-C., Miao, Y.-S., Dong, Y.-P., Tao, J.-Y., Monga, S.P.S., Wen, W., Wang, H.-Y., 2021. 4-phenylbutyric acid promotes hepatocellular carcinoma via initiating cancer stem cells through activation of PPAR- α . *Clinical and Translational Medicine* 11, e379. <https://doi.org/10.1002/ctm2.379>

- Chen, Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., Huang, P., 2007. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 39, 267–274. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9086-x>
- Cheong, J.-H., Park, E.S., Liang, J., Dennison, J.B., Tsavachidou, D., Nguyen-Charles, C., Cheng, K.W., Hall, H., Zhang, D., Lu, Y., Ravoori, M., Kundra, V., Ajani, J., Lee, J.-S., Hong, W.K., Mills, G.B., 2011. Dual inhibition of Tumor Energy Pathway by 2-deoxy glucose and metformin Is Effective Against a Broad Spectrum of Preclinical Cancer Models. *Mol Cancer Ther* 10, 2350–2362. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0497>
- Cherepkova, M.Y., Sineva, G.S., Pospelov, V.A., 2016. Leukemia inhibitory factor (LIF) withdrawal activates mTOR signaling pathway in mouse embryonic stem cells through the MEK/ERK/TSC2 pathway. *Cell Death Dis* 7, e2050. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.387>
- Chiang, D.Y., Villanueva, A., Hoshida, Y., Peix, J., Newell, P., Minguez, B., LeBlanc, A.C., Donovan, D.J., Thung, S.N., Solé, M., Tovar, V., Alsinet, C., Ramos, A.H., Barretina, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Waxman, S., Bruix, J., Mazzaferro, V., Ligon, A.H., Najfeld, V., Friedman, S.L., Sellers, W.R., Meyerson, M., Llovet, J.M., 2008. Focal Gains of *VEGFA* and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 68, 6779–6788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0742>
- Chirurgie du Foie | Centre [WWW Document], 2021. URL <https://centre.chl.lu/fr/dossier/chirurgie-du-foie> (accessed 6.15.21).
- Choi, H.-J., Jhe, Y.-L., Kim, J., Lim, J.Y., Lee, J.E., Shin, M.-K., Cheong, J.-H., 2020. FoxM1-dependent and fatty acid oxidation-mediated ROS modulation is a cell-intrinsic drug resistance mechanism in cancer stem-like cells. *Redox Biology* 36, 101589. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101589>
- Chong, L.-W., Chou, R.-H., Liao, C.-C., Lee, T.-F., Lin, Y., Yang, K.-C., Hsu, Y.-C., 2015. Saturated fatty acid induces cancer stem cell-like properties in human hepatoma cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 61, 85–91.
- Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., Prinz, W.A., 2015. A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *J Cell Biol* 211, 261–271. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505067>
- Chow, A.K.-M., Ng, L., Lam, C.S.-C., Wong, S.K.-M., Wan, T.M.-H., Cheng, N.S.-M., Yau, T.C.-C., Poon, R.T.-P., Pang, R.W.-C., 2013. The Enhanced Metastatic Potential of Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cells with Sorafenib Resistance. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078675>
- Christofides, A., Konstantinidou, E., Jani, C., Boussiotis, V.A., 2021. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism* 114, 154338. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>
- Chu, Q.S.-C., Sangha, R., Spratlin, J., J. Vos, L., Mackey, J.R., McEwan, A.J.B., Venner, P., Michelakis, E.D., 2015. A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 33, 603–610. <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0221-y>
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S.E., Benoist, C., Mathis, D., 2012. PPAR γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose-tissue Treg cells. *Nature* 486, 549–553. <https://doi.org/10.1038/nature11132>
- Clemens, M.M., McGill, M.R., Apte, U., 2019. Chapter Nine - Mechanisms and biomarkers of liver regeneration after drug-induced liver injury, in: Ramachandran, A., Jaeschke, H. (Eds.), *Advances in Pharmacology, Drug-Induced Liver Injury*. Academic Press, pp. 241–262. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.03.001>

- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., Altaba, A.R. i, 2007. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal and tumorigenicity. *Curr Biol* 17, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.033>
- Cochrane, C.R., Szczepny, A., Watkins, D.N., Cain, J.E., 2015. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers* 7, 1554–1585. <https://doi.org/10.3390/cancers7030851>
- Coste, A. d. L., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.-A., Buendia, M.-A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., Perret, C., 1998. Somatic mutations of the *-catenin* gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 8847–8851. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8847>
- Costello, L.C., Franklin, R.B., 2005. ‘Why do tumour cells glycolyse?’: From glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem* 280, 1. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-8841-8>
- Couvelard, A., O’Toole, D., Turley, H., Leek, R., Sauvanet, A., Degott, C., Ruzniewski, P., Belghiti, J., Harris, A.L., Gatter, K., Pezzella, F., 2005. Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br J Cancer* 92, 94–101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602245>
- Crabtree, H.G., 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 23, 536–545.
- Czamara, K., Majzner, K., Selmi, A., Baranska, M., Ozaki, Y., Kaczor, A., 2017. Unsaturated lipid bodies as a hallmark of inflammation studied by Raman 2D and 3D microscopy. *Sci Rep* 7, 40889. <https://doi.org/10.1038/srep40889>
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., Shelton, A.A., Parmiani, G., Castelli, C., Clarke, M.F., 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10158–10163. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703478104>
- Dang, C.V., 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003>
- Daniel, B., Nagy, G., Czimmerer, Z., Horvath, A., Hammers, D.W., Cuaranta-Monroy, I., Poliska, S., Tzerpos, P., Kolostyak, Z., Hays, T.T., Patsalos, A., Houtman, R., Sauer, S., Francois-Deleuze, J., Rastinejad, F., Balint, B.L., Sweeney, H.L., Nagy, L., 2018. The nuclear receptor PPAR γ controls progressive macrophage polarization as a ligand-insensitive epigenomic ratchet of transcriptional memory. *Immunity* 49, 615-626.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.005>
- Daniel, Y., Lelou, E., Aninat, C., Corlu, A., Cabillic, F., 2021. Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells. *Cancers* 13, 1973. <https://doi.org/10.3390/cancers13081973>
- Darnaud, M., Faivre, J., Moniaux, N., 2013. Targeting gut flora to prevent progression of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 58, 385–387. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.019>
- Dashty, M., 2013. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry* 46, 1339–1352. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.04.027>
- David, C.J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., Manley, J.L., 2010. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 463, 364–368. <https://doi.org/10.1038/nature08697>
- de Brito, O.M., Scorrano, L., 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610. <https://doi.org/10.1038/nature07534>

- De Francesco, E.M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2018. Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication. *Biochem J* 475, 1611–1634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170164>
- de Jaime-Soguero, A., Abreu de Oliveira, W.A., Lluís, F., 2018. The Pleiotropic Effects of the Canonical Wnt Pathway in Early Development and Pluripotency. *Genes (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/genes9020093>
- De Stefano, F., Chacon, E., Turcios, L., Marti, F., Gedaly, R., 2018. Novel biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease* 50, 1115–1123. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.08.019>
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., Thompson, C.B., 2007. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19345–19350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>
- Deng, M., Cai, X., Long, L., Xie, L., Ma, H., Zhou, Y., Liu, S., Zeng, C., 2019. CD36 promotes the epithelial–mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- β . *J Transl Med* 17. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2098-6>
- DePhillips, P., Lenhoff, A.M., 2004. Relative retention of the fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2 on strong cation-exchange sorbents. *Journal of Chromatography A, 16th International Symposium on Preparative and Process Chromatography: Ion Exchange, Adsorption/Desorption Processes and Related Separation Techniques* 1036, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.012>
- Desai, A., Sandhu, S., Lai, J.-P., Sandhu, D.S., 2019. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol* 11, 1–18. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i1.1>
- Désert, R., Nieto, N., Musso, O., 2018. Dimensions of hepatocellular carcinoma phenotypic diversity. *World J Gastroenterol* 24, 4536–4547. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i40.4536>
- Désert, R., Rohart, F., Canal, F., Sicard, M., Desille, M., Renaud, S., Turlin, B., Bellaud, P., Perret, C., Clément, B., Cao, K.-A.L., Musso, O., 2017. Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection. *Hepatology* 66, 1502–1518. <https://doi.org/10.1002/hep.29254>
- Desvergne, B., 2008. PPAR δ/β : The Lobbyist Switching Macrophage Allegiance in Favor of Metabolism. *Cell Metabolism* 7, 467–469. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.05.002>
- Dhanasekaran, R., Limaye, A., Cabrera, R., 2012. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics. *Hepat Med* 4, 19–37. <https://doi.org/10.2147/HMER.S16316>
- Dhillon, K.K., Gupta, S., 2021. Biochemistry, Ketogenesis, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Dimitroulis, D., Damaskos, C., Valsami, S., Davakis, S., Garmpis, N., Spartalis, E., Athanasiou, A., Moris, D., Sakellariou, S., Kykalos, S., Tsourouflis, G., Garmpi, A., Delladetsima, I., Kontzoglou, K., Kouraklis, G., 2017. From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. *World J Gastroenterol* 23, 5282–5294. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i29.5282>
- Ding, D.-C., Liu, H.-W., Chu, T.-Y., 2016. Interleukin-6 from Ovarian Mesenchymal Stem Cells Promotes Proliferation, Sphere and Colony Formation and Tumorigenesis of an Ovarian Cancer Cell Line SKOV3. *J Cancer* 7, 1815–1823. <https://doi.org/10.7150/jca.16116>
- Ding, J., Jin, W., Chen, C., Shao, Z., Wu, J., 2012. Tumor Associated Macrophage \times Cancer Cell Hybrids May Acquire Cancer Stem Cell Properties in Breast Cancer. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041942>

- Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., Nagy, L.E., 2013. Kupffer Cells in the Liver. *Compr Physiol* 3, 785–797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Doi, I., 1976. Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Gan* 67, 1–10.
- Domenichini, A., Edmands, J.S., Adamska, A., Begicevic, R.-R., Paternoster, S., Falasca, M., 2019. Pancreatic cancer tumorspheres are cancer stem-like cells with increased chemoresistance and reduced metabolic potential. *Advances in Biological Regulation* 72, 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.02.001>
- Drakaki, A., Hatzia Apostolou, M., Polyta rchou, C., Vorvis, C., Poultsides, G.A., Souglakos, J., Georgoulas, V., Iliopoulos, D., 2015. Functional microRNA high throughput screening reveals miR-9 as a central regulator of liver oncogenesis by affecting the PPARA-CDH1 pathway. *BMC Cancer* 15, 542. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1562-9>
- Dubois Pot Schneider, H., Fekir, K., Coulouarn, C., Glaise, D., Aninat, C., Jarnouen, K., Guével, R.L., Kubo, T., Ishida, S., Morel, F., Corlu, A., 2014a. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology* 60, 2077–2090. <https://doi.org/10.1002/hep.27353>
- Dubois Pot Schneider, H., Fekir, K., Coulouarn, C., Glaise, D., Aninat, C., Jarnouen, K., Guével, R.L., Kubo, T., Ishida, S., Morel, F., Corlu, A., 2014b. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology* 60, 2077–2090. <https://doi.org/10.1002/hep.27353>
- Dunbar, E.M., Coats, B.S., Shroads, A.L., Langaee, T., Lew, A., Forder, J.R., Shuster, J.J., Wagner, D.A., Stacpoole, P.W., 2014. Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest New Drugs* 32, 452–464. <https://doi.org/10.1007/s10637-013-0047-4>
- Dunn, S.E., Ousman, S.S., Sobel, R.A., Zuniga, L., Baranzini, S.E., Youssef, S., Crowell, A., Loh, J., Oksenberg, J., Steinman, L., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 204, 321–330. <https://doi.org/10.1084/jem.20061839>
- Edmondson, H.A., Steiner, P.E., 1954. Primary carcinoma of the liver. A study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 7, 462–503. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195405\)7:3<462::AID-CNCR2820070308>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195405)7:3<462::AID-CNCR2820070308>3.0.CO;2-E)
- El-Shal, A.S., Zidan, H.E., Rashad, N.M., Wadea, F.M., 2017. Angiopoietin-like protein 3 and 4 expression 4 and their serum levels in hepatocellular carcinoma. *Cytokine* 96, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.006>
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., Thompson, C.B., 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64, 3892–3899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2904>
- Español-Suñer, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., Jacquemin, P., Lemaigre, F., Leclercq, I.A., 2012. Liver Progenitor Cells Yield Functional Hepatocytes in Response to Chronic Liver Injury in Mice. *Gastroenterology* 143, 1564–1575.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.024>
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., Mihara, K., 2003. Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *The Journal of Biochemistry* 134, 333–344. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg150>
- Fabre, N., Arrivet, E., Trancard, J., Bichet, N., Roome, N.O., Prenez, A., 2003. A new hepatoma cell line for toxicity testing at repeated doses 1.
- Fan, Q.-M., Jing, Y.-Y., Yu, G.-F., Kou, X.-R., Ye, F., Gao, L., Li, R., Zhao, Q.-D., Yang, Y., Lu, Z.-H., Wei, L.-X., 2014. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-

- like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 352, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.05.008>
- Fanali, C., Lucchetti, D., Farina, M., Corbi, M., Cufino, V., Cittadini, A., Sgambato, A., 2014. Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: Controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 20, 923–942. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.923>
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., Mamer, O.A., Avizonis, D., DeBerardinis, R.J., Siegel, P.M., Jones, R.G., 2013. AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo. *Cell Metabolism* 17, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.001>
- Faubert, B., Li, K.Y., Cai, L., Hensley, C.T., Kim, J., Zacharias, L.G., Yang, C., Do, Q.N., Doucette, S., Burguete, D., Li, H., Huet, G., Yuan, Q., Wigal, T., Butt, Y., Ni, M., Torrealba, J., Oliver, D., Lenkinski, R.E., Malloy, C.R., Wachsmann, J.W., Young, J.D., Kernstine, K., DeBerardinis, R.J., 2017. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* 171, 358–371.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.019>
- Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45–S53. <https://doi.org/10.1002/hep.20969>
- Fekir, K., Dubois-Pot-Schneider, H., Désert, R., Daniel, Y., Glaise, D., Rauch, C., Morel, F., Fromenty, B., Musso, O., Cabillic, F., Corlu, A., 2019. Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance. *Cancer Res* 79, 1869–1883. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2110>
- Feldkamp, T., Kribben, A., Roeser, N.F., Senter, R.A., Weinberg, J.M., 2006. Accumulation of nonesterified fatty acids causes the sustained energetic deficit in kidney proximal tubules after hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 290, F465–F477. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00305.2005>
- Feng, J., Dai, W., Mao, Y., Wu, L., Li, J., Chen, K., Yu, Q., Kong, R., Li, S., Zhang, J., Ji, J., Wu, J., Mo, W., Xu, X., Guo, C., 2020. Simvastatin re-sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by inhibiting HIF-1 α /PPAR- γ /PKM2-mediated glycolysis. *J Exp Clin Cancer Res* 39, 24. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-1528-x>
- Fernández-Miranda, C., Pérez-Carreras, M., Colina, F., López-Alonso, G., Vargas, C., Solís-Herruzo, J.A., 2008. A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease* 40, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2007.10.002>
- Fernie, A.R., Carrari, F., Sweetlove, L.J., 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007>
- Firtina Karagonlar, Z., Akbari, S., Karabicici, M., Sahin, E., Tercan Avci, S., Ersoy, N., Eren Ates, K., Balli, T., Karacicek, B., Kaplan, K.N., Celiker, C., Atabey, N., Erdal, E., 2020. A Novel Function for KLF4 in Modulating the De-Differentiation of EpCAM–/CD133–nonStem Cells into EpCAM+/CD133+ Liver Cancer Stem Cells in HCC Cell Line HuH7. *Cells* 9, 1198. <https://doi.org/10.3390/cells9051198>
- Font-Burgada, J., Shalapour, S., Ramaswamy, S., Hsueh, B., Rossell, D., Umemura, A., Taniguchi, K., Nakagawa, H., Valasek, M.A., Ye, L., Kopp, J.L., Sander, M., Carter, H., Deisseroth, K., Verma, I.M., Karin, M., 2015. Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell* 162, 766–779. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.026>

- Forbes, S., Vig, P., Poulson, R., Thomas, H., Alison, M., 2002. Hepatic stem cells. *The Journal of Pathology* 197, 510–518. <https://doi.org/10.1002/path.1163>
- Forbes, S.J., Newsome, P.N., 2016. Liver regeneration — mechanisms and models to clinical application. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13, 473–485. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.97>
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Brun, P., Evans, M., 1995. 15Deoxy-A 12g14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ . *Cell* 10.
- Forner, A., Reig, M., Varela, M., Burrel, M., Feliu, J., Briceño, J., Sastre, J., Martí-Bonmati, L., Llovet, J.M., Bilbao, J.I., Sangro, B., Pardo, F., Ayuso, C., Bru, C., Tabernero, J., Bruix, J., 2016. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH. *Medicina Clínica (English Edition)* 146, 511.e1-511.e22. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.07.013>
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., Youle, R.J., 2001. The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Developmental Cell* 1, 515–525. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00055-7)
- Fromenty, B., 2019. Inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation in drug-induced hepatic steatosis. *Liver Research* 3, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.06.001>
- Galuppo, R., Maynard, E., Shah, M., Daily, M.F., Chen, C., Spear, B.T., Gedaly, R., 2014. Synergistic Inhibition of HCC and Liver Cancer Stem Cell Proliferation by Targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/ β -Catenin Pathways. *Anticancer Research* 34, 1709–1713.
- Gammon, L., Biddle, A., Heywood, H.K., Johannessen, A.C., Mackenzie, I.C., 2013. Sub-Sets of Cancer Stem Cells Differ Intrinsically in Their Patterns of Oxygen Metabolism. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062493>
- Gao, H., Volat, F., Sandhow, L., Galitzky, J., Nguyen, T., Esteve, D., Åström, G., Mejhert, N., Ledoux, S., Thalamas, C., Arner, P., Guillemot, J.-C., Qian, H., Rydén, M., Bouloumié, A., 2017. CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells* 35, 1799–1814. <https://doi.org/10.1002/stem.2635>
- Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., Reitman, M.L., 2003. Liver Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Contributes to Hepatic Steatosis, Triglyceride Clearance, and Regulation of Body Fat Mass*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 34268–34276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300043200>
- Gawrieh, S., Noureddin, M., Loo, N., Mohseni, R., Awasty, V., Cusi, K., Kowdley, K.V., Lai, M., Schiff, E., Parmar, D., Patel, P., Chalasani, N., 2021. Saroglitazar, a PPAR- α/γ Agonist, for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Double-Blind Phase 2 Trial. *Hepatology* n/a. <https://doi.org/10.1002/hep.31843>
- Gilgenkrantz, H., Collin de l’Hortet, A., 2018. Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. *The American Journal of Pathology* 188, 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.03.008>
- Ginestier, C., 2017. Cellules souches cancéreuses : définition et techniques d’isolement. *Bulletin du Cancer* 104, 1060–1063. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.10.009>
- Gissen, P., Arias, I.M., 2015. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol* 63, 1023–1037. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015>
- Glaise, D., Ilyin, G.P., Loyer, P., Cariou, S., Bilodeau, M., Lucas, J., Puisieux, A., Ozturk, M., Guguen-Guillouzo, C., 1998. Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell lines. *Cell Growth & Differentiation* 9, 165.

- Glaser, S.S., Gaudio, E., Miller, T., Alvaro, D., Alpini, G., 2009. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 11, e7. <https://doi.org/10.1017/S1462399409000994>
- Global Cancer Observatory [WWW Document], 2020. URL <https://gco.iarc.fr/> (accessed 5.10.21).
- Gluchowski, N.L., Becuwe, M., Walther, T.C., Farese, R.V., 2017. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 343–355. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.32>
- Gomaraschi, M., Fracanzani, A.L., Dongiovanni, P., Pavanello, C., Giorgio, E., Da Dalt, L., Norata, G.D., Calabresi, L., Consonni, D., Lombardi, R., Branchi, A., Fargion, S., 2019. Lipid accumulation impairs lysosomal acid lipase activity in hepatocytes: Evidence in NAFLD patients and cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864, 158523. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2019.158523>
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G., Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13, 589–598. <https://doi.org/10.1038/ncb2220>
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, S.A., Mulligan, R.C., 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797–1806.
- Grabacka, M., Pierzchalska, M., Dean, M., Reiss, K., 2016. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17122093>
- Green, C.D., Ozguden-Akkoc, C.G., Wang, Y., Jump, D.B., Olson, L.K., 2010. Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species[S]. *Journal of Lipid Research* 51, 1871–1877. <https://doi.org/10.1194/jlr.M004747>
- Green, D.R., Chipuk, J.E., 2006. p53 and Metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* 126, 30–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.032>
- Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S., 1998. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* 78, 783–809. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.3.783>
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Seyec, J.L., Glaise, D., Canine, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C., 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *PNAS* 99, 15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Grisham, J.W., 1980. Cell Types in Long-Term Propagable Cultures of Rat Liver*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 349, 128–137. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb29521.x>
- Groussard, C., Morel, I., Chevanne, M., Monnier, M., Cillard, J., Delamarche, A., 2000. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of Applied Physiology* 89, 169–175. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.169>
- Grygiel-Górniak, B., 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. *Nutr J* 13, 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I.B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., Clément, B., Balabaud, C., Chevet, E., Laurent, A., Couchy, G., Letouzé, E., Calvo, F., Zucman-Rossi, J., 2012. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 44, 694–698. <https://doi.org/10.1038/ng.2256>
- Guillou, H., Martin, P., Jan, S., D'Andrea, S., Roulet, A., Catheline, D., Rioux, V., Pineau, T., Legrand, P., 2002. Comparative effect of fenofibrate on hepatic desaturases in wild-type

- and peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *Lipids* 37, 981–989. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-0990-3>
- Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P.G.P., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research* 49, 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., 2007. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions, Hepatocytes and Drug Development* 168, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.003>
- Guo, B., Huang, X., Lee, M.R., Lee, S.A., Broxmeyer, H.E., 2018. Antagonism of PPAR γ signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. *Nat Med* 24, 360–367. <https://doi.org/10.1038/nm.4477>
- Guo, X.-Y., Sun, F., Chen, J.-N., Wang, Y.-Q., Pan, Q., Fan, J.-G., 2018. circRNA_0046366 inhibits hepatocellular steatosis by normalization of PPAR signaling. *World J Gastroenterol* 24, 323–337. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i3.323>
- Hack, K., Reilly, L., Palmer, C., Read, K.D., Norval, S., Kime, R., Booth, K., Foerster, J., 2012. Skin-Targeted Inhibition of PPAR β/δ by Selective Antagonists to Treat PPAR β/δ – Mediated Psoriasis-Like Skin Disease In Vivo. *PLoS ONE* 7, e37097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037097>
- Hale, J.S., Otvos, B., Sinyuk, M., Alvarado, A.G., Hitomi, M., Stoltz, K., Wu, Q., Flavahan, W., Levison, B., Johansen, M.L., Schmitt, D., Neltner, J.M., Huang, P., Ren, B., Sloan, A.E., Silverstein, R.L., Gladson, C.L., DiDonato, J.A., Brown, J.M., McIntyre, T., Hazen, S.L., Horbinski, C., Rich, J.N., Lathia, J.D., 2014. Cancer stem cell-specific scavenger receptor CD36 drives glioblastoma progression. *Stem Cells* 32, 1746–1758. <https://doi.org/10.1002/stem.1716>
- Hall, C., Sato, K., Wu, N., Zhou, T., Kyritsi, K., Meng, F., Glaser, S., Alpini, G., 2017. Regulators of Cholangiocyte Proliferation. *Gene Expr* 17, 155–171. <https://doi.org/10.3727/105221616X692568>
- Hamburger, A., Salmon, S., 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461–463. <https://doi.org/10.1126/science.560061>
- Han, L., Shen, W.-J., Bittner, S., Kraemer, F.B., Azhar, S., 2017a. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future Cardiol* 13, 259–278. <https://doi.org/10.2217/fca-2016-0059>
- Han, L., Shen, W.-J., Bittner, S., Kraemer, F.B., Azhar, S., 2017b. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiol* 13, 279–296. <https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019>
- Han, M., Nwosu, Z.C., Piorońska, W., Ebert, M.P., Dooley, S., Meyer, C., 2020. Caveolin-1 Impacts on TGF- β Regulation of Metabolic Gene Signatures in Hepatocytes. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01606>
- Hanna, A., Shevde, L.A., 2016. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Mol Cancer* 15. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0509-3>
- Hardie, D.G., 2011. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *The American Journal of Clinical Nutrition* 93, 891S–896S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001925>
- Hardwick, J.P., 2008. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochemical Pharmacology* 75, 2263–2275. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.004>
- Harris, A.L., 2002. Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer* 2, 38–47. <https://doi.org/10.1038/nrc704>

- Hassani, S.-N., Totonchi, M., Sharifi-Zarchi, A., Mollamohammadi, S., Pakzad, M., Moradi, S., Samadian, A., Masoudi, N., Mirshahvaladi, S., Farrokhi, A., Greber, B., Araújo-Bravo, M.J., Sabour, D., Sadeghi, M., Salekdeh, G.H., Gourabi, H., Schöler, H.R., Baharvand, H., 2014. Inhibition of TGF β Signaling Promotes Ground State Pluripotency. *Stem Cell Rev and Rep* 10, 16–30. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9473-0>
- He, J., Hong, B., Bian, M., Jin, H., Chen, J., Shao, J., Zhang, F., Zheng, S., 2019. Docosahexaenoic acid inhibits hepatic stellate cell activation to attenuate liver fibrosis in a PPAR γ -dependent manner. *International Immunopharmacology* 75, 105816. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105816>
- He, J., Lu, H., Zou, Q., Luo, L., 2014. Regeneration of Liver After Extreme Hepatocyte Loss Occurs Mainly via Biliary Transdifferentiation in Zebrafish. *Gastroenterology* 146, 789–800.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.045>
- He, Z., Ning, N., Zhou, Q., Khoshnam, S.E., Farzaneh, M., 2020. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 146, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005>
- Hennedige, T., Kundapur Venkatesh, S., 2013. Imaging of hepatocellular carcinoma: diagnosis, staging and treatment monitoring. *Cancer Imaging* 12, 530–547. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2012.0044>
- Hershey, B.J., Vazzana, R., Joppi, D.L., Havas, K.M., 2020. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. *Journal of Clinical Medicine* 9, 87. <https://doi.org/10.3390/jcm9010087>
- Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.-L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R.S., Martinou, J.-C., 2012. Identification and Functional Expression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Science* 337, 93–96. <https://doi.org/10.1126/science.1218530>
- Higashi, T., Friedman, S.L., Hoshida, Y., 2017. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 121, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
- Holczbauer, A., Factor, V.M., Andersen, J.B., Marquardt, J.U., Kleiner, D., Raggi, C., Kitade, M., Seo, D., Akita, H., Durkin, M., Thorgeirsson, S.S., 2013. Modeling Pathogenesis of Primary Liver Cancer in Lineage-Specific Mouse Cell Types. *Gastroenterology* 145, 221–231. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.013>
- Hong, F., Pan, S., Guo, Y., Xu, P., Zhai, Y., 2019. PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* 24, 2545. <https://doi.org/10.3390/molecules24142545>
- Hoshida, Y., Nijman, S.M.B., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.-P., Chiang, D.Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Gabriel, S., Friedman, S.L., Kumada, H., Llovet, J.M., Golub, T.R., 2009. Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 69, 7385–7392. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1089>
- Hsu, I.C., Tokiwa, T., Bennett, W., Metcalf, R.A., Welsh, J.A., Sun, T., Harris, C.C., 1993. p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis* 14, 987–992. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.5.987>
- Huber, M.A., Kraut, N., Beug, H., 2005. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology, Cell-to-cell contact and extracellular matrix* 17, 548–558. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.001>
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., van de Wetering, M., Li, V.S.W., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., Grompe, M., Clevers, H., 2013. In vitro expansion

- of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250. <https://doi.org/10.1038/nature11826>
- Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Verstegen, M.M.A., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S.A., de Ligt, J., van de Wetering, M., Sasaki, N., Boers, S.J., Kemperman, H., de Jonge, J., Ijzermans, J.N.M., Nieuwenhuis, E.E.S., Hoekstra, R., Strom, S., Vries, R.R.G., van der Laan, L.J.W., Cuppen, E., Clevers, H., 2015. Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver. *Cell* 160, 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.050>
- Ishihara, N., Eura, Y., Mihara, K., 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of Cell Science* 117, 6535–6546. <https://doi.org/10.1242/jcs.01565>
- Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., Pandolfi, P.P., 2012. A PML-PPAR δ pathway for fatty acid oxidation regulates haematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* 18, 1350–1358. <https://doi.org/10.1038/nm.2882>
- Itoh, T., 2016. Stem/progenitor cells in liver regeneration. *Hepatology* 64, 663–668. <https://doi.org/10.1002/hep.28661>
- Iwasaki, H., Suda, T., 2009. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Science* 100, 1166–1172. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01177.x>
- Jain, M.R., Giri, S.R., Bhoi, B., Trivedi, C., Rath, A., Rathod, R., Ranvir, R., Kadam, S., Patel, H., Swain, P., Roy, S.S., Das, N., Karmakar, E., Wahli, W., Patel, P.R., 2018. Dual PPAR α/γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver International* 38, 1084–1094. <https://doi.org/10.1111/liv.13634>
- Jakobsson, A., Westerberg, R., Jakobsson, A., 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research* 45, 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004>
- Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Toftgård, R., 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet* 40, 1291–1299. <https://doi.org/10.1038/ng.239>
- Jang, G.-B., Kim, J.-Y., Cho, S.-D., Park, K.-S., Jung, J.-Y., Lee, H.-Y., Hong, I.-S., Nam, J.-S., 2015. Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep12465>
- Jang, H.-J., Suh, P.-G., Lee, Y.J., Shin, K.J., Cocco, L., Chae, Y.C., 2018. PLC γ 1: Potential arbitrator of cancer progression. *Advances in Biological Regulation, Symposium Issue 2017* 67, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.11.003>
- Jansen, G.A., Wanders, R.J.A., 2006. Alpha-Oxidation. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.012>
- Jiang, X., Stockwell, B.R., Conrad, M., 2021. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 266–282. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00324-8>
- Jin, H., Wang, S., Zaal, E.A., Wang, C., Wu, H., Bosma, A., Jochems, F., Isima, N., Jin, G., Lieftink, C., Beijersbergen, R., Berkers, C.R., Qin, W., Bernards, R., 2020. A powerful drug combination strategy targeting glutamine addiction for the treatment of human liver cancer. *eLife* 9, e56749. <https://doi.org/10.7554/eLife.56749>
- Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., Dick, J.E., 2006. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature Medicine* 12, 1167–1174. <https://doi.org/10.1038/nm1483>
- Jinushi, M., Chiba, S., Yoshiyama, H., Masutomi, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Yagita, H., Takaoka, A., Tahara, H., 2011. Tumor-associated macrophages regulate

- tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12425–12430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106645108>
- Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I., 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>
- Kallini, J.R., Gabr, A., Salem, R., Lewandowski, R.J., 2016. Transarterial Radioembolization with Yttrium-90 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Adv Ther* 33, 699–714. <https://doi.org/10.1007/s12325-016-0324-7>
- Kanakasabai, S., Walline, C.C., Chakraborty, S., Bright, J.J., 2011. PPAR δ deficient mice develop elevated Th1/Th17 responses and prolonged experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research* 1376, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.059>
- Kang, H., Kim, H., Lee, S., Youn, H., Youn, B., 2019. Role of Metabolic Reprogramming in Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT). *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2042. <https://doi.org/10.3390/ijms20082042>
- Kang, K., Reilly, S.M., Karabacak, V., Gangl, M.R., Fitzgerald, K., Hatano, B., Lee, C.-H., 2008. Adipocyte-Derived Th2 Cytokines and Myeloid PPAR δ Regulate Macrophage Polarization and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism* 7, 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.002>
- Kang, Y.-A., Pietras, E.M., Passegué, E., 2019. Deregulated Notch and Wnt signaling activates early-stage myeloid regeneration pathways in leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 217. <https://doi.org/10.1084/jem.20190787>
- Kanno, N., LeSage, G., Glaser, S., Alpini, G., 2001. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 281, G612–G625. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.3.G612>
- Karamboulas, C., Ailles, L., 2013. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Biochemistry of Stem Cells* 1830, 2481–2495. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.008>
- Kasai, F., Hirayama, N., Ozawa, M., Satoh, M., Kohara, A., 2018. HuH-7 reference genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. *Human Cell* 31, 261–267. <https://doi.org/10.1007/s13577-018-0212-3>
- Katoh, Masuko, Katoh, Masaru, 2007. WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clin Cancer Res* 13, 4042–4045. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2316>
- Katsuno, Y., Lamouille, S., Derynck, R., 2013. TGF- β signaling and epithelial–mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology* 25, 76–84. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b6371>
- Kaur, S., Siddiqui, H., Bhat, M.H., 2015. Hepatic Progenitor Cells in Action: Liver Regeneration or Fibrosis? *The American Journal of Pathology* 185, 2342–2350. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.004>
- Kelly, D.P., Scarpulla, R.C., 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18, 357–368. <https://doi.org/10.1101/gad.1177604>
- Keohane, E.M., Otto, C.N., Walenga, J.M., 2019. Rodak's Hematology - E-Book: Clinical Principles and Applications. Elsevier Health Sciences.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator–activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103, 1489–1498.
- Kim, D.J., Bility, M.T., Billin, A.N., Willson, T.M., Gonzalez, F.J., Peters, J.M., 2006. PPAR β/δ selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation. *Cell Death Differ* 13, 53–60. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401713>

