Rôle du facteur de transcription ChREBP dans la carcinogenèse hépatique

Emmanuel Benichou

▶ **To cite this version:**

Emmanuel Benichou. Rôle du facteur de transcription ChREBP dans la carcinogenèse hépatique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7108 . tel-03704307

HAL Id: tel-03704307
https://theses.hal.science/tel-03704307

Submitted on 24 Jun 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.

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE DOCTORALE BioSpc 562

Spécialité : Biologie cellulaire, moléculaire, physiologie et physiopathologie

Thèse de Doctorat

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Paris

Présentée par

Emmanuel BENICHOU

Sujet de Thèse

Rôle du facteur de transcription ChREBP dans la carcinogenèse hépatique

Dirigée par Dr. Renaud DENTIN, CR HDR INSERM

Travaux réalisés à l'Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université de Paris
24 Rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 PARIS

Soutenue publiquement le 18 Juin 2021

Devant le jury composé de

Pr. Valérie PARADIS, PU-PH Université de Paris	Président
Dr. Jean-Ehrland RICCI, DR Université Sophia Antipolis	Rapporteur
Dr. Catherine MULLER, PU Université Toulouse III	Rapporteur
Dr. Gana PANASYUK, DR Université de Paris	Examinateur
Dr. Géraldine GENTRIC, CR UMPC Sorbonnes Universités	Examinateur
Dr. Renaud Dentin, CR Institut Cochin	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Valérie Paradis de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je remercie également très sincèrement mes rapporteurs Jean-Ehrland Ricci et Catherine Muller. Merci enfin à Ganna Panasyuk et Géraldine Gentric d'avoir accepté d'être mes examinateurs.

Un immense merci à Renaud Dentin d'avoir dirigé cette thèse pendant plus de 3 ans. Merci de m'avoir accordé ta confiance et ce dès mon stage de M1. C'est grâce à toi que j'ai décidé de me lancer dans une thèse et je t'en serai toujours reconnaissant. Merci de m'avoir transmis autant de connaissances et de conseils scientifiques, de m'avoir fait participer à différents congrès internationaux, et d'avoir toujours été compréhensif et humain envers moi. Grâce à toi j'ai vraiment pu m'épanouir tout au long de cette thèse donc vraiment un immense merci.

Merci à Frédéric Bouillaud et Anne Lombès de m'avoir acceuilli au sein de leur équipe. Un grand merci pour les connaissances scientifiques que vous m'avez partagées.

Un très grand merci à Carina Prip-Buus d'une part pour toutes les expériences de flux métaboliques, mais aussi pour ta sagesse et tes conseils avisés lors des différentes répétitions de mes présentations. Merci aussi pour tous tes encouragements.

Merci également à Clotilde Alves-Guerra pour tous tes conseils, tes encouragements et les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eues.

Merci beaucoup à Véronique Lenoir, qui m'a également été d'une grande aide durant cette thèse, que ça soit pour les flux métaboliques ou les commandes. Merci également pour ton immense gentillesse et ta bienveillance.

A Sandra Guilmeau, merci beaucoup de m'avoir fait confiance dans le projet CRC mais aussi et surtout pour ton aide précieuse lors des xénogreffes. Merci enfin pour toutes les discussions scientifiques et les conseils que tu as pu me donner tout au long de ma thèse.

Merci aussi à Catherine Postic et Anne-Françoise Burnol pour vos conseils, votre aide, votre gentillesse et vos connaissances scientifiques notamment durant le M2 et la première partie de ma thèse.

Je tiens également à remercier toute mon équipe, Céline, Nourredine, Inès, Maïly, Khwala. Merci particulièrement à Angèle, je te souhaite bon courage dans la suite de ta thèse.

Un grand merci à tous les anciens de l'équipe Dentin. Selin, Bolaji et Boris vous êtes devenus bien plus que des collègues. Selin, merci de m'avoir formé et tous tes conseils quand je suis arrivé en M1. Bolaji, un grand merci pour ton aide sans faille dans le projet. Boris, merci pour toutes ces discussions scientifiques/politiques. Mais surtout, merci à vous trois pour tous les bons moments, les fous rire, les délires qu'on a pu avoir. Grâce à vous, je n'ai pas vu les 3 ans de thèse passer, et j'avoue que votre présence au labo la dernière année m'a beaucoup manquée.

Merci également à tous les membres, actuels ou anciens de l'équipe Postic. Merci plus particulièrement à Dalale, Wafa, Paula et Fadila. Merci à vous pour tous ces bons moments que l'on a pu passer ensemble.

Merci à Manon, Andréa, Hanna et Lisa qui sont devenues entre autres mes acolytes du midi. Vous avez égayé mes repas ! Je vous souhaite à toutes bon courage pour la suite.

Un merci tout particulier à Lélia et Camille qui elles aussi sont devenues des véritables amies. Vous avez toujours été la même quand ça n'a pas été facile. Votre présence jusqu'à la fin a rendu mon expérience à Cochin incroyable. Un grand merci également pour votre aide pendant la rédaction de mon manuscrit et pour tous ces bons moments passés ensembles, au labo ou ailleurs.

Je tenais également à remercier ma famille, et particulièrement mon père et ma mère qui m'ont toujours soutenus, même quand ça n'a pas été facile pour moi.

Enfin un grand merci à Pauline, qui me supporte depuis maintenant bientôt 4 ans. Et merci au petit être qui grandit en toi et que j'ai hâte de rencontrer.

SOMMAIRE

Table des illustrations 9
Table des abréviations 11

Introduction générale

PARTIE I : Physiologie du foie et du carcinome hépatocellulaire

I) Physiologie du foie 16
1) Structure et organisation du foie 16
2) Fonctions biologiques du foie 17

II) Le cancer du foie 18
1) Épidémiologie des cancers du foie 18
2) Mécanismes de la carcinogenèse hépatique et facteurs de risque 20
3) Caractéristiques pathologiques du CHC 22
3.1) Physiopathologie 23
3.2) Anatomopathologie du CHC 23
3.3) Classifications anatomopathologiques 23
3.4) Présentations cliniques et biologiques 24
4) Classification moléculaire des CHC 25
4.1) Altérations chromosomiques 25
4.2) Caractéristiques des CHC associés aux classes G1-G2-G3 et S1-S2 27
5) Diagnostic et traitements du CHC 28
5.1) Diagnostic 28
5.2) Traitements existants 29

PARTIE II : Les voies de signalisation oncogéniques du CHC

I) Les principales voies de signalisations impliquées dans le développement du CHC . 32
1) TP53 33

2) Wnt/β-caténine 33
3) c-Myc 35
4) Voie de signalisation du stress oxydatif NRF2/KEAP1 35
5) Voie de signalisation du TGFβ 36
6) Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) 36
7) La voie RAS/RAF/MAPK 38

II) La voie PI3K/AKT/mTOR dans le CHC 39
1) La signalisation PI3K/AKT/mTOR 40
2) La PI3 kinase 40
3) La protéine kinase AKT 41
4) Les complexes mTORC1 et mTORC2 42
4.1) Le complexe mTORC1 42
4.2) Le complexe mTORC2 43
5) Systèmes de régulation de la voie PI3K/AT/mTOR 43
5.1) Les phosphatases 43
5.2) Les boucles de rétrocontrôle 44
6) Dérégulation de la voie PI3K/AT/mTOR dans le cadre du CHC 44
7) La voie PI3K/AT/mTOR comme cible thérapeutique dans le CHC 45

PARTIE III : Métabolisme hépatique et reprogrammation métabolique de l'hépatocyte cancéreux

I) Métabolisme hépatique physiologique 48
1) Métabolisme du glucose 48
1.1) la glycolyse 49
1.2) la glycogénogenèse 52
1.3) la voie des pentoses phosphates (PPP) 52
2) Métabolisme lipidique 53
2.1) Structure et classification des AG 54
2.2) Le captage des AG par le foie 55
2.3) L'activation des AG en acyl-CoA 55

2.4) la voie de biosynthèse des acides gras 56
2.5) Elongation et désaturation des AG 57
2.6) Synthèse des TG 58
2.7) Synthèse des phospholipides 59
2.8) Oxydation des AG 60
3) Métabolisme de la glutamine 61
4) Voie de biosynthèse des nucléotides 63
4.1) voie de biosynthèse des purines 63
4.2) voie de biosynthèse des pyrimidines 64
5) Le cycle de Krebs 65

II) Métabolisme tumoral du CHC 66
1) La reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse 66
1.1) L'adaptation métabolique des tumeurs : l'effet Warburg 66
1.2) De l'effet Warbug à la meilleure compréhension du métabolisme tumoral 67
2) Altérations des voies métaboliques dans le CHC 70
2.1) Altération de la glycolyse 70
2.2) Altération du métabolisme de la glutamine 71
2.3) Reprogrammation du métabolisme des lipides 73
2.4) Les acides nucléiques 74
3) Oncogènes et suppresseurs de tumeur dans la reprogrammation métabolique . 77
3.1) La β-caténine 77
3.2) TP53 77
3.3) HIF1α 78
3.4) c-MYC 79
3.5) PI3K/AKT/mTOR 80
4) La reprogrammation métabolique comme cible thérapeutique 81

PARTIE IV : Le facteur de transcription ChREBP

I) Structure et régulation de l'activité de ChREBP 84
1) Structure 84

2) Régulation de l'activité de ChREBP dans le foie 86

2.1) Régulation de la transcription de ChREBP 86

2.2) Régulation activatrice de l'activité de ChREBP 86

2.3) Régulation inhibitrice de l'activité de ChREBP 89

2.4) Autres modifications post-traductionnelles et partenaires de ChREBP . 89

II) Rôle de ChREBP et implication dans les mécanismes de carcinogenèse 92

1) Rôle de ChREBP dans le foie 92

1.1) Gènes cibles de ChREBP 92

1.2) Rôle de ChREBP dans le métabolisme glucidique et lipidique 93

2) Fonctions et régulation de ChREBP dans d'autres tissus..... 94

2.1) Implication de ChREBP dans le pancréas endocrine 94

2.2) Implication de ChREBP dans le tissu adipeux 95

3) Implication de CHREBP dans la tumorigenèse 96

Résultats

- **Objectifs 100**
- **Résumés des résultats obtenus 102**

Discussion et perspectives de travail 116

Références Bibliographiques

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 – Organisation du foie et du lobule hépatique

Figure 2 – Mécanismes impliqués dans la transformation maligne de l'hépatocyte

Figure 3 – Les différents stades de gravité du CHC

Figure 4 – Schéma récapitulatif de la classification moléculaire des CHC

Figure 5 – Schéma récapitulatif de la prise en charge des patients atteints de CHC

Figure 6 – Algorithme de la prise en charge des patients atteints de CHC de stade avancé

Figure 7 − La voie Wnt/β-Caténine

Figure 8 − Les principales voies de signalisation induites par les RTKs

Figure 9 − La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

Figure 10 − Structures des sous-unités P85a et P110 de la PI3K

Figure 11 – Schéma représentatif de la voie de signalisation mTOR

Figure 12 − Inhibiteurs pharmacologiques de la voie PI3K/AKT/mTOR

Figure 13 − La glycolyse hépatique

Figure 14 − La voie des pentoses phosphates

Figure 15 − Structure et nomenclature d'un acide gras

Figure 16 − Prise en charge et activation des acides gras

Figure 17 –Synthèse *de novo* des acides gras

Figure 18 − Estérification des acides gras

Figure 19 − Synthèse des phospholipides

Figure 20 − Métabolisme de la glutamine

Figure 21 − Synthèse des purines et des pyrimidines

Figure 22 − Le cycle de Krebs

Figure 23 – La reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse

Figure 24 − L'effet Warburg

Figure 25 − Les « Hallmarks » des cancers

Figure 26 − Reprogrammation du métabolisme du glucose et de la glutamine dans le cancer

Figure 27 – Rôle des oncogènes et suppresseurs de tumeurs dans le métabolisme tumoral

Figure 28 – Inhibiteurs pharmacologiques ciblant le métabolisme tumoral

Figure 29 – Structure du facteur de transcription ChREBP et de son variant ChREBPβ

Figure 30 – Activation de ChREBP par le glucose ChREBP

Figure 31 – Mécanisme d'inhibition de l'activité de ChREBP

Figure 32 – Régulation de la glycolyse et la lipogenèse par SREBP-1c et ChREBP

TABLE DES ABREVIATIONS

18F-FDG : 18F-fluorodésoxyglucose
2-DG : 2-desoxy-D-glucose
3-BP : 3-bromopyruvate
4E-BP1 : Eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
6PGD : 6-phosphogluconate déshydrogenase
α-KG : α-cetoglutarate

ABD : Adaptator Binding Domain
ACC : Acetylcoenzyme A Carboxylase
ACLY : ATP-Citrate Lyase
ACS : Acyl-CoA Synthase
ACSL : Long-chain Acyl-CoA Synthase
ACTA : Aspartate transcarbamylase
AFB1 : Aflatoxine B1
AFP : Alpha-1-fœtoprotein
AG : Acides Gras
AGPAT : Acylglycerol phosphate acyltransferase
AMPc : Cyclic Adenosine Monophosphate
APC : Adenomatous Polyposis Coli
ASH : Alcoholic Steato Hepatatis
ATP : Adenosine Triphosphate

BH : Bcl-2 Homology
bHLH-LZ : basic helix-loop-helix leucine zipper

CAF : Cancer Associated Fibroblast
CAT : Carnitine translocase
CHC : Carcinome HépatoCellulaire
ChoRE : Carbohydrate Response Element
ChREBP : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein
CKI ε : Casein kinase I epsilon
CL : Cardiolipin
CPS1 : Carbamoyl-phosphate synthase 1
CPT1 : Carnitine Palmitoyl Transferase 1
CS : Citrate synthase
CTP : Cytidine triphosphate

DAG : Diacylglycerid
DAMPs : Damage Associated Molecular Pattern
DCP : Des-gamma carboxyprothrombine
DEPTOR : DEP-domain-containing mTOR interacting protein
DGAT : Diacylglycerol acyltransferase

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor
Elovl : Elongation of very long chain fatty acid
EMT : Transition épithelio-mésenchymateuse
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

F1,6BP : fructose 1,6-bisphosphate
FABP : Fatty Acid Binding Protein
FADH : Flavine Adenine Dicluneotide
FAS : Fatty Acid Synthase
FAT : Fatty Acid Translocase
FATP : Fatty Acid Transporter Proteins
FGF19 : Fibroblast Growth Factor 19
FGF21 : Fibroblast Growth Factor 21
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor
FXR : Farnesoid X receptor

G1P : glucose 1-phosphate
G6P : glucose 6-phosphate
G6PDH : 6-phosphate deshydrogenase
G6PG : Gluconate 6-phosphate
GK : Glucokinase
GKRP : Glucokinase Regulatory Protein
GLS : Glutaminase
GLUD : Glutamate dehydrogenase
GLUT : Glucose Transporter
GOT : Glutamate–oxaloacetate transaminase
GPAT : Glycerol 3-phosphate acyltransferase
GPT : Glutamate–pyruvate transaminase
GRACE : Glucose Response Conserved Element
GS : Glutamine synthase
GS : Glycogène synthase
GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3-beta
GSM : Glucose Sensing Module
GTP : Guanosine triphosphate