- Kim, E., Viatour, P., 2020. Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks. *Experimental & Molecular Medicine* 52, 1898–1907. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00527-1>
- Kim, H., Ahn, Y., 2004. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in the Glucose-Sensing Apparatus of Liver and β -Cells. *Diabetes* 53, S60–S65. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S60>
- Kim, H., Lin, Q., Glazer, P.M., Yun, Z., 2018. The hypoxic tumor microenvironment in vivo selects the cancer stem cell fate of breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 20, 16. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0944-8>
- Kim, H.-S., Hwang, Y.-C., Koo, S.-H., Park, K.S., Lee, M.-S., Kim, K.-W., Lee, M.-K., 2013. PPAR- γ Activation Increases Insulin Secretion through the Up-regulation of the Free Fatty Acid Receptor GPR40 in Pancreatic β -Cells. *PLOS ONE* 8, e50128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050128>
- Kim, J., Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G.L., Dang, C.V., 2007. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1. *Molecular and Cellular Biology* 27, 7381–7393. <https://doi.org/10.1128/MCB.00440-07>
- Kim, S., Kim, H., Park, S.-K., Im, S.-S., Li, T., Cheon, H.G., Ahn, Y., 2004. Liver Glucokinase Can Be Activated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . *Diabetes* 53, S66–S70. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S66>
- Kleemann, R., Gervois, P.P., Verschuren, L., Staels, B., Princen, H.M.G., Kooistra, T., 2003. Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NF κ B-C/EBP- β complex formation. *Blood* 101, 545–551. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1762>
- Kleinsmith, L.J., Pierce, G.B., 1964. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* 24, 1544–1551.
- Klenk, E., Kahlke, W., 1963. Über das Vorkommen der 3.7.11.15-Tetramethyl-hexadecansäure (Phytansäure) in den Cholesterinestern und anderen Lipoidfraktionen der Organe bei einem Krankheitsfall unbekannter Genese (Verdacht auf Heredopathia atactica polyneuritiformis [Refsum-Syndrom]) 333, 133–139. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1963.333.1.133>
- Knowles, B., Howe, C., Aden, D., 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497–499. <https://doi.org/10.1126/science.6248960>
- Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N.A., McNiven, M.A., Schrader, M., 2005. A Role for Fis1 in Both Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell* 16, 10.
- Koch, U., Lehal, R., Radtke, F., 2013. Stem cells living with a Notch. *Development* 140, 689–704. <https://doi.org/10.1242/dev.080614>
- Komiya, Y., Habas, R., 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68–75.
- Koopman, W.J.H., Verkaart, S., Visch, H.-J., Westhuizen, F.H. van der, Murphy, M.P., Heuvel, L.W.P.J. van den, Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2005. Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂⁻-mediated mitochondrial outgrowth. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 288, C1440–C1450. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00607.2004>
- Koren, E., Fuchs, Y., 2016. The bad seed: Cancer stem cells in tumor development and resistance. *Drug Resistance Updates* 28, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.06.006>
- Korla, K., Mitra, C.K., 2014. Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 32, 242–256. <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.762723>

- Kota, B.P., Huang, T.H.-W., Roufogalis, B.D., 2005. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* 51, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.07.012>
- Koundouros, N., Pouligiannis, G., 2020. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British Journal of Cancer* 122, 4–22. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>
- Krause, D.S., Lazarides, K., von Andrian, U.H., Van Etten, R.A., 2006. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nature Medicine* 12, 1175–1180. <https://doi.org/10.1038/nm1489>
- Kreso, A., Dick, J.E., 2014. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 14, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
- Krey, G., Braissant, O., L’Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., Wahli, W., 1997. Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Molecular Endocrinology* 11, 779–791. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0007>
- Kubota, H., Reid, L.M., 2000. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12132–12137.
- Kühlbrandt, W., 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Kumar, D.P., Caffrey, R., Marioneaux, J., Santhekadur, P.K., Bhat, M., Alonso, C., Koduru, S.V., Philip, B., Jain, M.R., Giri, S.R., Bedossa, P., Sanyal, A.J., 2020. The PPAR α/γ Agonist Saroglitazar Improves Insulin Resistance and Steatohepatitis in a Diet Induced Animal Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep* 10, 9330. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66458-z>
- Kumar, M., Kumar, R., Hissar, S.S., Saraswat, M.K., Sharma, B.C., Sakhuja, P., Sarin, S.K., 2007. Risk factors analysis for hepatocellular carcinoma in patients with and without cirrhosis: A case–control study of 213 hepatocellular carcinoma patients from India. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22, 1104–1111. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04908.x>
- Kuniyasu, H., 2008. The Roles of Dietary PPAR γ Ligands for Metastasis in Colorectal Cancer [WWW Document]. *PPAR Research*. <https://doi.org/10.1155/2008/529720>
- La Paglia, L., Listì, A., Caruso, S., Amodeo, V., Passiglia, F., Bazan, V., Fanale, D., 2017. Potential Role of ANGPTL4 in the Cross Talk between Metabolism and Cancer through PPAR Signaling Pathway. *PPAR Res* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8187235>
- Lade, A.G., Monga, S.P.S., 2011. Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: Which way does the WNT blow? *Developmental Dynamics* 240, 486–500. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22522>
- Lai, E.C., 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965–973. <https://doi.org/10.1242/dev.01074>
- Lambert, J.E., Ramos–Roman, M.A., Browning, J.D., Parks, E.J., 2014. Increased De Novo Lipogenesis Is a Distinct Characteristic of Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 146, 726–735. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.049>
- Landes, T., Leroy, I., Bertholet, A., Diot, A., Khosrobakhsh, F., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.-C., Courilleau, D., Guillou, E., Olichon, A., Lenaers, G., Arnauné-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Belenguer, P., 2010. OPA1 (dys)functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Mitochondrial Morphology: Shaping the Cell Function* 21, 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.012>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres–Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E., 1994. A cell initiating human acute myeloid

- leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lathia, J.D., Hitomi, M., Gallagher, J., Gadani, S.P., Adkins, J., VasANJI, A., Liu, L., Eyler, C.E., Heddleston, J.M., Wu, Q., Minhas, S., Soeda, A., Hoepfner, D.J., Ravin, R., McKay, R.D.G., McLendon, R.E., Corbeil, D., Chenn, A., Hjelmeland, A.B., Park, D.M., Rich, J.N., 2011. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis* 2, e200. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.80>
- Lautt, W.W., 2007. Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: Vascular compliance, hepatic arterial buffer response, hepatorenal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatology Research* 37, 891–903. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00148.x>
- Le Foie et les Voies biliaires : Anatomie [WWW Document], 2014. . Centre Hépatobiliaire Paul Brousse. URL <http://www.centre-hepatobiliaire.org/maladies-foie/anatomie-foie.html> (accessed 2.7.17).
- Lee, C.-H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.-W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., Evans, R.M., 2006. PPAR δ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *PNAS* 103, 3444–3449. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511253103>
- Lee, H.-C., Wei, Y.-H., 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 822–834. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.010>
- Lee, J.-S., Chu, I.-S., Heo, J., Calvisi, D.F., Sun, Z., Roskams, T., Durnez, A., Demetris, A.J., Thorgeirsson, S.S., 2004. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 40, 667–676. <https://doi.org/10.1002/hep.20375>
- Lee, J.-S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I.-S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D.F., Mikaelyan, A., Roberts, L.R., Demetris, A.J., Sun, Z., Nevens, F., Roskams, T., Thorgeirsson, S.S., 2006a. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* 12, 410–416. <https://doi.org/10.1038/nm1377>
- Lee, J.-S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I.-S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D.F., Mikaelyan, A., Roberts, L.R., Demetris, A.J., Sun, Z., Nevens, F., Roskams, T., Thorgeirsson, S.S., 2006b. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nature Medicine* 12, 410–416. <https://doi.org/10.1038/nm1377>
- Lee, S., Jeong, S.-Y., Lim, W.-C., Kim, S., Park, Y.-Y., Sun, X., Youle, R.J., Cho, H., 2007. Mitochondrial Fission and Fusion Mediators, hFis1 and OPA1, Modulate Cellular Senescence*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 22977–22983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700679200>
- Lee, S.H., Hong, H.S., Liu, Z.X., Kim, R.H., Kang, M.K., Park, N.-H., Shin, K.-H., 2012. TNF α enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 activation in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 424, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.065>
- Lee, S.O., Yang, X., Duan, S., Tsai, Y., Strojny, L.R., Keng, P., Chen, Y., 2015. IL-6 promotes growth and epithelial-mesenchymal transition of CD133+ cells of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7, 6626–6638. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6570>
- Lee, Y., Friedman, S.L., 2010. Chapter 6 - Fibrosis in the Liver: Acute Protection and Chronic Disease, in: Kaestner, K.H. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Development, Differentiation and Disease of the Para-Alimentary Tract*. Academic Press, pp. 151–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385233-5.00006-4>
- Lee, Y.J., Ko, E.H., Kim, J.E., Kim, E., Lee, H., Choi, H., Yu, J.H., Kim, H.J., Seong, J.-K., Kim, K.-S., Kim, J., 2012. Nuclear receptor PPAR γ -regulated monoacylglycerol O-

- acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *PNAS* 109, 13656–13661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203218109>
- Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., Rojo, M., 2002. Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins. *Mol Biol Cell* 13, 4343–4354. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0330>
- Levrero, M., 2006. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 25, 3834–3847. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209562>
- Li, B., Cao, Y., Meng, G., Qian, L., Xu, T., Yan, C., Luo, O., Wang, S., Wei, J., Ding, Y., Yu, D., 2019. Targeting glutaminase 1 attenuates stemness properties in hepatocellular carcinoma by increasing reactive oxygen species and suppressing Wnt/beta-catenin pathway. *EBioMedicine* 39, 239–254. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.063>
- Li, D., Fu, Z., Chen, Ruiwan, Zhao, X., Zhou, Y., Zeng, B., Yu, M., Zhou, Q., Lin, Q., Gao, W., Ye, H., Zhou, J., Li, Z., Liu, Y., Chen, Rufu, 2015. Inhibition of glutamine metabolism counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to radiotherapy. *Oncotarget* 6, 31151–31163. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5150>
- Li, H., Ge, C., Zhao, F., Yan, M., Hu, C., Jia, D., Tian, H., Zhu, M., Chen, T., Jiang, G., Xie, H., Cui, Y., Gu, J., Tu, H., He, X., Yao, M., Liu, Y., Li, J., 2011. Hypoxia-inducible factor 1 alpha-activated angiopoietin-like protein 4 contributes to tumor metastasis via vascular cell adhesion molecule-1/integrin β 1 signaling in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 54, 910–919. <https://doi.org/10.1002/hep.24479>
- Li, J., Condello, S., Thomes-Pepin, J., Ma, X., Xia, Y., Hurley, T.D., Matei, D., Cheng, J.-X., 2017. Lipid Desaturation Is a Metabolic Marker and Therapeutic Target of Ovarian Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell* 20, 303–314.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.004>
- Li, L., Yang, L., Fan, Z., Xue, W., Shen, Z., Yuan, Y., Sun, X., Wang, D., Lian, J., Wang, L., Zhao, J., Zhang, Y., 2020. Hypoxia-induced GBE1 expression promotes tumor progression through metabolic reprogramming in lung adenocarcinoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0152-8>
- Li, W., Li, L., Hui, L., 2020. Cell Plasticity in Liver Regeneration. *Trends in Cell Biology* 30, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.007>
- Li, X., Zhao, Q., Qi, J., Wang, W., Zhang, D., Li, Z., Qin, C., 2018. lncRNA Ftx promotes aerobic glycolysis and tumor progression through the PPAR γ pathway in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 53, 551–566. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4418>
- Liang, Y., Han, H., Liu, L., Duan, Y., Yang, X., Ma, C., Zhu, Y., Han, J., Li, X., Chen, Y., 2018. CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells. *Oncogenesis* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0107-x>
- Liesa, M., Palacín, M., Zorzano, A., 2009. Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiological Reviews* 89, 799–845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>
- Lim, H.Y., Ho, Q.S., Low, J., Choolani, M., Wong, K.P., 2011. Respiratory competent mitochondria in human ovarian and peritoneal cancer. *Mitochondrion* 11, 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.12.015>
- Lin, S., Nascimento, E.M., Gajera, C., Chen, L., Neuhoefer, P., Garbuzov, A., Wang, S., Artandi, S.E., 2018. Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury. *Nature* 556, 244–248. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0004-7>

- Liu, K., Lee, J., Kim, J.Y., Wang, L., Tian, Y., Chan, S.T., Cho, C., Machida, K., Chen, D., Ou, J.-H.J., 2017. Mitophagy Controls the Activities of Tumor Suppressor p53 to Regulate Hepatic Cancer Stem Cells. *Molecular Cell* 68, 281–292.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.022>
- Liu, S., Hatano, B., Zhao, M., Yen, C.-C., Kang, K., Reilly, S.M., Gangl, M.R., Gorgun, C., Balschi, J.A., Ntambi, J.M., Lee, C.-H., 2011. Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ/β in Hepatic Metabolic Regulation. *J Biol Chem* 286, 1237–1247. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.138115>
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., Hajnóczky, G., 2009. Mitochondrial ‘kiss-and-run’: interplay between mitochondrial motility and fusion–fission dynamics. *The EMBO Journal* 28, 3074–3089. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.255>
- Liu, Y.-C., Yeh, C.-T., Lin, K.-H., 2020. Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9061331>
- Liver, E.A. for the S. of the, Cancer, E.O. for R. and T. of, 2012. EASL–EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 56, 908–943. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.001>
- Llovet, J.M., Hilgard, P., de Oliveira, A.C., Forner, A., Zeuzem, S., Galle, P.R., Häussinger, D., Moscovici, M., 2008. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *n engl j med* 13.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., 2004. *Molecular Cell Biology 5th Edition, Modern Genetic Analysis 2nd Edition & Cd-rom*. Macmillan Higher Education.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.-Y., Sung, K.W., Lee, C.W.H., Zhao, X.-D., Chiu, K.-P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.-L., Ruan, Y., Lim, B., Ng, H.-H., 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 38, 431–440. <https://doi.org/10.1038/ng1760>
- López-Terrada, D., Cheung, S.W., Finegold, M.J., Knowles, B.B., 2009. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology* 40, 1512–1515. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.003>
- Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., Chan, D.C., 2013. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *MBoC* 24, 659–667. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-10-0721>
- Lu, W.-Y., Bird, T.G., Boulter, L., Tsuchiya, A., Cole, A.M., Hay, T., Guest, R.V., Wojtacha, D., Man, T.Y., Mackinnon, A., Ridgway, R.A., Kendall, T., Williams, M.J., Jamieson, T., Raven, A., Hay, D.C., Iredale, J.P., Clarke, A.R., Sansom, O.J., Forbes, S.J., 2015. Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol* 17, 971–983. <https://doi.org/10.1038/ncb3203>
- Luan, W., Wang, Y., Chen, X., Shi, Y., Wang, J., Zhang, J., Qian, J., Li, R., Tao, T., Wei, W., Hu, Q., Liu, N., You, Y., 2015. PKM2 promotes glucose metabolism and cell growth in gliomas through a mechanism involving a let-7a/c-Myc/hnRNPA1 feedback loop. *Oncotarget* 6, 13006–13018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3514>
- Luo, P., Wu, S., Yu, Y., Ming, X., Li, S., Zuo, X., Tu, J., 2020. Current Status and Perspective Biomarkers in AFP Negative HCC: Towards Screening for and Diagnosing Hepatocellular Carcinoma at an Earlier Stage. *Pathol. Oncol. Res.* 26, 599–603. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00585-5>
- Magee, J.A., Piskounova, E., Morrison, S.J., 2012. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283–296. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.003>

- Mahnken, A.H., 2016. Current status of transarterial radioembolization. *World J Radiol* 8, 449–459. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i5.449>
- Mana, M.D., Hussey, A.M., Tzouanas, C.N., Imada, S., Barrera Millan, Y., Bahceci, D., Saiz, D.R., Webb, A.T., Lewis, C.A., Carmeliet, P., Mihaylova, M.M., Shalek, A.K., Yilmaz, Ö.H., 2021. High-fat diet-activated fatty acid oxidation mediates intestinal stemness and tumorigenicity. *Cell Reports* 35, 109212. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109212>
- Mandard, S., Müller, M., Kersten, S., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 61, 393–416. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3216-3>
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.Ng., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., Weinberg, R.A., 2008. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 133, 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Mansouri, R.M., Bauge, E., Staels, B., Gervois, P., 2008. Systemic and Distal Repercussions of Liver-Specific Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Control of the Acute-Phase Response. *Endocrinology* 149, 3215–3223. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1339>
- Mao, S.A., Glorioso, J.M., Nyberg, S.L., 2014. Liver Regeneration. *Transl Res* 163, 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.01.005>
- Mao-Qiang, M., Fowler, A.J., Schmuth, M., Lau, P., Chang, S., Brown, B.E., Moser, A.H., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W., Li, M., Metzger, D., Chambon, P.H., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2004. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- γ Activation Stimulates Keratinocyte Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* 123, 305–312. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23235.x>
- Marsillach, J., Camps, J., Ferré, N., Beltran, R., Rull, A., Mackness, B., Mackness, M., Joven, J., 2009. Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease. *BMC Gastroenterol* 9, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-9-3>
- Martin, P.G.P., Guillou, H., Lasserre, F., Déjean, S., Lan, A., Pascussi, J.-M., SanCristobal, M., Legrand, P., Besse, P., Pineau, T., 2007. Novel aspects of PPAR α -mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. *Hepatology* 45, 767–777. <https://doi.org/10.1002/hep.21510>
- Martinez-Outschoorn, U.E., Prisco, M., Ertel, A., Tsirigos, A., Lin, Z., Pavlides, S., Wang, C., Flomenberg, N., Knudsen, E.S., Howell, A., Pestell, R.G., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2011. Ketones and lactate increase cancer cell “stemness”, driving recurrence, metastasis and poor clinical outcome in breast cancer. *Cell Cycle* 10, 1271–1286. <https://doi.org/10.4161/cc.10.8.15330>
- Maruyama, H., Kiyono, S., Kondo, T., Sekimoto, T., Yokosuka, O., 2016. Palmitate-induced Regulation of PPAR γ via PGC1 α : a Mechanism for Lipid Accumulation in the Liver in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Med Sci* 13, 169–178. <https://doi.org/10.7150/ijms.13581>
- Matés, J.M., Segura, J.A., Campos-Sandoval, J.A., Lobo, C., Alonso, L., Alonso, F.J., Márquez, J., 2009. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Mitochondrial Dynamics and Function in Biology and Medicine* 41, 2051–2061. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.003>
- Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., Andrews, P.W., 2004. Specific Knockdown of Oct4 and β 2-microglobulin Expression by RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells and Embryonic Carcinoma Cells. *STEM CELLS* 22, 659–668. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-659>

- Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang, P.M., 2006. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* 312, 1650–1653. <https://doi.org/10.1126/science.1126863>
- Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.-H., Gavrilova, O., Ward, J.M., Brewer, B., Reitman, M.L., Gonzalez, F.J., 2003. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 111, 737–747. <https://doi.org/10.1172/JCI200317223>
- Mazzaferro, V., Bhoori, S., Sposito, C., Bongini, M., Langer, M., Miceli, R., Mariani, L., 2011. Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: An evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transplantation* 17, S44–S57. <https://doi.org/10.1002/lt.22365>
- McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., 2006. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 16, R551–R560. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., Franklin, R.A., 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1263–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>
- McGahan, J.P., Dodd, G.D., 2001. Radiofrequency Ablation of the Liver. *American Journal of Roentgenology* 176, 3–16. <https://doi.org/10.2214/ajr.176.1.1760003>
- McGlynn, K.A., Petrick, J.L., London, W.T., 2015. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* 19, 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.01.001>
- Meacham, C.E., Morrison, S.J., 2013. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328–337. <https://doi.org/10.1038/nature12624>
- Mege, J.-L., Capo, C., 2010. La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes ? *Med Sci (Paris)* 26, 83–88. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026183>
- Mello, T., Materozzi, M., Galli, A., 2016. PPARs and Mitochondrial Metabolism: From NAFLD to HCC. *PPAR Research* 2016, e7403230. <https://doi.org/10.1155/2016/7403230>
- Menendez, J.A., Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., Alarcón, T., 2014. Metabostemness: Metaboloepigenetic reprogramming of cancer stem-cell functions. *Oncoscience* 1, 803–806.
- Metcalf, D., 2003. The Unsolved Enigmas of Leukemia Inhibitory Factor. *STEM CELLS* 21, 5–14. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-5>
- Michalopoulos, G.K., 2017. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 65, 1384–1392. <https://doi.org/10.1002/hep.28988>
- Michalopoulos, G.K., 2007. Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology* 213, 286–300. <https://doi.org/10.1002/jcp.21172>
- Michalopoulos, G.K., Bhushan, B., 2021. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 18, 40–55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>
- Michelakis, E.D., Webster, L., Mackey, J.R., 2008. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer* 99, 989–994. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604554>
- Mirzaei, H., Hamblin, M.R., 2020. Regulation of Glycolysis by Non-coding RNAs in Cancer: Switching on the Warburg Effect. *Molecular Therapy - Oncolytics* 19, 218–239. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.10.003>

- Mitchell, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S., 2003. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631–642. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00393-3)
- Modica-Napolitano, J.S., Singh, K.K., 2004. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion, Mitochondrial Medicine - Developing the Scientific Basis to Medical Management of Mitochondrial Disease* 4, 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.027>
- Moon, C.M., Kwon, J.-H., Kim, J.S., Oh, S.-H., Jin Lee, K., Park, J.J., Pil Hong, S., Cheon, J.H., Kim, T.I., Kim, W.H., 2014. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress cancer stem cells via inhibiting PTGS2 (cyclooxygenase 2) and NOTCH/HES1 and activating PPAR γ in colorectal cancer. *Int J Cancer* 134, 519–529. <https://doi.org/10.1002/ijc.28381>
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., Puisieux, A., 2008. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLOS ONE* 3, e2888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
- Moreno Luna, L.E., Kwo, P.Y., Roberts, L.R., Mettler, T.A., Gansen, D.N., Andrews, J.C., Wiseman, G.A., Misra, V.L., 2009. Liver transplantation after radioembolization in a patient with unresectable HCC. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6, 679–683. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.165>
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E., 2007. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal* 274, 1393–1418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>
- Moseti, D., Regassa, A., Kim, W.-K., 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17010124>
- Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J.-S., Li, X., 2020. FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Front. Cell Dev. Biol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>
- Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Latruffe, N., 1998. Expression of Putative Fatty Acid Transporter Genes Are Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor α and γ Activators in a Tissue- and Inducer-specific Manner*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 16710–16714. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16710>
- Mueckler, M., Thorens, B., 2013. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine, The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series)* 34, 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>
- Munn, E.A., 2014. *The Structure of Mitochondria*. Academic Press.
- Nagy, P., Bisgaard, H.C., Thorgeirsson, S.S., 1994. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *Journal of Cell Biology* 126, 223–233. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.1.223>
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res* 42, 3858–3863.
- Naudin, L., 2018. Modélisation du métabolisme énergétique tumoral glycolytique vs. respiratoire oxydatif 68.

- Nault, J.C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., Zucman-Rossi, J., 2013. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun* 4, 2218. <https://doi.org/10.1038/ncomms3218>
- Neuschwander-Tetri, B.A., 2017. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med* 15. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0806-8>
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc'h, J.L., Siliart, B., Dumon, H., 2008. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92, 272–283. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A., 1998. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95, 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9)
- Ning, Z., Guo, X., Liu, Xiaolong, Lu, C., Wang, A., Wang, X., Wang, W., Chen, H., Qin, W., Liu, Xinyu, Zhou, L., Ma, C., Du, J., Lin, Z., Lou, H., Otkur, W., Qi, H., Chen, D., Xia, T., Liu, J., Tan, G., Xu, G., Piao, H., 2020. USP22-dependent accumulation of lipidomes drives hepatocellular carcinoma progression by stabilizing PPAR γ (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-82450/v1>
- Nissanka, N., Moraes, C.T., 2018. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Lett* 592, 728–742. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12956>
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Eagle, A.R., Vats, D., Morel, C.R., Goforth, M.H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A.W., Chawla, A., 2008. Alternative (M2) activation of Kupffer cells by PPAR δ ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 7, 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.003>
- Olthoff, K.M., Forner, A., Hübscher, S., Fung, J., 2011. What is the best staging system for hepatocellular carcinoma in the setting of liver transplantation? *Liver Transplantation* 17, S26–S33. <https://doi.org/10.1002/lt.22352>
- Orcutt, S.T., Anaya, D.A., 2018. Liver Resection and Surgical Strategies for Management of Primary Liver Cancer. *Cancer Control* 25, 1073274817744621. <https://doi.org/10.1177/1073274817744621>
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., Dang, C.V., 2000. Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by c-Myc*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 21797–21800. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000023200>
- Oxidative decarboxylation of Pyruvate, 2018. . *Bioscience Notes*. URL <https://www.biosciencenotes.com/oxidative-decarboxylation-of-pyruvate/> (accessed 6.15.21).
- Palmieri, V.O., Santovito, D., Marano, G., Minerva, F., Ricci, L., D'Alitto, F., Angelelli, G., Palasciano, G., 2015. Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Radiol med* 120, 627–633. <https://doi.org/10.1007/s11547-014-0494-9>
- Panasyuk, G., Espeillac, C., Chauvin, C., Pradelli, L.A., Horie, Y., Suzuki, A., Annicotte, J.-S., Fajas, L., Foretz, M., Verdeguer, F., Pontoglio, M., Ferré, P., Scoazec, J.-Y., Birnbaum, M.J., Ricci, J.-E., Pende, M., 2012. PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. *Nat Commun* 3, 672. <https://doi.org/10.1038/ncomms1667>
- Parent, R., Marion, M.-J., Furio, L., Trépo, C., Petit, M.-A., 2004. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 126, 1147–1156. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.002>

- Park, C.H., Bergsagel, D.E., McCulloch, E.A., 1971. Mouse Myeloma Tumor Stem Cells: A Primary Cell Culture Assay. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 46, 411–422. <https://doi.org/10.1093/jnci/46.2.411>
- Parolin, M.L., Spriet, L.L., Hultman, E., Matsos, M.P., Hollidge-Horvat, M.G., Jones, N.L., Heigenhauser, G.J.F., 2000. Effects of PDH activation by dichloroacetate in human skeletal muscle during exercise in hypoxia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 279, E752–E761. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.4.E752>
- Pastò, A., Bellio, C., Pilotto, G., Ciminale, V., Silic-Benussi, M., Guzzo, G., Rasola, A., Frasson, C., Nardo, G., Zulato, E., Nicoletto, M.O., Manicone, M., Indraccolo, S., Amadori, A., 2014. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget* 5, 4305–4319.
- Patel, M.S., Korotchkina, L.G., 2003. The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex*. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31, 5–15. <https://doi.org/10.1002/bmb.2003.494031010156>
- Patitucci, C., Couchy, G., Bagattin, A., Cañeque, T., de Reyniès, A., Scoazec, J.-Y., Rodriguez, R., Pontoglio, M., Zucman-Rossi, J., Pende, M., Panasyuk, G., 2017. Hepatocyte nuclear factor 1 α suppresses steatosis-associated liver cancer by inhibiting PPAR γ transcription. *J Clin Invest* 127, 1873–1888. <https://doi.org/10.1172/JCI90327>
- Pavlova, N.N., Thompson, C.B., 2016. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. *Cell Metab* 23, 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S., Bernard, L., Viale, G., Pelicci, P.G., Di Fiore, P.P., 2010. Biological and Molecular Heterogeneity of Breast Cancers Correlates with Their Cancer Stem Cell Content. *Cell* 140, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.007>
- Pediconi, N., Salerno, D., Lupacchini, L., Angrisani, A., Peruzzi, G., De Smaele, E., Levrero, M., Belloni, L., 2019. EZH2, JMJD3, and UTX epigenetically regulate hepatic plasticity inducing retro-differentiation and proliferation of liver cells. *Cell Death Dis* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1755-2>
- Penas, F., Mirkin, G.A., Vera, M., Cevey, Á., González, C.D., Gómez, M.I., Sales, M.E., Goren, N.B., 2015. Treatment in vitro with PPAR α and PPAR γ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852, 893–904. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.019>
- Peng, H., Wisse, E., Tian, Z., 2016. Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell Mol Immunol* 13, 328–336. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.96>
- Penno, A., Hackenbroich, G., Thiele, C., 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Phospholipids and phospholipid metabolism* 1831, 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.12.001>
- Pérez-Martín, M., Rivera, P., Blanco, E., Loreface, C., Decara, J., Pavón, F.J., Serrano, A., Rodríguez de Fonseca, F., Suárez, J., 2016. Environmental Enrichment, Age, and PPAR α Interact to Regulate Proliferation in Neurogenic Niches. *Front. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00089>
- Pesce, M., Schöler, H.R., 2001. Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. *STEM CELLS* 19, 271–278. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-4-271>
- Pestereva, E., Kanakasabai, S., Bright, J.J., 2012. PPAR γ agonists regulate the expression of stemness and differentiation genes in brain tumour stem cells. *British Journal of Cancer* 106, 1702–1712. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.161>
- Pettersen, I.K.N., Tusubira, D., Ashrafi, H., Dyrstad, S.E., Hansen, L., Liu, X.-Z., Nilsson, L.I.H., Løvsletten, N.G., Berge, K., Wergedahl, H., Bjørndal, B., Fluge, Ø., Bruland,

- O., Rustan, A.C., Halberg, N., Røslund, G.V., Berge, R.K., Tronstad, K.J., 2019. Upregulated PDK4 expression is a sensitive marker of increased fatty acid oxidation. *Mitochondrion* 49, 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.009>
- Pfanner, N., Warscheid, B., Wiedemann, N., 2019. Mitochondrial protein organization: from biogenesis to networks and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>
- Pine, S.R., Ryan, B.M., Varticovski, L., Robles, A.I., Harris, C.C., 2010. Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cells. *PNAS* 107, 2195–2200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909390107>
- Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., Indiveri, C., 2014. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front. Chem.* 2. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00061>
- Poirier, Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T., Hiltunen, J.K., 2006. Peroxisomal β -oxidation—A metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Peroxisomes: Morphology, Function, Biogenesis and Disorders* 1763, 1413–1426. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.034>
- Poniatowski, Ł.A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., Szukiewicz, D., 2015. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. *Mediators Inflamm* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/137823>
- Popov, L.-D., 2020. Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24, 4892–4899. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15194>
- Pore, N., Jiang, Z., Shu, H.-K., Bernhard, E., Kao, G.D., Maity, A., 2006. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1 α expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res* 4, 471–479. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0234>
- Poupin, N., Corlu, A., Cabaton, N.J., Dubois-Pot-Schneider, H., Canlet, C., Person, E., Bruel, S., Frainay, C., Vinson, F., Maurier, F., Morel, F., Robin, M.-A., Fromenty, B., Zalko, D., Jourdan, F., 2018. Large-Scale Modeling Approach Reveals Functional Metabolic Shifts during Hepatic Differentiation. *J. Proteome Res.* *acs.jproteome.8b00524*. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00524>
- Prenner, S., Kulik, L., 2018. 46 - Hepatocellular Carcinoma, in: Sanyal, A.J., Boyer, T.D., Lindor, K.D., Terrault, N.A. (Eds.), *Zakim and Boyer's Hepatology (Seventh Edition)*. Elsevier, Philadelphia, pp. 668-692.e9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37591-7.00046-X>
- Prigione, A., Adjaye, J., 2010. Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1729–1741. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103198ap>
- Puchalska, P., Crawford, P.A., 2017. Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell Metab* 25, 262–284. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>
- Raggi, C., Mousa, H.S., Correnti, M., Sica, A., Invernizzi, P., 2016. Cancer stem cells and tumor-associated macrophages: a roadmap for multitargeting strategies. *Oncogene* 35, 671–682. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.132>
- Raimundo, N., Baysal, B.E., Shadel, G.S., 2011. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends in Molecular Medicine* 17, 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.06.001>
- Rajasingh, J., Bright, J.J., 2006. 15-Deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J₂ regulates leukemia inhibitory factor signaling through JAK-STAT pathway in mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 312, 2538–2546. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.04.010>

- Rakhshandehroo, M., Hooiveld, G., Müller, M., Kersten, S., 2009. Comparative Analysis of Gene Regulation by the Transcription Factor PPAR α between Mouse and Human. *PLOS ONE* 4, e6796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006796>
- Rambold, A.S., Kostelecky, B., Elia, N., Lippincott-Schwartz, J., 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10190–10195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107402108>
- Raoul, J.-L., Sangro, B., Forner, A., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Bolondi, L., Lencioni, R., 2011. Evolving strategies for the management of intermediate-stage hepatocellular carcinoma: Available evidence and expert opinion on the use of transarterial chemoembolization. *Cancer Treatment Reviews* 37, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.07.006>
- Raven, A., Lu, W.-Y., Man, T.Y., Ferreira-Gonzalez, S., O’Duibhir, E., Dwyer, B.J., Thomson, J.P., Meehan, R.R., Bogorad, R., Koteliansky, V., Kotelevtsev, Y., French-Constant, C., Boulter, L., Forbes, S.J., 2017. Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature* 547, 350–354. <https://doi.org/10.1038/nature23015>
- Recio, C., Guerra, B., Guerra-Rodríguez, M., Aranda-Tavío, H., Martín-Rodríguez, P., de Mirecki-Garrido, M., Brito-Casillas, Y., García-Castellano, J.M., Estévez-Braun, A., Fernández-Pérez, L., 2019. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-5: an opportunity for drug development in oncohematology. *Oncogene* 38, 4657–4668. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0752-3>
- Reddy, J.K., Hashimoto, T., 2001. PEROXISOMAL β -OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR–ACTIVATED RECEPTOR α : An Adaptive Metabolic System. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 193–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.193>
- Rehman, J., Zhang, H.J., Toth, P.T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A.N., Wietholt, C., Archer, S.L., 2012. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* 26, 2175–2186. <https://doi.org/10.1096/fj.11-196543>
- Rena, G., Hardie, D.G., Pearson, E.R., 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60, 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Robinson, M.B., Lee, M.L., DaSilva, S., 2020. Glutamate Transporters and Mitochondria: Signaling, Co-compartmentalization, Functional Coupling, and Future Directions. *Neurochem Res* 45, 526–540. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02974-8>
- Rodríguez-Enríquez, S., Carreño-Fuentes, L., Gallardo-Pérez, J.C., Saavedra, E., Quezada, H., Vega, A., Marín-Hernández, A., Olín-Sandoval, V., Torres-Márquez, M.E., Moreno-Sánchez, R., 2010. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 1744–1751. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.07.010>
- Roehlen, N., Crouchet, E., Baumert, T.F., 2020. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>
- Rogatzki, M.J., Ferguson, B.S., Goodwin, M.L., Gladden, L.B., 2015. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front. Neurosci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00022>
- Röhrig, F., Schulze, A., 2016. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 732–749. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.89>
- Rombouts, K., Carloni, V., 2013. The fibrotic microenvironment as a heterogeneity facet of hepatocellular carcinoma. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-17>