HAT : Histone acetyltransferase
HBV : Hepatatis B Virus
HBx : protein X of hepatitis B virus
HCV : Hepatatis C Virus
HGF : Hepatic growth factor
HGFR : Hepatic growth factor receptor
HIF-1 : Hypoxia Inducible factor 1
HK : Hexokinase
HMGB1 : High mobility group box-1

IDH : Isocitrate desydrogenase
IGF2 : Insulin-like growth factor 2
IGFR : Insulin-like growth factor
IMP : Inosinic Acid

L-PK : Liver Pyruvate Kinase
LDH : Lactate dehydrogenase
LID : Low glucose Inhibitory Domain
LPL : Lipopropein lipase

LXR : Liver X receptor

MCR : Mondo Conserved Region
ME : Malic Enzyme
MEC : Matrice Extra Cellulaire
mLST8 : mammalian Lethal with Sec13 protein 8
Mlx : Max Like Protein
mlxipl : mlx interacting protein like
MODY : Mature Onset Diabetes of the Youth
mSIN1 : mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
mTORC2 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 2
MUFA : Mono Unsaturated Fatty Acid

NADH : Nicotine Amide Dinucleotide
NADPH : Nicotine Amide Dinucleotide Phosphate
NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH : Non-Alcoholic Steato Hepatatis
NES : Nuclear Export Signal
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NLS : Nuclear Localization Signal

OGA : O-GlcNAcase
OGT : O-GlcNac transferase
OXPHOS : Oxidative Phosphorylation

p70S6K : S6 Kinase 1
PA : Phosphatidic Acid
PAHSAs : Palmitic acid esters of hydroxy stearic acids
PAP-1 : Phosphatidic acid phosphohydrolase
PC : Phosphatidylcholine
PC : Pyruvate carboxylase
PD1 : Program cell death
PDCD4 : Programmed Cell Death Protein 4
PDGF : Platelet-derived growth factor
PDH : Pyruvate dehydrogenase
PDK1 : Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PDL1 : Program cell death ligand
PEP : Phosphoenolpyruvate
PFK1 : 6-Phosphofructose-Kinase-1
PH : Pleckstrin homology
PHLPP1/2 : Pleckstrin Homology domain leucin-rich repeat protein phosphtases 1 and 2
PIKK : Phosphatidyl Inositol Kinase-related kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PK : Pyruvate kinase
PKA : Protein kinase A
PKB : Protein Kinase B
PKC : Protein kinase C
PL : Phospholipid
PP2A : Protein Phosphatase 2A

PPI : protein phosphatase I
PRAS40: Proline Rich Akt Substrate 40
pRb : Retinoblastoma protein
PRPP : Phosphoribosylpyrophosphate
PSAT : Phosphoserine transaminase
PTEN : Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome ten
PUFA : Poly Unsaturated Fatty Acid

R5P : Ribose 5-phosphate
RAPTOR : Regulatory associated protein of mTOR
RAS-MAPK : Ras-mitogen activated protein kinase
RBD : RAS Binding Domain
RE : endoplasmic Reticulum
RICTOR : Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RPIA : Ribose 5-phosphate isomerase
RPS6K : Ribosomal protein S6 kinase
RTKs : Récepteurs à activité tyrosine kinase
Ru5P : Ribulose 5-phosphate

SCD : Stearoyl-CoA Desaturase
SDH : Succinate dehydrogenase
SFA : Saturated Fatty Acid
SGK1 : Serum and glucocorticoid-induced protein kinase
SH2 : Src Homology 2
SIRT1 : Sirtuin 1
Src : Sarcome proto-oncogene
SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c

TCF : T-cell factor
TEP : Tomographie par émission de positrons
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TG : Triglyceride
TGFα : Transforming growth factor alpha
TGFβ : Transforming growth factor β
TIGAR : Tumor protein 53-induced glycolysis and apoptosis regulator
TKT : Transketolase
TLRs : Toll like Receptor
TR : Thyroid Hormone Receptor
TSC1/2 : Tuberous sclerosis complex 1/2
TYMS : Thymidylate synthase

UDP-glucose : Uridine diphosphate-glucose
UMPS : Uridine monophosphate synthase

VEGF : Vascular endothelial growth factor
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

X5P : Xylulose 5-phosphate

Introduction générale

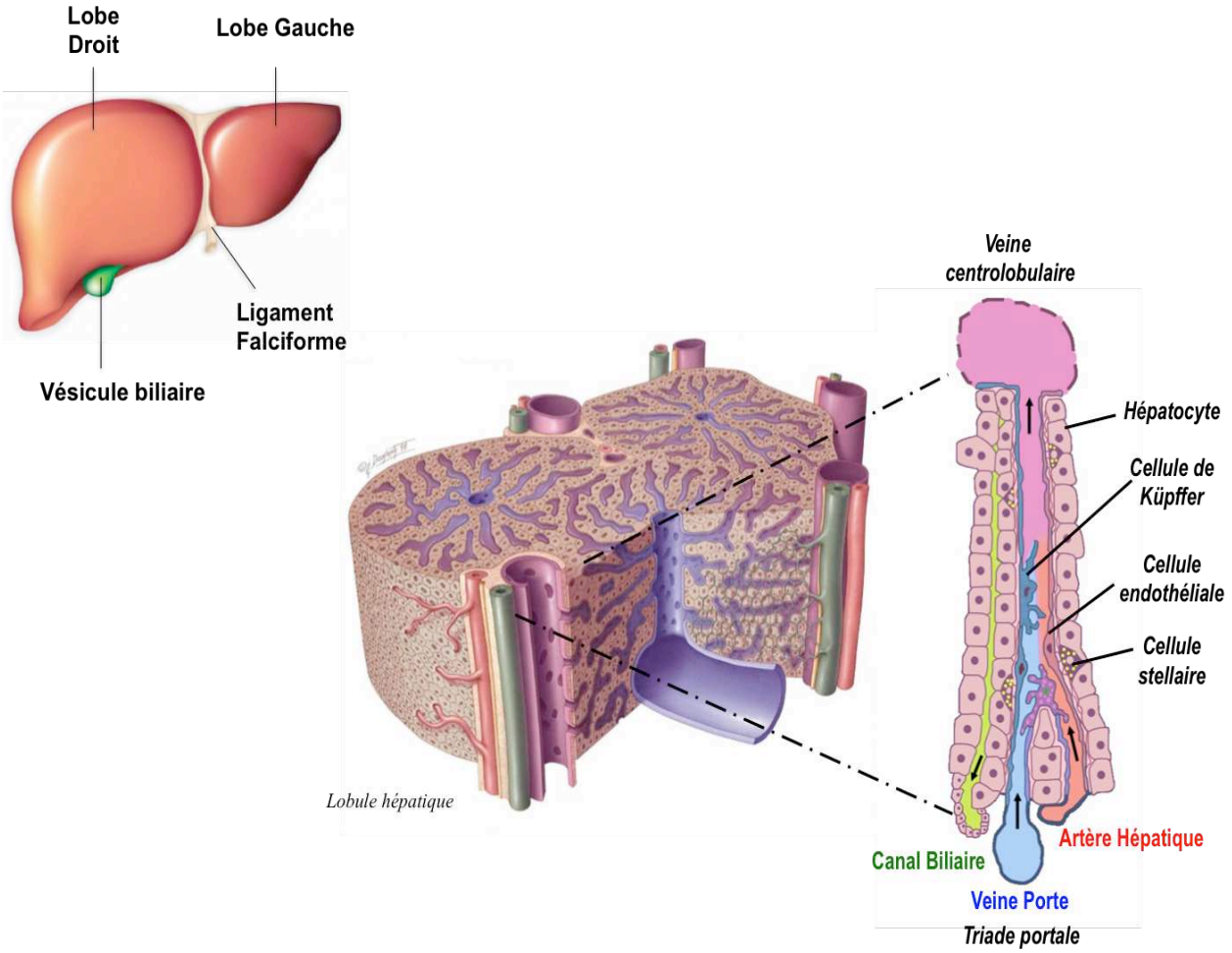


Figure 1: Organisation du foie et du lobule hépatique
(adapté de Stenvall et al., 2014)

Partie 1 : Physiologie du foie et du Carcinome Hépatocellulaire (CHC)

I. Physiologie du foie

1) Structure et organisation du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Il assure plusieurs fonctions essentielles telles que la détoxification et l'épuration mais aussi des fonctions de synthèse et de stockage. D'un point de vue anatomique, le foie est constitué de deux lobes – gauche et droit – séparés par l'insertion du ligament falciforme chez l'homme, et de quatre lobes distincts chez la souris et le rat. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. Ce lobule s'organise autour d'une veine centrolobulaire à partir de laquelle les travées hépatocytaires s'étendent jusqu'aux espaces porte situés à chaque sommet du lobule. Ces espaces portes sont constitués d'un canal biliaire, d'une veinule hépatique et d'une artère hépatique permettant ainsi une double irrigation du foie : la majorité de l'apport sanguin hépatique provient de la veine porte, qui transporte nutriments, hormones, facteurs de croissance provenant de l'intestin. L'autre partie de l'apport sanguin se fait via l'artère hépatique qui lui est riche en oxygène. Le foie est composé de différents types cellulaires qui s'organisent dans le lobule hépatique et qui fonctionnent conjointement pour assurer toutes les fonctions hépatiques (Figure 1) (Trefts et al., 2017).

Les hépatocytes représentent à eux seuls 80% de la masse hépatique. Ils ont une forme polyédrique et sont organisés en travées. Ces cellules ont la particularité d'être parfois polynucléés et polarisées : elles possèdent une face exposée au sang séparée par un endothélium et sur leur face opposée, leurs membranes sont accolées pour former un réseau de canalicule biliaire. Ce sont les hépatocytes qui remplissent la majorité des fonctions hépatiques, dont la fonction métabolique (Abdel-Misih et al., 2010). En effet, équipés d'abondantes mitochondries et de réticulum endoplasmique, ce sont de véritables usines de production pour les acides biliaires et les produits du métabolisme du cholestérol. Les hépatocytes assurent également beaucoup d'autres fonctions métaboliques, telles que la

formation d'urée, de la glutamine et du glucose via la néoglucogenèse. En dehors de ce rôle de synthèse, ils ont un rôle de détoxification de molécules provenant de l'intestin du fait de la présence d'un arsenal d'enzymes de détoxification appelées collectivement enzymes p450 (DM Grant, 1991).

- Les cholangiocytes (cellules épithéliales biliaires) sont le deuxième type de cellules hépatiques le plus abondant dans le foie. Ils forment les canaux biliaires et leur principale fonction est de permettre le transport de la bile vers l'intestin.
- Les cellules sinusoïdales endothéliales, représentant environ 20% des cellules du foie, forment la paroi des sinusoïdes et permettent l'apport de sang aux différentes cellules hépatiques. Elles constituent ainsi la première barrière entre les hépatocytes et le sang.
- Les cellules de Kupffer sont des macrophages spécialisés du foie, localisés à l'intérieur des sinusoïdes. Ces macrophages dérivent de monocytes circulants, prolifèrent dans le foie et constituent le composant majoritaire du système mononucléaire phagocytaire. Elles assurent un rôle fondamental dans la réponse aux pathogènes dans le foie et la circulation. Ces macrophages assurent un rôle fondamental en participant à l'élimination des déchets cellulaires et des pathogènes, ainsi qu'au recrutement d'autres cellules immunitaires en cas d'inflammation (Bilzer et al., 2006)
- Finalement, les cellules étoilées, également appelées cellules stellaires hépatiques ou cellules de Ito, sont situées dans l'espace de Disse et jouent un rôle majeur dans le développement et la progression de la fibrose hépatique en contrôlant la production de la matrice extracellulaire. Il a été ainsi montré qu'en cas de lésions hépatiques, ces cellules sont activées et acquièrent un phénotype myofibroblastique, soulignant leur rôle dans la mise en place de la fibrose hépatique (Khomich et al., 2019). Elles jouent également un rôle dans le stockage de la vitamine A et D.

2) Fonctions biologiques du foie

Le foie intervient dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles au bon fonctionnement de l'organisme. Il joue un rôle déterminant dans la régulation du volume sanguin, dans l'immuno-surveillance aux pathogènes, dans la synthèse de protéines essentielles à la vie comme l'albumine (principale protéine du sang), ou encore des facteurs de coagulation sanguine. Il joue un rôle important dans le processus de digestion des graisses en permettant la synthèse de la bile qui est libérée dans l'intestin grêle après avoir été stockée dans la vésicule biliaire. Le foie à également un rôle majeur dans la détoxification en

favorisant la destruction de composés xénobiotiques endogènes ou exogènes, telles que l'alcool, l'urée, ou encore des agents pathogènes qui proviennent de l'intestin, qui seront ensuite éliminés de l'organisme via la bile (Trefts et al., 2017, Abdel-Misih et al., 2010). Le foie assure également un contrôle endocrinien majeur dans l'organisme en synthétisant et secrétant des hépatokines telles que FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21) qui joue un rôle important dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline au niveau périphérique (Keinicke et al., 2020).

En plus de ces fonctions, le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie énergétique en contrôlant le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Il contrôle en effet le métabolisme du cholestérol, de l'urée, des acides aminés et l'homéostasie des deux sources énergétiques majeures, le glucose et les acides gras, en fonction des besoins nutritifs requis pour assurer les fonctions essentielles de l'organisme. Dans la seconde partie de ce chapitre introductif, seront particulièrement développées les fonctions de contrôle par le foie du métabolisme du glucose, des acides gras et de la glutamine.

En conclusion le foie est un organe central de l'organisme jouant un rôle important dans plusieurs fonctions biologiques essentielles dont la régulation de l'homéostasie métabolique. Du fait de ce rôle central, il est exposé continuellement à des agressions endogènes et exogènes qui peuvent à terme entrainer des atteintes chroniques du foie. Ces atteintes exposent au risque de développer un cancer du foie tel que le carcinome hépatocellulaire (CHC), ce dernier se développant très rarement sur un foie sain.

II. Le cancer du foie

1) Épidémiologie des cancers du foie

En 2020, le cancer du foie est le sixième cancer le plus diagnostiqué et la troisième cause de mort par cancer dans le monde (https://gco.iarc.fr/). Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogenèse hépatique représente un enjeu de santé publique majeur. Son ratio incidence/mortalité se rapproche de 1 principalement dû au fait que la plupart des cas sont détectés à des stades avancés de la maladie et par le fait que ces cancers présentent une forte résistance aux traitements thérapeutiques aujourd'hui disponibles. En 2018 par exemple,

841 000 cas de cancers du foie ont été diagnostiqués et on estime à 782 000 le nombre de décès liés à ce cancer dans le monde (Bray et al., 2018).