- Romero, R., Sayin, V.I., Davidson, S.M., Bauer, M.R., Singh, S.X., LeBoeuf, S.E., Karakousi, T.R., Ellis, D.C., Bhutkar, A., Sanchez-Rivera, F.J., Subbaraj, L., Martinez, B., Bronson, R.T., Prigge, J.R., Schmidt, E.E., Thomas, C.J., Goparaju, C., Davies, A., Dolgalev, I., Heguy, A., Allaj, V., Poirier, J.T., Moreira, A.L., Rudin, C.M., Pass, H.I., Vander Heiden, M.G., Jacks, T., Papagiannakopoulos, T., 2017. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in a dependence on glutaminolysis. *Nat Med* 23, 1362–1368. <https://doi.org/10.1038/nm.4407>
- Ronnett, G.V., Kleman, A.M., Kim, E.-K., Landree, L.E., Tu, Y., 2006. Fatty Acid Metabolism, the Central Nervous System, and Feeding. *Obesity* 14, 201S-207S. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.309>
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., Mortensen, R.M., 1999. PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell* 4, 611–617. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80211-7)
- Rosenbaum, J., Mavier, P., Dhumeaux, D., 1991. Interactions cellulaires dans le foie. *Med Sci (Paris)* 7, 110. <https://doi.org/10.4267/10608/4319>
- Roskams, T.A., Theise, N.D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P.S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Crawford, J.M., Crosby, H.A., Desmet, V., Finegold, M.J., Geller, S.A., Gouw, A.S.H., Hytiroglou, P., Knisely, A.S., Kojiro, M., Lefkowitz, J.H., Nakanuma, Y., Olynyk, J.K., Park, Y.N., Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P.J., Strain, A.J., Thung, S.N., Wanless, I.R., West, A.B., 2004. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39, 1739–1745. <https://doi.org/10.1002/hep.20130>
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., Capaldi, R.A., 2004. Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Res* 64, 985–993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1101>
- Rui, L., 2014. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* 4, 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Ruiz i Altaba, A., Sánchez, P., Dahmane, N., 2002. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature Reviews Cancer* 2, 361–372. <https://doi.org/10.1038/nrc796>
- Ruppert, P.M.M., Park, J.-G., Xu, X., Hur, K.Y., Lee, A.-H., Kersten, S., 2019. Transcriptional profiling of PPAR α -/- and CREB3L3/-/- livers reveals disparate regulation of hepatoproliferative and metabolic functions of PPAR α . *BMC Genomics* 20, 199. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5563-y>
- Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Veldhoven, P.P.V., Waltregny, D., Daniëls, V.W., Machiels, J., Vanderhoydonc, F., Smans, K., Waelkens, E., Verhoeven, G., Swinnen, J.V., 2010. De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res* 70, 8117–8126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3871>
- Salem, R., Lewandowski, R.J., Kulik, L., Wang, E., Riaz, A., Ryu, R.K., Sato, K.T., Gupta, R., Nikolaidis, P., Miller, F.H., Yaghami, V., Ibrahim, S.M., Senthilnathan, S., Baker, T., Gates, V.L., Atassi, B., Newman, S., Memon, K., Chen, R., Vogelzang, R.L., Nemcek, A.A., Resnick, S.A., Chrisman, H.B., Carr, J., Omary, R.A., Abecassis, M., Benson, A.B., Mulcahy, M.F., 2011. Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 140, 497-507.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.049>

- Saluja, I., Granneman, J.G., Skoff, R.P., 2001. PPAR δ agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* 33, 191–204. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200103\)33:3<191::AID-GLIA1018>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200103)33:3<191::AID-GLIA1018>3.0.CO;2-M)
- Samid, D., Wells, M., Greene, M.E., Shen, W., Palmer, C.N.A., Thibault, A., 2000. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ as a Novel Target in Cancer Therapy: Binding and Activation by an Aromatic Fatty Acid with Clinical Antitumor Activity. *Clin Cancer Res* 6, 933–941.
- Sanderson, L.M., Boekschoten, M.V., Desvergne, B., Müller, M., Kersten, S., 2009. Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPAR α and PPAR β/δ in regulation of gene expression in mouse liver. *Physiological Genomics* 41, 42–52. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00127.2009>
- Santos-de-Frutos, K., Djouder, N., 2021. When dormancy fuels tumour relapse. *Commun Biol* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02257-0>
- Sato, K., Kennedy, L., Liangpunsakul, S., Kusumanchi, P., Yang, Z., Meng, F., Glaser, S., Francis, H., Alpini, G., 2019. Intercellular Communication between Hepatic Cells in Liver Diseases. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092180>
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., Brivanlou, A.H., 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine* 10, 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>
- Schaefer, K.L., Wada, K., Takahashi, H., Matsushashi, N., Ohnishi, S., Wolfe, M.M., Turner, J.R., Nakajima, A., Borkan, S.C., Saubermann, L.J., 2005. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Inhibition Prevents Adhesion to the Extracellular Matrix and Induces Anoikis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res* 65, 2251–2259. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3037>
- Schmuth, M., Haqq, C.M., Cairns, W.J., Holder, J.C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A.J., Chuang, G., Moser, A.H., Brown, B.E., Mao-Qiang, M., Uchida, Y., Schoonjans, K., Auwerx, J., Chambon, P., Willson, T.M., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2004. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- β/δ Stimulates Differentiation and Lipid Accumulation in Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 122, 971–983. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22412.x>
- Schneller, D., Angel, P., 2019. Cellular Origin of Hepatocellular Carcinoma, in: Tirnitz-Parker, J.E.E. (Ed.), *Hepatocellular Carcinoma*. Codon Publications, Brisbane (AU).
- Scholtyssek, C., Katzenbeisser, J., Fu, H., Uderhardt, S., Ipseiz, N., Stoll, C., Zaiss, M.M., Stock, M., Donhauser, L., Böhm, C., Kleyer, A., Hess, A., Engelke, K., David, J.-P., Djouad, F., Tuckermann, J.P., Desvergne, B., Schett, G., Krönke, G., 2013. PPAR β/δ governs Wnt signaling and bone turnover. *Nat Med* 19, 608–613. <https://doi.org/10.1038/nm.3146>
- Scott, D.A., Richardson, A.D., Filipp, F.V., Knutzen, C.A., Chiang, G.G., Ronai, Z.A., Osterman, A.L., Smith, J.W., 2011. Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines: BEYOND THE WARBURG EFFECT*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 42626–42634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282046>
- Sekiya, S., Suzuki, A., 2014. Hepatocytes, Rather than Cholangiocytes, Can Be the Major Source of Primitive Ductules in the Chronically Injured Mouse Liver. *The American Journal of Pathology* 184, 1468–1478. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.005>
- Semenza, G.L., 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development* 20, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.009>
- Senni, N., Savall, M., Granados, D.C., Alves-Guerra, M.-C., Sartor, C., Lagoutte, I., Gougelet, A., Terris, B., Gilgenkrantz, H., Perret, C., Colnot, S., Bossard, P., 2019. β -catenin-

- activated hepatocellular carcinomas are addicted to fatty acids. *Gut* 68, 322–334. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315448>
- Severi, T., van Malenstein, H., Verslype, C., van Pelt, J.F., 2010. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 31, 1409–1420. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.142>
- Shank, J.J., Yang, K., Ghannam, J., Cabrera, L., Johnston, C.J., Reynolds, R.K., Buckanovich, R.J., 2012. Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecologic Oncology* 127, 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.07.115>
- Shen, B., Chu, E.S.H., Zhao, G., Man, K., Wu, C.-W., Cheng, J.T.Y., Li, G., Nie, Y., Lo, C.M., Teoh, N., Farrell, G.C., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2012. PPAR γ inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. *Br J Cancer* 106, 1486–1494. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.130>
- Shin, S., Upadhyay, N., Greenbaum, L.E., Kaestner, K.H., 2015. Ablation of Foxl1-Cre–Labeled Hepatic Progenitor Cells and Their Descendants Impairs Recovery of Mice From Liver Injury. *Gastroenterology* 148, 192–202.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.039>
- Signes, A., Fernandez-Vizarra, E., 2018. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. *Essays in Biochemistry* 62, 255–270. <https://doi.org/10.1042/EBC20170098>
- Sikder, K., Shukla, S.K., Patel, N., Singh, H., Rafiq, K., 2018. High Fat Diet Upregulates Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis via Intervention of PPAR- γ . *CPB* 48, 1317–1331. <https://doi.org/10.1159/000492091>
- Singer, K., Kastenberger, M., Gottfried, E., Hammerschmied, C.G., Büttner, M., Aigner, M., Seliger, B., Walter, B., Schlösser, H., Hartmann, A., Andreesen, R., Mackensen, A., Kreutz, M., 2011. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: High expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8+ T-cell infiltration in the tumor. *International Journal of Cancer* 128, 2085–2095. <https://doi.org/10.1002/ijc.25543>
- Singh, A., Settleman, J., 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>
- Singh, A.M., Reynolds, D., Cliff, T., Ohtsuka, S., Mathyses, A., Sun, Y., Menendez, L., Kulik, M., Dalton, S., 2012. Signaling network cross-talk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 10, 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.014>
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., Duncan, S.A., 2010. Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell* 18, 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>
- Solinas, G., Borén, J., Dulloo, A.G., 2015. De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Molecular Metabolism* 4, 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.004>
- Song, X., Liu, J., Kuang, F., Chen, X., Zeh, H.J., Kang, R., Kroemer, G., Xie, Y., Tang, D., 2021. PDK4 dictates metabolic resistance to ferroptosis by suppressing pyruvate oxidation and fatty acid synthesis. *Cell Reports* 34. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108767>

- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., Chan, D.C., 2009. Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *MBoC* 20, 3525–3532. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-03-0252>
- Song, Z., Xiaoli, A.M., Yang, F., 2018. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients* 10, 1383. <https://doi.org/10.3390/nu10101383>
- Sørensen, K.K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R.S., Smedsrød, B., 2015. Liver Sinusoidal Endothelial Cells, in: *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, pp. 1751–1774. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140078>
- Stacpoole, P.W., Martyniuk, C.J., James, M.O., Calcutt, N.A., 2019. Chapter Eight - Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy, in: Fernyhough, P., Calcutt, N.A. (Eds.), *International Review of Neurobiology, Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration and Peripheral Neuropathies*. Academic Press, pp. 211–238. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.05.003>
- Stafeev, Yu.S., Michurina, S.S., Zubkova, E.S., Beloglazova, I.B., Ratner, E.I., Parfenova, E.V., Men'shikov, M.Yu., 2018. Modulation of the Inflammatory Status of Macrophages and Their Paracrine Effect on the Sensitivity of Adipocytes to Insulin with Sirtuin and PPAR γ Receptor Activators. *Bull Exp Biol Med* 165, 429–433. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4186-7>
- Stanger, B.Z., 2015. Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver. *Annu Rev Physiol* 77, 179–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170255>
- Strand, D.W., Jiang, M., Murphy, T.A., Yi, Y., Konvinse, K.C., Franco, O.E., Wang, Y., Young, J.D., Hayward, S.W., 2012. PPAR γ isoforms differentially regulate metabolic networks to mediate mouse prostatic epithelial differentiation. *Cell Death & Disease* 3, e361–e361. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.99>
- Sugiarto, S., Persson, A.I., Munoz, E.G., Waldhuber, M., Lamagna, C., Andor, N., Hanecker, P., Ayers-Ringler, J., Phillips, J., Siu, J., Lim, D., Vandenberg, S., Stallcup, W., Berger, M.S., Bergers, G., Weiss, W.A., Petritsch, C., 2011. Asymmetry-defective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors. *Cancer Cell* 20, 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.011>
- Sun, H., Song, T., 2015. Hepatocellular carcinoma: Advances in diagnostic imaging. *Drug Discoveries & Therapeutics* 9, 310–318. <https://doi.org/10.5582/ddt.2015.01058>
- Suzuki, A., Zheng, Y.-W., Kondo, R., Kusakabe, M., Takada, Y., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H., 2000. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32, 1230–1239. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.20349>
- Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, Z.S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R.M., Barak, Y., Schwabe, J., Nagy, L., 2010. STAT6 Transcription Factor Is a Facilitator of the Nuclear Receptor PPAR γ -Regulated Gene Expression in Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 33, 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.009>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., Ivy, S.P., 2011. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8, 97–106. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.196>
- Takebe, N., Ivy, S.P., 2010. Controversies in Cancer Stem Cells: Targeting Embryonic Signaling Pathways. *Clin Cancer Res* 16, 3106–3112. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2934>

- Takeuchi, K., Reue, K., 2009. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1195–E1209. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90958.2008>
- Tanaka, N., Moriya, K., Kiyosawa, K., Koike, K., Gonzalez, F.J., Aoyama, T., 2008. PPAR α activation is essential for HCV core protein–induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest* 118, 683–694. <https://doi.org/10.1172/JCI33594>
- Tao, Y., Wang, M., Chen, E., Tang, H., 2017. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules [WWW Document]. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2017/4256352>
- Tarlow, B.D., Pelz, C., Naugler, W.E., Wakefield, L., Wilson, E.M., Finegold, M.J., Grompe, M., 2014. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 15, 605–618. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.008>
- Tatematsu, M., Ho, R.H., Kaku, T., Ekem, J.K., Farber, E., 1984. Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol* 114, 418–430.
- The liver: Structure, function, and disease [WWW Document], 2018. URL <https://www.medicalnewstoday.com/articles/305075> (accessed 4.16.20).
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., Crawford, J.M., 1999. The canals of hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30, 1425–1433. <https://doi.org/10.1002/hep.510300614>
- Thomson, S., Petti, F., Sujka-Kwok, I., Mercado, P., Bean, J., Monaghan, M., Seymour, S.L., Argast, G.M., Epstein, D.M., Haley, J.D., 2011. A systems view of epithelial–mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis* 28, 137–155. <https://doi.org/10.1007/s10585-010-9367-3>
- Thorgeirsson, S.S., 2017. Stemness in Liver Cancer. *DDI* 35, 387–389. <https://doi.org/10.1159/000456592>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., Prudent, J., 2018. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry* 62, 341–360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Tirinato, L., Liberale, C., Di Franco, S., Candeloro, P., Benfante, A., La Rocca, R., Potze, L., Marotta, R., Ruffilli, R., Rajamanickam, V.P., Malerba, M., De Angelis, F., Falqui, A., Carbone, E., Todaro, M., Medema, J.P., Stassi, G., Di Fabrizio, E., 2015. Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells Unveiled by Spectroscopic Imaging. *Stem Cells* 33, 35–44. <https://doi.org/10.1002/stem.1837>
- To, J.C., Chiu, A.P., Tschida, B.R., Lo, L.H., Chiu, C.H., Li, X.-X., Kuka, T.P., Linden, M.A., Amin, K., Chan, W.-C., Bell, J.B., Moriarity, B.S., Largaespada, D.A., Keng, V.W., 2020. ZBTB20 regulates WNT/CTNNB1 signalling pathway by suppressing PPAR γ during hepatocellular carcinoma tumourigenesis. *JHEP Rep* 3, 100223. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100223>
- Trevisani, F., D’Intino, P.E., Morselli-Labate, A.M., Mazzella, G., Accogli, E., Caraceni, P., Domenicali, M., De Notariis, S., Roda, E., Bernardi, M., 2001. Serum α -fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *Journal of Hepatology* 34, 570–575. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)00053-2)
- Tsochatzis, E.A., Bosch, J., Burroughs, A.K., 2014. Liver cirrhosis. *The Lancet* 383, 1749–1761. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60121-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60121-5)

- Turdo, A., Veschi, V., Gaggianesi, M., Chinnici, A., Bianca, P., Todaro, M., Stassi, G., 2019. Meeting the Challenge of Targeting Cancer Stem Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00016>
- Uldry, M., Thorens, B., 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447, 480–489. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1085-0>
- Uriel, J., 1976. Cancer, Retrodifferentiation, and the Myth of Faust. *Cancer Res* 36, 4269–4275.
- Van Haele, M., Snoeck, J., Roskams, T., 2019. Human Liver Regeneration: An Etiology Dependent Process. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092332>
- Vauthey, J.-N., Lauwers, G.Y., Esnaola, N.F., Do, K.-A., Belghiti, J., Mirza, N., Curley, S.A., Ellis, L.M., Regimbeau, J.-M., Rashid, A., Cleary, K.R., Nagorney, D.M., 2002. Simplified Staging for Hepatocellular Carcinoma. *JCO* 20, 1527–1536. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.6.1527>
- Verkade, P.E., Van Der Lee, J., 1934. Researches on fat metabolism. II. *Biochem J* 28, 31–40.
- Vermeulen, L., de Sousa e Melo, F., Richel, D.J., Medema, J.P., 2012. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *The Lancet Oncology* 13, e83–e89. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70257-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70257-1)
- Vermeulen, L., Melo, F.D.S.E., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T., Tuynman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., Sprick, M.R., Kemper, K., Richel, D.J., Stassi, G., Medema, J.P., 2010. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology* 12, 468–476. <https://doi.org/10.1038/ncb2048>
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2012a. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2012b. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>
- Volmer, R., van der Ploeg, K., Ron, D., 2013. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4628–4633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217611110>
- Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Kudo, C., Shibuya, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Tachibana, M., Miyoshi, H., Kamisaki, Y., Mayumi, T., Kadowaki, T., Blumberg, R.S., 2006. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ -mediated Regulation of Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 12673–12681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513786200>
- Wagner, R., Hieronimus, A., Lamprinou, A., Heni, M., Hatziagelaki, E., Ullrich, S., Stefan, N., Staiger, H., Häring, H.-U., Fritsche, A., 2014. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) modulates free fatty acid receptor 1 (FFAR1) dependent insulin secretion in humans. *Molecular Metabolism* 3, 676–680. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.001>
- Waldherr, M., Mišák, M., Ferk, F., Tomc, J., Žegura, B., Filipič, M., Mikulits, W., Mai, S., Haas, O., Huber, W.W., Haslinger, E., Knasmüller, S., 2018. Use of HuH6 and other human-derived hepatoma lines for the detection of genotoxins: a new hope for laboratory animals? *Arch Toxicol* 92, 921–934. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2109-4>
- Wallace, D.C., 2012. Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer* 12, 685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>
- Wanders, A., van Grunsven, E.G., Jansen, G.A., 2000. Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α - and ω -oxidation systems in humans. *Biochemical Society Transactions* 28, 9.

- Wanders, R.J.A., Jansen, G.A., Lloyd, M.D., 2003. Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1631, 119–135. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(03\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00003-9)
- Wanders, R.J.A., Komen, J., Kemp, S., 2011. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *The FEBS Journal* 278, 182–194. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07947.x>
- Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C.Y., Nusse, R., 2015. Self-renewing diploid Axin2+ cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* 524, 180–185. <https://doi.org/10.1038/nature14863>
- Wang, J., Wen, T., Li, Z., Che, X., Gong, L., Jiao, Z., Qu, X., Liu, Y., 2020. CD36 upregulates DEK transcription and promotes cell migration and invasion via GSK-3 β / β -catenin-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer. *Aging (Albany NY)* 13, 1883–1897. <https://doi.org/10.18632/aging.103985>
- Wang, K., Zhang, T., Dong, Q., Nice, E.C., Huang, C., Wei, Y., 2013. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death Dis* 4, e537–e537. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.50>
- Wang, W., Quan, Y., Fu, Q., Liu, Y., Liang, Y., Wu, J., Yang, G., Luo, C., Ouyang, Q., Wang, Y., 2014. Dynamics between Cancer Cell Subpopulations Reveals a Model Coordinating with Both Hierarchical and Stochastic Concepts. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084654>
- Wang, X., Sun, Y., Wong, J., Conklin, D.S., 2013. PPAR γ maintains ERBB2-positive breast cancer stem cells. *Oncogene* 32, 5512–5521. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.217>
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.-J., Sul, H.S., 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm4074>
- Wang, Z., Li, F., Quan, Y., Shen, J., 2019. Avicularin ameliorates human hepatocellular carcinoma via the regulation of NF- κ B/COX-2/PPAR- γ activities. *Mol Med Rep* 19, 5417–5423. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10198>
- Wanless, I.R., 2020. The Role of Vascular Injury and Congestion in the Pathogenesis of Cirrhosis: the Congestive Escalator and the Parenchymal Extinction Sequence. *Curr Hepatology Rep* 19, 40–53. <https://doi.org/10.1007/s11901-020-00508-y>
- Warburg, O., 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, O., 1928. The Chemical Constitution of Respiration Ferment. *Science* 68, 437–443. <https://doi.org/10.1126/science.68.1767.437>
- Wei, Z., Liu, X., Cheng, C., Yu, W., Yi, P., 2021. Metabolism of Amino Acids in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.603837>
- Weis, S., Franke, A., Mössner, J., Jakobsen, J.C., Schoppmeyer, K., 2013. Radiofrequency (thermal) ablation versus no intervention or other interventions for hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003046.pub3>
- Welte, M.A., Gould, A.P., 2017. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Recent Advances in Lipid Droplet Biology* 1862, 1260–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006>
- Westergaard, M., Henningsen, J., Kratchmarova, I., Kristiansen, K., Svendsen, M.L., Johansen, C., Jensen, U.B., Schrøder, H.D., Berge, R.K., Iversen, L., Bolund, L., Kragballe, K., 2001. Modulation of Keratinocyte Gene Expression and Differentiation by PPAR-Selective Ligands and Tetradecylthioacetic Acid. *Journal of Investigative Dermatology* 116, 702–712. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01329.x>

- Wierenga, A.T.J., Cunningham, A., Erdem, A., Lopera, N.V., Brouwers-Vos, A.Z., Pruis, M., Mulder, A.B., Günther, U.L., Martens, J.H.A., Vellenga, E., Schuringa, J.J., 2019. HIF1/2-exerted control over glycolytic gene expression is not functionally relevant for glycolysis in human leukemic stem/progenitor cells. *Cancer Metab* 7, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40170-019-0206-y>
- Williams, G.R., 1965. DYNAMIC ASPECTS OF THE TRICARBOXYLIC ACID CYCLE IN ISOLATED MITOCHONDRIA. *Can J Biochem* 43, 603–615. <https://doi.org/10.1139/o65-070>
- Wilson, J.W., Leduc, E.H., 1958. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 76, 441–449. <https://doi.org/10.1002/path.1700760213>
- Wolf, A., Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., Hawkins, C., Guha, A., 2011. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med* 208, 313–326. <https://doi.org/10.1084/jem.20101470>
- Wong, N., 2000. A Comprehensive Karyotypic Study on Human Hepatocellular Carcinoma by Spectral Karyotyping. *Hepatology* 32, 1060–1068. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.19349>
- Wu, S.-D., Ma, Y.-S., Fang, Y., Liu, L.-L., Fu, D., Shen, X.-Z., 2012. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treatment Reviews* 38, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.06.010>
- Xiao, Y., Cai, S., Liu, L., Yang, X., Yun, J., 2018. Decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha indicates unfavorable outcomes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Manag Res* 10, 1781–1789. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S166971>
- Xin, H.-W., Ambe, C.M., Hari, D.M., Wiegand, G.W., Miller, T.C., Chen, J.-Q., Anderson, A.J., Ray, S., Mullinax, J.E., Koizumi, T., Langan, R.C., Burka, D., Herrmann, M.A., Goldsmith, P.K., Stojadinovic, A., Rudloff, U., Thorgeirsson, S.S., Avital, I., 2013. Label-retaining liver cancer cells are relatively resistant to sorafenib. *Gut* 62, 1777–1786. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303261>
- Xu, J., Lamouille, S., Derynck, R., 2009. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research* 19, 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, R., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J.S., Feng, L., Bhalla, K.N., Keating, M.J., Huang, P., 2005. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Res* 65, 613–621.
- Xu, R.-H., Barron, T.L., Gu, F., Root, S., Peck, R.M., Pan, G., Yu, J., Antosiewicz-Bourget, J., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J.A., 2008. NANOG is a Direct Target of TGF β /Activin Mediated SMAD Signaling in Human ES Cells. *Cell Stem Cell* 3, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.001>
- Yamamoto, S., Kondo, S., 2018. Oral chemotherapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 19, 993–1001. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1479398>
- Yang, C., Huang, X., Liu, Z., Qin, W., Wang, C., 2020. Metabolism-associated molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Mol Oncol* 14, 896–913. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12639>
- Yang, J., Mowry, L.E., Nejak-Bowen, K.N., Okabe, H., Diegel, C.R., Lang, R.A., Williams, B.O., Monga, S.P., 2014. Beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: A Wnt-Wnt situation! *Hepatology* 60, 964–976. <https://doi.org/10.1002/hep.27082>

- Yang, J.D., Hainaut, P., Gores, G.J., Amadou, A., Plymoth, A., Roberts, L.R., 2019. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 589–604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>
- Yang, J.D., Roberts, L.R., 2010. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 448–458. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.100>
- Yang, L., Venneti, S., Nagrath, D., 2017. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 19, 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
- Yang, N., Wang, T., Li, Q., Han, F., Wang, Z., Zhu, R., Zhou, J., 2021. HBXIP drives metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma cells via METTL3-mediated m6A modification of HIF-1 α . *Journal of Cellular Physiology* 236, 3863–3880. <https://doi.org/10.1002/jcp.30128>
- Yu, J., Qiao, L., Zimmermann, L., Ebert, M.P.A., Zhang, H., Lin, W., Röcken, C., Malfertheiner, P., Farrell, G.C., 2006. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Hepatology* 43, 134–143. <https://doi.org/10.1002/hep.20994>
- Yu, J., Shen, B., Chu, E.S.H., Teoh, N., Cheung, K.-F., Wu, C.-W., Wang, S., Lam, C.N.Y., Feng, H., Zhao, J., Cheng, A.S.L., To, K.-F., Chan, H.L.Y., Sung, J.J.Y., 2010a. Inhibitory role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro. *Hepatology* 51, 2008–2019. <https://doi.org/10.1002/hep.23550>
- Yu, J., Zhang, S., Chu, E.S.H., Go, M.Y.Y., Lau, R.H.Y., Zhao, Junhong, Wu, C.-W., Tong, L., Zhao, Jingmin, Poon, T.C.W., Sung, J.J.Y., 2010b. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma reverses hepatic nutritional fibrosis in mice and suppresses activation of hepatic stellate cells in vitro. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 948–957. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.02.006>
- Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., Pestell, R.G., 2012. Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 2144–2151. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>
- Yuneva, M.O., Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., Chen, X., Bishop, J.M., 2012. The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type. *Cell Metabolism* 15, 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.015>
- Zampieri, L.X., Grasso, D., Bouzin, C., Brusa, D., Rossignol, R., Sonveaux, P., 2020. Mitochondria Participate in Chemoresistance to Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 18, 1379–1391. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-1145>
- Zawacka-Pankau, J., Grinkevich, V.V., Hünten, S., Nikulenkov, F., Gluch, A., Li, H., Enge, M., Kel, A., Selivanova, G., 2011. Inhibition of Glycolytic Enzymes Mediated by Pharmacologically Activated p53: TARGETING WARBURG EFFECT TO FIGHT CANCER*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 41600–41615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.240812>
- Zaytseva, Y.Y., Wallis, N.K., Southard, R.C., Kilgore, M.W., 2011. The PPAR γ Antagonist T0070907 Suppresses Breast Cancer Cell Proliferation and Motility via Both PPAR γ -dependent and -independent Mechanisms. *Anticancer Res* 31, 813–823.
- Zhang, C., Liu, J., Liang, Y., Wu, R., Zhao, Y., Hong, X., Lin, M., Yu, H., Liu, L., Levine, A.J., Hu, W., Feng, Z., 2013. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat Commun* 4, 2935. <https://doi.org/10.1038/ncomms3935>
- Zhang, F., Duan, S., Tsai, Y., Keng, P.C., Chen, Yongbing, Lee, S.O., Chen, Yuhchayau, 2016. Cisplatin treatment increases stemness through upregulation of hypoxia-inducible

- factors by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 107, 746–754. <https://doi.org/10.1111/cas.12937>
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V., Semenza, G.L., 2007. HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity. *Cancer Cell* 11, 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.04.001>
- Zhang, L., Jiao, M., Wu, K., Li, L., Zhu, G., Wang, X., He, D., Wu, D., 2014. TNF- α induced epithelial mesenchymal transition increases stemness properties in renal cell carcinoma cells. *Int J Clin Exp Med* 7, 4951–4958.
- Zhang, N., Chu, E.S.H., Zhang, J., Li, X., Liang, Q., Chen, J., Chen, M., Teoh, N., Farrell, G., Sung, J.J.Y., Yu, J., 2014. Peroxisome proliferator activated receptor alpha inhibits hepatocarcinogenesis through mediating NF- κ B signaling pathway. *Oncotarget* 5, 8330–8340.
- Zhang, Sheng, Jiang, J., Chen, Z., Wang, Y., Tang, W., Chen, Y., Liu, L., 2018. Relationship of PPARG, PPARGC1A, and PPARGC1B polymorphisms with susceptibility to hepatocellular carcinoma in an eastern Chinese Han population. *Onco Targets Ther* 11, 4651–4660. <https://doi.org/10.2147/OTT.S168274>
- Zhang, Shijian, Yang, X., Wang, L., Zhang, C., 2018. Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells (Review). *Oncology Letters* 16, 679–686. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8716>
- Zhao, C., Blum, J., Chen, A., Kwon, H.Y., Jung, S.H., Cook, J.M., Lagoo, A., Reya, T., 2007. Loss of β -Catenin Impairs the Renewal of Normal and CML Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell* 12, 528–541. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.003>
- Zhao, H., Yan, C., Hu, Y., Mu, L., Liu, S., Huang, K., Li, Q., Li, X., Tao, D., Qin, J., 2020. Differentiated cancer cell-originated lactate promotes the self-renewal of cancer stem cells in patient-derived colorectal cancer organoids. *Cancer Letters* 493, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.044>
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D.W., Abel, P.W., Tu, Y., 2013. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 32, 4814–4824. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.494>
- Zhao, T., Du, H., Blum, J.S., Yan, C., 2015. Critical role of PPAR γ in myeloid-derived suppressor cell-stimulated cancer cell proliferation and metastasis. *Oncotarget* 7, 1529–1543.
- Zhou, J., Su, P., Wang, L., Chen, Joanna, Zimmermann, M., Genbacev, O., Afonja, O., Horne, M.C., Tanaka, T., Duan, E., Fisher, S.J., Liao, J., Chen, Jie, Wang, F., 2009. mTOR supports long-term self-renewal and suppresses mesoderm and endoderm activities of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7840–7845. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901854106>
- Zhou, P., Li, B., Liu, F., Zhang, M., Wang, Q., Liu, Y., Yao, Y., Li, D., 2017. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 16, 52. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0624-9>
- Zhu, Y., Ghosh, P., Charnay, P., Burns, D.K., Parada, L.F., 2002. Neurofibromas in NF1: Schwann Cell Origin and Role of Tumor Environment. *Science* 296, 920–922. <https://doi.org/10.1126/science.1068452>
- Zhu, Y., Zheng, B., Wang, H., Chen, L., 2017. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. *Acta Pharmacol Sin* 38, 614–622. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.5>
- Zucman-Rossi, J., 2010. Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease* 42, S235–S241. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(10\)60511-7](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(10)60511-7)

- Zuo, Q., He, J., Zhang, S., Wang, H., Jin, G., Jin, H., Cheng, Z., Tao, X., Yu, C., Li, B., Yang, C., Wang, S., Lv, Y., Zhao, F., Yao, M., Cong, W., Wang, C., Qin, W., 2021. PPAR γ Coactivator-1 α Suppresses Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting Warburg Effect by PPAR γ -Dependent WNT/ β -Catenin/Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isozyme 1 Axis. *Hepatology* 73, 644–660. <https://doi.org/10.1002/hep.31280>
- Zwijsen, A., Goumans, M.-J., Lawson, K.A., Rooijen, M.A.V., Mummery, C.L., 1999. Ectopic expression of the transforming growth factor β type II receptor disrupts mesoderm organisation during mouse gastrulation. *Developmental Dynamics* 214, 141–151. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199902\)214:2<141::AID-AJA4>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199902)214:2<141::AID-AJA4>3.0.CO;2-S)

Annexes

Revue

**Interplay between Metabolism
Reprogramming and Epithelial-to-
Mesenchymal Transition in Cancer
Stem Cells**

Review

Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells

Yoann Daniel ^{1,†} , Elise Lelou ^{1,†} , Caroline Aninat ¹, Anne Corlu ^{1,*}  and Florian Cabillic ^{1,2}

¹ INSERM, Université Rennes, INRAE, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), F-35000 Rennes, France; yoann.daniel@univ-rennes1.fr (Y.D.); elise.lelou@univ-rennes1.fr (E.L.); caroline.aninat@univ-rennes1.fr (C.A.); florian.cabillic@univ-rennes1.fr (F.C.)

² Laboratoire de Cytogénétique et Biologie Cellulaire, CHU Rennes, F-35000 Rennes, France

* Correspondence: anne.corlu@inserm.fr

† Co-first authors.

Simple Summary: Tumor cells display important plasticity potential. Notably, tumor cells have the ability to change toward immature cells called cancer stem cells under the influence of the tumor environment. Importantly, cancer stem cells are a small subset of relatively quiescent cells that, unlike rapidly dividing differentiated tumor cells, escape standard chemotherapies, causing relapse or recurrence of cancer. Interestingly, these cells adopt a specific metabolism. Most often, they mainly rely on glucose uptake and metabolism to sustain their energy needs. This metabolic reprogramming is set off by environmental factors such as pro-inflammatory signals or catecholamine hormones (epinephrine, norepinephrine). A better understanding of this process could provide opportunities to kill cancer stem cells. Indeed, it would become possible to develop drugs that act specifically on metabolic pathways used by these cells. These new drugs could be used to strengthen the effects of current chemotherapies and overcome cancers with poor prognoses.



Citation: Daniel, Y.; Lelou, E.; Aninat, C.; Corlu, A.; Cabillic, F. Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells. *Cancers* **2021**, *13*, 1973. <https://doi.org/10.3390/cancers13081973>

Academic Editor: Amancio Carnero

Received: 25 March 2021

Accepted: 15 April 2021

Published: 20 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tumor cells display important plasticity potential, which contributes to intratumoral heterogeneity. Notably, tumor cells have the ability to redifferentiate toward immature states under the influence of their microenvironment. Importantly, this phenotypical conversion is paralleled by a metabolic rewiring, and according to the metabostemness theory, metabolic reprogramming represents the first step of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and acquisition of stemness features. Most cancer stem cells (CSC) adopt a glycolytic phenotype even though cells retain functional mitochondria. Such adaptation is suggested to reduce the production of reactive oxygen species (ROS), protecting CSC from detrimental effects of ROS. CSC may also rely on glutaminolysis or fatty acid metabolism to sustain their energy needs. Besides pro-inflammatory cytokines that are well-known to initiate the redifferentiation process, the release of catecholamines in the microenvironment of the tumor can modulate both EMT and metabolic changes in cancer cells through the activation of EMT transcription factors (ZEB1, Snail, or Slug (SNAI2)). Importantly, the acquisition of stem cell properties favors the resistance to standard care chemotherapies. Hence, a better understanding of this process could pave the way for the development of therapies targeting CSC metabolism, providing new strategies to eradicate the whole tumor mass in cancers with unmet needs.