La survenue des cancers du foie n'est pas uniformément répartie sur l'ensemble des régions du globe. En effet, la majorité des cas sont observés en Afrique sous-saharienne et en Asie de l'est. La Chine représente à elle seule plus de 50% des cas de cancers hépatiques dans le monde avec des taux d'incidence remarquablement élevés pour les hommes et pour les femmes. Les régions à risque intermédiaire sont représentées par certains pays européens comme l'Italie, l'Espagne ou la Grèce, et les régions à faible risque par les pays scandinaves et d'Amérique du nord (Dasgupta et al., 2020).

Il existe plusieurs types de cancer primitifs du foie.

- Les **hépatobastomes** sont des cancers très rares qui se développent chez les enfants, généralement de moins de 4 ans. Les cellules de l'hépatoblastome sont similaires aux cellules hépatiques fœtales. Environ deux enfants sur trois atteints de ces tumeurs sont traités avec succès par chirurgie et chimiothérapie, bien que les tumeurs soient plus difficiles à traiter si elles se sont propagées à l'extérieur du foie (Hiyama, 2014).
- Les **angiosarcomes** sont également des cancers rares qui prennent source dans les cellules tapissant les vaisseaux sanguins du foie. Ces tumeurs se développent rapidement et sont généralement trop répandues pour être réséquées chirurgicalement au moment où elles sont trouvées. La chimiothérapie et la radiothérapie peuvent aider à ralentir la maladie, mais ces cancers sont généralement très difficiles à traiter (Rujeerapaiboon and Wetwittayakhlang, 2020).
- **Les cholangiocarcinomes,** connus comme les cancers des canaux biliaires, représentent 10 % à 20 % de tous les cancers du foie (Rizvi et al., 2018). Ces cancers commencent dans les cellules qui tapissent les petits canaux biliaires dans le foie.
- **Le carcinome hépatocellulaire (CHC)** représente enfin le cancer primitif du foie le plus fréquent chez l'adulte (75 à 85% des cas). Il touche les hépatocytes (Torre et al., 2012). L'incidence mondiale du CHC est hétérogène en raison de la prévalence variable des facteurs de risque. En 2018 on estime que 72% des cas surviennent en Asie (dont plus de 50% en Chine), 10% en Europe, 7,8% en Afrique, 5% en Amérique du Nord et 4,5% en Amérique latine (McGlynn and London, 2011). Les CHC peuvent aussi très rapidement métastasés dans d'autres organes du corps incluant dans la majorité des cas les poumons (55 %), les ganglions

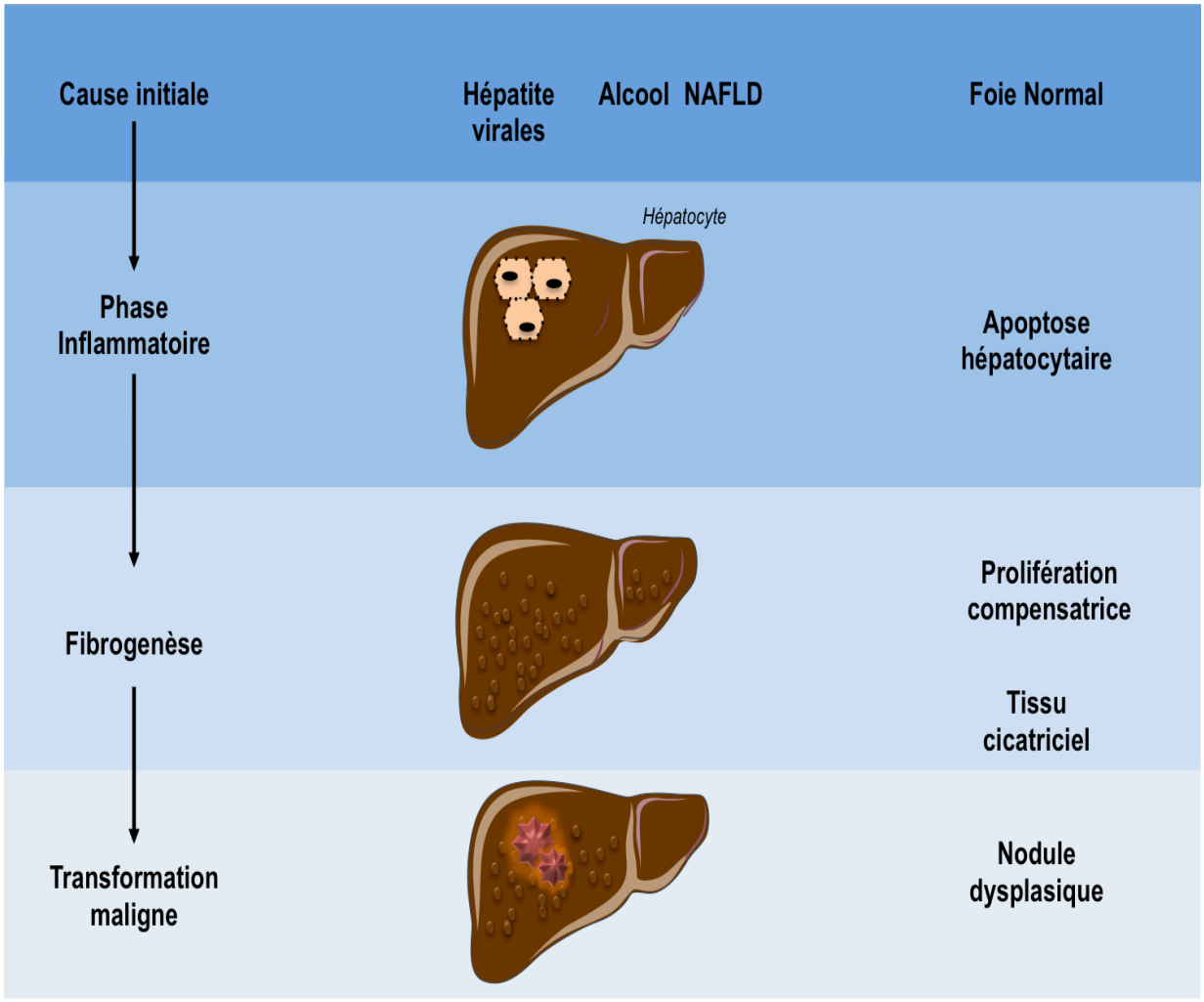


Figure 2: Mécanismes impliqués dans la transformation maligne de l'hépatocyte

Le CHC survient dans le cadre d'une inflammation chronique du foie et est plus étroitement liée à une hépatite virale chronique (hépatite B ou C) ou à une exposition à des toxines comme l'alcool ou l'aflatoxine. Certaines maladies chroniques, comme l'hémochromatose et le déficit en alpha 1-antitrypsine, augmentent considérablement le risque de développer un CHC. Le syndrome métabolique et la NASH sont également de plus en plus reconnus comme des facteurs de risque. A terme, cet environnement inflammatoire et fibrogénique est propice pour l'apparition de foyer dysplasiques, qui mèneront à l'initiation et au développement du CHC.

(53 %), les os (28 %), les glandes surrénales (11 %), le péritoine (11 %), et le cerveau (2 %) (Wu et al., 2017). Le CHC est un cancer d'une importante hétérogénéité du fait des différentes composantes génétiques qui accompagnent son développement. L'incidence des CHC a ainsi sensiblement augmenté ces dix dernières années dans le monde en lien avec plusieurs facteurs environnementaux et biologiques.

2) Mécanismes de la carcinogenèse hépatique et facteurs de risques

Dans ce contexte, l'atteinte la plus caractéristique dans la carcinogenèse du CHC est une lésion hépatique chronique sous-jacente, qui conduit à des cycles répétés de mort des hépatocytes, d'inflammation et de prolifération cellulaire compensatrice. Cette régénération répétée du foie fournit un environnement mutagène et conduit à terme au développement du CHC. Ces mécanismes de la tumorigenèse hépatique sont par conséquent des processus comportant plusieurs étapes : les hépatites chroniques et la cirrhose étant le plus souvent les étapes pré-néoplasiques durant lesquelles des phénomènes d'inflammation et de sénescence réplicative vont entrainer une accumulation d'altérations génétiques qui vont favoriser la sélection d'hépatocytes transformés (Figure 2) (Ringelhan et al., 2018, Fattovich et al., 2004). Les hépatites virales, la consommation abusive d'alcool et le développement de la stéatose hépatique non alcoolique ou NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) sont les facteurs de risques les plus importants pour le développement du CHC.

- **Infection par les hépatites virales B et C**

L'un des facteurs de risque majeur au développement d'un CHC est l'hépatite virale en réponse aux virus de l'hépatite B (HBV) ou de l'hépatite C (HCV). Ainsi, environ 10 à 25% des patients atteints de l'hépatite B développeront un CHC au cours de leur vie. Contrairement aux autres hépatites, ce CHC pourra se développer sur un fond cirrhotique comme non cirrhotique (Ringelhan et al., 2017). Les réactions immunitaires lors d'une infection persistante par le HBV ou le HCV sont insuffisantes pour éliminer le virus, ce qui entraîne des lésions hépatiques progressives et un cycle de réparation menant à terme à des lésions oncogéniques. Le CHC résultant de l'infection par HBV peut être la conséquence de l'activation de protéines pro-oncogéniques virales, comme la protéine X du virus de l'hépatite B (HBx) qui est capable notamment d'altérer l'expression de gènes régulant la prolifération ou d'inactiver le gène suppresseur de tumeur *TP53 (*Ringelhan et al., 2018*)*. D'autres études ont également montré que l'infection par le HBV augmente les évènements

mutationnels sur le génome entrainant la carcinogenèse hépatique. On notera particulièrement les mutations intervenant sur les gènes TERT (telomerase reverse transcriptase, codant pour la télomérase) ou CCNE1 (codant pour la cycline E, protéine du cycle cellulaire) (Neuveut et al., 2010). L'infection par HCV est également un facteur de risque du CHC. En effet, 80% des patients atteints de l'hépatite C développeront une hépatite chronique qui évoluera vers la cirrhose pour 20% d'entre eux. Dans le cas de l'hépatite C, contrairement à l'infection par HBV, l'émergence du CHC se fait presque exclusivement dans un contexte de cirrhose (Chattergoon et al., 2014). De plus, il a été montré que le virus de l'hépatite C induit la transformation maligne des hépatocytes par action sur les mécanismes de différenciation et de prolifération cellulaire (Vescovo et al., 2016).

- **L'alcool**

En Europe, près de la moitié des CHC est liée à la consommation abusive d'alcool. Des études menées aux Etats-Unis ont également montré que l'alcoolisme chronique augmente de 2 à 4 fois le risque de développer un CHC (European Association for the Study of Liver, 2012). Un stress toxique continu dû à la consommation chronique d'alcool peut entraîner une stéatose hépatique puis une stéatohépatite alcoolique (ASH) et à terme un CHC. Dans l'ASH, plusieurs études ont décrit que l'accumulation de DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) spécifiques dans les hépatocytes serait responsable de la transformation cellulaire. On pourra citer l'exemple de l'acétaldéhyde, produit du métabolisme de l'alcool, ou de la protéine HMGB1 (High mobility group box-1) sécrétée dans le milieu extra-cellulaire lors de l'apoptose ou de la nécrose des hépatocytes, qui peuvent tout deux activer l'inflamasome en modulant l'activité de NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3). NLRP3 est un récepteur cytosolique qui reconnaît ces DAMPs dérivés du métabolisme de l'alcool. Lorsqu'il est activé, NRLP3 met en place l'inflammasome qui conduit à la mort cellulaire et à terme à l'initiation tumorale (Ge et al., 2014). Ainsi, l'inhibition de NLRP3 et par conséquent de l'inflammasome a un effet bénéfique sur l'ASH induite par l'éthanol et sur l'initiation et le développement du CHC (Iracheta-Vellve et al., 2015).

- **La NAFLD**

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), est une manifestation hépatique du syndrome métabolique. Sa prévalence, en augmentation constante dans le monde (30% aux Etats-Unis), est fortement corrélée à l'augmentation de l'incidence des pathologies de

l'obésité, du diabète, des dyslipidémies et des troubles associés au syndrome métabolique (Rinella et al., 2018). Elle regroupe différentes atteintes hépatiques allant de la simple stéatose réversible et bégnine, à la stéatohépatite inflammatoire (NASH), la fibrose, la cirrhose et finalement au CHC. Cependant, à ce jour, les mécanismes sous-jacents qui sont impliqués dans le développement du CHC sur un foie stéatosé restent partiellement élucidés. Des études ont néanmoins montré que les acides gras saturés, le cholestérol et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvaient activer les récepteurs TLRs (toll like receptor) et notamment l'isoforme TLR4 dans le foie pour induire une réponse l'inflammation chronique de bas bruit. Cette inflammation chronique va avoir pour effet de recruter certaines cellules du système immunitaire comme les macrophages ou les lymphocytes cytotoxiques induisant ainsi des cycles d'apoptose/régénération des hépatocytes pouvant mener au développement d'une fibrose puis d'une cirrhose et à terme à l'initiation et au développement du CHC (Szabo and Petrasek, 2015).

- **Autres facteurs de risques**

Parmi les autres facteurs de risques, on trouve l'exposition à l'aflatoxine B1 (AFB1), une mycotoxine pouvant contaminer la nourriture en Asie et en Afrique, lorsque celle-ci n'est pas conservée dans de bonnes conditions. Au niveau mécanistique, l'intoxication à l'AFB1 entraine notamment des mutations du gène suppresseur de tumeur TP53 (Hamid et al., 2013). L'exposition à l'acide aristolochique, présent dans la médecine traditionnelle chinoise, ou encore le tabac sont aussi des facteurs de risques (Nault and Letouzé, 2019). On peut également citer des maladies génétiques rares comme l'hémochromatose ou la déficience en α-antitrypsine, qui entrainent le développement d'une cirrhose puis d'un CHC, ou encore les diabètes de type MODY (Mature Onset Diabetes of the Youth) qui favorisent l'émergence d'adénomes pouvant évoluer vers des CHC avec le temps (Dragani, 2010).

3) Caractéristiques pathologiques du CHC

Macroscopiquement, le CHC se présente sous forme de nodules de taille variable pouvant aller de quelques millimètres à plus de 20 centimètres de diamètre dans certains cas. Il se définit ainsi comme étant une tumeur épithéliale maligne d'origine hépatocytaire.

3.1) Physiopathologie

Comme décrit plus haut, lors d'atteintes hépatiques répétées ou de maladies chroniques du foie, un tissu cicatriciel va progressivement apparaître près des zones où les cellules hépatiques ont été endommagées. Il s'agit du phénomène de fibrose hépatique, où les cellules étoilées se mettent à synthétiser du collagène et ainsi altérer la structure de la matrice extracellulaire (MEC) et le fonctionnement du microenvironnement hépatique. La fibrose peut au fil du temps évoluer vers la cirrhose. Dans ce cas le tissu cicatriciel va entourer les amas de cellules hépatiques qui régénèrent : ce sont les nodules de régénération. Selon l'avancée des dommages subis par le foie, l'étendue de la fibrose sera plus ou moins importante et plusieurs stades successifs vont alors se succéder avant l'installation de la cirrhose. Celle-ci est définie par une fibrose « mutilante » avec destruction de l'architecture normale du foie et la présence de nodules de régénération (Libbrecht et al., 2005).