Keywords: cancer stem cell; cell plasticity; metabolism reprogramming; epithelial-to-mesenchymal transition; catecholamines

1. Introduction

In the 1920s, Warburg first claimed that tumor cells displayed metabolic dysregulation. Based on studies that showed superior lactate production in tumors compared to non-tumor cells, he postulated that “the respiration of all tumor cells is damaged” [1,2]. Since then, the landscape of metabolic reprogramming in tumor cells has become more complex. Studies have shown that tumor cells may use glycolysis, glutaminolysis, or lipid catabolism to meet

their energy needs and maintain their anabolism. In addition, inconsistent with Warburg's theory, they have shown that most tumor cells retain functional mitochondria [3–6] and revealed an unexpected inter- and intra-tumoral metabolic heterogeneity [7].

Increasing evidence shows that metabolic reprogramming in tumor cells partly relies on epithelial-to-mesenchymal transition (EMT, Figure 1). EMT is a biological process that takes place during embryonic development, tissue repair, and regeneration, or neoplastic transformation, by which epithelial cells lose cell polarity and cell-cell adhesion and gain migratory/invasion properties [8–11]. It is a multistep process orchestrated by EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs). EMT ultimately gives rise to a fully mesenchymal cell state, passing through various intermediate cell types, the so-called quasi-mesenchymal cells, which can co-express epithelial (E-cadherin) and mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin) [12]. Unlike normal cells, tumor cells usually undergo incomplete EMT, which endows cells with the ability to escape apoptosis, anoikis, and senescence and evade immune surveillance. Importantly, quasi-mesenchymal cells, rather than fully mesenchymal cells, were shown to efficiently seed metastases at distant sites, likely because they are able to carry out more easily the reverse mesenchymal-epithelial transition (MET) [13]. During the EMT process, tumor cells also acquire progenitor/stem cells (CSC) marker expression (e.g., CD44, CD133, Nanog, and OCT-4) and properties, notably self-renewal, asymmetric cell division, tumor initiation, drug resistance, and disease recurrence. CSC are in a dynamic state and display high plasticity potential. They can move from quiescent to proliferative states and/or commit to differentiation, the derived-differentiated cells being able to retrodifferentiate toward CSC state. This phenotypical conversion of tumor cells is accompanied by a metabolic rewiring that is likely to contribute to therapeutic escape [14]. Accordingly, the tumors affected by a high EMT level are poorly differentiated tumors with CSC enrichment, and their prognosis is poor [15–17].

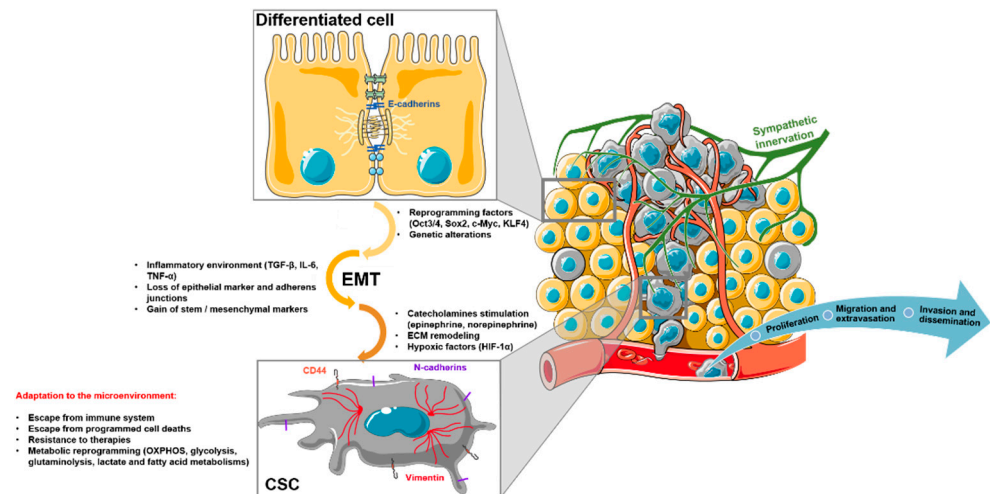


Figure 1. Tumor microenvironment drives epithelial-to-mesenchymal transition and tumor progression. Under the effects of genetic alterations and/or the influence of the microenvironment (inflammatory cytokines, hypoxic factors, catecholamines), differentiated tumor cells can undergo epithelial-to-mesenchymal transition and metabolism reprogramming. These alterations lead to the development of cancer stem cells that escape programmed cell death, evade the host immune system, and resist standard care chemotherapies. ECM: extracellular matrix; CSC: cancer stem cell; EMT: epithelial-to-mesenchymal transition; OXPHOS: oxidative phosphorylation.

Importantly, the inflammatory environment associated with some cancers has been shown to contribute to both EMT and establishment of a tissue niche that supports CSC genesis (Figure 1). We have previously shown that an inflammatory environment containing transforming growth factor (TGF)- β 1, interleukin (IL)-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α triggers EMT and commits differentiated tumoral hepatocytes into a retrodifferentiation

program toward cells harboring a CSC phenotype [18,19]. This retrodifferentiation is associated with metabolic reprogramming, the acquisition of invasive properties, and resistance to chemotherapy [20]. Similarly, in breast cancer, IL-6 secreted by tumor cells participates in the initiation of EMT, leading to an enrichment in CSC-like CD44⁺ cell subpopulation, with mesenchymal phenotype and invasive properties [21,22]. TGF- β 1/TNF- α /Interferon (IFN)- γ -dependent activation of the indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) pathway in lung, liver, and breast cancer cell lines also drives EMT and confers immunomodulatory properties to the cells, which both contribute to metastasis and cancer progression [23]. Besides proinflammatory cytokines, neurotransmitters contribute to EMT in well-vascularized and -innervated tumors [24–28]. Among them, the norepinephrine and epinephrine catecholamines have been shown to participate in EMT and metabolic reprogramming in liver and colorectal cancers [29,30]. In this review, we discuss the interplay between stemness acquisition and metabolism reprogramming, focusing on the role of the microenvironment, notably catecholamines.

2. Metabolism in Cancer Stem Cells

Metabolic reprogramming is widely described in various biological processes such as inflammation, immune response, and development [31]. For instance, reprogramming from glycolysis to oxidative phosphorylation (OXPHOS) takes place during the differentiation of embryonic stem cells [32–34] while the reverse shift, from OXPHOS to glycolysis, occurs during genetic reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPS) [35,36]. Unfortunately, the high plasticity of tumor cells allows them to move along metabolic/differentiation axes [37] to adapt to their environment. This property drives chemoresistance and cancer recurrence. Importantly, reports in the literature suggest a tissue-dependent heterogeneity of CSC: some are glycolysis-dependent, others preferentially use OXPHOS, and still others display hybrid phenotypes [38–41] (Figure 2).

Like differentiated tumor cells, CSC can get their energy from glucose [16,42–45]. Adoption of a glycolytic metabolism can be driven by microenvironmental constraints, such as a hypoxic environment, or induced by mitochondria dysfunctions [46–49]. For example, mutations in genes encoding subunits of the respiratory chain complexes have been associated with the transformation of differentiated tumor cells into CSC [50]. Recently, it has become widely accepted that adoption of a glycolytic metabolism can be an unforced event which may occur even when oxygen is available in the microenvironment and in cells lacking mitochondria dysfunctions. As a result of glycolytic reprogramming, the glycolysis intermediate pyruvate is converted to lactate instead of feeding the tricarboxylic acid (TCA) cycle [17,35,41,51,52]. The lactate synthesis yields less ATP per glucose than OXPHOS, but this is offset by both increased glucose uptake and lactate dehydrogenase A (LDHA) activity [17,39]. Importantly, this reprogramming allows cells to sustain their anabolism while restricting the production of reactive oxygen species (ROS) that are highly toxic for CSC endowed with low levels of ROS detoxification enzymes [53,54] (Figure 2). Consistently, dual inhibition of LDHA, which blocks glycolysis end-step, and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), which favors the flow of pyruvate into the TCA cycle, represses the CSC phenotype in CD133⁺/PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma (HCC) cells [55]. Interestingly, our team has recently shown that selective inhibition of PDK4 by dichloroacetate or shRNA in hepatic CSC succeeded to reverse the resistance to sorafenib [20].

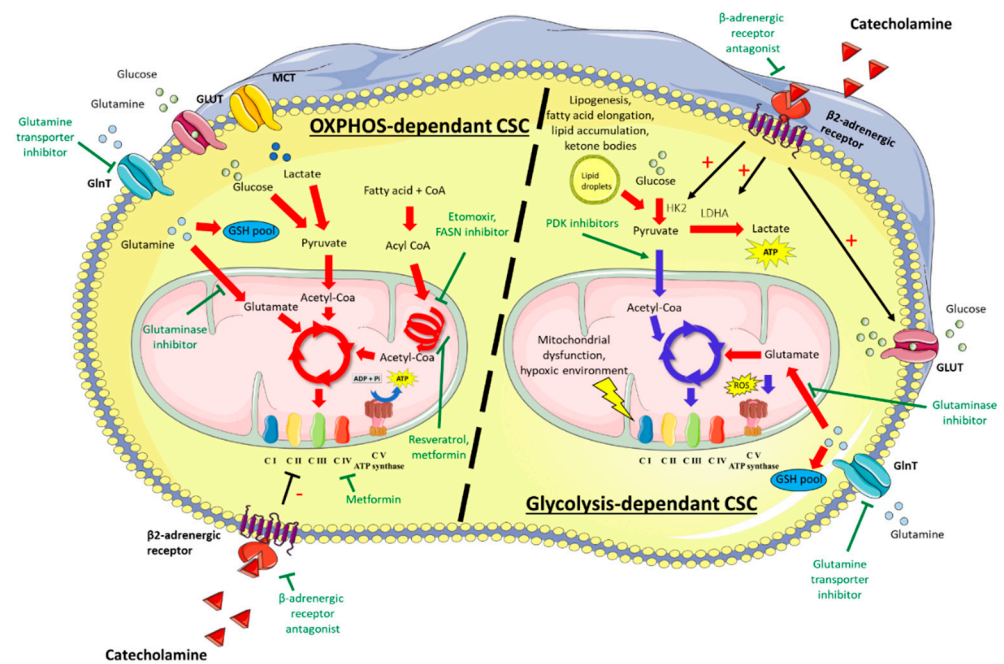


Figure 2. Glycolysis- or OXPHOS-dependent cancer stem cells. Depending on tissue location and quiescence/proliferation status, CSC preferentially use glycolysis or OXPHOS to meet their energy needs. Glycolysis-dependent CSC are characterized by increased lactate production and/or glutaminolysis. Catecholamines favor the glycolytic profile by increasing the expression of glucose transporters and key glycolytic enzymes (HK2, LDHA). Lower use of OXPHOS reduces the ROS production. In OXPHOS-dependent CSC, the TCA cycle is fed from glucose, glutamine, and fatty acids. Metabolic-targeted therapies under investigation are indicated in green. Red arrows indicate intensified signaling pathways and blue arrows indicate reduced signaling pathways. CSC: cancer stem cell; OXPHOS: oxidative phosphorylation, ROS: reactive oxygen species; HK2: hexokinase 2; LDHA: lactate dehydrogenase A; GSH: glutathione; GLUT, glucose transporter; GlnT, glutamine transporter; MCT, monocarboxylate transporter; CI: complex I of the respiratory chain.

Besides glucose, amino acids, fatty acids (FA), and extracellular catabolites can support the metabolism of CSC. Glutaminolysis has an important role in carcinogenesis and some KRAS-driven non-small cell lung cancers (NSCLC), among cancers with the worse outcome, display glutaminolysis dependency [56]. Apart from the production of energy through the TCA cycle via α -ketoglutarate intermediate, glutaminolysis is involved in the synthesis of amino acids, nucleotides, and FA [57]. Moreover, glutaminolysis has beneficial effects on the redox balance by generating antioxidant molecules such as glutathione (GSH), which interacts with O_2^- produced by the electron transport chain (Figure 2). This antioxidant property is illustrated by the reduction of ROS levels in neonatal hepatocytes following glutamine supplementation and explains, at least in part, why CSC particularly benefit from the use of glutaminolysis [58]. Accordingly, CSC in glioblastoma, pancreatic ductal adenocarcinoma, and B-cell acute lymphoblastic leukemia express CD9 that favors the localization of the glutamine transporter at the plasma membrane, thus promoting glutaminolysis [59]. Likewise, the inhibition of glutamine metabolism has been shown to attenuate stemness properties in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers [60,61].

FA provide another fuel pathway for CSC. The expression of FA translocase (a.k.a. CD36), which allows lipid uptake, is correlated with poor prognosis in various cancers [62], and CD36 is suggested as a stem cell marker in breast, brain, and adipose tissue tumors [63–65]. Elevated FA oxidation (FAO) is proposed to maintain CSC self-renewal by modulating lipid and membrane synthesis, quenching ROS through NADPH production, and promoting chemoresistance [66,67]. Pastò et al. reported an increased transcription level of FAO-related genes in CSC from epithelial ovarian cancer [68]. Chen et al. also reported increased FAO,

associated with a decrease of FA elongation, in tumor-initiating cells (TIC) from HCC cell lines that overexpress the stem cell marker Nanog [69]. On the other hand, a lipogenic switch is proposed to favor the production of monounsaturated lipids that are less susceptible to lipid peroxidation, restricting the detrimental effect of ROS in CSC [70]. In addition, the excess of free FA can be converted to triglycerides and stored as lipid droplets to avoid toxicity. Accumulation of such lipid droplets is frequently found in CSC [20,71]. Of note, the lipogenic switch can strengthen the glycolytic reprogramming, as FA synthesis allows the production of the NAD⁺ needed for glycolysis. Accordingly, Vazquez-Martin et al. demonstrated that increased FA synthesis and neutral lipid accumulation are associated with glycolysis reprogramming in iPS and CSC [70] (Figure 2).

The self-degradation process of unnecessary macromolecules or damaged organelles, called autophagy, also allows cells to maintain cellular homeostasis and adapt their metabolism to overcome stressful conditions. Notably, in nutrient-poor environments, Mit/TFE family of transcription factors regulate the transcription of genes involved in the lysosomal-autophagy pathway and in lipid metabolism (lipophagy, β -oxidation, and ketogenesis), such as PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor- α) and PGC1 α (PPAR γ co-activator 1 α). Autophagy is especially relevant for CSC, as they primarily reside in nutrient-poor and acidic environments known to hold pro-autophagic signals [72]. Lipid droplets, typically enriched in CSC, can be engulfed in autophagosomes and targeted to lysosomes, in which acid hydrolases generate simple molecules to sustain core anabolic functions. Moreover, mitophagy of senescent mitochondria is useful to reduce the level of ROS, protecting CSC from DNA damages. Autophagy has been shown to support the maintenance of hepatic CSC by removing mitochondria-associated P53, preventing P53 binding on Nanog promoter that results in the suppression of Nanog expression [73]. Likewise, autophagy supports the maintenance of CD44⁺CD24^{-/low} breast CSC via IL-6-mediated autocrine signaling [74,75].

Finally, extracellular catabolites produced by the cells surrounding the tumor, such as ketone bodies and lactate, represent another unexpected and important source of energy for CSC [76,77]. Ketone bodies have been shown to increase the expression of stemness-related genes in breast cancer [78,79]. In addition, yet long regarded as a dead-end waste product, lactate can be selectively up-taken by CSC and stimulate stem cell growth [80]. In patient-derived colorectal cancer organoids, Zhao et al. proposed a metabolic commensalism based on the exchange of lactate between CSC and non-CSC. Lactate secreted by glycolytic non-CSC in the environment through the monocarbohydrate transporter MCT4 is taken up by CSC through MCT1, enhancing OXPHOS activity and promoting self-renewal of CSC via ROS/AKT/Wnt/ β -catenin pathway [81]. Consistent with these observations, silencing MCT transporters in either CSC or non-CSC reduces the tumor-initiating activity. Notably, oxidative tumor cells can force the surrounding stromal cells to adopt a glycolytic metabolism in order to obtain additional lactate for their own metabolism [82]. The underlying mechanism of action of lactate is starting to be elucidated. In glycolytic cancer cells, lactate activates an NDRG3/Raf/ERK tumor-growth pathway whereas it promotes mitochondrial biogenesis, pro-angiogenic signaling, and glutaminolysis in oxidative cancer cells [83]. In addition, lactate, by scavenging free radicals, also prevents the initiation step of lipid peroxidation [84].

Of note, the glycolytic shift toward lactate production does not preclude the course of OXPHOS, which can be activated by alternative fuels such as FA, amino-acids, or extracellular catabolites (Figure 2). Accordingly, various studies have shown that OXPHOS could be efficient in CSC, some of which preferentially adopt a mitochondrial oxidative metabolism [85,86]. The significant contribution of OXPHOS in cancer stemness has notably been proven from the high level of mitochondria biogenesis driven by PPAR- γ co-activator 1a (PGC-1a) in stem-like cancer cells [40], the up-regulation of enzymes involved in the respiratory chain in ovarian CSC [68], and the OXPHOS-dependency of CSC in small cell lung cancer [87,88]. Importantly, the presence of functional mitochondria is useful to sustain increased energy needs when CSC move from quiescent to a proliferative state or commit to a differentiated state.

3. Metabolism Reprogramming, a First Step for EMT?

Renewed interest in cancer cell metabolism has raised questions about the interplay between metabolism reprogramming and EMT, while it is not easy to formally determine which one governs the other.

Some well-known EMT-TFs, tumor suppressor genes and oncogenes, have been described to rewire the cell metabolism. Snail (a.k.a. SNAI1) regulates many genes involved in glucose metabolism, such as glucose phosphate isomerase and aldolase [89]. More recently, Snail has been shown to promote glucose metabolism by inducing epigenetic silencing of FBP1 in basal-like breast cancer [90]. Likewise, Snail limits OXPHOS by repressing the activity of both cytochrome C oxidase and mitochondrial respiratory complex I. Moreover, Snail reprograms glucose metabolism toward the pentose phosphate pathway by repressing phosphofructokinase platelet (PFKP), a rate-limiting enzyme of glycolysis [91]. Zeb1, another EMT-TFs, also contributes to metabolic plasticity in pancreatic tumor cells, allowing cells to switch between OXPHOS or glycolytic profile: whichever is most appropriate [92]. The third example of the role of EMT-TFs in the metabolism switch, Twist, has been shown to decrease mitochondrial mass while increasing glucose consumption and lactate production in twist-positive breast cancer cells. This energy metabolic reprogramming is induced via the activation of β 1-integrin, FAK, and PI3K/AKT/mTOR pathway and the inhibition of p53 pathway [93]. Of note, PI3K activation was shown to directly coordinate glycolysis by mobilization of aldolase from actin [94]. In addition, loss of the tumor suppressor p53, which is best known to contribute to the acquisition of stemness features [95], was shown to activate the phosphoglycerate mutase, a rate-limiting enzyme of glycolysis, and downregulate the electron transport activity [96,97]. Finally, KRAS, a well-known oncogene, which up-regulates the transcription of the major EMT-promoting factor Myc, also increases glycolysis by enhancing glucose uptake through the glucose transporter GLUT1 in both lung and colorectal carcinomas [98,99]. It was also shown to increase glycolysis by inhibiting glutaminolysis in pancreatic cancers [100].

Conversely, metabolic reprogramming may cause EMT and stemness. In 2011, Folmes et al. demonstrated that glycolytic gene expression precedes the expression of genes associated with pluripotency, suggesting that a glycolytic switch may induce cell dedifferentiation in mouse embryonic fibroblasts [101]. The causative role of glycolysis reprogramming in EMT is strengthened by data in ovarian cancers. Indeed, Siu et al. showed that IL6-dependent overexpression of hexokinase II (HK2), the rate-limiting first step of glycolysis, results in the expression of stem markers (Nanog, Oct4, Klf4, Sox9, and CD117) and increases invasiveness, subsequent to FAK-ERK-MMP9 signaling pathway activation [102]. LDHA that catalyzes the subsequent step of glycolysis, the conversion of pyruvate into lactate, promotes the transcription of genes involved in the EMT process by increasing H3K27 acetylation [103]. Hence, epithelial marker E-cadherin is down-regulated whereas EMT-TFs, mesenchymal markers, and TGF- β R1 were found positively regulated in papillary thyroid carcinoma [103]. Increased lactate levels in the microenvironment have also been shown to induce EMT in breast cancers [44], and treatment of breast cancer cells with lactate leads to gene signature associated with stemness [78]. In addition, the supplementation of the culture medium with lactate and high glucose concentration induces the expression of genes related to stemness (Nanog, Oct4, and Sox2) as well as the resistance to anoikis in HCC CD133⁻/PLC/PRF/5 cell line [55]. Recently, Sandforth et al. reinforced the role of lactate production and of the resulting acidic microenvironment in the acquisition of stemness features. They showed that increased lactate uptake following the overexpression of the membrane transporter monocarboxylate transporter-1 (MCT1) leads to the acquisition of stem markers (Nestin, Oct4, Klf4, Nanog) by pancreatic adenocarcinoma cells [104]. As regards the mode of action, it was shown that acidic pH promotes autocrine TGF β 2 signaling, which induces both partial EMT and accumulation of triglycerides in lipid droplets that represent energy stores available for FA oxidation and ATP needs [105].

Besides glycolytic switch, alterations in the lipid metabolism have also been shown to promote EMT and stemness in various cancers [106–109]. Increased lipid content is associated

with EMT in breast cancers and lipid signatures are useful to segregate EMT and non-EMT tissues [110]. In addition, elevated expression of CD36 promotes EMT through free FA uptake and subsequent activation of Wnt/TFG β signaling in hepatocellular carcinoma [111]. Likewise, Wang et al. recently demonstrated that CD36 upregulates the DEK proto-oncogene transcription and promotes migration and invasion via GSK-3 β / β -catenin-mediated EMT in gastric cancer [112]. Also, the overexpression of FABP4, a FA transport protein, upregulates the EMT-TF Snail and the matrix-metalloproteinases MMP2/9. It promotes both metabolism and EMT, partly by activating Akt pathway in colon cancer cells [113]. In addition, FA synthase, a key enzyme of *de novo* lipogenesis that converts dietary carbohydrates to fatty acids, mediates EMT in breast cancer cells, possibly through regulating liver fatty acid-binding protein (L-FABP) and VEGF/VEGFR-2 [107,114]. Accordingly, inhibition of FA synthase has been shown to attenuate CD44-associated signaling and reduce metastases in colorectal cancer [106]. Of note, reduced expression of CD44 attenuates the activation of MET, Akt, FAK, and paxillin, all known to regulate adhesion, migration, and invasion. At last, metabolic reprogramming toward increased mevalonate pathway activity that produces cholesterol but also prenyl anchors is associated with EMT and cell retrodifferentiation toward CSC [108]. Myc-driven mevalonate metabolism has recently been shown to maintain brain tumor-initiating cells and immature sphere-forming cells [115,116].

Interestingly, autophagy and EMT share signaling pathways (TFG- β , STAT3) and are linked in an intricate relationship, notably through reciprocal interaction between cytoskeleton and mitochondria [117,118]. Autophagy is useful for the EMT process as it helps cells to overcome anoikis after loss of cell anchorage and to escape immune surveillance during cell spreading [119]. Upregulation of autophagy by HIF-1 α favors EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells. Likewise, DNA-damage regulated autophagy modulator 1 (DRAM1), known as a target of TP53-mediated autophagy, has been reported to promote migration and invasion abilities of glioma stem cells [120]. However, autophagy could also ensure the degradation of specific EMT-TF, e.g., Snail and Twist [121,122], and favors mitochondrial fusion and the reconstitution of the mitochondrial network. This limits the accumulation of free mitochondria below the cell membrane, preventing actin skeleton remodeling and the subsequent formation of filopodia and lamellipodia that support cell motility and migration [117]. Accordingly, autophagy inhibition reduces the incidence of pulmonary metastases in an orthotopic mouse model of HCC [123] and potentiates the anti-EMT effects (migration/invasion) of alterolol in melanoma cells [124]. Likewise, drugs with pro-autophagic properties (e.g., alisertib, an aurora kinase A inhibitor) inhibit EMT in human ovarian and colorectal cancer cells [125,126].

Finally, mitochondrial dysfunctions may also cause EMT and stemness. Mutations in the succinate dehydrogenase (SDH) B subunit gene, involved in the complex II of the respiratory chain and the TCA cycle, are associated with the induction of the EMT-TFs, TWIST1, and Snail [127–129]. Moreover, knockout of the mitochondrial pyruvate carrier 1 (MPC1), which restricts the entry of pyruvate in the TCA cycle, leads to increased expression of the stem cell marker Nanog [130]. Conversely, the expression of mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40 (CHCHD4), which increases glutamine metabolism and respiratory chain activity, reduces the expression of EMT-related genes [131].

4. Catecholamines: Actors of the Interplay between EMT and Metabolism?

In recent years, increasing reports have put forth the link between cancer development and catecholamines, especially epinephrine and norepinephrine, which emerged as new actors able to influence the growth and aggressiveness of many types of tumors. Indeed, catecholamines have been shown to modulate both EMT and metabolic changes in cancer cells and chronic stress to trigger a CSC phenotype in tumor cells in immunodeficient mice models [132]. Interestingly, chronic stress is characterized by a release of epinephrine in the bloodstream by the adrenal gland and an increase of sympathetic nerve activity [133]. Thus, pro-tumoral effects of catecholamines are observed both in animal cancer models

exposed to chronic stress [134,135] and in clinical data. Moreover, high concentration of epinephrine in patient blood samples is correlated with a lower median survival rate in pancreatic [136], breast [132], and hepatocellular cancers [137].

On a molecular level, catecholamines can promote EMT through the activation of EMT-TFs such as ZEB1, Snail, or Slug (SNAI2). In the gastric cancer cell lines MGC-803 and HGC-27, isoproterenol, a β_2 -adrenergic receptor (β_2 -ADR) agonist, activates ZEB1 and Snail, leading to the expression of EMT (CDH2, Vimentin, α -SMA) and CSC (CD44) markers through the STAT3 signaling pathway activation [138]. Similarly, in the gastric adenocarcinoma cell lines BGC-823 and SGC-7901, norepinephrine represses E-cadherin and induces vimentin expressions through the activation of the β_2 -ADR-HIF1 α -Snail axis [139]. Moreover, Slug can be induced by norepinephrine in the ovarian cancer cell lines SKOV-3 and PA-1 [140]. This induction is mediated by a β_2 -ADR-HIF1 α and c-Myc dependent pathway, which results in the induction of hTERT. Therefore, hTERT activates NF- κ B, leading to an increased expression of Slug, enhancing the EMT process. In addition, catecholamines favor the secretion of extracellular matrix (ECM) remodeling enzymes by the cancer cells, enhancing their invasion capacities. Li et al. reported that the activation by catecholamines of both α_1 - and β_2 -ADR leads to the release of matrix metalloproteinase 7 (MMP-7) and ADAM12, which in turn allows the EGFR transactivation in HCC cells and their invasiveness [141]. In the ovarian cancer cell lines EG and SKOV3, as well as in the colorectal SW480 cancer cell line and in oral squamous cell carcinoma (OSCC) SCC25 and Cal27 cell lines, catecholamines by a β -ADR-depending pathway increase the cell migration and invasion by up-regulating MMP-2 and MMP-9 [142–145]. In the OSCC cell lines SCC25 and Cal27, norepinephrine stimulation is also associated with the enhancement of CSC-like phenotype, notably by an induction of the expression of stem markers (CD44, OCT4, SOX2, and ALDH1) and of the formation of colonies and spheres [146]. Moreover, catecholamines can also promote the EMT by enhancing the production of TGF- β . For example, in the colorectal HT29 and lung A549 cancer cell lines, activation of β_2 -ADR leads to an induction of TGF- β 1 by a cAMP-dependent pathway. This production enables the activation of the TGF- β receptor I (TGF- β RI) and the induction of Snail by both a stabilization of HIF-1 α and a phosphorylation of Smad3 [146]. Epinephrine is also able to induce TGF- β 1 in the pancreatic cancer cell line PANC-1 [136]. In these cells, epinephrine induces the translocation of the RNA binding protein human antigen R (HuR) in the cytoplasm as well as its phosphorylation on S221. This translocation leads to an activation of the TGF- β pathway. One hypothesis suggested by the authors to explain the induction of TGF- β 1 in their model is that HuR may allow the stabilization of its mRNA. In both these publications, the effects of catecholamines result in an enhancement of the migration, the E-cadherin repression, and the vimentin induction. Norepinephrine can also indirectly enhance EMT (N-cadherin, Vimentin, and Snail) and stemness (Nanog) markers in HCC cells by activating hepatic stellate cells that release the secreted frizzled-related protein 1 (sFRP1), which leads to the activation of Wnt/ β -catenin pathway in the tumor cells, thus favoring HCC progression [147]. Last but not least, catecholamines are also able to enhance the production of pro-inflammatory cytokines, which are involved in EMT [18,21–23,148]. Epinephrine induces IL-6 in the HCC HepaRG cell line [149] whereas β -ADR activation by norepinephrine mediates its induction in the ovarian cancer lines SKOV3.ip1, Hey-A8, and EG [150] as well as in the melanoma cell lines A375 and Hs29-4T [151]. In addition to IL-6 secretion, metastatic melanoma cells can release IL-8 and VEGF under a β_2 -ADR-dependent catecholamines stimulation [152]. This β_2 -ADR-dependent VEGF secretion also promotes angiogenesis in gastric cancer cells [153].

Importantly, catecholamines can also dysregulate some metabolic pathways in cancer cells. Cui et al. recently found, in breast cancer models, that epinephrine is able to induce stem-like cell phenotype and stem cell factor expression through an increase of the glycolysis [132]. They showed that epinephrine, by activating the β_2 -ADR, induces the expression of LDHA, resulting in lactate accumulation and a cytosolic acidification to a pH 6.4. This weak acidic environment allows the stabilization of the proto-oncogene c-Myc

by its interaction with the deubiquitinase USP28. Hence, c-Myc promotes the induction of Slug, a well-known regulator of EMT and stemness in cancer cells. Furthermore, they showed that a high serum epinephrine concentration is correlated with a higher level of LDHA, USP28, c-Myc, and Slug in the tumoral tissues of 83 breast cancers. Overall survival and disease-free survival rates are also better in patients with a low serum epinephrine concentration. Moreover, in a diethylnitrosamine (DEN)-induced HCC mouse model, epinephrine, by a β_2 -ADR activation, promotes the glucose metabolism but also the OXPHOS, favoring the tumor growth [154]. Indeed, by inhibiting the autophagy through an Akt pathway, a stabilization of HIF1 α is observed, which then induces further genes involved in glucose metabolism such as the GLUT1 and the HK2. This mechanism participates in sorafenib chemoresistance in this model. HK2 is also found overexpressed in HCC tissues. This overexpression was positively correlated to the ADRB2 overexpression in these tissues, and both were associated with poor prognosis [155]. In fact, Kang et al. demonstrated in the 4T1 mouse breast cancer cell line that HK2 expression is regulated by the activation of the adrenoceptor, thus regulating glycolysis metabolism [156]. In addition, a new HCC classification based on metabolism-related genes from transcriptomic data showed that the HCC C1 subclass, categorized with a high metabolic gene expression profile including amino-acid or lipid metabolisms signatures and partly with a positive EMT signature profile, is enriched in "Dopamine/Epinephrine/Norepinephrine biosynthesis" signatures [157]. These results reinforce the role of catecholamines in the interplay between EMT and metabolisms in some tumor cells.

In conclusion, the release of catecholamines in the microenvironment of the tumor can facilitate several pro-tumoral actions related to EMT and metabolism reprogramming, especially glycolysis and OXPHOS, as well as the acquisition by the cancer cell of stemness properties, altogether leading to treatment resistance. The fact that most of these effects are β_2 -ADR-dependent suggests that antagonist of this receptor could represent an adjuvant treatment of cancer therapy in order to slow down tumor aggressiveness.

5. Conclusions/Perspectives

CSC are likely to cause chemotherapy resistance and recurrence of cancers. Implementing therapeutic approaches that achieve efficient removal of CSC is thus crucial for defeating cancer. However, CSC share numerous properties with normal stem cells, including expression of cell surface markers (CD44, CD133) and activation of signaling pathways (Wnt, Notch), making it difficult to develop therapies targeting CSC while sparing normal stem cells [79,158]. Since 2010, cell metabolism has become an accepted hallmark of cancer. Accumulative data support the metabostemness theory, which suggests that metabolic reprogramming favors EMT and stemness, resulting in pejorative outcomes for patients. Questions then arose as to whether CSC adopt a specific metabolism, providing opportunities for targeted therapies. The scientific literature reports tissue-dependent metabolic heterogeneity and flexibility, which allows CSC to rewire their metabolism depending on microenvironmental constraints. Lack of uniformity in the metabolism of CSC complicates therapeutic developments. Nevertheless, among various options, glutaminolysis-dependency or extensive use of autophagy may provide attractive targets. In recent years, various drug candidates targeting metabolism, some of which are likely relevant for CSC, have entered clinical investigation, including autophagy activators (e.g., metformin, alisertib) [126], PDK inhibitors [159], glutamine transporter inhibitors and glutaminase inhibitors (e.g., telaglenastat) [61,160,161], FA synthase inhibitors [162,163], P53 activators [164,165], and β -adrenergic receptor antagonists [166,167]. Further studies are warranted to determine the efficacy of these drugs in combination with standard care chemotherapies or synthetic lethal approaches in cancers with unmet needs.

Author Contributions: Y.D., E.L., C.A., A.C. and F.C. co-wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut national de la santé et de la recherche médicale (*Inserm*), the University of Rennes 1, the French National Cancer Institute (INCa) grant # INCA_12688 and the «Ligue contre le cancer—Comités d’Ille-et-Vilaine, des Côtes d’Armor, de Loire Atlantique et de Vendée».