L'émergence du CHC chez des patients ne présentant aucune forme de cirrhose a toutefois également été constatée et a fait naître l'idée selon laquelle il pourrait exister des CHC "sur foie sain" comme dans les cas de CHC de type fibrolamellaire. Dans de rares cas, le CHC peut en effet survenir en l'absence de fibrose hépatique comme l'ont démontré des études histologiques. Les facteurs de risque qui y sont associés vont alors plutôt relever de l'obésité et de certains génotoxiques (Brancatelli et al., 2002).

3.2) Anatomopathologie du CHC

Les cellules tumorales sont morphologiquement atypiques et peuvent entre autres contenir des corps de Mallory (amas de microfilaments polymérisés), des amas de bile, du glycogène et enfin des gouttelettes lipidiques. L'architecture tumorale en tant que telle tente plus ou moins de reproduire l'architecture retrouvée dans un foie normal, avec des rapports nucléocytoplasmiques et une densité cellulaire toutefois plus élevés, mais également un réseau sinusoïdal nettement diminué. Les travées de cellules tumorales sont typiquement plus épaisses que dans le foie normal. De même, les cellules issues d'un CHC peuvent aussi présenter une architecture pseudoglandulaire avec formation d'acini (Kojiro, 2005).

3.3) Classifications anatomopathologiques

Plusieurs systèmes de classification anatomopathologiques du CHC existent et reposent sur l'état de différenciation des cellules de l'hépatocarcinome. En effet, plus le foie tumoral va

Auteurs	Principales catégories	Caractéristiques
World Health Organization, 2000	Bien différencié	Architecture trabéculaire ou pseudo-acineuse Atypie cyto-nucléaires modérées
	Moyennement différencié	Architecture trabéculaire Atypie cyto-nucléaires marquées
	Peu différencié	Architecture compacte Atypie cyto-nucléaires plus marquées
Edmonson et Steiner, 1954	Grade I	Hépatocytes très bien différenciés semblables à des cellules normales
	Grade II	Hépatocytes bien différenciés présentant de faibles changements de structure
	Grade III	Hépatocyte pléomorphe à noyaux proéminents Présence de cellules géantes plurinuclées
	Grade IV	Hépatocytes anaplasiques Cytoplasme réduit et noyaux proéminents

Figure 3: Les différents stades de gravité du CHC selon les classifications de la WHO et d'Edmonson

La WHO (Who classification of tumors) répertorie trois stades de gravité du CHC allant des CHC bien différenciés, moyennement différenciés et peu différenciés. La classification d'Edmonson et Steiner stratifie les CHC en quatre grades (Grade 1 à 4).

ressembler à du foie normal, plus il sera considéré comme étant bien différencié. L'organisation mondiale de la santé a d'ailleurs proposé de classer les CHC selon leur état de différenciation avec des tumeurs très, moyennement et peu différenciées. Le grade d'Edmondson-Steiner tient également compte de son côté du degré de différenciation des tumeurs avec (Edmondson and Steiner, 1954) (Figure 3) :

• Le grade I qui correspond à un carcinome très bien différencié, difficile à distinguer du tissu non tumoral.

• Le grade II où les hépatocytes tumoraux possèdent encore un état bien différencié mais avec des changements légers mais bien définis.

• Le grade III où les cellules cancéreuses d'origine hépatocytaire présentent de larges noyaux et quelques cellules géantes plurinucléées.

• Le grade IV où les cellules cancéreuses présentent un état majoritairement dédifférencié avec un cytoplasme grandement réduit et des noyaux de plus en plus volumineux.

L'intérêt de cette classification repose sur le fait de pouvoir rapidement, efficacement et uniformément déterminer le niveau d'agressivité tumorale. Une même tumeur peut toutefois présenter différents aspects et grades selon la zone étudiée : on parle alors d'hétérogénéité intratumorale.

3.4) Présentations cliniques et biologiques

Souvent asymptomatique à ses débuts, le CHC sur foie cirrhotique est rarement diagnostiqué par des manifestations cliniques. Les symptômes les plus fréquents sont souvent masqués par ceux de la cirrhose, notamment avec une altération de l'état général, comme l'hyporexie et/ou la perte de poids. Les complications de la cirrhose peuvent aussi être révélatrices de la présence d'hépatocarcinome comme lors de la présence d'une décompensation ascitique, d'ictère ou d'hémorragie digestive. Dans de rares cas, les circonstances de découverte de CHC peuvent aussi découler de l'identification de métastases (osseuse, pulmonaire ou surrénalienne).

Dans ce contexte, les principaux marqueurs biologiques utilisés lors du dépistage du CHC sont:

• L'AFP (alpha-1-fœtoprotéine), dont la synthèse diminue rapidement à la naissance pour s'interrompre à l'âge adulte. L'augmentation des concentrations circulantes d'AFP à l'âge adulte est souvent synonyme de la présence d'un CHC avec une spécificité d'environ 60%. Cependant, en présence de tumeurs de petites tailles, les niveaux d'AFP affichés peuvent être normaux. Par ailleurs, l'AFP peut également servir de marqueur pour surveiller la progression ou le risque de récidive de la tumeur. Elle a également une valeur sur le pronostic de survie. En effet, plus le niveau circulant d'AFP est élevé, moins bon est l'espérance de vie des patients atteints d'un CHC (Fujiyama, 2002).

• La DCP (des-gamma carboxyprothrombine) dont la synthèse fait suite à l'acquisition par les cellules tumorales d'un déficit en précurseur de la prothrombine. Elle permet de différencier les patients cirrhotiques présentant ou non un CHC avec une spécificité proche de 90%. Son augmentation étant d'autre part indépendante de celle de l'AFP, l'association de ces deux marqueurs apporte un gain de sensibilité considérable dans le dépistage du CHC. Enfin, sa concentration sera fonction du volume tumoral (Marrero et al., 2003).

• La glypican-3 qui est une protéine extracellulaire seulement exprimée au cours du développement du CHC. Selon certaines études, sa spécificité à l'hépatocarcinome atteindrait 100% et sa détermination en association avec celle de l'AFP augmenterait la sensibilité de détection du CHC (Capurro et al., 2003).

4) Classification moléculaire des CHC

4.1) Altérations chromosomiques

Durant le processus d'initiation et du développement du CHC, les hépatocytes tumoraux accumulent un grand nombre de réarrangements chromosomiques, ce qui à terme conduit à la formation de caryotypes très complexes et à un nombre conséquent de mutations. Parmi ces réarrangements, nous avons notamment le phénomène de délétion chromosomique. En effet, durant ces 20 dernières années, plusieurs études ont identifié le bras chromosomiques les plus fréquemment perdus dans les cas de CHC, à savoir les chromosomes: 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p et 6q (Niu et al., 2016). Ainsi, de façon générale, les CHC peuvent être divisés en deux groupes selon l'état de leur stabilité chromosomique: 1) dans le premier, on observe une certaine stabilité chromosomique et la mutation de la β-caténine avec une perte du chromosome 8p. Ceci est associée à des tumeurs de grandes tailles et une moindre prévalence

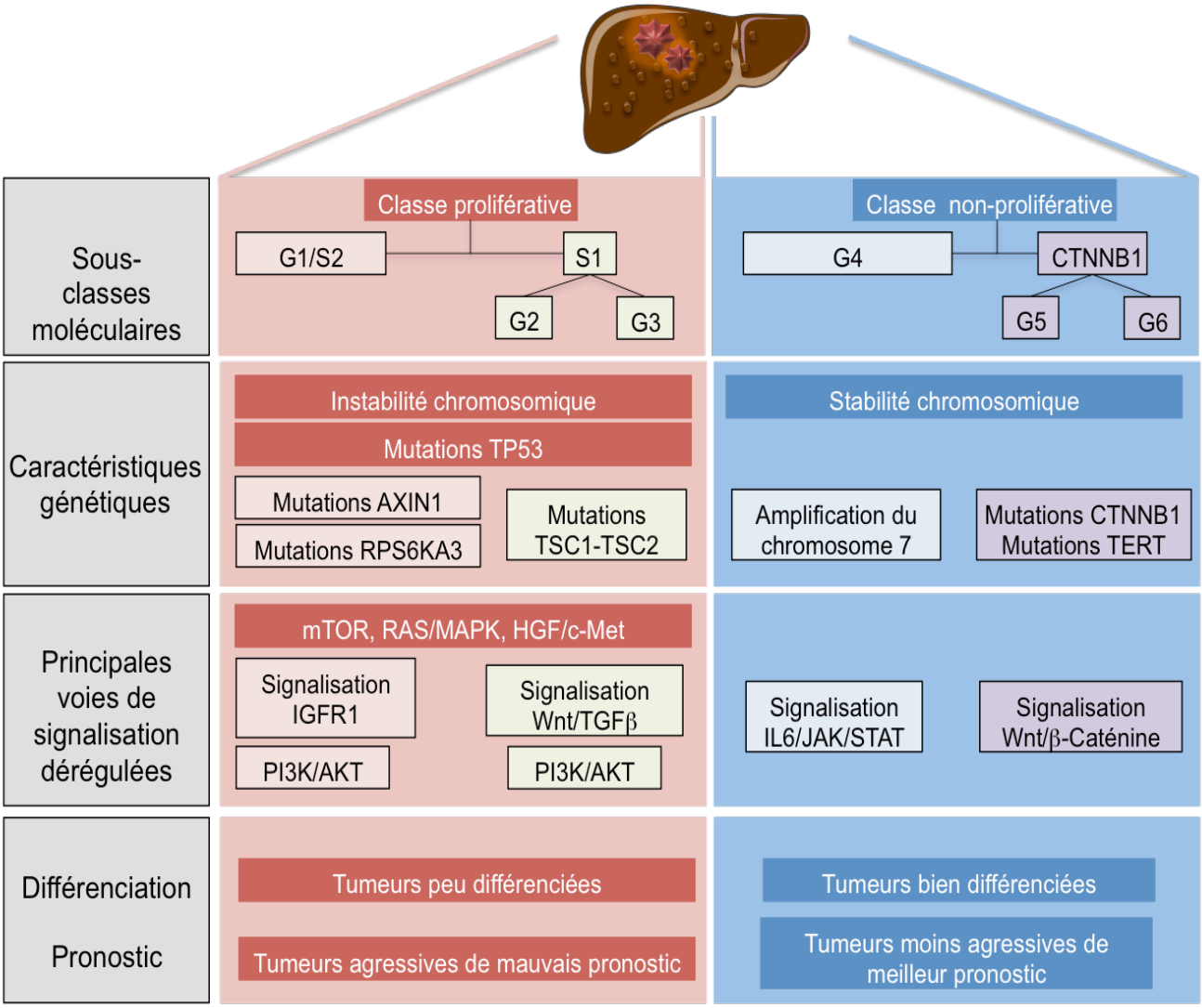


Figure 4: Schéma récapitulatif de la classification moléculaire des CHC

Les principales classes et sous-classes de CHC sont caractérisées par leur profil d'expression génique et d'autres caractéristiques, comme les voies de signalisation affectées dans les tumeurs, le degré de différenciation cellulaire et le pronostic vital.

d'infection par le virus de l'hépatite B. 2) dans le second groupe, on observe une importante instabilité chromosomique. Des mutations affectant certains gènes suppresseurs de tumeurs vont être retrouvées, notamment pour p53, et ces délétion chromosomiques seront associées à des tumeurs peu différenciées, à une forte prévalence de l'infection par le virus de l'hépatite B et enfin à un mauvais pronostic de survie à long terme (Zucman-Rossi et al., 2015).

Des études menées sur de larges cohortes de patients ainsi que les outils de séquençage de nouvelle génération ont permis de classer ces CHC suivant leurs caractéristiques mutationnelles et/ou phénotypiques. L'étude de Boyault *et al.* en 2007 classe ainsi les CHC selon 6 groupes, de G1 à G6, en corrélant l'expression des gènes au sein des tumeurs avec leur génotype et leur phénotype (Boyault et al., 2007). Ainsi, les groupes G1 à G3, dans lesquels on retrouve les CHC mutés pour les gènes *TP53* (G2 et G3) et *AXIN1* (G1), regroupent des tumeurs chromosomiquement instables. A l'inverse, les tumeurs mutées pour *CTNNB1*, codant la β-caténine, sont présentes dans les groupes G5 et G6, qui constitue avec le groupe G4, un ensemble de tumeurs chromosomiquement stables (Figure 4). Dans ce même contexte, Hoshida et ses collaborateurs proposent une classification différente dans laquelle 3 groupes, S1 à S3, sont décrits (Hoshida et al., 2009). Brièvement, les groupes S1 et S2 sont notamment associés respectivement à des mutations de *TGFβ* (transforming growth factor β) et de la voie de signalisation PI3K/AKT (Phosphatidyl-inositol-3-kinase/AKT). Comme pour les groupes G1 à G3 décrits précédemment, Les CHC du groupe S1 et S2 sont prolifératifs et peu différenciés. A l'inverse, le groupe S3 est associé à des tumeurs présentant des mutations activatrices de CTNNB1, et sont peu prolifératifs et bien différenciés.

En conclusion, bien qu'il existe quelques différences entre ces deux classements, certaines observations restent récurrentes et de manière générale, on peut ainsi classer les CHC en deux catégories : la première regroupe des tumeurs prolifératives, peu différenciées, très vascularisées et de mauvais pronostic. Les mutations les plus fréquentes sont retrouvées sur le gène suppresseur de tumeur TP53 ainsi que certains gènes des voies de signalisation PI3K/AKT ou de la voie de signalisation du *TGFβ*. La seconde catégorie regroupe des tumeurs principalement mutées pour CTNNB1, peu prolifératives et bien différenciées. Elles sont généralement de meilleur pronostic que le premier groupe.

4.2) Caractéristiques des CHC associés aux classes (G1-G2-G3) et (S1-S2)

Les classes dites prolifératives sont généralement associées à une étiologie liée au virus de l'hépatite B mais peuvent également se développer sur un foie cirrhotique ou atteint de NASH. Comme décrit précédemment, cette catégorie de CHC comprend des tumeurs cliniquement agressives, mal différenciées présentant fréquemment une invasion vasculaire. D'un point de vue anatomopathologique, ces CHC sont caractérisés par un fort épaississement des travées d'hépatocytes (Macrotrabecular Hepatocarcinoma). Au niveau des voies de signalisation, ces tumeurs présentent une activation fréquente des voies de signalisation pro oncogéniques associées à la survie, incluant les voies PI3K/AKT/mTOR (mamalian Target of Rapamycin), RAS-MAPK (ras-mitogen activated protein kinase), HGF-HGFR (Hepatic growth factor/Hepatic growth factor receptor) ou encore wnt-*TGFβ* (Rebouissou and Nault, 2020). D'un point de vue génique, ces CHC se caractérisent dans la grande majorité des cas par un enrichissement en mutations inhibitrices du gène suppresseur de tumeur TP53. On prendra l'exemple des mutations affectant le gène RPS6K (ribosomal protein S6 kinase) qui intervient dans la voie de signalisation RAS-MAPK, le gène AXIN 1 qui est un régulateur de la voie Wnt-*β* caténine et les gènes TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2) qui sont des régulateurs négatifs de l'oncogène mTORC1. Plusieurs études ont également montré une amplification du gène FGF19 (Fibroblast Growth Factor 19) et du gène CCND1, codant pour la cycline D1 (Zucman-Rossi et al., 2015, Lee et al., 2004). Enfin, cette classe est caractérisée par une forte instabilité chromosomique, par un profil global d'hypométhylation de l'ADN et par la réexpression de marqueurs dits progéniteurs de l'hépatocyte comme l'AFP. Au niveau du micro-environnement, on observe une forte immunosuppression favorisant une immunité pro-tumorale au détriment d'une immunité anti-tumorale. De manière plus précise, on peut subdiviser la classe des CHC prolifératifs en deux autres sous classes :

- La classe S1 ou G2 / G3 est associée plus spécifiquement à la voie wnt/TGF*b*. C'est dans ce sous-groupe que l'on observe la plus forte immunosuppression.
- La classe dites « des progéniteurs » (G1 ou S2). Cette classe est associée principalement à la réexpression des marqueurs progéniteurs hépatiques tels que l'AFP, et à la voie de signalisation pro-oncogénique PI3K/AKT/mTOR.

Dans tous les cas, ces tumeurs présentent une vascularisation importante, et sont des tumeurs de mauvais pronostic.

En conclusion, cette classification du CHC en 6 groupes moléculaires différents marque donc une nouvelle fois cette notion d'hétérogénéité fonctionnelle de l'hépatocarcinome, avec notamment une activation préférentielle de certaines voies de signalisation cellulaires selon le groupe étudié. Cette "taxonomie" moléculaire, estampillée par une surexpression importante de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR seulement dans les groupes G1 et G2, pourrait laisser présager à une fonction plus délétère du métabolisme au sein de ces cellules cancéreuses. En effet, compte tenu du lien intime qui existe entre la voie de signalisation AKT et mTOR et du rôle de ce dernier dans l'oncométabolisme, ces tumeurs pourraient avoir une plus grande capacité à se reprogrammer d'un point de vue métabolique. Cela permet l'adaptation aux conditions parfois stringeantes du microenvironnement, tout en maintenant un haut potentiel tumorigénique. Ce trait phénotypique, qui sera développé plus tard dans cette partie introductive du manuscrit, pourrait ainsi grandement influer la survie des patients atteints de CHC.

5) Diagnostic et traitements du CHC

5.1) Diagnostic

Pour les patients atteints de cirrhose et les patients porteurs de HBV non cirrhotiques, une surveillance régulière est recommandée pour dépister l'apparition d'un CHC, à raison d'une visite tous les 6 mois environ (Singal et al., 2020). Ce dépistage se fait principalement par des techniques d'imagerie car il s'agit d'actes non-invasifs, bien tolérés et suffisamment sensibles. L'échographie est l'examen de référence, l'IRM, plus couteuse, étant proposée en seconde intention. En parallèle, l'examen biologique le plus utilisé reste, comme décrit précédemment, le dosage sérique de l'AFP dont la sensibilité n'est que de 60% environ. En effet, dans 30 % des formes manifestes de CHC, les concentrations sériques en AFP sont supérieures à 500 ng/ml. Il est important de souligner ici que les concentrations en AFP sont indétectables chez un individu adulte sain. Dans les autres cas de CHC, les valeurs sont intermédiaires et similaires à celles observées dans l'hépatite chronique ou la cirrhose (Tzartzeva et al., 2018). La découverte d'un CHC peut également avoir lieu lors de la survenue de symptômes en rapport avec le développement de la tumeur: altération de l'état

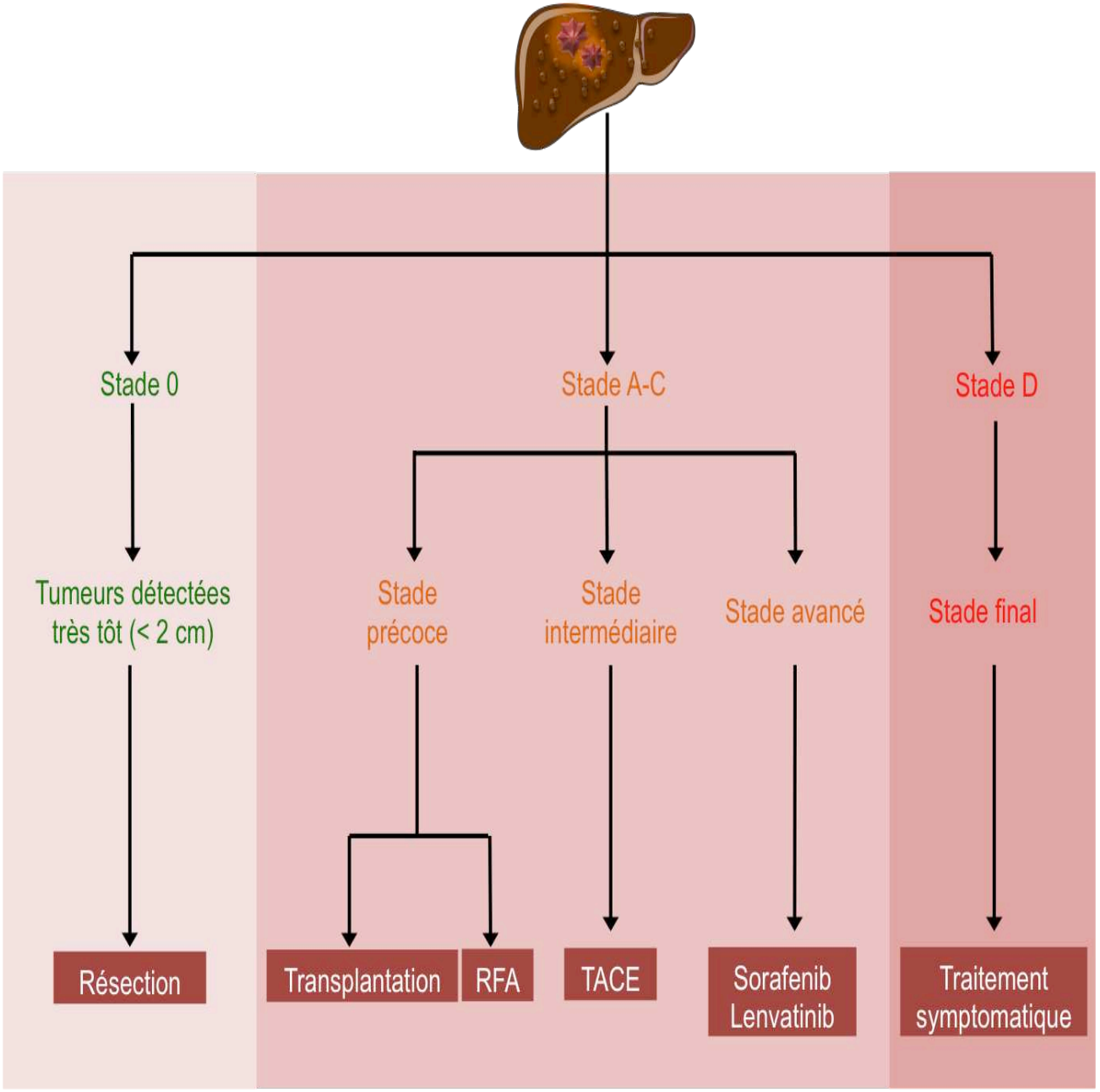


Figure 5: Schéma récapitulatif de la prise en charge des patients atteints de CHC

La prise en charge clinique des patients atteints de CHC dépend de la classification du BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) : Stade 0 : très précoce, Stade A-C : précoce-intermédiaire-avancé, Stade D : final

RFA : Ablation par radiofréquence, TACE : Chémo-embolisation transartérielle

général, douleurs abdominales, ascite, hémorragie digestive. Bien que le diagnostic soit habituellement facile, la tumeur est le plus souvent déjà évoluée et les possibilités de traitement à visée curative sont très limitées.

5.2) Traitements existants

Le CHC est un cancer de mauvais pronostic en partie dû à un diagnostic tardif, d'une résistance élevée au traitement de chimiothérapie et d'une grande hétérogénéité moléculaire. La résection chirurgicale est le traitement curatif de premier choix, surtout pour les CHC qui se développent sur foie non cirrhotique (Vibert et al., 2019). Chez les patients cirrhotiques, le risque de mortalité lié à l'opération est plus élevé. C'est pourquoi la chirurgie ne peut être proposée qu'à une minorité de patients. Cependant, la résection peut traiter avec succès des tumeurs de grande taille, pour lesquelles des alternatives thérapeutiques efficaces n'existent pas. Pour les petites lésions (moins de 3cm), on pourra préférer des techniques ablatives locales comme la radiofréquence, qui sont moins invasives, moins coûteuses et moins risquées que la résection chirurgicale (Roayaie et al., 2015, Vibert et al., 2019). La transplantation hépatique est le traitement le plus adapté pour traiter les CHC développés sur foie cirrhotique. Cependant, la disponibilité des organes étant très limitée, la sélection des patients doit être stricte afin d'obtenir un bénéfice maximal en termes de survie (Tang et al., 1998). Pour permettre un contrôle du CHC durant la période d'attente de la greffe, un traitement par radiofréquence peut être envisagé pour les patients ayant une fonction hépatique suffisante. Cependant, dans la majorité des cas la découverte tardive du CHC amène à devoir traiter fréquemment des stades avancés de tumeurs. La prise en charge thérapeutique de ces formes avancées est extrêmement limitée et le choix s'oriente alors souvent vers des soins palliatifs, qui consistent en l'utilisation de la chimiothérapie (Figure 5).

Des progrès thérapeutiques majeurs ont été accomplis au cours des 15 dernières années dans ce domaine, et l'évènement qui a particulièrement changé la prise en charge des patients fut l'autorisation de mise sur le marché d'une nouvelle molécule anti-angiogénique en 2007 : le Sorafenib (Nexavar®) pour les CHC à un stade avancé (Llovet et al., 2008). Depuis, plusieurs études ont montré que le Sorafenib inhibe différentes voies de signalisation, dont les voies du VEGF (Vascular endothelial growth factor) et du PDGF (Platelet-derived growth factor) qui régulent l'angiogenèse, mais aussi la voie Ras/MAPK qui régule la prolifération cellulaire. Cette molécule a permis une amélioration significative de la survie globale et de la survie sans

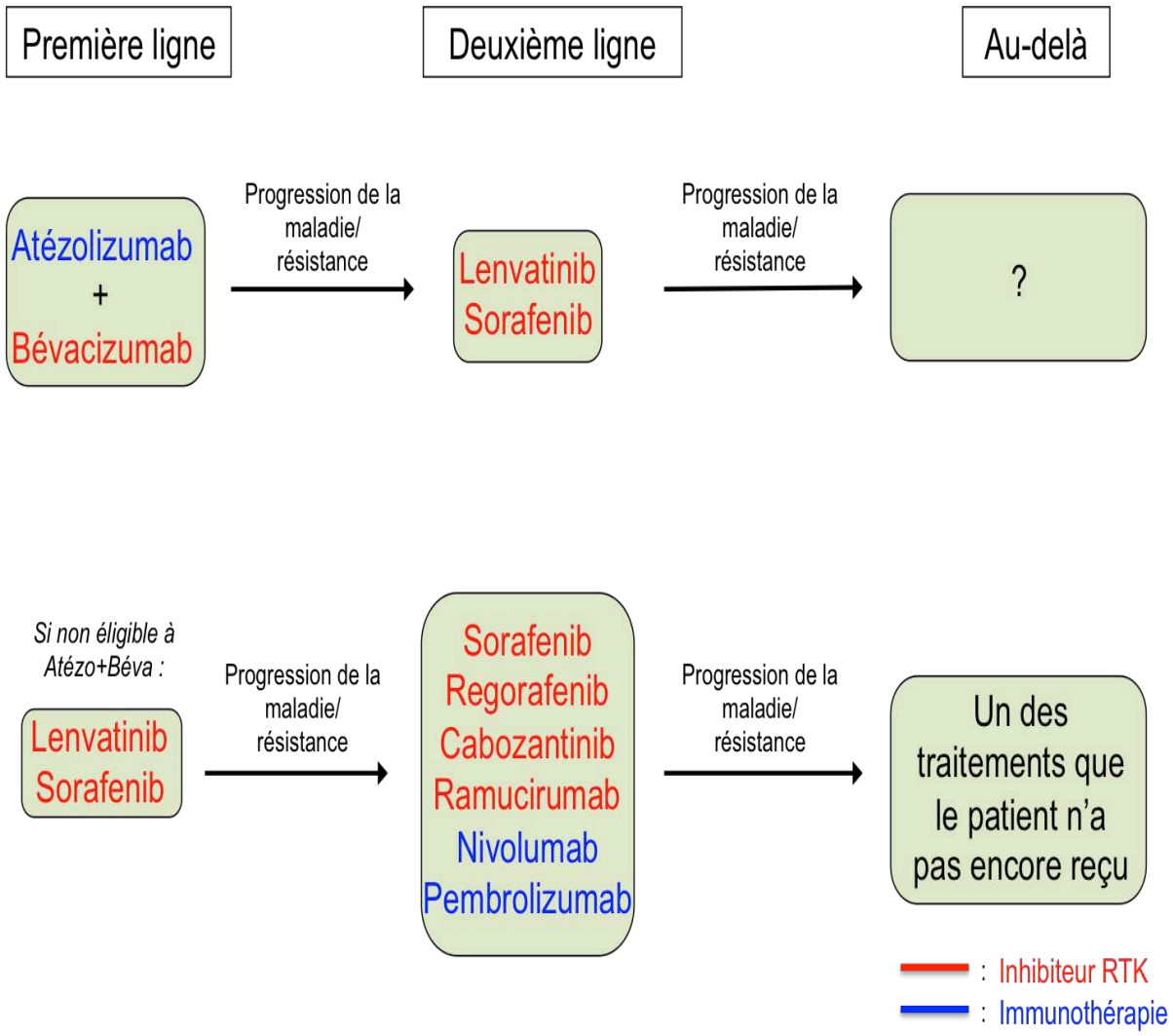


Figure 6: Algorithme de la prise en charge des patients atteints de CHC de stade avancé

La prise en charge des patients atteints de CHC avancés a connu récemment un changement important avec l'arrivée du cocktail Atezolizumab et Bevacizumab. Ce traitement est ainsi devenu le traitement de référence à la place de la Sorafenib et/ou du Lenvatinib.
***RTKI**: Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor*

progression tumorale. Le Sorafenib est longtemps resté la seule molécule approuvée pour le traitement des CHC avancés (Llovet et al., 2008). Ce n'est qu'à partir de 2017 que plusieurs autres molécules, dérivées du Sorafenib, ont vu le jour dans le traitement des CHC avancés comme le Regorafenib, le Lenvatinib et le Cabozantinib. Ce sont également des inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase comme le VEGFR, l'EGFR ou l'IGFR (Faivre et al., 2020). Cependant, l'efficacité de ces traitements reste limitée à ce jour, leur action permettant un allongement relativement court de la durée de vie des patients ayant un CHC (environ 13 mois) (Figure 6).