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Warburg, O. The Chemical Constitution of Respiration Ferment. *Science* **1928**, *68*, 437–443. [[CrossRef](#)]
2. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)]
3. Sciacovelli, M.; Gonçalves, E.; Isaac Johnson, T.; Roberto Zecchini, V.; da Costa, A.S.H.; Gaude, E.; Vercauteren Drubbel, A.; Julian Theobald, S.; Abbo, S.; Tran, M.; et al. Fumarate Is an Epigenetic Modifier That Elicits Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Nature* **2016**, *537*, 544–547. [[CrossRef](#)]
4. Masin, M.; Vazquez, J.; Rossi, S.; Groeneveld, S.; Samson, N.; Schwalie, P.C.; Deplancke, B.; Frawley, L.E.; Gouttenoire, J.; Moradpour, D.; et al. GLUT3 Is Induced during Epithelial-Mesenchymal Transition and Promotes Tumor Cell Proliferation in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Metab.* **2014**, *2*, 11. [[CrossRef](#)]
5. Dalmau, N.; Jaumot, J.; Tauler, R.; Bedia, C. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Involves Triacylglycerol Accumulation in DU145 Prostate Cancer Cells. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 3397–3406. [[CrossRef](#)]
6. Ito, K.; Suda, T. Metabolic Requirements for the Maintenance of Self-Renewing Stem Cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 243–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hensley, C.T.; Faubert, B.; Yuan, Q.; Lev-Cohain, N.; Jin, E.; Kim, J.; Jiang, L.; Ko, B.; Skelton, R.; Loudat, L.; et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell* **2016**, *164*, 681–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. 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. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Eastham, A.M.; Spencer, H.; Soncin, F.; Ritson, S.; Merry, C.L.R.; Stern, P.L.; Ward, C.M. Epithelial-Mesenchymal Transition Events during Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11254–11262. [[CrossRef](#)]
10. Polyak, K.; Weinberg, R.A. Transitions between Epithelial and Mesenchymal States: Acquisition of Malignant and Stem Cell Traits. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 265–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Tiwari, N.; Gheldof, A.; Tatari, M.; Christofori, G. EMT as the Ultimate Survival Mechanism of Cancer Cells. *Semin. Cancer Biol.* **2012**, *22*, 194–207. [[CrossRef](#)]
12. Lambert, A.W.; Weinberg, R.A. Linking EMT Programmes to Normal and Neoplastic Epithelial Stem Cells. *Nat. Rev. Cancer* **2021**, 1–14. [[CrossRef](#)]
13. Pastushenko, I.; Mauri, F.; Song, Y.; de Cock, F.; Meeusen, B.; Swedlund, B.; Impens, F.; Van Haver, D.; Opitz, M.; Thery, M.; et al. Fat1 Deletion Promotes Hybrid EMT State, Tumour Stemness and Metastasis. *Nature* **2021**, *589*, 448–455. [[CrossRef](#)]
14. Pinto, C.A.; Widodo, E.; Waltham, M.; Thompson, E.W. Breast Cancer Stem Cells and Epithelial Mesenchymal Plasticity—Implications for Chemoresistance. *Cancer Lett.* **2013**, *341*, 56–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Paudyal, B.; Oriuchi, N.; Paudyal, P.; Higuchi, T.; Nakajima, T.; Endo, K. Expression of Glucose Transporters and Hexokinase II in Cholangiocellular Carcinoma Compared Using [¹⁸F]-2-Fluoro-2-Deoxy-d-Glucose Positron Emission Tomography. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 260–266. [[CrossRef](#)]
16. Krzeslak, A.; Wojcik-Krowiranda, K.; Forma, E.; Jozwiak, P.; Romanowicz, H.; Bienkiewicz, A.; Brys, M. Expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Endometrial and Breast Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **2012**, *18*, 721–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Feng, W.; Gentles, A.; Nair, R.V.; Huang, M.; Lin, Y.; Lee, C.Y.; Cai, S.; Scheeren, F.A.; Kuo, A.H.; Diehn, M. Targeting Unique Metabolic Properties of Breast Tumor Initiating Cells. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1734–1745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Dubois-Pot-Schneider, H.; Fekir, K.; Coulouarn, C.; Glaise, D.; Aninat, C.; Jarnouen, K.; Guével, R.L.; Kubo, T.; Ishida, S.; Morel, F.; et al. Inflammatory Cytokines Promote the Retrodifferentiation of Tumor-Derived Hepatocyte-like Cells to Progenitor Cells. *Hepatology* **2014**, *60*, 2077–2090. [[CrossRef](#)]
19. Cabillic, F.; Corlu, A. Regulation of Transdifferentiation and Retrodifferentiation by Inflammatory Cytokines in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **2016**, *151*, 607–615. [[CrossRef](#)]
20. Fekir, K.; Dubois-Pot-Schneider, H.; Désert, R.; Daniel, Y.; Glaise, D.; Rauch, C.; Morel, F.; Fromenty, B.; Musso, O.; Cabillic, F.; et al. Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1869–1883. [[CrossRef](#)]
21. Sullivan, N.J.; Sasser, A.K.; Axel, A.E.; Vesuna, F.; Raman, V.; Ramirez, N.; Oberyshyn, T.M.; Hall, B.M. Interleukin-6 Induces an Epithelial–Mesenchymal Transition Phenotype in Human Breast Cancer Cells. *Oncogene* **2009**, *28*, 2940–2947. [[CrossRef](#)]

22. Xie, G.; Yao, Q.; Liu, Y.; Du, S.; Liu, A.; Guo, Z.; Sun, A.; Ruan, J.; Chen, L.; Ye, C.; et al. IL-6-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes the Generation of Breast Cancer Stem-Like Cells Analogous to Mammosphere Cultures. *Int. J. Oncol.* **2011**, *40*, 1171–1179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ricciardi, M.; Zanutto, M.; Malpeli, G.; Bassi, G.; Perbellini, O.; Chilosi, M.; Bifari, F.; Krampera, M. Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Induced by Inflammatory Priming Elicits Mesenchymal Stromal Cell-Like Immune-Modulatory Properties in Cancer Cells. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 1067–1075. [[CrossRef](#)]
24. Zahalka, A.H.; Arnal-Estapé, A.; Maryanovich, M.; Nakahara, F.; Cruz, C.D.; Finley, L.W.S.; Frenette, P.S. Adrenergic Nerves Activate an Angio-Metabolic Switch in Prostate Cancer. *Science* **2017**, *358*, 321–326. [[CrossRef](#)]
25. Magnon, C.; Hall, S.J.; Lin, J.; Xue, X.; Gerber, L.; Freedland, S.J.; Frenette, P.S. Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression. *Science* **2013**, *341*. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, L.; Wu, L.L.; Huan, H.B.; Chen, X.J.; Wen, X.D.; Yang, D.P.; Xia, F. Sympathetic and Parasympathetic Innervation in Hepatocellular Carcinoma. *Neoplasma* **2017**, *64*, 840–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cole, S.W.; Nagaraja, A.S.; Lutgendorf, S.K.; Green, P.A.; Sood, A.K. Sympathetic Nervous System Regulation of the Tumour Microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 563–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kuol, N.; Stojanovska, L.; Apostolopoulos, V.; Nurgali, K. Crosstalk between Cancer and the Neuro-Immune System. *J. Neuroimmunol.* **2018**, *315*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Huan, H.-B.; Wen, X.-D.; Chen, X.-J.; Wu, L.; Wu, L.-L.; Zhang, L.; Yang, D.-P.; Zhang, X.; Bie, P.; Qian, C.; et al. Sympathetic Nervous System Promotes Hepatocarcinogenesis by Modulating Inflammation through Activation of Alpha1-Adrenergic Receptors of Kupffer Cells. *Brain Behav. Immun.* **2017**, *59*, 118–134. [[CrossRef](#)]
30. Albo, D.; Akay, C.L.; Marshall, C.L.; Wilks, J.A.; Verstovsek, G.; Liu, H.; Agarwal, N.; Berger, D.H.; Ayala, G.E. Neurogenesis in Colorectal Cancer Is a Marker of Aggressive Tumor Behavior and Poor Outcomes. *Cancer* **2011**, *117*, 4834–4845. [[CrossRef](#)]
31. Angajala, A.; Lim, S.; Phillips, J.B.; Kim, J.-H.; Yates, C.; You, Z.; Tan, M. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
32. Wanet, A.; Rémacle, N.; Najar, M.; Sokal, E.; Arnould, T.; Najimi, M.; Renard, P. Mitochondrial Remodeling in Hepatic Differentiation and Dedifferentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *54*, 174–185. [[CrossRef](#)]
33. Chung, S.; Arrell, D.K.; Faustino, R.S.; Terzic, A.; Dzeja, P.P. Glycolytic Network Restructuring Integral to the Energetics of Embryonic Stem Cell Cardiac Differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *48*, 725–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shapira, S.N.; Christofk, H.R. Metabolic Regulation of Tissue Stem Cells. *Trends Cell Biol.* **2020**, *30*, 566–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Varum, S.; Rodrigues, A.S.; Moura, M.B.; Momcilovic, O.; Easley, C.A.; Ramalho-Santos, J.; Van Houten, B.; Schatten, G. Energy Metabolism in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Counterparts. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20914. [[CrossRef](#)]
36. Panopoulos, A.D.; Yanes, O.; Ruiz, S.; Kida, Y.S.; Diep, D.; Tautenhahn, R.; Herreras, A.; Batchelder, E.M.; Plongthongkum, N.; Lutz, M.; et al. The Metabolome of Induced Pluripotent Stem Cells Reveals Metabolic Changes Occurring in Somatic Cell Reprogramming. *Cell Res.* **2012**, *22*, 168–177. [[CrossRef](#)]
37. Désert, R.; Nieto, N.; Musso, O. Dimensions of Hepatocellular Carcinoma Phenotypic Diversity. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 4536–4547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Liao, J.; Qian, F.; Tchabo, N.; Mhawech-Fauceglia, P.; Beck, A.; Qian, Z.; Wang, X.; Huss, W.J.; Lele, S.B.; Morrison, C.D.; et al. Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell-Like Properties Contribute to Tumor Generation, Metastasis and Chemotherapy Resistance through Hypoxia-Resistant Metabolism. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84941. [[CrossRef](#)]
39. Palorini, R.; Votta, G.; Balestrieri, C.; Monestiroli, A.; Olivieri, S.; Vento, R.; Chiaradonna, F. Energy Metabolism Characterization of a Novel Cancer Stem Cell-Like Line 3AB-OS. *J. Cell. Biochem.* **2014**, *115*, 368–379. [[CrossRef](#)]
40. De Luca, A.; Fiorillo, M.; Peiris-Pagès, M.; Ozsvari, B.; Smith, D.L.; Sanchez-Alvarez, R.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Cappello, A.R.; Pezzi, V.; Lisanti, M.P.; et al. Mitochondrial Biogenesis Is Required for the Anchorage-Independent Survival and Propagation of Stem-Like Cancer Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14777–14795. [[CrossRef](#)]
41. Janiszewska, M.; Suvà, M.L.; Riggi, N.; Houtkooper, R.H.; Auwerx, J.; Clément-Schatlo, V.; Radovanovic, I.; Rheinbay, E.; Provero, P.; Stamenkovic, I. Imp2 Controls Oxidative Phosphorylation and Is Crucial for Preserving Glioblastoma Cancer Stem Cells. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1926–1944. [[CrossRef](#)]
42. Wolf, A.; Agnihotri, S.; Micallef, J.; Mukherjee, J.; Sabha, N.; Cairns, R.; Hawkins, C.; Guha, A. Hexokinase 2 Is a Key Mediator of Aerobic Glycolysis and Promotes Tumor Growth in Human Glioblastoma Multiforme. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 313–326. [[CrossRef](#)]
43. Wang, S.; Wang, N.; Zheng, Y.; Yang, B.; Liu, P.; Zhang, F.; Li, M.; Song, J.; Chang, X.; Wang, Z. Caveolin-1 Inhibits Breast Cancer Stem Cells via c-Myc-Mediated Metabolic Reprogramming. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 450. [[CrossRef](#)]
44. Kamarajugadda, S.; Stemboroski, L.; Cai, Q.; Simpson, N.E.; Nayak, S.; Tan, M.; Lu, J. Glucose Oxidation Modulates Anoikis and Tumor Metastasis. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 1893–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wilhelm, K.; Happel, K.; Eelen, G.; Schoors, S.; Oellerich, M.F.; Lim, R.; Zimmermann, B.; Aspalter, I.M.; Franco, C.A.; Boettger, T.; et al. FOXO1 Couples Metabolic Activity and Growth State in the Vascular Endothelium. *Nature* **2016**, *529*, 216–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nishimura, K.; Fukuda, A.; Hisatake, K. Mechanisms of the Metabolic Shift during Somatic Cell Reprogramming. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kozlov, A.M.; Lone, A.; Betts, D.H.; Cumming, R.C. Lactate Preconditioning Promotes a HIF-1 α -Mediated Metabolic Shift from OXPHOS to Glycolysis in Normal Human Diploid Fibroblasts. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8388. [[CrossRef](#)]

48. Peng, F.; Wang, J.-H.; Fan, W.-J.; Meng, Y.-T.; Li, M.-M.; Li, T.-T.; Cui, B.; Wang, H.-F.; Zhao, Y.; An, F.; et al. Glycolysis Gatekeeper PDK1 Reprograms Breast Cancer Stem Cells under Hypoxia. *Oncogene* **2018**, *37*, 1062–1074. [[CrossRef](#)]
49. Sun, L.; Suo, C.; Li, S.; Zhang, H.; Gao, P. Metabolic Reprogramming for Cancer Cells and Their Microenvironment: Beyond the Warburg Effect. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Rev. Cancer* **2018**, *1870*, 51–66. [[CrossRef](#)]
50. Ahn, E.H.; Lee, S.H.; Kim, J.Y.; Chang, C.-C.; Loeb, L.A. Decreased Mitochondrial Mutagenesis during Transformation of Breast Stem Cells into Tumorigenic Cells. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 4569–4578. [[CrossRef](#)]
51. Ciavardelli, D.; Rossi, C.; Barcaroli, D.; Volpe, S.; Consalvo, A.; Zucchelli, M.; De Cola, A.; Scavo, E.; Carollo, R.; D'Agostino, D.; et al. Breast Cancer Stem Cells Rely on Fermentative Glycolysis and Are Sensitive to 2-Deoxyglucose Treatment. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1336. [[CrossRef](#)]
52. Chen, K.-Y.; Liu, X.; Bu, P.; Lin, C.-S.; Rakhilin, N.; Locasale, J.W.; Shen, X. A Metabolic Signature of Colon Cancer Initiating Cells. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2014**, *2014*, 4759–4762. [[CrossRef](#)]
53. Diehn, M.; Cho, R.W.; Lobo, N.A.; Kalisky, T.; Dorie, M.J.; Kulp, A.N.; Qian, D.; Lam, J.S.; Ailles, L.E.; Wong, M.; et al. Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells. *Nature* **2009**, *458*, 780–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chang, C.-W.; Chen, Y.-S.; Tsay, Y.-G.; Han, C.-L.; Chen, Y.-J.; Yang, C.-C.; Hung, K.-F.; Lin, C.-H.; Huang, T.-Y.; Kao, S.-Y.; et al. ROS-Independent ER Stress-Mediated NRF2 Activation Promotes Warburg Effect to Maintain Stemness-Associated Properties of Cancer-Initiating Cells. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Song, K.; Kwon, H.; Han, C.; Zhang, J.; Dash, S.; Lim, K.; Wu, T. Active Glycolytic Metabolism in CD133(+) Hepatocellular Cancer Stem Cells: Regulation by MIR-122. *Oncotarget* **2015**, *6*, 40822–40835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Romero, R.; Sayin, V.I.; Davidson, S.M.; Bauer, M.R.; Singh, S.X.; LeBoeuf, S.E.; Karakousi, T.R.; Ellis, D.C.; Bhutkar, A.; Sanchez-Rivera, F.J.; et al. Keap1 Loss Promotes Kras-Driven Lung Cancer and Results in a Dependence on Glutaminolysis. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1362–1368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Altman, B.J.; Stine, Z.E.; Dang, C.V. From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 619–634. [[CrossRef](#)]
58. Babu, R.; Eaton, S.; Drake, D.P.; Spitz, L.; Pierro, A. Glutamine and Glutathione Counteract the Inhibitory Effects of Mediators of Sepsis in Neonatal Hepatocytes. *J. Pediatr. Surg.* **2001**, *36*, 282–286. [[CrossRef](#)]
59. Wang, V.M.-Y.; Ferreira, R.M.M.; Almagro, J.; Evan, T.; Legrave, N.; Thin, M.Z.; Frith, D.; Carvalho, J.; Barry, D.J.; Snijders, A.P.; et al. CD9 Identifies Pancreatic Cancer Stem Cells and Modulates Glutamine Metabolism to Fuel Tumour Growth. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 1425–1435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Li, D.; Fu, Z.; Chen, R.; Zhao, X.; Zhou, Y.; Zeng, B.; Yu, M.; Zhou, Q.; Lin, Q.; Gao, W.; et al. Inhibition of Glutamine Metabolism Counteracts Pancreatic Cancer Stem Cell Features and Sensitizes Cells to Radiotherapy. *Oncotarget* **2015**, *6*, 31151–31163. [[CrossRef](#)]
61. Li, B.; Cao, Y.; Meng, G.; Qian, L.; Xu, T.; Yan, C.; Luo, O.; Wang, S.; Wei, J.; Ding, Y.; et al. Targeting Glutaminase 1 Attenuates Stemness Properties in Hepatocellular Carcinoma by Increasing Reactive Oxygen Species and Suppressing Wnt/Beta-Catenin Pathway. *EBioMedicine* **2019**, *39*, 239–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Koundouros, N.; Poulogiannis, G. Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Cancer. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 4–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Liang, Y.; Han, H.; Liu, L.; Duan, Y.; Yang, X.; Ma, C.; Zhu, Y.; Han, J.; Li, X.; Chen, Y. CD36 Plays a Critical Role in Proliferation, Migration and Tamoxifen-Inhibited Growth of ER-Positive Breast Cancer Cells. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hale, J.S.; Otvos, B.; Sinyuk, M.; Alvarado, A.G.; Hitomi, M.; Stoltz, K.; Wu, Q.; Flavahan, W.; Levison, B.; Johansen, M.L.; et al. Cancer Stem Cell-Specific Scavenger Receptor CD36 Drives Glioblastoma Progression. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1746–1758. [[CrossRef](#)]
65. Gao, H.; Volat, F.; Sandhow, L.; Galitzky, J.; Nguyen, T.; Esteve, D.; Åström, G.; Mejhert, N.; Ledoux, S.; Thalamas, C.; et al. CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells* **2017**, *35*, 1799–1814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Choi, H.-J.; Jhe, Y.-L.; Kim, J.; Lim, J.Y.; Lee, J.E.; Shin, M.-K.; Cheong, J.-H. FoxM1-Dependent and Fatty Acid Oxidation-Mediated ROS Modulation Is a Cell-Intrinsic Drug Resistance Mechanism in Cancer Stem-Like Cells. *Redox Biol.* **2020**, *36*, 101589. [[CrossRef](#)]
67. Wang, T.; Fahrman, J.F.; Lee, H.; Li, Y.-J.; Tripathi, S.C.; Yue, C.; Zhang, C.; Lifshitz, V.; Song, J.; Yuan, Y.; et al. JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 136–150.e5. [[CrossRef](#)]
68. Pastò, A.; Bellio, C.; Pilotto, G.; Ciminale, V.; Silic-Benussi, M.; Guzzo, G.; Rasola, A.; Frasson, C.; Nardo, G.; Zulato, E.; et al. Cancer Stem Cells from Epithelial Ovarian Cancer Patients Privilege Oxidative Phosphorylation, and Resist Glucose Deprivation. *Oncotarget* **2014**, *5*, 4305–4319. [[CrossRef](#)]
69. Chen, C.-L.; Uthaya Kumar, D.B.; Punj, V.; Xu, J.; Sher, L.; Tahara, S.M.; Hess, S.; Machida, K. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-Like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 206–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Vazquez-Martin, A.; Corominas-Faja, B.; Cufi, S.; Vellon, L.; Oliveras-Ferreros, C.; Menendez, O.J.; Joven, J.; Lupu, R.; Menendez, J.A. The Mitochondrial H⁺-ATP Synthase and the Lipogenic Switch. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 207–218. [[CrossRef](#)]
71. Hershey, B.J.; Vazzana, R.; Joppi, D.L.; Havas, K.M. Lipid Droplets Define a Sub-Population of Breast Cancer Stem Cells. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 87. [[CrossRef](#)]

72. Auberger, P.; Puissant, A. Autophagy, a Key Mechanism of Oncogenesis and Resistance in Leukemia. *Blood* **2017**, *129*, 547–552. [[CrossRef](#)]
73. Liu, K.; Lee, J.; Kim, J.Y.; Wang, L.; Tian, Y.; Chan, S.T.; Cho, C.; Machida, K.; Chen, D.; Ou, J.-H.J. Mitophagy Controls the Activities of Tumor Suppressor P53 to Regulate Hepatic Cancer Stem Cells. *Mol. Cell* **2017**, *68*, 281–292.e5. [[CrossRef](#)]
74. Cufí, S.; Vazquez-Martin, A.; Oliveras-Ferreros, C.; Martin-Castillo, B.; Vellon, L.; Menendez, J.A. Autophagy Positively Regulates the CD44⁺ CD24^{-/low} Breast Cancer Stem-like Phenotype. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 3871–3885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Maycotte, P.; Jones, K.L.; Goodall, M.L.; Thorburn, J.; Thorburn, A. Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 651–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Bonuccelli, G.; Tsirigos, A.; Whitaker-Menezes, D.; Pavlides, S.; Pestell, R.G.; Chiavarina, B.; Frank, P.G.; Flomenberg, N.; Howell, A.; Martinez-Outschoorn, U.E.; et al. Ketones and Lactate “Fuel” Tumor Growth and Metastasis. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 3506–3514. [[CrossRef](#)]
77. Faubert, B.; Li, K.Y.; Cai, L.; Hensley, C.T.; Kim, J.; Zacharias, L.G.; Yang, C.; Do, Q.N.; Doucette, S.; Burguete, D.; et al. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* **2017**, *171*, 358–371.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Martinez-Outschoorn, U.E.; Prisco, M.; Ertel, A.; Tsirigos, A.; Lin, Z.; Pavlides, S.; Wang, C.; Flomenberg, N.; Knudsen, E.S.; Howell, A.; et al. Ketones and Lactate Increase Cancer Cell “Stemness”, Driving Recurrence, Metastasis and Poor Clinical Outcome in Breast Cancer. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 1271–1286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Snyder, V.; Reed-Newman, T.C.; Arnold, L.; Thomas, S.M.; Anant, S. Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 203. [[CrossRef](#)]
80. Martínez-Reyes, I.; Chandel, N.S. Mitochondrial TCA Cycle Metabolites Control Physiology and Disease. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 102. [[CrossRef](#)]
81. Zhao, H.; Yan, C.; Hu, Y.; Mu, L.; Liu, S.; Huang, K.; Li, Q.; Li, X.; Tao, D.; Qin, J. Differentiated Cancer Cell-Originated Lactate Promotes the Self-Renewal of Cancer Stem Cells in Patient-Derived Colorectal Cancer Organoids. *Cancer Lett.* **2020**, *493*, 236–244. [[CrossRef](#)]
82. Whitaker-Menezes, D.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Lin, Z.; Ertel, A.; Flomenberg, N.; Witkiewicz, A.K.; Birbe, R.; Howell, A.; Pavlides, S.; Gandara, R.; et al. Evidence for a Stromal-Epithelial “Lactate Shuttle” in Human Tumors: MCT4 Is a Marker of Oxidative Stress in Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 1772–1783. [[CrossRef](#)]
83. Payen, V.L.; Mina, E.; Van Hée, V.F.; Porporato, P.E.; Sonveaux, P. Monocarboxylate Transporters in Cancer. *Mol. Metab.* **2020**, *33*, 48–66. [[CrossRef](#)]
84. Groussard, C.; Morel, I.; Chevanne, M.; Monnier, M.; Cillard, J.; Delamarche, A. Free Radical Scavenging and Antioxidant Effects of Lactate Ion: An In Vitro Study. *J. Appl. Physiol.* **2000**, *89*, 169–175. [[CrossRef](#)]
85. Porporato, P.E.; Payen, V.L.; Pérez-Escuredo, J.; De Saedeleer, C.J.; Danhier, P.; Copetti, T.; Dhup, S.; Tardy, M.; Vazeille, T.; Bouzin, C.; et al. A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 754–766. [[CrossRef](#)]
86. Maiuri, M.C.; Kroemer, G. Essential Role for Oxidative Phosphorylation in Cancer Progression. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 11–12. [[CrossRef](#)]
87. Vlashi, E.; Lagadec, C.; Vergnes, L.; Matsutani, T.; Masui, K.; Poulou, M.; Popescu, R.; Donna, L.D.; Evers, P.; Dekmezian, C.; et al. Metabolic State of Glioma Stem Cells and Nontumorigenic Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16062–16067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Gao, C.; Shen, Y.; Jin, F.; Miao, Y.; Qiu, X. Cancer Stem Cells in Small Cell Lung Cancer Cell Line H446: Higher Dependency on Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation than Non-Stem Cancer Cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. De Craene, B.; Gilbert, B.; Stove, C.; Bruyneel, E.; van Roy, F.; Berx, G. The Transcription Factor Snail Induces Tumor Cell Invasion through Modulation of the Epithelial Cell Differentiation Program. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6237–6244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Dong, C.; Yuan, T.; Wu, Y.; Wang, Y.; Fan, T.W.M.; Miriyala, S.; Lin, Y.; Yao, J.; Shi, J.; Kang, T.; et al. Loss of FBP1 by Snail-Mediated Repression Provides Metabolic Advantages in Basal-Like Breast Cancer. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 316–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Kim, N.H.; Cha, Y.H.; Lee, J.; Lee, S.-H.; Yang, J.H.; Yun, J.S.; Cho, E.S.; Zhang, X.; Nam, M.; Kim, N.; et al. Snail Reprograms Glucose Metabolism by Repressing Phosphofructokinase PFKP Allowing Cancer Cell Survival under Metabolic Stress. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14374. [[CrossRef](#)]
92. Krebs, A.M.; Mitschke, J.; Lasierra Losada, M.; Schmalhofer, O.; Boerries, M.; Busch, H.; Boettcher, M.; Mougiakakos, D.; Reichardt, W.; Bronsert, P.; et al. The EMT-Activator Zeb1 Is a Key Factor for Cell Plasticity and Promotes Metastasis in Pancreatic Cancer. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 518–529. [[CrossRef](#)]
93. Yang, L.; Hou, Y.; Yuan, J.; Tang, S.; Zhang, H.; Zhu, Q.; Du, Y.; Zhou, M.; Wen, S.; Xu, L.; et al. Twist Promotes Reprogramming of Glucose Metabolism in Breast Cancer Cells through PI3K/AKT and P53 Signaling Pathways. *Oncotarget* **2015**, *6*, 25755–25769. [[CrossRef](#)]
94. Hu, H.; Juvekar, A.; Lyssiotis, C.A.; Lien, E.C.; Albeck, J.G.; Oh, D.; Varma, G.; Hung, Y.P.; Ullas, S.; Lauring, J.; et al. Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton. *Cell* **2016**, *164*, 433–446. [[CrossRef](#)]
95. Spike, B.T.; Wahl, G.M. P53, Stem Cells, and Reprogramming. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 404–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Bartesaghi, S.; Graziano, V.; Galavotti, S.; Henriquez, N.V.; Betts, J.; Saxena, J.; Minieri, V.; Deli, A.; Karlsson, A.; Martins, L.M.; et al. Inhibition of Oxidative Metabolism Leads to P53 Genetic Inactivation and Transformation in Neural Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 1059–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Kondoh, H.; Lleonart, M.E.; Gil, J.; Wang, J.; Degan, P.; Peters, G.; Martinez, D.; Carnero, A.; Beach, D. Glycolytic Enzymes Can Modulate Cellular Life Span. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 177–185. [[PubMed](#)]
98. Yun, J.; Rago, C.; Cheong, I.; Pagliarini, R.; Angenendt, P.; Rajagopalan, H.; Schmidt, K.; Wilson, J.K.V.; Markowitz, S.; Zhou, S.; et al. Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science* **2009**, *325*, 1555. [[CrossRef](#)]
99. Pupo, E.; Avanzato, D.; Middonti, E.; Bussolino, F.; Lanzetti, L. KRAS-Driven Metabolic Rewiring Reveals Novel Actionable Targets in Cancer. *Front. Oncol.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)]
100. Son, J.; Lyssiotis, C.A.; Ying, H.; Wang, X.; Hua, S.; Ligorio, M.; Perera, R.M.; Ferrone, C.R.; Mullarky, E.; Shyh-Chang, N.; et al. Glutamine Supports Pancreatic Cancer Growth through a Kras-Regulated Metabolic Pathway. *Nature* **2013**, *496*, 101–105. [[CrossRef](#)]
101. Folmes, C.D.L.; Nelson, T.J.; Martinez-Fernandez, A.; Arrell, D.K.; Lindor, J.Z.; Dzeja, P.P.; Ikeda, Y.; Perez-Terzic, C.; Terzic, A. Somatic Oxidative Bioenergetics Transitions into Pluripotency-Dependent Glycolysis to Facilitate Nuclear Reprogramming. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 264–271. [[CrossRef](#)]
102. Siu, M.K.Y.; Jiang, Y.-X.; Wang, J.-J.; Leung, T.H.Y.; Han, C.Y.; Tsang, B.K.; Cheung, A.N.Y.; Ngan, H.Y.S.; Chan, K.K.L. Hexokinase 2 Regulates Ovarian Cancer Cell Migration, Invasion and Stemness via FAK/ERK1/2/MMP9/NANOG/SOX9 Signaling Cascades. *Cancers* **2019**, *11*, 813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Hou, X.; Shi, X.; Zhang, W.; Li, D.; Hu, L.; Yang, J.; Zhao, J.; Wei, S.; Wei, X.; Ruan, X.; et al. LDHA Induces EMT Gene Transcription and Regulates Autophagy to Promote the Metastasis and Tumorigenesis of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Sandforth, L.; Ammar, N.; Dinges, L.A.; Röcken, C.; Arlt, A.; Sebens, S.; Schäfer, H. Impact of the Monocarboxylate Transporter-1 (MCT1)-Mediated Cellular Import of Lactate on Stemness Properties of Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Corbet, C.; Bastien, E.; Santiago de Jesus, J.P.; Dierge, E.; Martherus, R.; Vander Linden, C.; Doix, B.; Degavre, C.; Guilbaud, C.; Petit, L.; et al. TGF β 2-Induced Formation of Lipid Droplets Supports Acidosis-Driven EMT and the Metastatic Spreading of Cancer Cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 454. [[CrossRef](#)]
106. Zaytseva, Y.Y.; Rychahou, P.G.; Gulhati, P.; Elliott, V.A.; Mustain, W.C.; O'Connor, K.; Morris, A.J.; Sunkara, M.; Weiss, H.L.; Lee, E.Y.; et al. Inhibition of Fatty Acid Synthase Attenuates CD44-Associated Signaling and Reduces Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1504–1517. [[CrossRef](#)]
107. Li, J.; Dong, L.; Wei, D.; Wang, X.; Zhang, S.; Li, H. Fatty Acid Synthase Mediates the Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 171–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Gruenbacher, G.; Thurnher, M. Mevalonate Metabolism in Cancer Stemness and Trained Immunity. *Front. Oncol.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
109. Brandi, J.; Dando, I.; Pozza, E.D.; Biondani, G.; Jenkins, R.; Elliott, V.; Park, K.; Fanelli, G.; Zolla, L.; Costello, E.; et al. Proteomic Analysis of Pancreatic Cancer Stem Cells: Functional Role of Fatty Acid Synthesis and Mevalonate Pathways. *J. Proteom.* **2017**, *150*, 310–322. [[CrossRef](#)]
110. Sabtu, S.N.; Sani, S.F.A.; Looi, L.M.; Chiew, S.F.; Pathmanathan, D.; Bradley, D.A.; Osman, Z. Indication of High Lipid Content in Epithelial-Mesenchymal Transitions of Breast Tissues. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3250. [[CrossRef](#)]
111. Nath, A.; Li, I.; Roberts, L.R.; Chan, C. Elevated Free Fatty Acid Uptake via CD36 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14752. [[CrossRef](#)]
112. Wang, J.; Wen, T.; Li, Z.; Che, X.; Gong, L.; Jiao, Z.; Qu, X.; Liu, Y. CD36 Upregulates DEK Transcription and Promotes Cell Migration and Invasion via GSK-3 β / β -Catenin-Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer. *Aging (Albany NY)* **2020**, *13*, 1883–1897. [[CrossRef](#)]
113. Tian, W.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Zhu, T.; Hua, Y.; Li, H.; Zhang, Q.; Xia, M. FABP4 Promotes Invasion and Metastasis of Colon Cancer by Regulating Fatty Acid Transport. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 512. [[CrossRef](#)]
114. Hung, C.-M.; Kuo, D.-H.; Chou, C.-H.; Su, Y.-C.; Ho, C.-T.; Way, T.-D. Osthole Suppresses Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Repression of the c-Met/Akt/MTOR Pathway in Human Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9683–9690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Wang, X.; Huang, Z.; Wu, Q.; Prager, B.C.; Mack, S.C.; Yang, K.; Kim, L.J.Y.; Gimple, R.C.; Shi, Y.; Lai, S.; et al. MYC-Regulated Mevalonate Metabolism Maintains Brain Tumor-Initiating Cells. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 4947–4960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Liu, M.; Xia, Y.; Ding, J.; Ye, B.; Zhao, E.; Choi, J.-H.; Alptekin, A.; Yan, C.; Dong, Z.; Huang, S.; et al. Transcriptional Profiling Reveals a Common Metabolic Program for Tumorigenicity in High-Risk Human Neuroblastoma and Mouse Neuroblastoma Sphere-Forming Cells. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 609–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Gugnoni, M.; Sancisi, V.; Manzotti, G.; Gandolfi, G.; Ciarrocchi, A. Autophagy and Epithelial-Mesenchymal Transition: An Intricate Interplay in Cancer. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Chen, H.-T.; Liu, H.; Mao, M.-J.; Tan, Y.; Mo, X.-Q.; Meng, X.-J.; Cao, M.-T.; Zhong, C.-Y.; Liu, Y.; Shan, H.; et al. Crosstalk between Autophagy and Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Application in Cancer Therapy. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 101. [[CrossRef](#)]