Plus récemment, avec les avancées majeures de l'immunothérapie, des anticorps monoclonaux anti-PD1 (programm cell death) et anti PDL1 (programm cell death ligand) peuvent désormais être utilisés en deuxième ligne de traitement si les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase ne sont pas suffisants (El-Khoueiry et al., 2017, Zhu et al., 2018). Aujourd'hui, les recherches cliniques dans le traitement des CHC s'articulent autour de la combinaison de plusieurs molécules thérapeutiques. Ainsi, en début d'année 2021, un nouveau traitement à base d'Atezolizumab, un anticorps anti-PDL1 et de Bevacizumab, un anticorps anti-VEGF est devenu le traitement de référence pour la prise en charge des patients présentant des CHC avancés à la place du Sorafenib. L'étude clinique de phase III a en effet démontré un rallongement significatif de la durée de vie des patients avec ce traitement comparé à la prise en charge avec le Sorafenib seul (Figure 6) (Finn et al., 2020). Cette avancée majeure ouvre la voie à plusieurs essais de phase I/II ou II/III combinant un ou plusieurs inhibiteurs de checkpoint immunitaire (PDL1, CTLA-4) avec des molécules inhibitrices de récepteurs à activité tyrosine kinase, essais qui sont en cours pour déterminer l'efficacité de ces combinaisons (Finn et al. 2020, Xu et al., 2019, Bang et al., 2020).

En conclusion de cette première partie, le CHC est le cancer primitif du foie le plus répandu et constitue la troisième cause de mort par cancer dans le monde. Son incidence est en constante augmentation et il existe aujourd'hui peu de moyens efficaces de lutter contre cette pathologie, les traitements thérapeutiques restant encore très limités. Le CHC est une maladie caractérisée par son hétérogénéité. Les différents facteurs étiologiques conduisent à la transformation maligne par des processus moléculaires distincts. Cette situation s'explique par l'accumulation de mutations au cours d'une maladie hépatique chronique progressant jusqu'au CHC dans un processus encore mal connu. Des efforts continus sont nécessaires pour identifier les différentes voies de signalisation et les différents évènements

physiopathologiques impliquées dans l'hépatocarcinogenèse, afin d'amener au développement de nouvelles thérapies ciblées.

Partie 2 : Les voies de signalisation oncogéniques impliquées dans le CHC

I. Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement du CHC

Comme évoqué plus haut, l'apparition d'un CHC est un processus complexe résultant de multiples altérations génétiques, épigénétiques, métaboliques et micro-environnementales. Bien que les mécanismes moléculaires de l'hépatocarcinogenèse ne soient pas encore totalement élucidés, on sait que la dérégulation de certains gènes contrôlant des voies de signalisation majeures, par le biais de mutations ou de modifications épigénétiques, est un mécanisme fondamental dans la transformation des hépatocytes lors de la survenue d'un CHC. En effet, l'accumulation de ces altérations conduit à l'accélération de la prolifération des hépatocytes et à un avantage sélectif de ces populations clonales dans les lésions pré-néoplasiques, entrainant à terme le développement du cancer. Les voies de signalisation altérées dans le CHC sont principalement des voies impliquées dans la prolifération, la senescence ou l'apoptose, mais on retrouve aussi des voies contrôlant la différenciation, l'inflammation ou encore l'angiogenèse (Farazi and DePinho, 2006).

Ainsi de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont perturbées dans le CHC, parmi elles on retrouve les protéines p53, Wnt/β-caténine, c-Myc, ou encore pRb (retinoblastoma protein). L'équilibre entre la survie et l'apoptose est également modifié dans les CHC. Ainsi, les voies du TGFβ, de la PI3K/AKT/mTOR et de l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) sont souvent altérées, ce qui favoriserait la survie et la résistance à l'apoptose des hépatocytes tumoraux. De plus, l'altération de ces voies est associée à un mauvais pronostic pour le CHC (Giannelli et al., 2006; Hu et al., 2003; Ito et al., 2001). Il est également important de rappeler que la progression tumorale est favorisée par la réactivation de la télomérase dans près de 90% des CHC (Farazi and DePinho, 2006; Farazi et al., 2003). L'accumulation de ces altérations conduit à l'accélération de la prolifération des hépatocytes et à la sélection de populations clonales dans les nodules dysplasiques. Certaines voies sont altérées dès les étapes précancéreuses. C'est par exemple le

cas pour les facteurs de croissance TGFα (Transforming growth factor alpha) et IGF2 (Insulin-like growth factor 2) (Lin et al., 2001). Au contraire, d'autres voies de signalisation ne sont dérégulées que dans les étapes tardives de la carcinogenèse hépatique comme pour la voie Wnt/β-caténine, qui reste généralement normale dans le tissu cirrhotique et les nodules dysplasiques. Nous nous intéresserons particulièrement dans cette deuxième partie introductive à des voies de signalisation altérées dans le CHC et à leurs implications. Cette liste n'est cependant pas exhaustive.

1) TP53

Le gène suppresseur de tumeur TP53, codant la protéine p53, est le gène le plus fréquemment muté dans le CHC et ces mutations se retrouvent le plus souvent dans les populations qui ont été exposées à l'aflatoxine B1 ou infectées par le virus de l'hépatite B (Zucman-Rossi, 2010). Placé à l'intersection d'un réseau de voies de signalisation cellulaires capitales à la régulation de la croissance cellulaire et de l'apoptose, une mutation de ce gène aura des conséquences néfastes pour l'hépatocyte sain. En conditions physiologiques, en réponse à un stress cellulaire ou à différents agents génotoxiques causant des dommages à l'ADN, la protéine p53 est stabilisée et peut jouer son rôle de facteur de transcription et orienter la cellule vers l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence en fonction du stimulus reçu. Dans ce contexte, la mutation de p53 peut s'avérer grandement profitable aux cellules cancéreuses et notamment celles issues de CHC. Ces dernières pourront ainsi échapper aux mécanismes de contrôle de l'apoptose ou de la senescence cellulaire. Les cellules pourront ainsi croître de façon anarchique tout en échappant à la mort cellulaire par apoptose, elle-même induite par des mécanismes de surveillance de la réplication de l'ADN (Janic et al., 2018). On retrouve ainsi des mutations du gène codant p53 dans plus de 50% des CHC développés chez les sujets exposés à l'aflatoxine B1, alors que ce chiffre n'est que de 20% chez les sujets non exposés (Hussain et al., 2007). D'autres facteurs peuvent entrainer une inactivation de p53, par exemple la surexpression de le protéine MDM2 (murine double minute 2), inhibiteur de p53 (Qin and Tang, 2002).

2) Wnt/β-caténine

La β-caténine est une protéine essentielle impliquée dans l'activation transcriptionnelle via Wnt (Wingless-related integration site) et dans l'adhésion cellule-cellule. La voie Wnt/β-

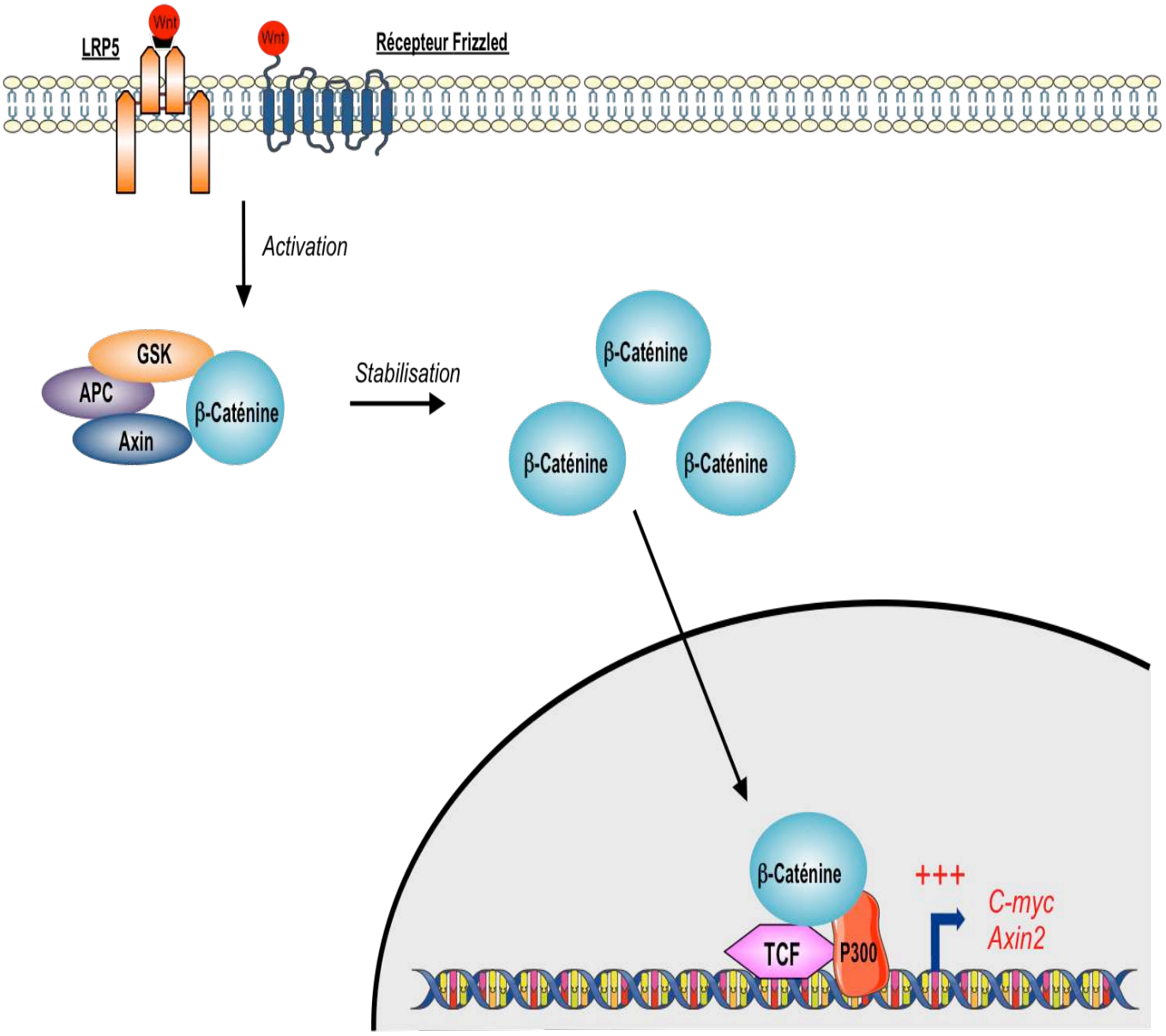


Figure 7: Schéma représentatif de la voie Wnt/β-Caténine

Brièvement, sous l'effet d'un signal Wnt, la β-caténine est libérée de son complexe de séquestration et est transloquée dans le noyau des hépatocytes. Elle s'associe alors au facteur TCF au niveau du promoter de ses gènes cibles pour induire un programme génique spécifique.

***APC**: Adenomatous Polyposis Coli, **Wnt**: Wingless-related integration site, **LRP5**: LDL-Related Protein 5, **GSK**: Glycogen Synthase Kinase*

caténine, très conservée au cours de l'évolution, intervient physiologiquement au cours de l'embryogenèse, mais aussi lors de processus oncogéniques dans lesquels elle est dérégulée. Lors de l'activation de la voie Wnt, la caséine kinase I epsilon (CKIε) active la protéine Dishevelled (Dvl) par phosphorylation. Dvl, par son association à l'axine, inhibe la glycogène synthase kinase 3-bêta (GSK3β) qui ne peut plus phosphoryler ses substrats, dont la β-caténine, l'axine, et APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Figure 7). L'axine possède des sites de liaison à la GSK3β, APC et la β-caténine. A travers cette liaison, elle facilite ainsi la phosphorylation d'APC et de la β-caténine par la GSK3β (Hart et al., 1998). Lorsque la phosphorylation de la β-caténine est inhibée, elle se dissocie du complexe APC/Axine/GSK3β et peut être transloquée dans le noyau, où elle se lie au facteur de transcription «T-cell factor» (TCF), ce qui induit la transcription de ses gènes cibles, tels que la Cycline D1 (Shtutman et al., 1999). En l'absence de Wnt, la β-caténine est phosphorylée par GSK3β sur les sérines 29, 33, 37, 45 et sur la thréonine 41 (Morin, 1999; Yost et al., 1996). Elle est alors reconnue par β-TRCP (ou slimb), un constituant d'une E3 ubiquitine ligase, ce qui entraine son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome.

L'oncogène CTNNB1 codant la β-caténine est muté dans 5 à 50% des CHC et de manière générale, la voie Wnt/β-caténine est la voie la plus dérégulée dans les CHC (Zucman-Rossi, 2010). Les mutations de CTNNB1 sont plus fréquentes dans les CHC avec stabilité chromosomique et sont significativement associées aux mutations du facteur de transcription NFE2L2 (voie du stress oxydatif NRF2/KEAP1) et aux mutations du promoteur de TERT. Les mutations de la β-caténine touchent généralement les sites de phosphorylation par la GSK3β, empêchant ainsi la dégradation de la β-caténine, ce qui provoque son accumulation nucléaire et une activation constitutive du signal β-caténine (Morin et al., 1997). Chez la souris, il a été établi que l'activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine dans les hépatocytes a un effet oncogénique. Ainsi, l'activation d'un signal β-caténine dans un modèle murin d'invalidation d'APC spécifiquement dans l'hépatocyte conduit au développement de CHC (Colnot et al., 2004). D'un point de vue moléculaire la β-caténine activée est impliquée dans la différenciation, la prolifération, la migration et également l'adhésion cellulaire.

3) c-Myc

Le proto-oncogène c-Myc est un facteur de transcription essentiel, impliqué notamment dans la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose ou la tumorigenèse. Il appartient à la famille des protéines contenant un domaine «basic helix-loop-helix leucine zipper» (bHLH-LZ). L'activation transcriptionnelle par c-Myc nécessite obligatoirement sa dimérisation avec la protéine Max. Cet hétérodimère se fixe à l'ADN au voisinage de promoteurs de gènes cibles grâce aux séquences E-box localisées sur le promoteur de ses gènes cibles (Blackwell et al., 1993). L'activité de transactivation de c-Myc nécessite le recrutement de co-facteurs, dont certains, comme TRRAP, TIP60 ou encore la Reptine et la Pontine, ont été identifiés au sein de complexes de remodelage de la chromatine (Cowling and Cole, 2006). Le gène c-Myc est amplifié et surexprimé dans environ 30% des CHC et est associé à un mauvais pronostic (Takahashi et al., 2007). Cette amplification est retrouvée plus fréquemment dans les CHC peu différenciés, métastatiques, multi-nodulaires ou qui récidivent. De plus, on retrouve une corrélation entre la surexpression de c-Myc et l'altération de p53 dans le CHC (Kawate et al., 1999). La surexpression de c-Myc, conditionnelle et restreinte à l'hépatocyte, suffit à induire des CHC chez la souris, et à l'inverse, son inactivation conduit à limiter le développement tumoral et entraine la régression du volume tumoral dans des CHC déjà formés (Murakami et al., 1993; Shachaf et al., 2004).

4) Voie de signalisation du stress oxydatif NRF2/KEAP1

Une des voies de signalisation impliquée dans la réponse au stress oxydatif est la voie NRF2/KEAP1. NRF2 (codé par NFE2L2) est un facteur de transcription sensible au niveau intracellulaire aux espèces réactives de l'oxygène. Dans sa forme inactive, NRF2 est associé à un complexe inhibiteur composé de KEAP1 et CUL3. NRF2 est alors polyubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Quand le niveau d'espèces réactives de l'oxygène augmente dans la cellule, NRF2 se dissocie de KEAP1 et migre dans le noyau de la cellule pour agir comme facteur de transcription et induire l'expression de gènes impliqués dans la réponse antioxydante (Motohashi et al., 2004). Initialement, la voie de signalisation NRF2/KEAP1 a été reliée à des propriétés anti-tumorales dans des modèles murins exposés à du stress oxydatif chronique. L'identification de mutations somatiques activatrices de NRF2 et inhibitrices de KEAP1 entrainant une activation constitutive de cette voie dans les CHC et

dans d'autres types de cancers hépatiques comme l'hépatoblastome soulignant le potentiel rôle pro-tumorigénique de cette voie de signalisation (Zavattari et al., 2015, Orrù et al., 2020). Des études sur des modèle de CHC murins ont pu démontrer que l'activation de la voie NRF2/KEAP1 était nécessaire au développement tumoral tandis que l'inactivation de cette voie mène une mort cellulaire induite par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et réduit ainsi le développement tumoral (Raghunath et al., 2018, Ngo et al., 2017).

5) Voie de signalisation du TGFβ

De manière générale, cette voie est décrite pour jouer un rôle central dans l'homéostasie, la morphogenèse tissulaire et la différenciation via l'induction des processus apoptotiques et de prolifération. Plus récemment, elle a été démontrée comme étant une voie clef dans l'induction de la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) sur différents types de cellules épithéliales et plus particulièrement dans la fibrose car elle est directement impliquée dans la production des protéines de la MEC tel que le collagène. Elle est donc en ce qui concerne les étapes tardives du développement du CHC une voie dite pro-tumorale en régulant positivement la transition EMT et la mobilité cellulaire. A l'inverse, cette voie de signalisation est considérée comme anti-tumorale lors des stades précoces de carcinogenèse hépatique de par son effet d'inducteur de l'apoptose de cellules transformées (J. L. Leight et al., 2012). *In vitro*, le TGFβ est capable d'induire la transition EMT sur hépatocytes isolés de souris (Chen et al., 2011 ; Kaimori et al., 2007). Cette voie est gouvernée par différents facteurs de la famille du TGFβ possédant un récepteur à sérine-thréonine kinase spécifique appelé TGFβ-R. Le TGFβ a également un rôle clef dans la régulation du processus EMT via son action autocrine. Elle facilite ainsi la sécrétion du PDGF qui est capable à son tour d'activer les voies de signalisation pro-oncogéniques PI3K/AKT/mTOR et RAS/MAPK via les protéines effectrices Src (sarcome proto-oncogene) et Ras plus en amont après liaison avec son récepteur le PDGF-R (Contreras et al., 2019).

6) Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)

Aujourd'hui on dénombre 58 récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) regroupés selon leur organisation structurale en 20 familles (Robinson et al., 2000). Tous ces récepteurs ont

une structure globale et des mécanismes d'activation relativement similaires. Les RTKs sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une région extracellulaire, comportant le site de liaison pour son ligand, une région transmembranaire de 20 acides aminés permettant leur ancrage dans la membrane plasmique et une région cytoplasmique comprenant le domaine à activité tyrosine kinase (Hubbard et al., 2007). La région extracellulaire est très variable entre les RTKs. Ce sont ces différents domaines qui vont conférer aux RTKs leur spécificité de liaison au ligand. La région cytoplasmique contient quant à elle un domaine kinase très conservé. Après liaison avec leur ligand, les RTKs vont se dimériser, et s'autophosphoryler entrainant un changement conformationnel responsable de leur activation. C'est dans cette nouvelle forme active qu'ils vont pouvoir initier l'activation de différentes voies de signalisation comme la voie des MAPK (mitogene-activated protein kinase), PI3K (phosphoinositide-3 kinase) et SRC. L'activation de ces voies leur permet d'induire de nombreux processus cellulaires comme la survie, la prolifération, la mobilité ou encore la différenciation (Lemmon and Schlessinger, 2010). Les ligands des RTKs sont des molécules extracellulaires diverses regroupant les facteurs de croissance, les facteurs neurotrophiques, les cytokines ou encore les hormones.

Ces dernières années, la découverte d'altérations moléculaires de RTKs dans les cancers a augmenté de façon exponentielle, grâce notamment au séquençage à haut débit. Certaines de ces modifications sont aujourd'hui connues pour augmenter l'activité de ces RTKs ou pour les activer de façon indépendante du ligand. En conséquence, l'inhibition de leur signalisation constitue une cible de choix pour lutter contre le développement et la progression des cancers. Les principaux récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans l'hépatocarcinogenèse sont le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR), le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (C-Met), le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR), le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et l'insulin-like growth factor (IGFR) (Moeini et al., 2012).

Les voies induites par le récepteur VEGFR jouent un rôle critique dans l'angiogenèse et donc dans la capacité du CHC à former des métastases. En condition d'hypoxie, le VEGFR est activé par différents ligands pro-oncogéniques comme VEGF, FGF, IGF ou encore HIF-1 (Hypoxia Inducible factor 1). Cette liaison ligand-récepteur entraine l'activation de plusieurs voies de signalisation en aval qui sont impliquées dans la prolifération, la survie, la migration

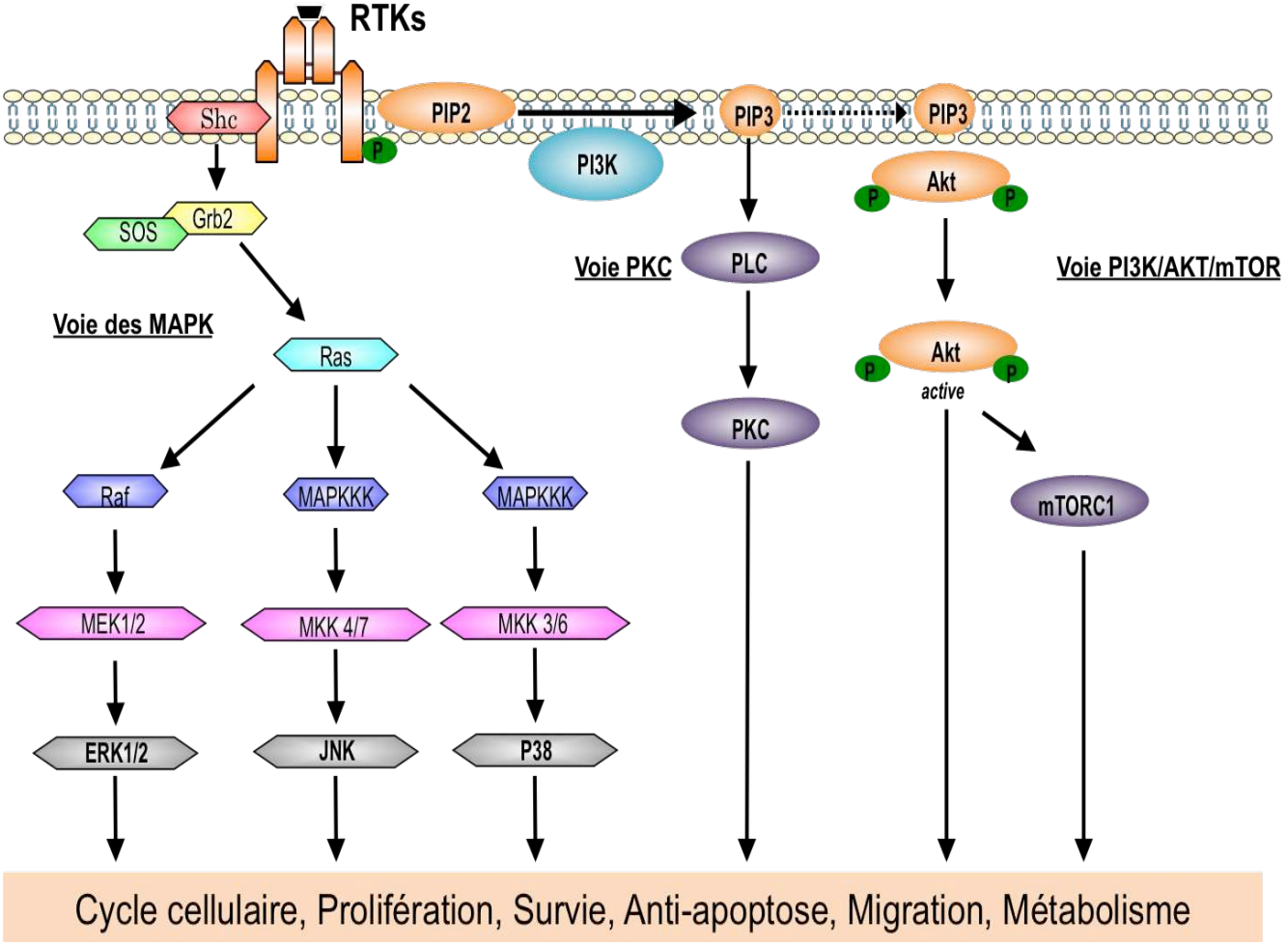


Figure 8: Schéma représentatif des principales voies de signalisation induites par les RTKs

Les principales voies impliquées dans la signalisation des RTKs sont la voie des MAPK, la voie PKC et la PI3K/AKT/mTOR. Toutes ces voies sont oncogéniques et elles induisent dans les CHC des effets pro-prolifératives, anti-apoptotiques et pro-métastatiques.

***RTK**: Récépteur tyrosine kinase, **MAPK**: MAP Kinase, **ERK1/2**: Extracellular signal-Regulated Kinase; **Grb2**: Growth factor Receptor-Binding protein 2; **MEK**: MAP Kinase Kinase; **MKK**: MAP kinase-interacting Kinase; **Raf**: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; **Ras**: Rat Sarcoma; **Shc**: Src Homology/Collagen; **PI3K**: Phosphatidylinositol 3 Kinase; **PIP**: Phosphatidylinositol Phosphate, **PLC**: Phospholipase C, **PKC**: Proteine Kinase C, **mTORC1**: Mammalian Target of Rapamycine Complex, **JNK**: Junk Protein, **SOS**: Son of Sevenless*

et la perméabilité vasculaire, favorisant ainsi une néovascularisation et une invasion tumorale. Des études sur des lignées cellulaires hépatomateuses transformées ainsi que dans des biopsies de patients atteints de CHC ont montré que l'expression du VEGFR est augmentée et est corrélée à des CHC invasifs et résistants aux traitements de chimiothérapie (Shimamura et al., 2000, Poon et al., 2004). La dérégulation de l'axe HGF/c-Met joue également un rôle critique dans le développement du CHC. En effet, l'activation de c-Met entraine l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie, la migration et la transition EMT. Ainsi, il a été montré, dans des cohortes de patients atteints de CHC, qu'une expression élevée de C-Met est associée à un faible taux de survie à 5 ans de ces patients (Ueki et al., 1997). Enfin, comme pour les récepteurs VEGFR et C-Met, les signalisations induites par l'IGFR, l'EGFR, le FGFR et le PDGFR sont fréquemment dérégulées dans les CHC (Moeini et al., 2012). Ces RTKs contrôlent également dans la carcinogenèse hépatique des processus biologiques comme la prolifération, l'apoptose, la croissance et la migration cellulaire. Là encore, la dérégulation de ces voies entraine donc des CHC de mauvais pronostic, hautement prolifératifs et invasifs des sous-classes G1, G2 et G3. L'action de ces différents récepteurs RTKs décrite ci-dessus passe par l'activation de plusieurs voies de signalisation nécessaires à l'initiation et au développement du CHC, dont les plus étudiées sont les voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR (Figure 8).

Ainsi, compte tenu du rôle critique de ces différents RTKs dans le développement du CHC, des thérapies ciblées visant à inhiber l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs ont été développées dans un but thérapeutique. Encore aujourd'hui, la grande majorité des traitements utilisés contre le CHC sont en effet des inhibiteurs de multiples kinases ciblant entre autres divers RTKs. Ainsi la Sorafenib et le Lenvatinib, ciblant le VEGFR, le PDGFR et le FGFR sont utilisés en première intention chez les patients atteints de CHC (Llovet et al., 2008 ; Kudo et al., 2018). D'autres comme, le Cabozantinib et l'Erlotinib, ciblant respectivement C-MET et l'EGFR, sont actuellement en essai clinique de phase III (Faivre et al., 2020).

7) La voie RAS/RAF/MAPK

La voie RAS/RAF/MAPK est une voie de transduction du signal très conservée régulant des processus de la carcinogenèse hépatique comme la prolifération cellulaire, la différenciation,

l'angiogenèse et la survie. Cette voie est particulièrement activée en réponse à la liaison de plusieurs facteurs de croissance aux RTKs, déclenchant une cascade de phosphorylation. Ainsi, RAS est entre autres activé par la fixation de différentes cytokines et hormones de croissance tels que l'EGF, l'HGF, l'IGF, le FGF ou encore le TNF-α. En amont, et suite à l'activation des RTKs, cette voie de signalisation est régulée par les protéines kinases intracellulaires MEK1 et MEK2, qui vont à leur tour phosphoryler les kinases ERK1 et ERK2. ERK1/2 vont alors contrôler l'activité cellulaire en agissant sur une variété de substrats dans le cytoplasme et le noyau (Gollob et al., 2006) pour inhiber l'apoptose et favoriser la prolifération cellulaire (Figure 8). Dans de nombreux cancers, cette voie est constitutivement active (K. L. Dunn et al., 2005). Environ 30% des cancers possèderaient une mutation sur l'un des gènes Ras (Ha-ras, N-ras, Ki-ras…) faisant de la voie RAS/RAF/MAPK une voie clef dans le développement et le traitement du cancer. Dans ce contexte, dans 2 à 9% des CHC, la voie de signalisation RAS/RAF/MAPK est activée (Huynh et al., 2003 ; Ito et al., 1998 ; Feng et al., 2020). D'un point de vue thérapeutique, plusieurs inhibiteurs pharmacologiques visant cette voie sont actuellement en phase d'étude pré-clinique et clinique. Parmi ces molécules, l'Erlotinib est un inhibiteur puissant et réversible de l'EGF (Huether et al., 2006). Dans ce contexte, dans une étude de phase II composée de 38 patients atteints de CHC, l'Erlotinib a démontré une activité anti-tumorale significative sur le développement du CHC (Philip et al., 2005). Dans l'ensemble, ces études suggèrent donc que la voie RAS/RAF/MAPK constitue donc une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du CHC.