119. Akalay, I.; Janji, B.; Hasmim, M.; Noman, M.Z.; André, F.; Cremoux, P.D.; Bertheau, P.; Badoual, C.; Vielh, P.; Larsen, A.K.; et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Autophagy Induction in Breast Carcinoma Promote Escape from T-Cell-Mediated Lysis. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 2418–2427. [[CrossRef](#)]
120. Chen, C.; Liang, Q.-Y.; Chen, H.-K.; Wu, P.-F.; Feng, Z.-Y.; Ma, X.-M.; Wu, H.-R.; Zhou, G.-Q. DRAM1 Regulates the Migration and Invasion of Hepatoblastoma Cells via Autophagy-EMT Pathway. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 2427–2433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Grassi, G.; Di Caprio, G.; Santangelo, L.; Fimia, G.M.; Cozzolino, A.M.; Komatsu, M.; Ippolito, G.; Tripodi, M.; Alonzi, T. Autophagy Regulates Hepatocyte Identity and Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transitions Promoting Snail Degradation. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1880. [[CrossRef](#)]
122. Qiang, L.; Zhao, B.; Ming, M.; Wang, N.; He, T.-C.; Hwang, S.; Thorburn, A.; He, Y.-Y. Regulation of Cell Proliferation and Migration by P62 through Stabilization of Twist1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 9241–9246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Peng, Y.-F.; Shi, Y.-H.; Ding, Z.-B.; Ke, A.-W.; Gu, C.-Y.; Hui, B.; Zhou, J.; Qiu, S.-J.; Dai, Z.; Fan, J. Autophagy Inhibition Suppresses Pulmonary Metastasis of HCC in Mice via Impairing Anoikis Resistance and Colonization of HCC Cells. *Autophagy* **2013**, *9*, 2056–2068. [[CrossRef](#)]
124. Bao, Y.; Ding, Z.; Zhao, P.; Li, J.; Chen, P.; Zheng, J.; Qian, Z. Autophagy Inhibition Potentiates the Anti-EMT Effects of Alteronol through TGF- β /Smad3 Signaling in Melanoma Cells. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Ren, B.-J.; Zhou, Z.-W.; Zhu, D.-J.; Ju, Y.-L.; Wu, J.-H.; Ouyang, M.-Z.; Chen, X.-W.; Zhou, S.-F. Alisertib Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, Autophagy and Suppresses EMT in HT29 and Caco-2 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Ding, Y.-H.; Zhou, Z.-W.; Ha, C.-F.; Zhang, X.-Y.; Pan, S.-T.; He, Z.-X.; Edelman, J.L.; Wang, D.; Yang, Y.-X.; Zhang, X.; et al. Alisertib, an Aurora Kinase A Inhibitor, Induces Apoptosis and Autophagy but Inhibits Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 425–464. [[CrossRef](#)]
127. Aspuria, P.-J.P.; Lunt, S.Y.; Våremo, L.; Vergnes, L.; Gozo, M.; Beach, J.A.; Salumbides, B.; Reue, K.; Wiedemeyer, W.R.; Nielsen, J.; et al. Succinate Dehydrogenase Inhibition Leads to Epithelial-Mesenchymal Transition and Reprogrammed Carbon Metabolism. *Cancer Metab.* **2014**, *2*. [[CrossRef](#)]
128. Lorient, C.; Burnichon, N.; Gadessaud, N.; Vescovo, L.; Amar, L.; Libé, R.; Bertherat, J.; Plouin, P.-F.; Jeunemaitre, X.; Gimenez-Roqueplo, A.-P.; et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Is Activated in Metastatic Pheochromocytomas and Paragangliomas Caused by SDHB Gene Mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, E954–E962. [[CrossRef](#)]
129. Lorient, C.; Domingues, M.; Berger, A.; Menara, M.; Ruel, M.; Morin, A.; Castro-Vega, L.-J.; Letouzé, É.; Martinelli, C.; Bemelmans, A.-P.; et al. Deciphering the Molecular Basis of Invasiveness in Sdhb-Deficient Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 32955–32965. [[CrossRef](#)]
130. Li, X.; Han, G.; Li, X.; Kan, Q.; Fan, Z.; Li, Y.; Ji, Y.; Zhao, J.; Zhang, M.; Grigalavicius, M.; et al. Mitochondrial Pyruvate Carrier Function Determines Cell Stemness and Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 46363–46380. [[CrossRef](#)]
131. Thomas, L.W.; Stephen, J.M.; Esposito, C.; Hoer, S.; Antrobus, R.; Ahmed, A.; Al-Habib, H.; Ashcroft, M. CHCHD4 Confers Metabolic Vulnerabilities to Tumour Cells through Its Control of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Cancer Metab.* **2019**, *7*, 2. [[CrossRef](#)]
132. Cui, B.; Luo, Y.; Tian, P.; Peng, F.; Lu, J.; Yang, Y.; Su, Q.; Liu, B.; Yu, J.; Luo, X.; et al. Stress-Induced Epinephrine Enhances Lactate Dehydrogenase A and Promotes Breast Cancer Stem-Like Cells. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 1030–1046. [[CrossRef](#)]
133. Antoni, M.H.; Lutgendorf, S.K.; Cole, S.W.; Dhabhar, F.S.; Sephton, S.E.; McDonald, P.G.; Stefanek, M.; Sood, A.K. The Influence of Bio-Behavioural Factors on Tumour Biology: Pathways and Mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 240–248. [[CrossRef](#)]
134. Qin, J.; Jin, F.; Li, N.; Guan, H.; Lan, L.; Ni, H.; Wang, Y. Adrenergic Receptor B2 Activation by Stress Promotes Breast Cancer Progression through Macrophages M2 Polarization in Tumor Microenvironment. *BMB Rep.* **2015**, *48*, 295–300. [[CrossRef](#)]
135. Shan, T.; Ma, J.; Ma, Q.; Guo, K.; Guo, J.; Li, X.; Li, W.; Liu, J.; Huang, C.; Wang, F.; et al. B2-AR-HIF-1 α : A Novel Regulatory Axis for Stress-Induced Pancreatic Tumor Growth and Angiogenesis. *Curr. Mol. Med.* **2013**, *13*, 1023–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Pu, J.; Zhang, X.; Luo, H.; Xu, L.; Lu, X.; Lu, J. Adrenaline Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition via HuR-TGF β Regulatory Axis in Pancreatic Cancer Cells and the Implication in Cancer Prognosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 1273–1279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Liu, J.; Zong, G.; Zhang, C.; Li, C.; Chen, X.; Zhang, Y. Anxiety and Serum Catecholamines as Predictors of Survival and Recurrence in Hepatocellular Carcinoma. *Psychooncology* **2017**, *26*, 1347–1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Lu, Y.-J.; Geng, Z.-J.; Sun, X.-Y.; Li, Y.-H.; Fu, X.-B.; Zhao, X.-Y.; Wei, B. Isoprenaline Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer Cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *408*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Shan, T.; Cui, X.; Li, W.; Lin, W.; Li, Y.; Chen, X.; Wu, T. Novel Regulatory Program for Norepinephrine-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 847–856. [[CrossRef](#)]
140. Choi, M.J.; Cho, K.H.; Lee, S.; Bae, Y.J.; Jeong, K.J.; Rha, S.Y.; Choi, E.J.; Park, J.H.; Kim, J.M.; Lee, J.-S.; et al. HTERT Mediates Norepinephrine-Induced Slug Expression and Ovarian Cancer Aggressiveness. *Oncogene* **2015**, *34*, 3402–3412. [[CrossRef](#)]
141. Li, J.; Yang, X.-M.; Wang, Y.-H.; Feng, M.-X.; Liu, X.-J.; Zhang, Y.-L.; Huang, S.; Wu, Z.; Xue, F.; Qin, W.-X.; et al. Monoamine Oxidase A Suppresses Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Inhibiting the Adrenergic System and Its Transactivation of EGFR Signaling. *J. Hepatol.* **2014**, *60*, 1225–1234. [[CrossRef](#)]
142. Sood, A.K.; Bhatti, R.; Kamat, A.A.; Landen, C.N.; Han, L.; Thaker, P.H.; Li, Y.; Gershenson, D.M.; Lutgendorf, S.; Cole, S.W. Stress Hormone-Mediated Invasion of Ovarian Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 369–375. [[CrossRef](#)]

143. Landen, C.N.; Lin, Y.G.; Armaiz Pena, G.N.; Das, P.D.; Arevalo, J.M.; Kamat, A.A.; Han, L.Y.; Jennings, N.B.; Spannuth, W.A.; Thaker, P.H.; et al. Neuroendocrine Modulation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10389–10396. [[CrossRef](#)]
144. Masur, K.; Niggemann, B.; Zanker, K.S.; Entschladen, F. Norepinephrine-Induced Migration of SW 480 Colon Carcinoma Cells Is Inhibited by Beta-Blockers. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2866–2869.
145. Zhang, B.; Wu, C.; Chen, W.; Qiu, L.; Li, S.; Wang, T.; Xie, H.; Li, Y.; Li, C.; Li, L. The Stress Hormone Norepinephrine Promotes Tumor Progression through B2-Adrenoreceptors in Oral Cancer. *Arch. Oral Biol.* **2020**, *113*, 104712. [[CrossRef](#)]
146. Zhang, J.; Deng, Y.; Liu, J.; Wang, Y.; Yi, T.; Huang, B.; He, S.; Zheng, B.; Jiang, Y. Norepinephrine Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in HT-29 and A549 Cells in Vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2016**, *142*, 423–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Lin, X.-H.; Liu, H.-H.; Hsu, S.-J.; Zhang, R.; Chen, J.; Chen, J.; Gao, D.-M.; Cui, J.-F.; Ren, Z.-G.; Chen, R.-X. Norepinephrine-Stimulated HSCs Secrete SFRP1 to Promote HCC Progression Following Chronic Stress via Augmentation of a Wnt16B/ β -Catenin Positive Feedback Loop. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*, 64. [[CrossRef](#)]
148. Cohen, E.N.; Gao, H.; Anfossi, S.; Mego, M.; Reddy, N.G.; Debeb, B.; Giordano, A.; Tin, S.; Wu, Q.; Garza, R.J.; et al. Inflammation Mediated Metastasis: Immune Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Inflammatory Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132710. [[CrossRef](#)]
149. Aninat, C.; Seguin, P.; Descheemaeker, P.-N.; Morel, F.; Malledant, Y.; Guillouzo, A. Catecholamines Induce an Inflammatory Response in Human Hepatocytes. *Crit. Care Med.* **2008**, *36*, 848–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Nilsson, M.B.; Armaiz-Pena, G.; Takahashi, R.; Lin, Y.G.; Trevino, J.; Li, Y.; Jennings, N.; Arevalo, J.; Lutgendorf, S.K.; Gallick, G.E.; et al. Stress Hormones Regulate Interleukin-6 Expression by Human Ovarian Carcinoma Cells through a Src-Dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29919–29926. [[CrossRef](#)]
151. Moretti, S.; Massi, D.; Farini, V.; Baroni, G.; Parri, M.; Innocenti, S.; Cecchi, R.; Chiarugi, P. β -Adrenoceptors Are Upregulated in Human Melanoma and Their Activation Releases pro-Tumorigenic Cytokines and Metalloproteases in Melanoma Cell Lines. *Lab. Invest.* **2013**, *93*, 279–290. [[CrossRef](#)]
152. Yang, E.V.; Kim, S.; Donovan, E.L.; Chen, M.; Gross, A.C.; Webster Marketon, J.I.; Barsky, S.H.; Glaser, R. Norepinephrine Upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 Expression in Human Melanoma Tumor Cell Lines: Implications for Stress-Related Enhancement of Tumor Progression. *Brain Behav. Immun.* **2009**, *23*, 267–275. [[CrossRef](#)]
153. Lu, Y.; Xu, Q.; Zuo, Y.; Liu, L.; Liu, S.; Chen, L.; Wang, K.; Lei, Y.; Zhao, X.; Li, Y. Isoprenaline/ β 2-AR Activates Plexin-A1/VEGFR2 Signals via VEGF Secretion in Gastric Cancer Cells to Promote Tumor Angiogenesis. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Wu, F.-Q.; Fang, T.; Yu, L.-X.; Lv, G.-S.; Lv, H.-W.; Liang, D.; Li, T.; Wang, C.-Z.; Tan, Y.-X.; Ding, J.; et al. ADRB2 Signaling Promotes HCC Progression and Sorafenib Resistance by Inhibiting Autophagic Degradation of HIF1 α . *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 314–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Zhang, Z.-F.; Feng, X.-S.; Chen, H.; Duan, Z.-J.; Wang, L.-X.; Yang, D.; Liu, P.-X.; Zhang, Q.-P.; Jin, Y.-L.; Sun, Z.-G.; et al. Prognostic Significance of Synergistic Hexokinase-2 and Beta2-Adrenergic Receptor Expression in Human Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection. *BMC Gastroenterol.* **2016**, *16*, 57. [[CrossRef](#)]
156. Kang, F.; Ma, W.; Ma, X.; Shao, Y.; Yang, W.; Chen, X.; Li, L.; Wang, J. Propranolol Inhibits Glucose Metabolism and 18 F-FDG Uptake of Breast Cancer through Posttranscriptional Downregulation of Hexokinase-2. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 439–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Yang, C.; Huang, X.; Liu, Z.; Qin, W.; Wang, C. Metabolism-Associated Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 896–913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Peiris-Pagès, M.; Martínez-Outschoorn, U.E.; Pestell, R.G.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. Cancer Stem Cell Metabolism. *Breast Cancer Res.* **2016**, *18*. [[CrossRef](#)]
159. Stacpoole, P.W. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*. [[CrossRef](#)]
160. Jin, H.; Wang, S.; Zaal, E.A.; Wang, C.; Wu, H.; Bosma, A.; Jochems, F.; Isima, N.; Jin, G.; Lieftink, C.; et al. A Powerful Drug Combination Strategy Targeting Glutamine Addiction for the Treatment of Human Liver Cancer. *eLife* **2020**, *9*, e56749. [[CrossRef](#)]
161. Riess, J.W.; Frankel, P.; Shackelford, D.; Dunphy, M.; Badawi, R.D.; Nardo, L.; Cherry, S.R.; Lanza, I.; Reid, J.; Gonsalves, W.I.; et al. Phase 1 Trial of MLN0128 (Sapanisertib) and CB-839 HCl (Telaglenastat) in Patients with Advanced NSCLC (NCI 10327): Rationale and Study Design. *Clin. Lung Cancer* **2021**, *22*, 67–70. [[CrossRef](#)]
162. Schcolnik-Cabrera, A.; Chávez-Blanco, A.; Domínguez-Gómez, G.; Taja-Chayeb, L.; Morales-Barcenas, R.; Trejo-Becerril, C.; Perez-Cardenas, E.; Gonzalez-Fierro, A.; Dueñas-González, A. Orlistat as a FASN Inhibitor and Multitargeted Agent for Cancer Therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 475–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Menendez, J.A.; Lupu, R. Fatty Acid Synthase (FASN) as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Expert Opin. Targets* **2017**, *21*, 1001–1016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Yi, Y.; Zhang, W.; Yi, J.; Xiao, Z.-X. Role of P53 Family Proteins in Metformin Anti-Cancer Activities. *J. Cancer* **2019**, *10*, 2434–2442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Shen, Y.-A.; Lin, C.-H.; Chi, W.-H.; Wang, C.-Y.; Hsieh, Y.-T.; Wei, Y.-H.; Chen, Y.-J. Resveratrol Impedes the Stemness, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Metabolic Reprogramming of Cancer Stem Cells in Nasopharyngeal Carcinoma through P53 Activation. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/590393/> (accessed on 26 January 2021).

-
166. Coelho, M.; Soares-Silva, C.; Brandão, D.; Marino, F.; Cosentino, M.; Ribeiro, L. β -Adrenergic Modulation of Cancer Cell Proliferation: Available Evidence and Clinical Perspectives. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, *143*, 275–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 167. Montoya, A.; Elgueta, D.; Campos, J.; Chovar, O.; Falcón, P.; Matus, S.; Alfaro, I.; Bono, M.R.; Pacheco, R. Dopamine Receptor D3 Signalling in Astrocytes Promotes Neuroinflammation. *J. Neuroinflamm.* **2019**, *16*, 258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

**Retrodifferentiation of Human
Tumor Hepatocytes to Stem Cells
Leads to Metabolic Reprogramming
and Chemoresistance**

Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance

Karim Fekir¹, Hélène Dubois-Pot-Schneider¹, Romain D esert¹, Yoann Daniel¹, Denise Glaise¹, Claudine Rauch¹, Fabrice Morel¹, Bernard Fromenty¹, Orlando Musso¹, Florian Cabillic^{1,2}, and Anne Corlu¹



Abstract

Human hepatocellular carcinoma (HCC) heterogeneity promotes recurrence and therapeutic resistance. We recently demonstrated that inflammation favors hepatocyte retrodifferentiation into progenitor cells. Here, we identify the molecular effectors that induce metabolic reprogramming, chemoresistance, and invasiveness of retrodifferentiated HCC stem cells. Spheroid cultures of human HepaRG progenitors (HepaRG-Spheres), HBG-BC2, HepG2, and HuH7 cells and isolation of side population (SP) from HepaRG cells (HepaRG-SP) were analyzed by transcriptomics, signaling pathway analysis, and evaluation of chemotherapies. Gene expression profiling of HepaRG-SP and HepaRG-Spheres revealed enriched signatures related to cancer stem cells, metastasis, and recurrence and showed that HepaRG progenitors could retrodifferentiate into an immature state. The transcriptome from these stem cells matched that of proliferative bad outcome HCCs in a cohort of 457 patients. These HCC stem cells expressed high levels of cytokines triggering retrodifferentiation and displayed high migration

and invasion potential. They also showed changes in mitochondrial activity with reduced membrane potential, low ATP production, and high lactate production. These changes were, in part, related to angiotensin-like 4 (ANGPTL4)-induced upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), an inhibitor of mitochondrial pyruvate dehydrogenase. Upregulation of ANGPTL4 and PDK4 paralleled that of stem cells markers in human HCC specimens. Moreover, the PDK4 inhibitor dichloroacetate reversed chemoresistance to sorafenib or cisplatin in HCC stem cells derived from four HCC cell lines. In conclusion, retrodifferentiated cancer cells develop enhanced invasion and therapeutic resistance through ANGPTL4 and PDK4. Therefore, restoration of mitochondrial activity in combination with chemotherapy represents an attractive therapeutic approach in HCC.

Significance: Restoring mitochondrial function in human hepatocellular carcinomas overcomes cancer resistance.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer-related deaths worldwide. Despite recent progress in treatment, tumor recurrence remains high. HCCs show heterogeneous cell populations, suggesting that liver tumors may originate from different cell types (1). Although mature hepatocytes have long been considered as the target of oncogenic transformation, it is now proposed that HCCs may arise from different cells of the hepatic lineage, that is, hepatocytes, hepatoblasts, and hepatic progenitors (2, 3). Furthermore, the presence of cancer stem cells (CSC) in HCCs derived from these cell types

suggest that any cell of the hepatic lineage could acquire stem cell properties. *In vitro* experiments have demonstrated that the inflammatory microenvironment promotes the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocytes toward bipotent progenitor cells (4) and human and mouse hepatocytes can undergo reversible ductal metaplasia in response to injury *in vivo* (5). These new insights on the plasticity of differentiated tumor cells add to the complexity of the origin of CSCs and reinforce the hypothesis of their contribution to the cellular heterogeneity and chemoresistance in HCC (6). In addition, CSCs are spared by cancer chemotherapy that usually affects differentiated and dividing cells to reduce the tumor mass.

CSCs share properties with normal adult stem cells. They are able to self-renew by symmetric division but can also undergo asymmetric division, which preserves the stem cell pool, and give rise to a progeny of transit-amplifying cells that commit to a lineage differentiation program. CSCs are thought to give rise to all cell types within the tumor and can promote malignant progression. They exhibit drug resistance by having a low proliferation rate and high expression of xenobiotic transporters (7). Similar dysregulations of signaling pathways for stemness, proliferation, and differentiation in normal stem cells have been identified in CSCs and can contribute to tumor formation (8). Recent data unveiled unexpected metabolic heterogeneity within

¹INSERM, Univ Rennes, INRA, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), Rennes, France. ²CHU Rennes, Laboratoire de Cytog en etique et Biologie Cellulaire, Rennes, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Anne Corlu, Institute Nutrition, Metabolisms and Cancer (NuMeCan), Hôpital Pontchaillou, Rue Henri le Guilloux, Rennes 35033, France. Phone: 3302-2323-3870; Fax: 3302-9954-0137; E-mail: anne.corlu@inserm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2110

  2019 American Association for Cancer Research.

Fekir et al.

the tumor mass (9) and suggested that CSCs could harbor distinct metabolic phenotypes from differentiated tumor cells in various tissues. However, the metabolic profile of CSCs is controversial. Metabolic plasticity could allow CSCs to alternatively rely on either glycolysis or oxidative phosphorylation (OXPHOS) rather than acquiring a stereotypical energy metabolism profile (10). Therefore, a better understanding of the functional properties of retrodifferentiated cells is crucial for developing new therapeutic approaches that aim to eradicate both CSCs and differentiated cancer cells.

Among HCC cell lines, some retain a poorly differentiated phenotype such as HuH7 and HepG2 cells, whereas others display reversible differentiation program, for example, HBG-BC2 (BC2) and HepaRG cell lines (11, 12). HepaRG cells differ from BC2 cells in that they display a higher potential for plasticity, which ranges from liver progenitors to highly differentiated hepatocyte- and biliary-like cells. Furthermore, differentiated HepaRG cells are able to retrodifferentiate into progenitor cells when seeded at low density (12). Recently, we have demonstrated that inflammatory cytokines and TGF β promote the retrodifferentiation of mature HepaRG hepatocyte-like cells and that retrodifferentiated progenitors express a genetic program typical of HCCs with aggressive behavior and unfavorable outcome (4). Here, we show that differentiated HepaRG hepatocyte-like cells not only retrodifferentiate to HCC progenitor cells, but also can acquire stem cell features under particular conditions. The HepaRG-derived stem cells expressed a transcriptomic program that was similar to proliferative, bad outcome HCCs in two separate cohorts totaling 457 patients. Emergence of the CSC phenotype is associated with a modulation of invasion, inflammation, redox homeostasis, and energy metabolism, initiated, in part, by angiopoietin like-4 (ANGPTL4) and mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 4. We demonstrate that the upregulation of PDK4 was associated to chemoresistance that could be successfully reversed by the PDK4 inhibitor dichloroacetate (DCA), in four HCC cell lines. Therefore, targeting stem cells by restoring mitochondrial pyruvate oxidation in combination with chemotherapy appears as a promising approach to treat HCC.

Materials and Methods

Sphere culture

HepaRG and BC2 cells were originally isolated in the laboratory (11, 12) and grown in William E medium containing 0.025 g/L pyruvic acid and supplemented with 10% FCS, 5 μ g/mL insulin, and hydrocortisone hemisuccinate (5×10^{-5} and 7×10^{-7} mol/L, respectively). HepG2 and HuH7 cells, obtained from ATCC and European Collection of Authenticated Cell Cultures, were grown in Eagle minimum essential medium (MEM) and DMEM, respectively, both supplemented with 10% FCS. For the sphere culture, cells were seeded in the same media with 2% FCS and 50-fold reduced concentration of insulin and hydrocortisone hemisuccinate, for 5 days. Then, cells were detached and seeded in ultra-low attachment plates in DMEM/F12 medium supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mmol/L L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 0.1 mmol/L β -mercaptoethanol, and 4 ng/mL fibroblast growth factor 2 (FGF2, Miltenyi Biotec) for 5 more days. Medium was renewed at day 1 and 3. The use of human embryonic stem (hES) cells H9 (WA09 obtained from WiCell) was approved by the French Biomedicine Agency (no. RE10-013 I/C/R). Cell line authentication was

performed with AuthentiFiler PCR Amplification Kit, Genotype Comparison Tool v1.0 (Life Technologies) and *Mycoplasma* testing was performed twice a year with MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

Side population quantification and sorting by flow cytometry

At day 4, HepaRG, HuH7, and HepG2 cells were suspended at 1×10^6 cells/mL in Hank balanced salt solution supplemented with 3% FCS and 10 mmol/L HEPES, and incubated for 90 minutes with 20 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), with or without the P-glycoprotein inhibitor verapamil (50 μ mol/L, Sigma-Aldrich). Then, 1 μ g/mL propidium iodide (Pharmingen) was added and cells were filtered through a 40- μ m strainer to obtain a single-cell suspension. Cell analysis and sorting were performed using Becton Dickinson FACSAria III. Fluorescence emission of Hoechst 33342 was measured through 450DF20 BP (Hoechst blue) and 675DF20 BP (Hoechst red) optical filters. Dead cells were discriminated using propidium iodide labeling. Cells able to efflux Hoechst 33342 are referred to as side population (SP) cells.

Microarray analysis and hierarchical clustering

mRNAs were obtained from biological replicates of H9 hES cells ($n = 3$), HepaRG-SP ($n = 4$), HepaRG-Spheres ($n = 4$), and HepaRG cells recovered 4 or 10 days after seeding in standard medium [HepaRG-D4 ($n = 4$) or HepaRG-D10 ($n = 4$), respectively]. RNA purity and integrity were evaluated with an Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies). Genome-wide expression profiling was performed using the low-input Quick-Amp Labeling Kit and human SurePrint G3 8×60 K pangenomic microarrays (Agilent Technologies). Gene expression data were processed using Feature Extraction and GeneSpring software (Agilent Technologies).

The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through Series accession number GSE75752 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE75752>).

To determine genes significantly deregulated between all different conditions, a one-way ANOVA was performed with a $P < 0.001$ and a fold change (FC) > 4 . To determine genes significantly deregulated between Spheres and HepaRG-D10 cells or SP and HepaRG-D10 cells, a t test (Bonferroni FWER correction) with a $P < 0.03$, $FC > 2$ and $P < 0.05$, $FC > 3$ was used, respectively. Different fold-changes and P values were used to obtain a comparable numbers of genes in both conditions. Gene Cluster 3.0 software (Pearson metrics with centroid distances) was used to cluster the selected genes and conditions and TreeView 1.6 to visualize the clustering.

Gene set enrichment analysis

Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to check whether an *a priori* defined set of genes showed statistically significant, concordant differences between two biological states. GSEA was performed by using the Java-tool developed at the Broad Institute (Cambridge, MA). Unsupervised GSEA was done with the whole C2 collection of curated gene sets from the molecular signatures database (MSigDB). Enrichment score (ES) was determined after 1,000 permutations, as described previously (13).

IHC

The study protocol complied with French laws and regulations and was approved by INSERM's Institutional Review Board

(number 01-036) in the context of the National Network of Liver Biological Resource Centers. Sample collection was reported to the Ministry of Education and Research (no. DC-2008-338). All the patients provided written informed consent before study entry. Tissue microarray (TMA) comprises 25 patients with HCC and 5 histologically normal livers, all in triplicate as described previously (14). Briefly, TMA construction was done with a MiniCore3 tissue arrayer (Alphelys). Five-micron microtome sections were processed for IHC with a Discovery XT from Ventana Medical Systems (Roche) slide staining system. Antibodies used were purchased from Santa Cruz Biotechnology: hepatocyte nuclear factor 1 β (HNF1B, sc-8986), Prolab: CD44 (20282), Sigma Aldrich: leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (LGR5, HPA012530), lunatic fringe homolog (LFNG, AV44923), hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1, HPA019105), insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5, I7660), Indian hedgehog (IHH, AV45230), and ProteinTech: PDK4 (12949-1-AP) and ANGPTL4 (18374-1-AP). Stained slides were converted into high-resolution digital data with a NanoZoomer digital slide scanner (Hamamatsu). Digital slides were viewed using NDP.view software (Hamamatsu). The signal was independently read by four observers (K. Fekir, O. Musso, F. Cabillic, and A. Corlu) who were blinded to any information. Discrepancies were resolved by consensus reading. A 4-point scale (1-2-3-4) reflecting increasing signal intensity was used. Focal and general expressions of the proteins were considered.

Anticancer drug treatments

Adherent cells or spheres were cultured for 3 days in medium deprived of serum and supplemented with cisplatin (Accord Healthcare France SAS) or sorafenib (Interchim), alone or in combination with DCA.

HCC patient cohorts

Two independent HCC cohorts referred to as "the Roessler's cohort" ($n = 247$ HCCs, GEO Series accession number GSE14520) and The Cancer Genome Atlas liver hepatocellular carcinoma (TCGA-LIHC, $n = 210$ HCCs) cohort were used in this study. For the Roessler cohort, raw feature data from GEO were normalized and \log_2 intensity expression summary values for each probe set were calculated using Robust Multiarray Average (RMA, packages Affy). Each dataset was assessed for the detection of outliers and inter-array, experiment-related batch effects by principal component analysis and density plots. Because a clear-cut inter-array experiment-related batch effect was observed within GSE14520, this effect was corrected by the COMBAT method (package sva). Then, probes being detected over the background noise in at least one HCC were retained and quantile normalized (package preprocessCore). For the TCGA-LIHC cohort, normalized RNAseq data were downloaded from the Genomic Data Commons website and the patients were selected according to the method detailed in Desert and colleagues 2017 (15). Then, hierarchical cluster analysis were performed with the Ward's method using 1-Pearson correlation as a distance metric, based on the expression of the genes up- or downregulated in HepaRG-SP or HepaRG-Spheres.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SD. Data were analyzed using GraphPad Prism software (Version 5.0; GraphPad). The signifi-

cance was evaluated by Student t test for comparison of two conditions or by one-way ANOVA for comparison between groups.

See Supplementary Materials and Methods for further information.

Results

HCC cells can retrodifferentiate to cancer stem cells

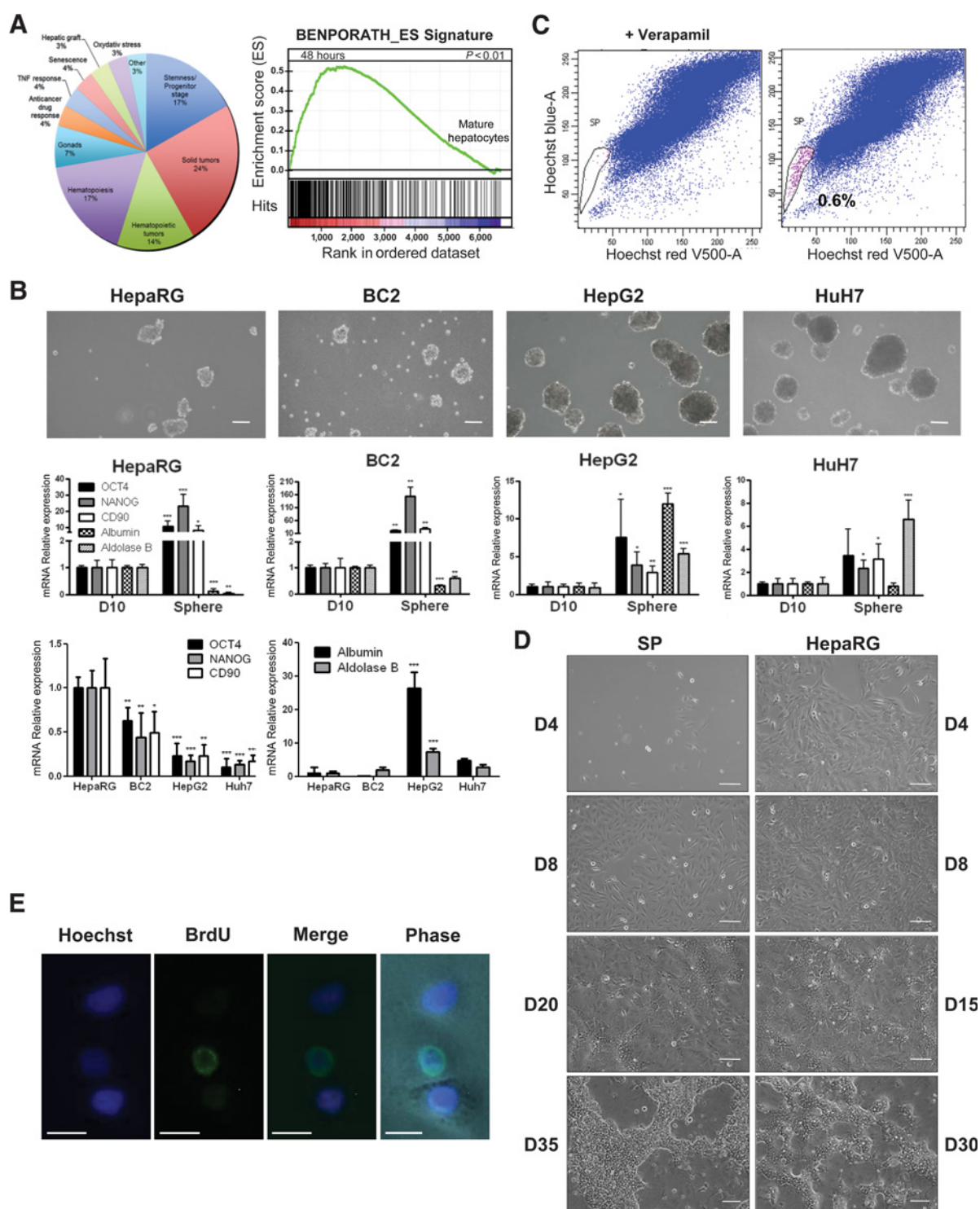
Cell phenotypic and functional plasticity is known to promote intratumor heterogeneity, which in turn contributes to chemotherapy resistances (16). To gain insight into the role of cell plasticity in chemoresistance, we first performed an unsupervised search for gene expression signatures matching the transcriptomic program of 48-hour-retrodifferentiated HepaRG hepatocyte-like cells to HCC progenitor cells (GSE52989; Supplementary Fig. S1A). GSEA revealed that among the top 50 signatures, 38% were related to solid and hematopoietic tumors, and 17% corresponded to stem cells, including the hES cell signature (Fig. 1A). Thus, CSCs can emerge from highly differentiated hepatocyte-like HCC cells.

To further characterize stemness features of HCC cells, we studied anchorage-independent growth and xenobiotic efflux of HepaRG, BC2, HepG2, and HuH7 HCC cell lines. Culture of the four cell lines under nonadherent serum- and EGF-free conditions resulted in the formation of 3D spheres (Fig. 1B). Spheres upregulated stem cell markers (OCT4, NANOG, CD90) when compared with cells cultured during the same period in adherent conditions (D10). Interestingly, HepaRG and BC2 cells, which are both able to reversibly differentiate, shared specific features: they formed smaller spheres, upregulated stem cell markers, and downregulated levels of hepatocyte makers (albumin, aldolase B) in comparison with HepG2 and HuH7 cells (Fig. 1B). Flow cytometry analysis demonstrated that the HepaRG-progenitor cells included 0.6% of SP cells (Fig. 1C), whereas SP cells accounted only for 0.04% in HuH7 and 0.01% in HepG2 cells. Interestingly, SP cells from the HepaRG cell line were able to differentiate to mature hepatocyte-like and biliary-like cells (Fig. 1D), as attested by cytochrome P450 3A4 and cytokeratin 19 staining, respectively (Supplementary Fig. S1B). Finally, BrdU pulse-chase experiments with two rounds of cell division without BrdU revealed late mitotic figures wherein only one nucleus was BrdU-positive, showing that asymmetric division occurred within the HepaRG-progenitor population (Fig. 1E).

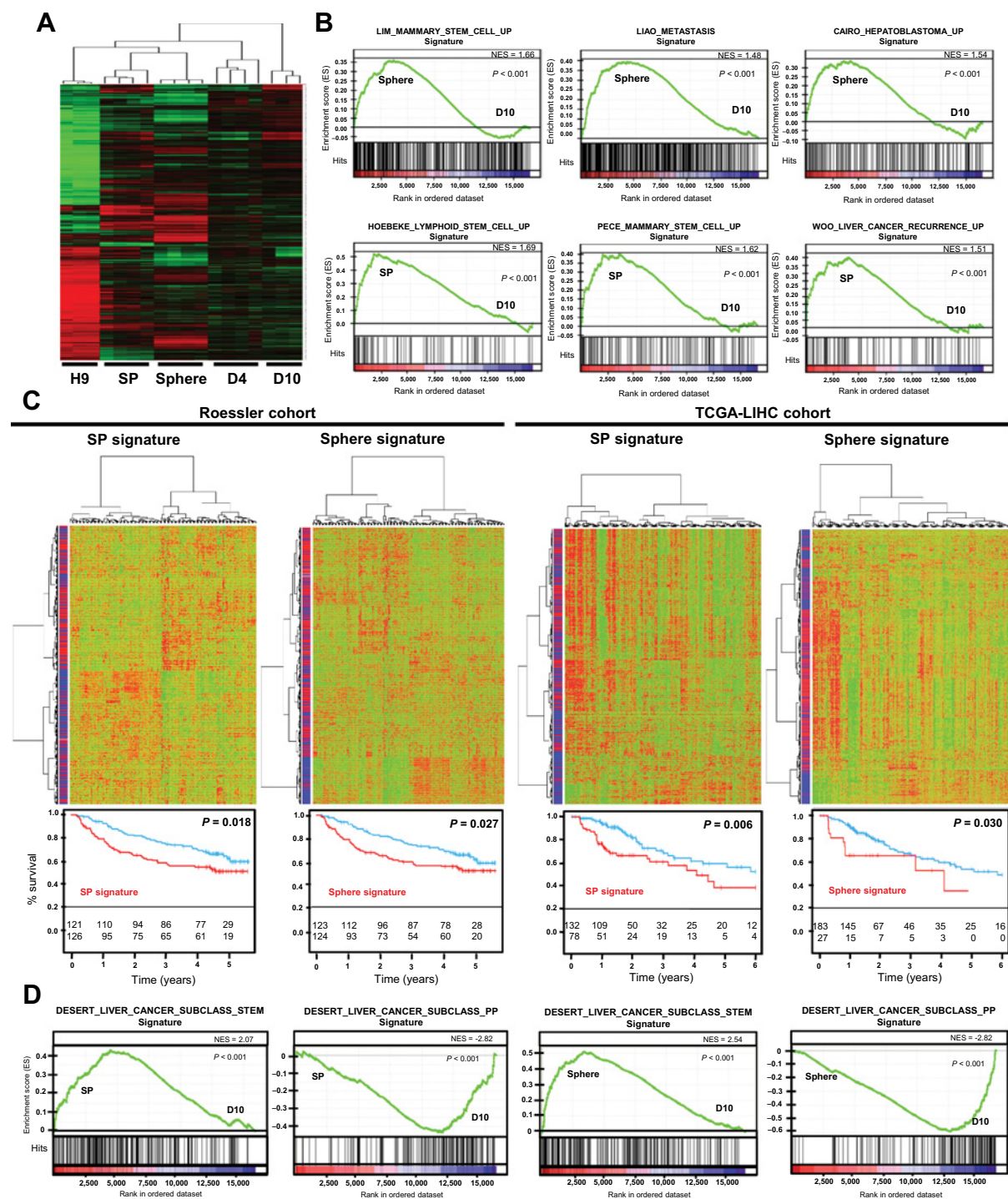
Gene signatures of HepaRG Spheres and SP are related to stemness and HCC with poor prognosis

Among the four HCC cell lines studied, HepaRG cells harbored the highest plasticity potential and stemness features. Thus, these cells were selected for transcriptomic analyses. Gene profiles of HepaRG-Spheres (Spheres) and HepaRG-SP cells (SP) were compared with those of hES cells (H9), HepaRG-progenitors (D4), and differentiating HepaRG cells (D10; Supplementary Fig. S1A). We identified 5,866 significantly deregulated genes by one-way ANOVA ($P < 0.001$, FC > 4). Hierarchical clustering of the differentially expressed genes showed two main branches classifying the samples according to the degree of stemness (Fig. 2A). One branch included D10, whereas the second one grouped hES cells, SP, Spheres, and D4. Interestingly, in this stem/progenitor cluster, the gene profiles of SP and Spheres were closer to the gene profiles of hES cells than that of D4. Accordingly, unsupervised

Fekir et al.

**Figure 1.**

Characterization of stem cell features in HCC cell lines. **A**, Unsupervised GSEA using the gene expression profiles of mature HepaRG-hepatocyte-like cells before and after 48 hours of retrodifferentiation. Top 50 gene signatures identified by GSEA (left). Among them GSEA revealed an enrichment of stem signatures such as the "Benporath_ES Signature" related to genes overexpressed in human embryonic stem cells (right). **B**, Phase-contrast photographs of HepaRG, BC2, HepG2, and HuH7 Spheres. Scale bar, 50 μ m. mRNA levels of OCT4, NANOG, CD90, albumin, and aldolase B in HepaRG, BC2, HepG2, and HuH7 Spheres compared with 10-day-old cells cultured in adherent conditions (D10; $n = 3$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **C**, Flow cytometry showing the HepaRG-SP that efficiently effluxes the Hoechst 33342 dye. **D**, Phase-contrast photographs of sorted SP and unsorted HepaRG cells at D4, D8, D15, D20, D30, and D35 after plating. Scale bar, 50 μ m. **E**, BrdU and Hoechst stainings in HepaRG progenitors (HepaRG-D4) after BrdU-pulse chase experiment. Scale bar, 10 μ m.

**Figure 2.**

SP and Sphere signatures match with poor outcome in HCC. **A**, Filtered microarray data clustered with Gene Cluster 3.0 and visualized with Treeview. SP, HepaRG-side population; Spheres, HepaRG-Spheres; D4, HepaRG-D4 (progenitors); D10, HepaRG-D10; H9, human embryonic stem cells. Green, lower expression; red, higher expression. **B**, Unsupervised GSEA highlighted enrichment of stem cell, hepatoblastoma, metastasis, and cancer recurrence signatures in HepaRG-SP and HepaRG-Spheres compared with HepaRG-D10 cells: Lim_mammary_stem_cell_up, Pece_mammary_stem_cell_up, Cairo_hepatoblastoma_up, Hoebeke_lymphoid_stem_cell_up, Liao_metastasis, and Woo_liver_cancer_recurrence_up signatures. **C**, Hierarchical clustering of patients from the Roesler cohort (GSE14520) and TCGA-LIHC cohort on the basis of SP or Sphere mRNA expression signature. Analysis was performed using the Ward's method using 1–Pearson correlation as a distance metric, based on the differential expression of the genes regulated in SP or Spheres (red) in comparison with HepaRG-D10 (blue). Kaplan–Meier curves for overall survival. Red curves, patients harboring SP or Sphere signature. **D**, GSEA showed that the gene profiles in SP and Spheres were enriched in gene signature corresponding to Desert_liver_subclass_stem and depleted in gene signature corresponding to Desert_liver_subclass_PP.

Fekir et al.

GSEA showed significant enrichment of signatures related to stem cells, hepatoblastoma, cancer recurrence, and metastasis in the gene profiles obtained from Spheres and SP compared with D10 (Fig. 2B). Notably, both SP and Sphere signatures discriminated two subpopulations of patients with HCC within two public transcriptomic datasets, consisting of 210 and 247 patients with HCC, respectively (Fig. 2C). Patients harboring SP or Sphere signatures had a decreased overall survival (Fig. 2C). They also displayed high serum alpha-fetoprotein (AFP) level, tumor grade, Tumor Node Metastases (TNM), Cancer of the Liver Italian Program (CLIP), and Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) stages, as well as metastasis signatures (Supplementary Table S1). Conversely, these patients showed low rates of periportal-type HCC signature, which highlights well-differentiated, favorable outcome tumors (15). Supervised GSEA confirmed that the SP and Sphere signatures were negatively and positively correlated with the gene expression signatures defining the periportal-type and STEM-type HCC subclasses, respectively (Fig. 2D; Supplementary Table S2) described by Desert and colleagues (15).

Acquisition of stem cell properties involves metabolic reprogramming

To gain more insight into the signaling pathways activated in these HCC stem cells, we compared the gene profiles of Spheres and SP versus D10 (Fig. 3A; Supplementary Table S3). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) revealed that top upregulated molecules in Spheres were the proinflammatory cytokines IL11, IL6, IL1 β , which trigger the retrodifferentiation process, and ANGPTL4 known to activate ERK and PI3K/AKT signaling pathways (17). Noteworthy, the main activated networks in both Spheres and SP were ERK and PI3K/AKT pathways while TGF β and TNF α were the upstream regulators (Fig. 3A; Supplementary Fig. S1C and S1D). Consistent with IPA results, a connectivity map approach identified the inhibitor of PI3K LY-294002 among the top 7 ranked molecules that are likely to reverse the gene expression profile induced during spherogenesis (Supplementary Table S4).

Analysis of 788 common genes differentially expressed in Spheres and SP versus D10 ($P < 0.05$, FC > 2) performed by GSEA confirmed significant enrichment of signatures related to stem cells, inflammatory response, angiogenesis and tumorigenesis, in both Spheres and SP (Fig. 3B; Supplementary Tables S5 and S6). Besides activation of ERK and PI3K, IPA identified PPARC and PPARC coactivator 1 α (PPARGC1A) associated to downregulation of numerous genes involved in the tricarboxylic acid (TCA) and OXPHOS. Decreased expression of *PPARGC1A*, known as a nodal regulator of mitochondria biogenesis and function, could be related to changes in mitochondrial pathways in both Spheres and SP cells (Fig. 3B). A downregulation of genes involved in OXPHOS [cytochrome c oxidase (COX), NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (*NDUF*), succinate dehydrogenase (*SDH*), and ubiquinol cytochrome c oxidoreductase chain (*UQRC*) families] was also observed with concurrent upregulation of glucose transporters (*GLUT3*, 5, and 6) and glycolytic enzymes [Phosphofructokinase, Platelet (*PFKP*), pyruvate kinase M (*PKM*)] (Fig. 3C; Supplementary Fig. S1E). Moreover, poor labeling of mitochondria by Mitotracker red revealed a reduced mitochondrial membrane potential in SP compared with non-SP cells, and suggested a reduced mitochondrial activity although the mitochondrial mass, assessed with COX subunit II (COX2) staining, was higher (Fig. 3D). Lower mitochondrial membrane potential was associated with lipid accumulation in Spheres

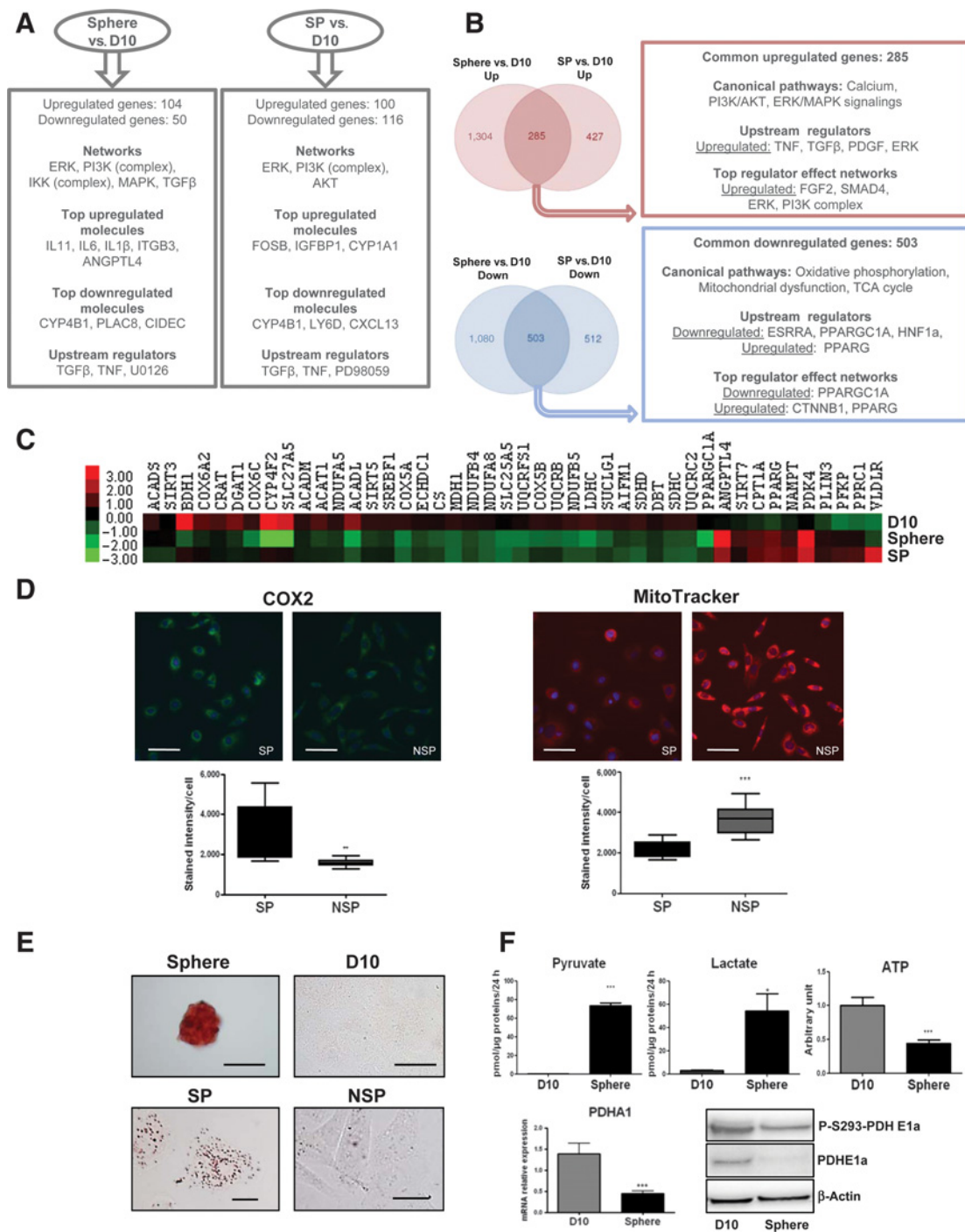
and SP (Fig. 3E). In parallel to *PPARGC1A* decrease, upregulation of *PPARG* was associated with increased transcription of its target gene *PDK4*, an inhibitor the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex (Fig. 3C). In keeping with the role of *PDK4*, increased phosphorylation of the E1- α subunit of PDH complex, high lactate production, low pyruvate consumption, and low ATP content were observed in HepaRG-Spheres (Fig. 3F). Of note, due to the limited number of available SP cells, the later experiments were only performed on Spheres.

Upregulated expression of ANGPTL4 and PDK4 is associated with stem cell markers in human HCCs

Unlike most other genes related to cell metabolism that were repressed, *ANGPTL4* and *PDK4* were found highly upregulated in HepaRG-Spheres and -SP (Fig. 3C). Interestingly, both were also significantly upregulated in BC2-Spheres along with stem cell markers (Fig. 1C; Supplementary Fig. S1F). This prompted us to evaluate the expression of *ANGPTL4* and *PDK4* by TMA-based immunochemistry in human HCCs ($n = 25$) and normal livers ($n = 5$). In normal liver, *ANGPTL4* and *PDK4* were predominantly detected in the cytoplasm of hepatocytes (Supplementary Fig. S1G). In HCCs, *ANGPTL4* and *PDK4* showed similar staining patterns: both proteins were diffusely detected in the tumor (Fig. 4A; Supplementary Fig. S1H). However, scattered cells showing upregulated expression of *ANGPTL4* and *PDK4* could be observed within the tumor parenchyma and intratumor fibrous tracts. Immunostaining of serial sections showed a similar staining pattern with respect to the progenitor/stem cell markers CD44, LGR5, HNF1B, IHH, LFNG, IGFBP5, and HAPLN1 (Fig. 4B; Supplementary Fig. S1H). Of note, *ANGPTL4/PDK4*-positive cells located within intratumor fibrous tracts were positive for anti-hepatocyte antibody (Supplementary Fig. S1H). *In situ* protein expression was semiquantitatively rated on a 4-point scale (1–4) by 4 observers in 25 HCCs. *ANGPTL4* and *PDK4* scores were highly correlated (Fig. 4C; Supplementary Fig. S1I) and associated with CSC markers, as shown by network correlation analysis (Fig. 4D). In addition, HCCs without tumor necrosis showed high protein expression scores of *ANGPTL4* and *PDK4* (Fig. 4E).

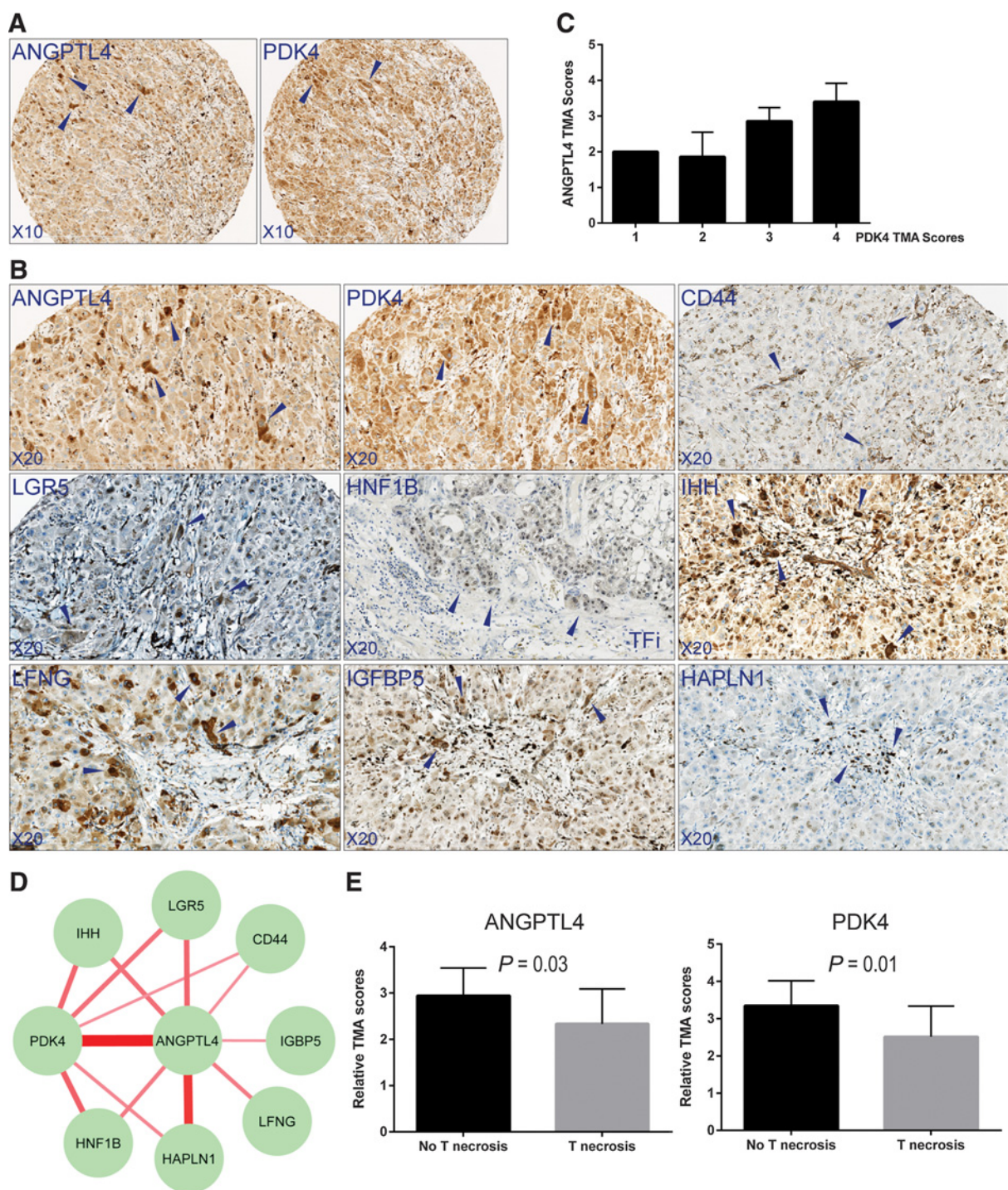
ANGPTL4 knockdown alters anti-inflammatory response, angiogenesis, and tumor cell invasion

ANGPTL4 is a multifaceted secreted protein that could play a role in anoikis resistance by stimulating NADPH oxidase, therefore leading to activation of the ERK and PI3K prosurvival pathways. In agreement, we found in Spheres and SP cells increased expression of the integrin β 1 subunit ITGB1, which is known to bind *ANGPTL4* and transduce its signal (Supplementary Fig. S1J; ref. 17). Hence, to evaluate the role of *ANGPTL4* on stemness acquisition and metabolism adaptation, we performed loss-of-function experiments in HepaRG cells only using Spheres, because the limited number of available SP cells did not allow us to carry out concomitant analyses. Transduction with lentivirus encoding shRNAs against *ANGPTL4* (Sh*ANGPTL4*) greatly diminished synthesis and secretion of *ANGPTL4*, whereas it neither affected spherogenesis nor viability assessed by lactate dehydrogenase (LDH) release (Fig. 5A and B). *ANGPTL4* knockdown reduced ERK phosphorylation, slightly decreased PI3K expression, whereas phosphorylated AKT was increased (Fig. 5A). Concomitantly, we detected a downregulated expression of metalloproteinases (MMP) *MMP2*, *MMP13*, anti-inflammatory cytokine *IL11* and proangiogenic factor *VEGFA* (Fig. 5C). These

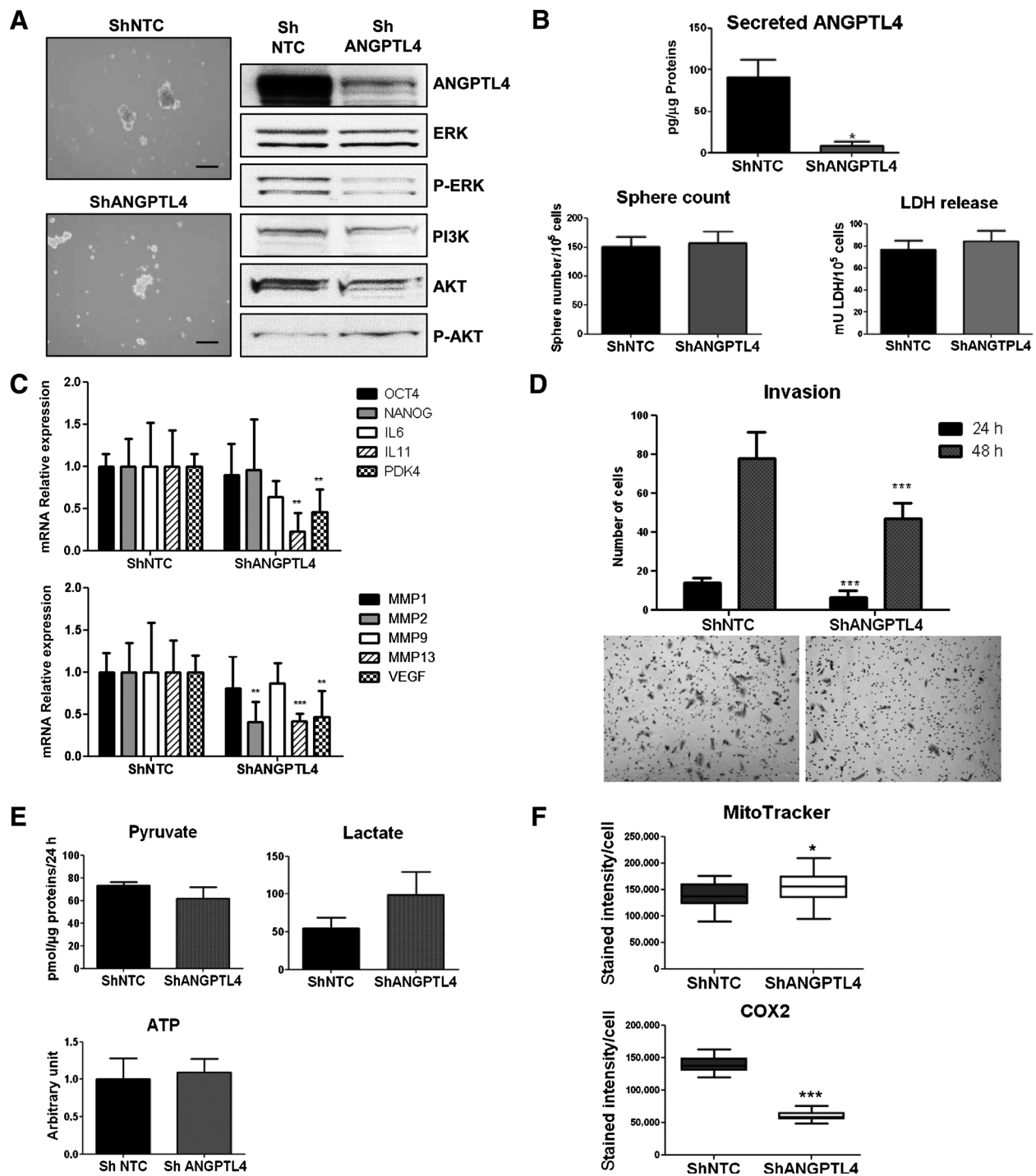
**Figure 3.**

Acquisition of stem cell properties and metabolic adaptation in HepaRG cells. **A**, Number of significantly deregulated genes between HepaRG-Spheres (Spheres) and HepaRG-D10 cells (D10; $P < 0.03$, FC > 2), and between HepaRG-SP (SP) and D10 ($P < 0.05$, FC > 3). Networks, top up- or downregulated molecules; top upstream regulators highlighted by IPA. **B**, Venn diagram showing common genes between Spheres and SP, both compared with D10. Numbers of common up- or downregulated genes in SP and Spheres ($P < 0.05$, FC > 2). Top canonical pathways, networks, upstream regulators, and top regulator effect networks highlighted by IPA. **C**, Heatmap of key genes involved in glycolysis, TCA cycle, and mitochondrial enzymes in SP, Spheres, and D10. Red shading, upregulation; green shading, downregulation. **D**, COX2 and MitoTracker staining in SP and non-SP (NSP) cells and quantification by Cell Health Profiling (Cellomics; $n = 3$). Scale bar, 50 μm . **E**, Oil-Red O staining in Spheres, D10, SP, and NSP cells. Scale bar, 50 μm . **F**, Levels of lactate, pyruvate, and ATP in Spheres and D10. ATP content is expressed as relative to D10 and is arbitrary set to 1 ($n = 3$). Relative expression of PDHA1 in HepaRG-Spheres and HepaRG-D10. Western blot analysis showing levels of PDHE1A and P-S293-PDHE1A in HepaRG-Spheres and D10. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Fekir et al.

**Figure 4.**

Association of ANGPTL4 and PDK4 expression with stem/progenitor cell markers in human HCCs. **A–C**, Tissue microarray–based immunostainings in HCCs. **A**, Serial sections showed similar staining patterns for ANGPTL4 and PDK4. Homogeneous staining coexisted with scattered tumor cells showing higher intensity signal (arrowheads). **B**, Serial sections of a same HCC wherein homogeneous staining coexisted with scattered tumor cells showing higher intensity signal for ANGPTL4, PDK4, CD44, LGR5, IHH, LFNG, IGFBP5, and HAPLN1 (arrowheads). HNF1B staining highlighted tumor cell cords infiltrating the tumor extracellular matrix (arrowheads). **C**, Immunostaining was quantified on a 0–4 scale by four observers. Protein expression scores of ANGPTL4 and PDK4 were correlated in 25 HCCs. Bars, mean \pm SD. **D**, Cytoscape correlation network analysis of the nine proteins based on a Gamma correlation coefficient value matrix (Supplementary Fig. S3B). Statistically significant coefficients ($P < 0.05$; $r \geq 0.4$) are represented by red links between nodes. Link color intensity and thickness are proportional to correlation coefficients. **E**, ANGPTL4 and PDK4 tumor scores were higher in HCCs without ($n = 12$) than with ($n = 13$) tumor necrosis (Student *t* test). Bars, mean \pm SD.

**Figure 5.**

Involvement of ANGPTL4 in inflammation, angiogenesis, and invasion in HepaRG cells. **A**, Phase-contrast photographs of nontargeting shRNA (ShNTC) or ShANGPTL4 Spheres. Scale bar, 50 μ m. Western blot analysis showing levels of ANGPTL4, ERK, P-ERK, PI3K, AKT, and P-AKT in ShNTC and ShANGPTL4 Spheres. **B**, Secretion of ANGPTL4 determined by ELISA in ShNTC and ShANGPTL4 Spheres. Number of Spheres after seeding of 1×10^5 ShNTC- or ShANGPTL4-infected cells. Viability of ShNTC and ShANGPTL4 Spheres assessed by LDH release ($n = 3$). **C**, mRNA levels of OCT4, NANOG, IL6, IL11, PDK4, MMP1, MMP2, MMP9, MMP13, and VEGF in ShNTC and ShANGPTL4 Spheres (ShNTC Spheres arbitrary set to 1; $n = 3$). **D**, Twenty-four- and 48-hour *in vitro* invasion potential of ShNTC and ShANGPTL4 Spheres ($n = 3$). Representative photographs of the invasion potential of ShNTC and ShANGPTL4 Spheres. **E**, Levels of lactate, pyruvate, and ATP in ShNTC and ShANGPTL4 Spheres. ATP content is expressed as relative to ShNTC ($n = 3$) and is arbitrary set to 1. **F**, Quantification of MitoTracker and COX2 staining using Cell Health Profiling ($n = 3$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

observations were consistent with reduced invasion capacity of the ShANGPTL4-Spheres (Fig. 5D). In metabolic terms, pyruvate and lactate extracellular concentrations as well as ATP and lipids contents were unchanged (Fig. 5E; Supplementary Fig. S1K). Interestingly, downregulation of *PDK4* by ShANGPTL4 (Fig. 5C) may favor mitochondrial activity as suggested by higher the MitoTracker staining (Fig. 5F). In contrast, COX2 staining was decreased by ShANGPTL4, thus suggesting that the compensatory increase in mitochondrial mass was no longer required for the restoration of mitochondrial activity.

ERK inhibition reduces cell invasion properties and PI3K inhibition alters cell survival

To specify the role of ERK and PI3K, downstream effectors of ANGPTL4/integrin signaling, we sought to target both pathways, which were found strongly activated in Spheres, using specific inhibitors. Although the sphere number was reduced and mild cell toxicity was detected by higher LDH release in the culture medium, HepaRG-progenitors treated with the MEK1/2 inhibitor U0126 (10 $\mu\text{mol/L}$) preserved their spherogenesis ability (Fig. 6A). After treatment, ERK phosphorylation was markedly reduced, whereas the total amount of ERK was unchanged (Fig. 6A). Unlike *OCT4* and *NANOG*, mRNA levels of *ANGPTL4*, *PDK4*, *VEGF*, *IL6*, *IL11*, *MMP1*, *2*, *9*, and *13* were decreased by U0126 (Fig. 6B). Consistent with the sharp downregulation of MMPs, a strong inhibition of the invasive potential of the spheres was observed (Fig. 6C). The ATP content was decreased, concomitantly to cell viability, while the lactate and pyruvate extracellular concentrations were not modified (Fig. 6D).

HepaRG-progenitors treated with the PI3K inhibitor LY294002 (10 $\mu\text{mol/L}$) showed an inhibition of AKT phosphorylation that resulted in alteration of sphere formation. Moreover, the release of LDH during the culture revealed reduced cell viability (Fig. 6E). In remaining cells, RNA levels of *ANGPTL4*, *PDK4*, *VEGF*, *IL6*, *IL11*, *PDK4*, *MMP1*, *2*, *9*, and *13* were downregulated compared with those of untreated spheres, whereas *OCT4* and *NANOG* expression was unchanged (Fig. 6F). Of note, 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 did not affect HepaRG-D10 cell viability. The low number of viable cells after LY294002 treatment did not allow us to perform metabolism and invasion assays.

PDK4 inhibition combined with chemotherapy increases tumor cell death

Because *ANGPTL4* and *PDK4* were found upregulated in stem/progenitor cells, we investigated their possible involvement in the resistance to standard chemotherapies. When exposed to cisplatin or sorafenib for 3 days, the viability of HepaRG, BC2, HuH7, and HepG2 cells was reduced by 50% to 80% compared with untreated cells. In contrast, HepaRG- and BC2-Spheres were totally chemoresistant. However, a moderate efficacy of cisplatin could be noted against HepG2- and HuH7-Spheres (Fig. 7A). Interestingly, in HepaRG-D4 cells that were resistant to cisplatin or sorafenib, we observed an increased expression of *OCT4*, *NANOG*, *ANGPTL4*, and *PDK4* (Fig. 7B). Moreover, among these markers, *PDK4* expression was found significantly increased in all HCC Spheres (Supplementary Fig. S1F). Hence, we hypothesized that inhibition of *PDK4* could reduce the chemoresistance by reactivating the mitochondrial PDH complex. Accordingly, in ShANGPTL4-HepaRG-Spheres, reduced expression of *PDK4* sensitized cells to sorafenib (Fig. 7C). Therefore, we evaluated the effects of the chemical PDK inhibitor DCA against HCC cell lines.

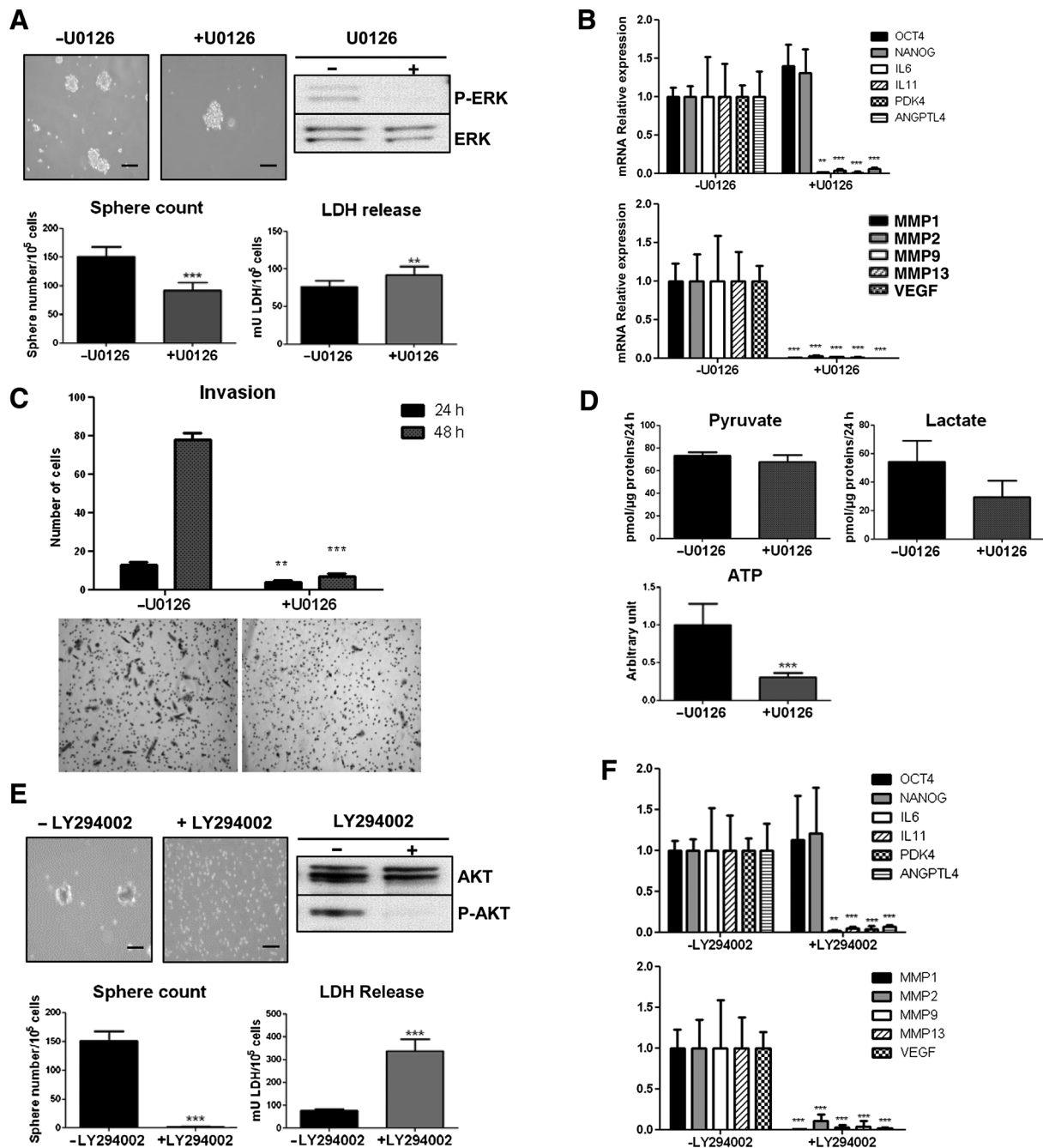
DCA (50 mmol/L) induced drastic decrease in cell viability in HepaRG-Spheres, which expressed the highest levels of *PDK4* (Fig. 7B and C; Supplementary Fig. S1F) and the co-treatment DCA/chemotherapy did not provide significant additional effect. Low expression levels of antioxidant enzymes such as hemoxygenase2 (*HMOX2*), superoxide dismutase 1 and 3 (*SOD1* and 3), and glutathione peroxidase 1 and 4 (*GPX1* and 4) in HepaRG-Spheres (Supplementary Fig. S1L) may enhance reactive oxygen species (ROS) toxicity and contribute to efficacy of DCA alone (Fig. 7C). On the contrary, DCA had no effect on cell viability of HepaRG-D10 and showed mild efficiency on HepaRG-D4, which expressed low and intermediate *PDK4* levels, respectively. Knocking-down *PDK4* expression with siRNA in HepaRG-D4 also reduced cell viability (Fig. 7C; Supplementary Fig. S1M). Cotreatment DCA/chemotherapy was more effective than chemotherapy alone on both HepaRG-D4 and HepaRG-D10 (Fig. 7C). In addition, efficacy of DCA and cotreatment DCA/chemotherapy was confirmed in BC2, HepG2, and HuH7 HCC cell lines (Fig. 7C) that all expressed *PDK4* at various levels (Supplementary Fig. S1F).

Discussion

Cell heterogeneity is one of the main features of HCC and likely contributes to drug resistance. The tumor microenvironment can significantly influence cell fate. Therefore, by understanding the mechanisms underlying how tumor cells adapt to their environment, the molecular basis of chemoresistance may be understood. We previously demonstrated that the crosstalk between the proinflammatory cytokines TNF α , IL6, and TGF β triggers retrodifferentiation of hepatocyte-like HCC cells into proliferating liver progenitors whose gene signatures match proliferative HCC subclasses that have a poor prognosis (4). In this work, we show that liver progenitors retrodifferentiate toward even more immature cells endowed with stem properties and increased chemoresistance. Both Spheres and SP expressed gene signatures related to stemness, inflammation, HCC metastasis, and recurrence. Notably, HCCs expressing the Sphere or SP signatures were associated with unfavorable outcome.

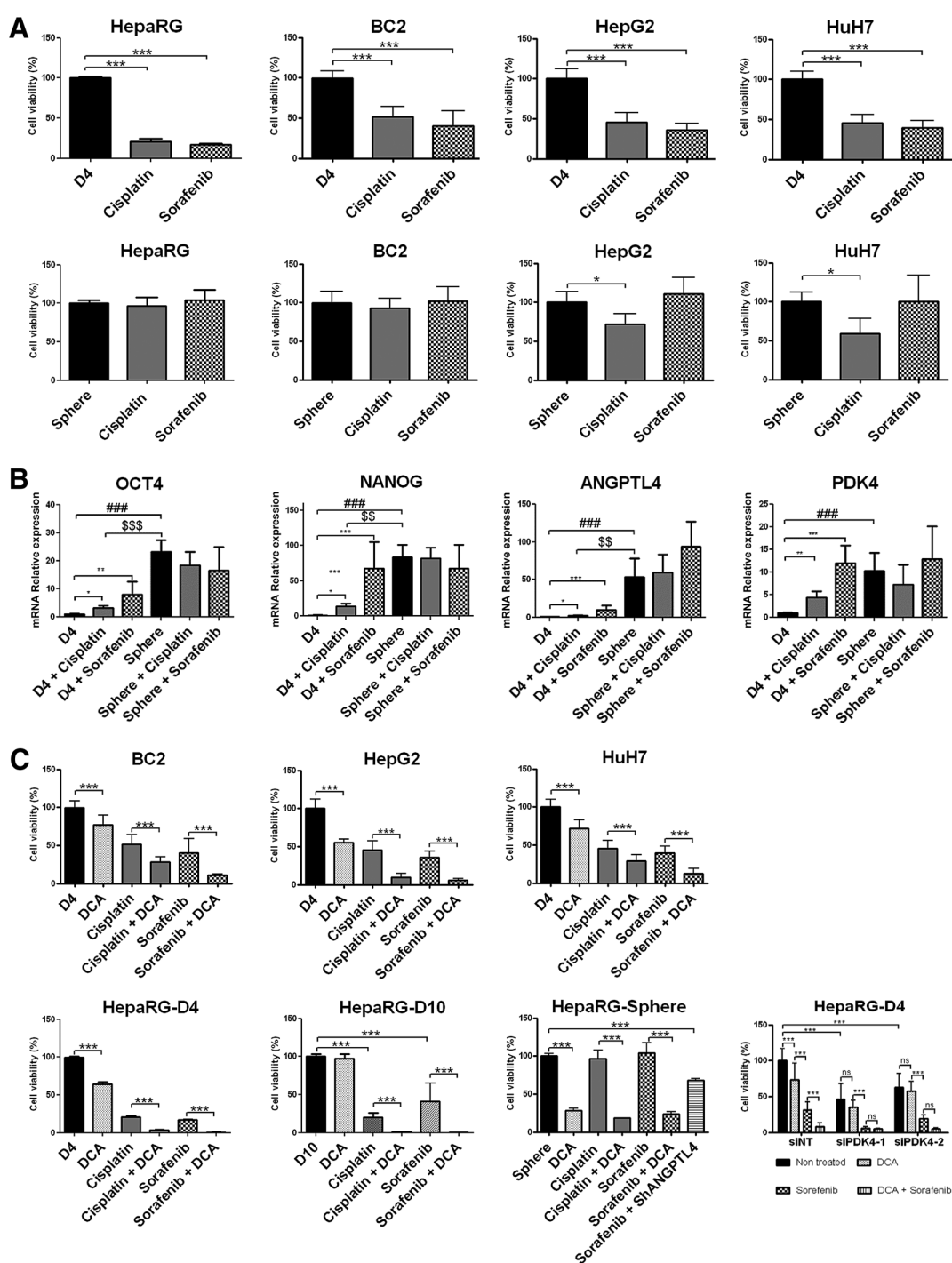
Gene expression profiling revealed that cytokines (TNF α , IL6, TGF β , IL11), whose expression in HCCs are associated with poor prognosis (18–21) and involved in retrodifferentiation, were expressed in Spheres and SP at higher levels than in progenitor cells. This emphasizes the role of an autocrine regulation by cytokines in cell fate conversion within the tumor and the maintenance of stem cell properties. It also highlights that the acquisition of stem properties was associated with an important modulation in cell metabolism. To support these findings, among the upregulated genes in both Spheres and SP, we identified *ANGPTL4*, a molecule described as a potential modulator of the cross-talk between metabolism and cancer (22), and *PDK4*, an enzyme responsible of cell metabolic plasticity (23).

ANGPTL4 is a circulating protein predominantly produced in the liver and adipose tissue, which regulates lipid and carbohydrate metabolism, redox homeostasis, and attenuates the inflammatory response (24). The biological significance of *ANGPTL4* in cancer remains controversial. In the liver, *ANGPTL4* expression has been found to be associated with cancer cell extravasation, enhanced tumorigenesis, and poor prognosis (25). In patients with HCC, serum *ANGPTL4* levels correlate with tumor progression and metastasis (25, 26). In contrast, *ANGPTL4* expression

**Figure 6.**

Involvement of ERK signaling pathway in cell invasion and PI3K signaling pathway in cell survival in HepaRG cells. Effect of MEK1/2 inhibitor (U0126, 10 $\mu\text{mol/L}$). **A**, Phase-contrast photographs, Western blot analysis of ERK and P-ERK, numbers of Spheres after seeding of 1×10^5 cells, and LDH release for viability assessment of HepaRG-Spheres ($n = 3$). Scale bar, 50 μm . **B**, mRNA levels of OCT4, NANOG, IL6, IL11, PDK4, ANGPTL4, MMP1, MMP2, MMP9, MMP13, and VEGF in HepaRG-Spheres treated with U0126 (untreated HepaRG-Spheres arbitrary set to 1; $n = 3$). **C**, Twenty-four- and 48-hour *in vitro* invasion potential of Spheres treated with U0126 ($n = 3$). Representative photographs of the invasion potential of HepaRG-Spheres obtained after treatment with U0126. **D**, Levels of pyruvate, lactate, and ATP in Spheres treated with or without U0126. ATP content is expressed as relative to untreated Spheres and is arbitrary set to 1 ($n = 3$). **E**, Effect of PI3K inhibitor (LY294002, 10 $\mu\text{mol/L}$). **E**, Phase-contrast photographs, Western blot analysis of AKT, P-AKT, and β -actin, numbers of HepaRG-Spheres after seeding of 1×10^5 cells, and LDH release for viability assessment of HepaRG-Spheres ($n = 3$). Scale bar, 50 μm . **F**, mRNA levels of OCT4, NANOG, IL6, IL11, PDK4, ANGPTL4, MMP1, MMP2, MMP9, MMP13, and VEGF in Spheres treated with LY294002 (untreated HepaRG-Spheres arbitrary set to 1, $n = 3$). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Fekir et al.

**Figure 7.**

PDK4 inhibition combined with chemotherapy contributes to increased tumor cell death in HCC cell lines. **A**, Evaluation by the MTT assay of viability of 4-day-old adherent (D4) or anchorage-independent (Spheres) HepaRG, BC2, HepG2, and HuH7 cells after 3-day treatment with cisplatin (10 $\mu\text{g}/\text{L}$ for HepaRG, HuH7, and HepG2; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for BC2) or sorafenib (2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ for HepaRG and HuH7; 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ for HepG2; 15 $\mu\text{mol}/\text{L}$ for BC2); untreated cells arbitrary set to 100, $n = 3$. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. **B**, mRNA levels of *OCT4*, *NANOG*, *ANGPTL4*, and *PDK4* in HepaRG-D4 (D4) and HepaRG Spheres (Spheres) treated with cisplatin or sorafenib (D4 arbitrary set to 1; $n = 4$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ for treated versus untreated D4 cells; ###, $P < 0.001$ for untreated Spheres versus untreated D4; \$, $P < 0.05$; \$\$, $P < 0.01$; \$\$\$, $P < 0.001$ for untreated Spheres versus treated D4. **C**, Viability of BC2, HepG2, HuH7, HepaRG-D4, HepaRG-D10, and HepaRG-Spheres evaluated by MTT assay after treatment with dichloroacetate (DCA, 50 mmol/L) in combination with cisplatin or sorafenib at the same concentrations as in **A** (untreated cells arbitrary set to 100; $n = 3$). Viability of ShANGPTL4-HepaRG-Spheres treated with sorafenib ($n = 4$). ***, $P < 0.001$. Viability of HepaRG-D4 transfected by siPDK4-1, siPDK4-2, or nontargeting siRNA (siNT) evaluated by MTT assay after treatment with DCA (50 mmol/L) in combination with sorafenib (2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$; $n = 3$). ns, nonsignificant.

has been shown to be significantly lower in HCC tissue than in nontumor tissue. The downregulation of ANGPTL4 RNA levels has been associated with advanced tumor stage, high alpha-fetoprotein levels, poor differentiation, and tumor recurrence (27, 28). Furthermore, ANGPTL4 may suppress HCC progression and metastasis in mice through disruption of a tumor-favorable microenvironment (27). This discrepancy may result from the dual expression pattern of ANGPTL4 in human HCCs. Using IHC, we observed a diffuse staining pattern of variable intensity in the tumor hepatocyte cytoplasm but also a very strong signal in scattered cells expressing CSC markers within the tumor parenchyma and intratumor fibrous tracts. The hypothesis that ANGPTL4 is involved in malignant progression was supported by *in vitro* knockdown of ANGPTL4 in HCC cells expressing CSC features.

ANGPTL4 expression was able to regulate IL11 but not IL6 production. Initially considered as an anti-inflammatory cytokine promoting cell adaptation to inflammatory environment, IL11 has been recently reported to present protumorigenic properties by protecting epithelial cells from death (29) and activating oncogenic signaling pathways (30). By interacting with integrins (predominantly ITGB1 and ITGB5), tumor-derived ANGPTL4 also sustains anchorage-related signals in the absence of extracellular matrix and cell–cell contacts. It stimulates NADPH oxidase-dependent production of ROS to maintain a high anion superoxide (O_2^-)/hydrogen peroxide (H_2O_2) ratio that activates the ERK and PI3K prosurvival pathways (17). We demonstrated that ANGPTL4 contributes to ERK activation and PI3K signaling, leading to upregulation of MMP-2 and 13 allowing tumor invasion and VEGF-A allowing angiogenesis. We also confirmed that PI3K/AKT and ERK signaling pathways are crucial for cell survival, inflammatory response, while stem cell marker expression was unchanged.

The PPAR γ , TGF β , and HIF1 α pathways are able to induce ANGPTL4 expression (22, 31). In the small HepaRG-Spheres (less than 200 μ m diameter), no significant accumulation of HIF1 α was detected (Supplementary Fig. S1N). In addition, high protein expression scores of ANGPTL4 were found in human HCCs without tumor necrosis, suggesting that tumors enriched in stem/progenitor cells are metabolically fit to withstand the cancer microenvironment. In terms of PPAR γ and TGF β signaling, they are both activated in Spheres and SP, and also described to regulate PDK4 expression (32, 33). In addition, we observed that inhibition of ERK or PI3K, known to affect PPAR γ transcriptional activity (34), decreased both ANGPTL4 and PDK4 expression.

Silencing ANGPTL4 in Spheres also decreased PDK4 expression and increased mitochondrial membrane potential, emphasizing its potential role in mediating an interplay between inflammation, metastasis, and metabolism (22). The PDH complex manages the competition between glucose and fatty acid oxidation by controlling the conversion of pyruvate into acetyl-coenzyme A. Therefore, by inactivating the PDH complex, PDK4 plays a pivotal role in metabolic plasticity because it restricts the supply of acetyl-coenzyme A from glucose oxidation to feed the TCA cycle. We noted low pyruvate consumption and high lactate production in the HepaRG-Spheres. However, reduced OXPHOS gene expression, mitochondrial ATP synthesis, and membrane potential, associated with accumulation of lipids suggested a lack of metabolic switch toward long-chain fatty acid oxidation to feed the TCA cycle. ANGPTL4 has been shown to inhibit lipoprotein lipase activity and contributes to intracellular lipase degradation

(35, 36). The increased expression of phosphofructokinase and glucose transporters GLUT3, 5, and 6 combined with the decreased expression of PPARGC1A, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis and function, suggest that both SP and Spheres use preferably the glycolytic pathway.

Mitochondria are the primary cellular source of ROS, in particular O_2^- , which is readily dismutated to the freely diffusible and cytotoxic H_2O_2 (37). Therefore, a reduction in OXPHOS could favor the survival of stem cells as a result of decreased mitochondrial H_2O_2 release (38). In addition, decreased mitochondrial activity is expected to impair the intrinsic apoptotic pathway (39). Consistent with these observations, metabolism reprogramming associated with a glycolytic profile is observed in hES and induced pluripotent stem cells, which leads to lower levels of ROS than in their progeny (40). During somatic reprogramming to pluripotency, it was demonstrated that glycolytic shift and inhibition of pyruvate transport into mitochondria occurs as a consequence of the induction of the expression of mitochondrial enzyme PDK1, which inhibits PDH (41). In the same way, recent reports suggest that a decrease in gene expression and protein amounts of the PDH complex in breast tumor-initiating cells is linked to reduced mitochondrial activity and higher glycolysis (42). A more active glycolysis over OXPHOS was detected in the CD133⁺ PLC/PRF/5 human HCC cell line compared with CD133⁻ cells (43) and in liver tumor-initiating stem-like cells in mice (44).

Recently, reports have suggested a causal link between metabolic change or mitochondrial dysfunction and chemoresistance. Consistent with this hypothesis, HCC-Spheres were resistant to cisplatin and sorafenib treatments compared with adherent cultures. The greatest cisplatin resistance of HepaRG and BC2 compared with HuH7 and HepG2 Spheres may result from the presence of proliferative cells in high-growing HuH7 and HepG2 Spheres. Moreover, HepaRG-D4-resistant cells strongly expressed OCT4, NANOG, ANGPTL4, and PDK4. These data suggest that these drugs spare cells with stem cell characteristics. Importantly, DCA, which is known to redirect glucose metabolism from glycolysis to TCA and OXPHOS (38), succeeded in increasing the effect of chemotherapies against all HCC cell lines assessed. The chemotherapeutic effect of DCA may originate from the inability of cells to counteract the increased ROS production following mitochondria reactivation. This effect was especially notable in Spheres, probably because of their low levels of antioxidant enzymes.

Despite initial favorable responses with sorafenib and improved survival with regorafenib (45), tyrosine kinase inhibitors do not completely block HCC progression (46–48). Therefore, identifying new therapeutic targets remains a challenge. We have demonstrated that cisplatin- and sorafenib-resistant HCC cells exhibit stem cells properties and have revealed that ANGPTL4/PDK4 contribute to the maintenance of CSC features. Importantly, we provide the proof of concept that targeting the enzymes involved in metabolic reprogramming could be useful in association with chemotherapy to better control HCC recurrence.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: K. Fekir, F. Morel, F. Cabillic, A. Corlu
Development of methodology: K. Fekir, R. Désert, D. Glaize, F. Morel, O. Musso, F. Cabillic, A. Corlu

Fekir et al.

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): K. Fekir, R. Désert, Y. Daniel, D. Glaise, C. Rauch, F. Morel, O. Musso, F. Cabillic, A. Corlu

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): K. Fekir, H. Dubois-Pot-Schneider, R. Désert, Y. Daniel, D. Glaise, C. Rauch, F. Morel, O. Musso, F. Cabillic, A. Corlu

Writing, review, and/or revision of the manuscript: K. Fekir, H. Dubois-Pot-Schneider, R. Désert, B. Fromenty, O. Musso, F. Cabillic, A. Corlu

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): K. Fekir, Y. Daniel, D. Glaise, C. Rauch, F. Morel, O. Musso, A. Corlu

Study supervision: F. Cabillic, A. Corlu

Acknowledgments

The authors thank Drs. P. Loyer and C. Aninat for thoughtful discussions and critical reading of the manuscript; Drs. L. Sulpice and D. Bergeat, Rennes University Hospital, for patient data; and Drs. Mireille Desille and Bruno Turlin, CRB-Santé, Biosit, Biogenouest, Rennes, France. The authors also thank the "Genomique Santé," "ImPACcell," "flow cytometry," "H2P2" Core facilities from Biogenouest, SFR Biosit, University of Rennes1 and the "flow cytometry" Core facility from Paul Brousse Hospital, Villejuif, France. This work was

supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to B. Fromenty, O. Musso, D. Glaise, C. Rauch), the Centre National de la Recherche Scientifique (to A. Corlu), the University of Rennes 1 (to F. Cabillic, Y. Daniel), the « Association pour la Recherche sur le Cancer », the « Ligue contre le cancer - Comités d'Ille-et-Vilaine, des Côtes d'Armor, de Loire Atlantique et de Vendée », Cancéropôle Grand Ouest (CONCERTO), and Institut National du Cancer (grant no. 12688). K. Fekir was funded by the « Conseil Régional de Bretagne », INSERM (CESOCA) and the Ligue contre le cancer-Comité d'Ille et Vilaine. H. Dubois-Pot-Schneider was funded by the Seventh Framework Programme (FP7) LIV-ES (grant no. 223317) and the « Contrat Plan Etat-Région ». R. Désert was funded by the « Conseil Régional de Bretagne » and INSERM (VALCIPRE).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received July 18, 2018; revised January 4, 2019; accepted February 26, 2019; published first March 5, 2019.

References

- Marquardt JU, Andersen JB, Thorgeirsson SS. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev* 2015;15:653–67.
- Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006;25:3818–22.
- Holzbaumer A, Factor VM, Andersen JB, Marquardt JU, Kleiner DE, Raggi C, et al. Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology* 2013;145:221–31.
- Dubois-Pot-Schneider H, Fekir K, Coulouarn C, Glaise D, Aninat C, Jarnouen K, et al. Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology* 2014;60:2077–90.
- Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ, et al. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2014;15:605–18.
- Cabillic F, Corlu A. Regulation of transdifferentiation and retrodifferentiation by inflammatory cytokines in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2016;151:607–15.
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res* 2006;312:3701–10.
- Oishi N, Yamashita T, Kaneko S. Molecular biology of liver cancer stem cells. *Liver Cancer* 2014;3:71–84.
- Martinez-Otschoorn UE, Peiris-Pages M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:11–31.
- Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer* 2016;114:1305–12.
- Glaise D, Ilyin GP, Loyer P, Cariou S, Bilodeau M, Lucas J, et al. Cell cycle gene regulation in reversibly differentiated new human hepatoma cell lines. *Cell Growth Differ* 1998;9:165–76.
- Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 2007;45:957–67.
- Coulouarn C, Corlu A, Glaise D, Guenon I, Thorgeirsson SS, Clement B. Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2012;72:2533–42.
- Mebarki S, Desert R, Sulpice L, Sicard M, Desille M, Canal F, et al. De novo HAPLN1 expression hallmarks Wnt-induced stem cell and fibrogenic networks leading to aggressive human hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 2016;7:39026–43.
- Desert R, Rohart F, Canal F, Sicard M, Desille M, Renaud S, et al. Human hepatocellular carcinomas with a periportal phenotype have the lowest potential for early recurrence after curative resection. *Hepatology* 2017;66:1502–18.
- Friemel J, Rechsteiner M, Frick L, Bohm F, Struckmann K, Egger M, et al. Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:1951–61.
- Zhu P, Tan MJ, Huang RL, Tan CK, Chong HC, Pal M, et al. Angiopoietin-like 4 protein elevates the prosurvival intracellular O2(-):H2O2 ratio and confers anoikis resistance to tumors. *Cancer Cell* 2011;19:401–15.
- Nong Y, Wu D, Lin Y, Zhang Y, Bai L, Tang H. Tenascin-C expression is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (HCC) patients and the inflammatory cytokine TNF-alpha-induced TNC expression promotes migration in HCC cells. *Am J Cancer Res* 2015;5:782–91.
- Ohishi W, Cologne JB, Fujiwara S, Suzuki G, Hayashi T, Niwa Y, et al. Serum interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study. *Int J Cancer* 2014;134:154–63.
- Lin TH, Shao YY, Chan SY, Huang CY, Hsu CH, Cheng AL. High serum transforming growth factor-beta1 levels predict outcome in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Clin Cancer Res* 2015;21:3678–84.
- Xiang ZL, Zeng ZC, Fan J, Tang ZY, Zeng HY. Expression of connective tissue growth factor and interleukin-11 in intratumoral tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep* 2012;39:6001–6.
- La Paglia L, Listi A, Caruso S, Amodeo V, Passiglia F, Bazan V, et al. Potential role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway. *PPAR Res* 2017;2017:8187235.
- Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab* 2014;11:10.
- Zhu P, Goh YY, Chin HF, Kersten S, Tan NS. Angiopoietin-like 4: a decade of research. *Biosci Rep* 2012;32:211–9.
- Li H, Ge C, Zhao F, Yan M, Hu C, Jia D, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha-activated angiopoietin-like protein 4 contributes to tumor metastasis via vascular cell adhesion molecule-1/integrin beta1 signaling in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011;54:910–9.
- El-Shal AS, Zidan HE, Rashad NM, Wade FM. Angiopoietin-like protein 3 and 4 expression 4 and their serum levels in hepatocellular carcinoma. *Cytokine* 2017;96:75–86.
- Ng KT, Xu A, Cheng Q, Guo DY, Lim ZX, Sun CK, et al. Clinical relevance and therapeutic potential of angiopoietin-like protein 4 in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2014;13:196.
- Zhang H, Wei S, Ning S, Jie Y, Ru Y, Gu Y. Evaluation of TGFbeta, XPO4, eIF5A2 and ANGPTL4 as biomarkers in HCC. *Exp Ther Med* 2013;5:119–27.
- Putoczki T, Ernst M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol* 2010;88:1109–17.

30. Onnis B, Fer N, Rapisarda A, Perez VS, Melillo G. Autocrine production of IL-11 mediates tumorigenicity in hypoxic cancer cells. *J Clin Invest* 2013; 123:1615–29.
31. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, et al. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 2008;133:66–77.
32. Strand DW, Jiang M, Murphy TA, Yi Y, Konvinse KC, Franco OE, et al. PPARgamma isoforms differentially regulate metabolic networks to mediate mouse prostatic epithelial differentiation. *Cell Death Dis* 2012;3:e361.
33. Zhang Y, Zhang Y, Geng L, Yi H, Huo W, Talmon G, et al. Transforming growth factor beta mediates drug resistance by regulating the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in colorectal cancer. *J Biol Chem* 2016; 291:17405–16.
34. Chen L, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes epithelial to mesenchymal transformation by Rho GTPase-dependent activation of ERK1/2. *J Biol Chem* 2006;281:24575–87.
35. Dijk W, Beigneux AP, Larsson M, Bensadoun A, Young SG, Kersten S. Angiopoietin-like 4 promotes intracellular degradation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J Lipid Res* 2016;57:1670–83.
36. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. *Curr Opin Lipidol* 2016;27:249–56.
37. Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2009;46:1283–97.
38. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 2007;11:37–51.
39. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305:626–9.
40. Prigione A, Ruiz-Perez MV, Bukowiecki R, Adjaye J. Metabolic restructuring and cell fate conversion. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1759–77.
41. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA 4th, Ramalho-Santos J, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* 2011;6: e20914.
42. Feng W, Gentles A, Nair RV, Huang M, Lin Y, Lee CY, et al. Targeting unique metabolic properties of breast tumor initiating cells. *Stem Cells* 2014;32: 1734–45.
43. Song K, Kwon H, Han C, Zhang J, Dash S, Lim K, et al. Active glycolytic metabolism in CD133(+) hepatocellular cancer stem cells: regulation by MIR-122. *Oncotarget* 2015;6:40822–35.
44. Chen CL, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, et al. NANOG metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism. *Cell Metab* 2016;23:206–19.
45. Kim K, Jha R, Prins PA, Wang H, Chacha M, Hartley ML, et al. Regorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (HCC): considerations for treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017;80:945–54.
46. Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, et al. Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study. *J Clin Oncol* 2013;31: 3509–16.
47. Cheng AL, Kang YK, Lin DY, Park JW, Kudo M, Qin S, et al. Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2013;31:4067–75.
48. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017;389:56–66.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Retrodifferentiation of Human Tumor Hepatocytes to Stem Cells Leads to Metabolic Reprogramming and Chemoresistance

Karim Fekir, Hélène Dubois-Pot-Schneider, Romain Désert, et al.

Cancer Res 2019;79:1869-1883. Published OnlineFirst March 5, 2019.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-18-2110](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2110)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2019/03/05/0008-5472.CAN-18-2110.DC1>

Cited articles This article cites 48 articles, 11 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/79/8/1869.full#ref-list-1>

Citing articles This article has been cited by 2 HighWire-hosted articles. Access the articles at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/79/8/1869.full#related-urls>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/79/8/1869>.
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Titre : Biomarqueurs et nouvelles approches thérapeutiques ciblant les cellules souches cancéreuses dans le carcinome hépatocellulaire

Mots clés : *Carcinome hépatocellulaire, cellules souches cancéreuses, métabolisme, mitochondrie, plasticité cellulaire, chimiorésistance, PPAR*

Résumé : La plasticité des hépatocytes tumoraux leur permet de se rétrodifférencier en cellules souches cancéreuses (CSC) sous l'influence de signaux pro-inflammatoires. Cette rétrodifférenciation contribue à l'hétérogénéité des carcinomes hépatocellulaires (CHC) et à leur chimiorésistance. Il a été démontré récemment que les processus de différenciation/rétrodifférenciation s'accompagnent d'une reprogrammation métabolique. Notre projet vise à caractériser la reprogrammation métabolique des hépatocytes tumoraux en fonction de leur état de différenciation et à identifier des acteurs du métabolisme cellulaire susceptibles de constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour modéliser la diversité des CHC, nous utilisons des lignées cellulaires qui présentent des aptitudes de différenciation/rétrodifférenciation différentes. Nos résultats montrent que les cellules hépatiques les plus immatures présentent un réseau mitochondrial moins développé, une diminution de l'activité mitochondriale se traduisant par une phosphorylation oxydative, une glutaminolyse, une β -oxydation, une lipogenèse *de novo* et une élongation des acides gras diminuées. En corollaire, la glycolyse basale et la production de lactate sont augmentées. Nous avons également mis en évidence que les CSC hépatiques captent des quantités importantes d'acides gras dans leur environnement et qu'elles les stockent sous forme de gouttelettes lipidiques.

Ces modifications du métabolisme lipidique en fonction de l'état de différenciation cellulaire nous a amenés à étudier la famille de récepteurs nucléaires PPAR, connue pour son rôle dans la différenciation et l'homéostasie métabolique. Nous montrons que PPAR γ favorise la rétrodifférenciation des hépatocytes tumoraux qui se traduit par une augmentation des marqueurs d'EMT et de cellules souches. Cette rétrodifférenciation s'accompagne également d'une diminution du nombre de branchements et de la longueur du réseau mitochondrial ainsi qu'une faible respiration mitochondriale. L'analyse de cohortes de CHC montre que PPAR γ est associé à un mauvais pronostic tandis que PPAR α , qui augmente au cours de la différenciation cellulaire, est lui un facteur de bon pronostic. L'inhibition de PPAR γ augmente la longueur et le nombre de branchements du réseau mitochondrial et réactive l'O₂PHOS ce qui génère une production de ROS, provoquant la mort des CSC hépatiques. L'activation de PPAR α provoque également une augmentation de la longueur du réseau mitochondrial et induit, en association avec le DCA, une mortalité cellulaire dans les CSC. Il apparaît donc intéressant d'évaluer les thérapies ciblant PPAR α ou PPAR γ en complément des chimiothérapies pour limiter la récurrence des CHC.

Title: Biomarkers and novel therapeutic approaches targeting cancer stem cell metabolism in hepatocellular carcinoma

Keywords: *Hepatocellular carcinoma, cancer stem cells, metabolism, mitochondria, cellular plasticity, chemoresistance, PPAR*

Abstract: The plasticity of tumor hepatocytes allows them to retrodifferentiate into cancer stem cells (CSC) under the influence of pro-inflammatory signals. This retrodifferentiation contributes to the heterogeneity of hepatocellular carcinomas (HCC) and their chemoresistance. It has recently been shown that differentiation/retrodifferentiation processes are accompanied by metabolic reprogramming. Our project aims at characterizing the metabolic reprogramming of tumor hepatocytes according to their differentiation state and to identify regulators of cell metabolism that could constitute new therapeutic targets. To model the diversity of HCC, we use cell lines with different differentiation/retrodifferentiation abilities. Our results show that the most immature liver cells exhibit a less developed mitochondrial network, decreased mitochondrial activity resulting in decreased oxidative phosphorylation, glutaminolysis, β -oxidation, lipogenesis and fatty acid elongation. As a corollary, basal glycolysis and lactate production are increased. We also demonstrated that hepatic CSC capture significant amounts of fatty acids from their environment and store them as lipid droplets.

These modifications of lipid metabolism according to the state of cell differentiation led us to study the family of nuclear receptors called PPAR, known for its role in differentiation and metabolic homeostasis. We show that PPAR γ promotes the retrodifferentiation of tumor hepatocytes resulting in an increase in EMT and stem cell markers. This retrodifferentiation is also accompanied by a decrease in mitochondrial network branching and length as well as a low mitochondrial respiration. Analysis of HCC cohorts shows that PPAR γ is associated with a poor prognosis while PPAR α , whose expression increases during cell differentiation, is a good prognostic factor. Inhibition of PPAR γ increases mitochondrial network branching and length and reactivates O₂PHOS, which generates ROS production, leading to the death of hepatic CSC. Interestingly, PPAR α activation causes an increase in the length of the mitochondrial network and induces, in association with DCA, a cell death in CSC. Therefore, it is interesting to evaluate therapies targeting PPAR α or PPAR γ in combination with chemotherapies to limit the recurrence of HCC.