II. La voie PI3K/AKT/mTOR dans le CHC

Dans le contexte de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et de son rôle dans le développement du CHC. La signalisation PI3K/AKT est bien connue pour favoriser et stimuler des processus carcinogènes fondamentaux, comme la survie, la prolifération et la motilité des cellules cancéreuses. Il a été notamment démontré que cette voie de signalisation est activée de manière constitutive dans presque tous les types de cancer chez l'homme et qu'elle est associée à des mécanismes de résistance aux traitements de chimiothérapie (Hoxhaj et al., 2020). Dans le cadre du CHC, elle est notamment représentée dans les sous classes prolifératives et de mauvais pronostic de type G1, G2 et G3.

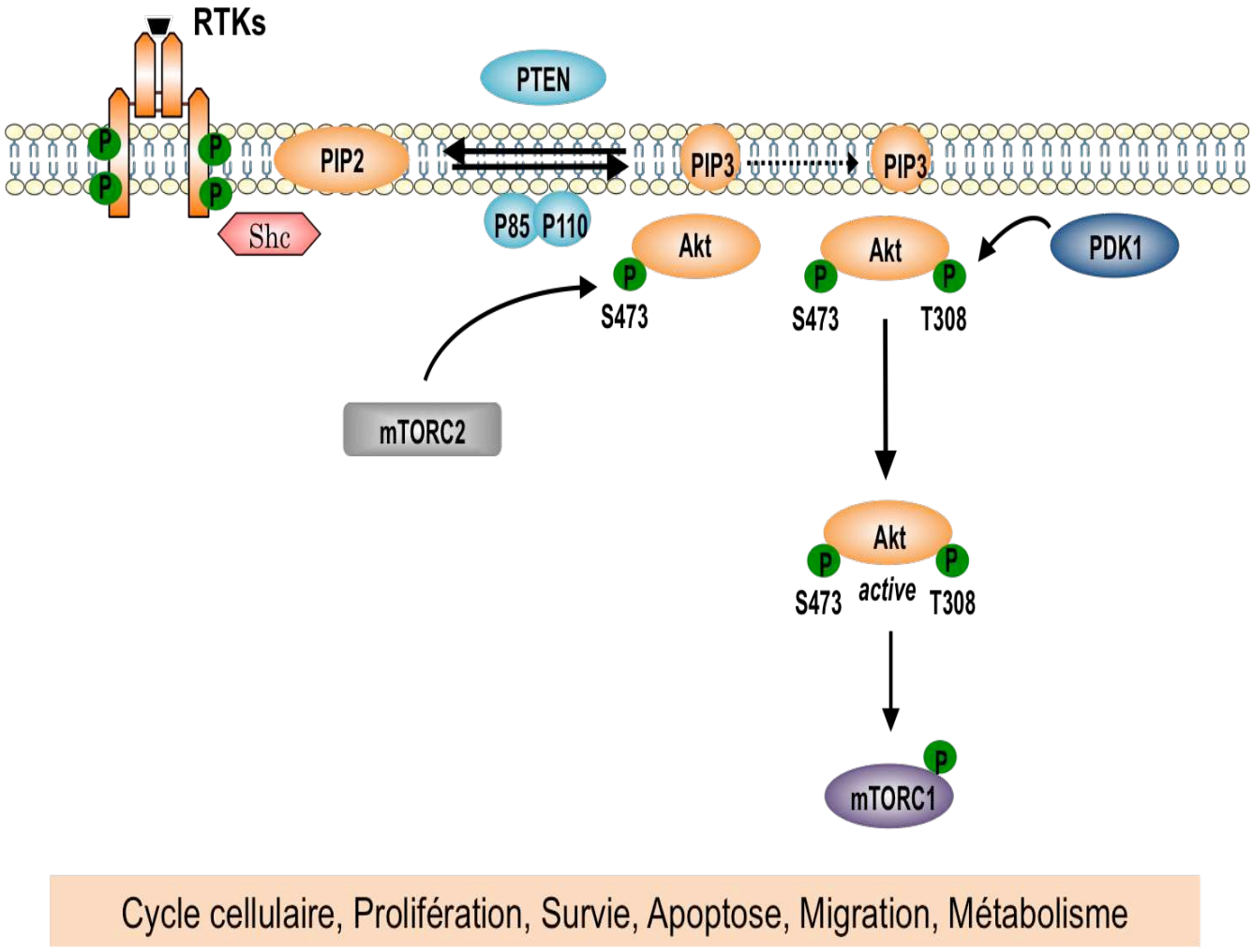


Figure 9: Schéma représentatif de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

Brièvement, suite à l'activation d'un RTK, la PI3K va être activée et va transformer le PIP_2 en PIP_3. La PDK1 et Akt sont alors recrutées à la membrane plasmique. Akt est ensuite phosphorylée de façon successive par mTORC2 et la PDK1. Ainsi activée, Akt agit sur ses substrats, dont mTORC1, et contrôle de nombreuses fonctions cellulaires. Le principal régulateur négatif de cette voie est la phosphatase PTEN, qui déphosphoryle le PIP_3 en PIP_2, empêchant ainsi le recrutement d'AKT à la membrane plasmique.

***RTK**: Récépteur tyrosine kinase, **PI3K**: Phosphatidylinositol 3 Kinase; **PIP**: Phosphatidylinositol Phosphate, **mTORC**: Mammalian Target of Rapamycine Complex, **PDK1**: Phosphoinositide Dependent Kinase, **Shc**: Src Homology/Collagen, **PTEN** : Phosphatase and Tensing Homolog*

1) La signalisation PI3K/AKT/mTOR

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire qui répond aux hormones et facteurs de croissance comme l'IGF, l'EGF ou FGF, des cytokines mais aussi de l'insuline (Hoxhaj et al., 2020). Ces stimuli sont reconnus par un récepteur membranaire RTK qui activent une cascade de phosphorylation de plusieurs protéines intracellulaires dont les trois principales sont la PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase), la protéine AKT (aussi connue sous le nom de Protéine Kinase B ou PKB) et mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) afin d'assurer différentes fonctions cellulaires (Figure 9) (Zhang et al., 2007). Dans les cellules saines, ses fonctions sont très variées et incluent notamment la régulation de la survie et la différenciation cellulaire, de la synthèse protéique, de la prolifération, de l'angiogenèse, du métabolisme et de la migration cellulaire (Vanhaesebroeck et al., 2010). Cette voie constitue un centre d'intérêt important dans l'étude de l'oncogenèse car la plupart des protéines la constituant sont des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes dont la mutation peut favoriser le développement d'un processus tumoral.

2) La PI3 kinase

Les protéines PI3K sont regroupées en trois classes (I, II, III) qui diffèrent selon leur structure, leur distribution tissulaire et leurs mécanismes d'activation. Parmi celles-ci, seule la PI3K de classe I est capable de générer du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) nécessaire à l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR (Backer, 2008 ; Maier et al., 1999). Au sein de cette classe se distingue généralement deux groupes classés sur la base de leur sous-unité régulatrice : la classe IA (p110α, p110β et p110δ) et la classe IB (p110γ). Les PI3K de classe IA sont des enzymes hétérodimériques constituées d'une sous-unité régulatrice (p85α, la plus abondante, et ses variants d'épissage p55α et p50α, p85β ou p55γ) et d'une sous-unité catalytique (p110δ essentiellement leucocytaire, p110α ou p110β, ubiquitaires) (Figure 10). Les sous-unités catalytiques contiennent un domaine ABD (Adaptator Binding Domain) facilitant la liaison avec la sous-unité régulatrice, un domaine RBD (RAS Binding Domain) facilitant la liaison à la membrane plasmique ainsi qu'un domaine kinase qui va phosphoryler le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate). Les sous-unités régulatrices contiennent quant à elles, deux domaines SH2 (Src Homology 2) qui assurent la fixation à la sous-unité

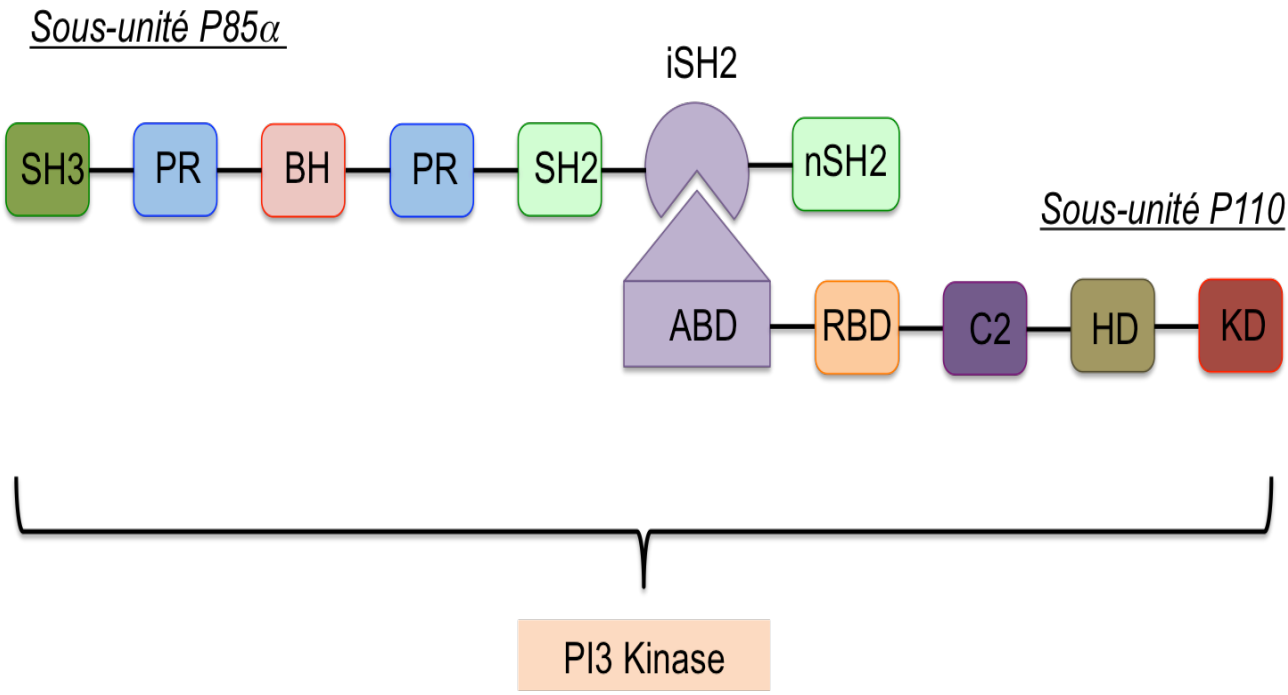


Figure 10: Schéma représentatif des sous-unités P85α et P110 de la PI3K

***SH3**: Src Homology 3 Domain, **PR**: Séquence riche en proline, **BH**: Domaine Rho-Gap-like, **SH2**: Src Homology 2 Domain, **iSH2**: Région inter-SH2, **nSH2**: Région N-terminale SH2, **ABD**: Domaine de liaison adaptateur, **RBD**: Domaine de liaison à RAS, **C2:** Domaine C2, **HD**: Domaine helical, **KD**: Domaine à activité kinase*

catalytique p110. Pour les protéines p85α et p85β, les domaines SH2 sont précédés par un domaine SH3, un domaine BH (Bcl-2 Homology) et deux régions riches en proline (Maier et al., 1999). En l'absence de ligand sur les RTKs, les sous-unités P85 vont inhiber l'activité de la sous-unité catalytique p110. C'est la fixation de p85 à un RTK activé par phosphorylation qui va avoir pour effet de lever l'inhibition exercée sur p110 et ainsi activer la PI3K. Les sous-unités catalytiques p110 sont ainsi activées grâce au recrutement des domaines SH2 de la sous-unité régulatrice sur des motifs consensus YxxM phosphorylés lors de l'engagement d'un récepteur couplé à des tyrosine kinases (Marone et al., 2008). Aussi, des molécules adaptatrices possédant un domaine SH2 comme les protéines IRS1 et IRS2 peuvent se fixer sur les RTKs et servir de relais entre ces dernières et p85α (Maeno et al., 2012; Onishi-Haraikawa et al., 2001; Shim et al., 2011). Cette liaison au récepteur lève l'inhibition de la sous-unité catalytique p110 exercée par p85α. La p110, ainsi adressée à la membrane, catalyse la synthèse de PtdIns(3,4)P2 et de PtdIns(3, 4, 5)P3, deux 3'-phosphoinositides (3'-PI) quasiment indétectables dans la membrane plasmique à l'état basal et qui recrutent sélectivement des protéines à domaine PH (Pleckstrin homology) comme la sérine/thréonine kinase AKT. Ces protéines activent à leur tour un grand nombre d'effecteurs impliqués dans le contrôle de la survie, de la prolifération et de la mobilité cellulaire (Courtney et al., 2010).

3) La protéine kinase AKT

La protéine AKT, appelée aussi protéine PKB (Protein Kinase B), est une sérine/thréonine kinase constituée d'un domaine PH amino terminal, d'un domaine catalytique central et d'un petit domaine régulateur contenant un motif hydrophobe en extrémité carboxy-terminale. Chez les mammifères, il existe trois isoformes d'AKT (AKT1, AKT2 et AKT3) hautement conservées (plus de 80 % d'homologie de séquence), codées par trois gènes différents (Chan et al., 1999). L'isoforme AKT1 est exprimée dans la majorité des tissus de l'organisme tandis que l'isoforme AKT2 est préférentiellement exprimée dans les tissus sensibles à l'insuline comme le foie, le tissu adipeux ou le muscle squelettique. L'expression d'AKT3 est enfin restreinte au cerveau et aux testicules (Hanada et al., 2004). Le domaine PH d'AKT joue un rôle essentiel dans la translocation de la protéine vers la membrane plasmique puisqu'il a pour fonction d'interagir avec les PIP3 produit par la PI3K. Le domaine kinase possède un résidu thréonine en position 308, hautement conservé chez les mammifères, dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activation de la protéine AKT. La région hydrophobe possède aussi un

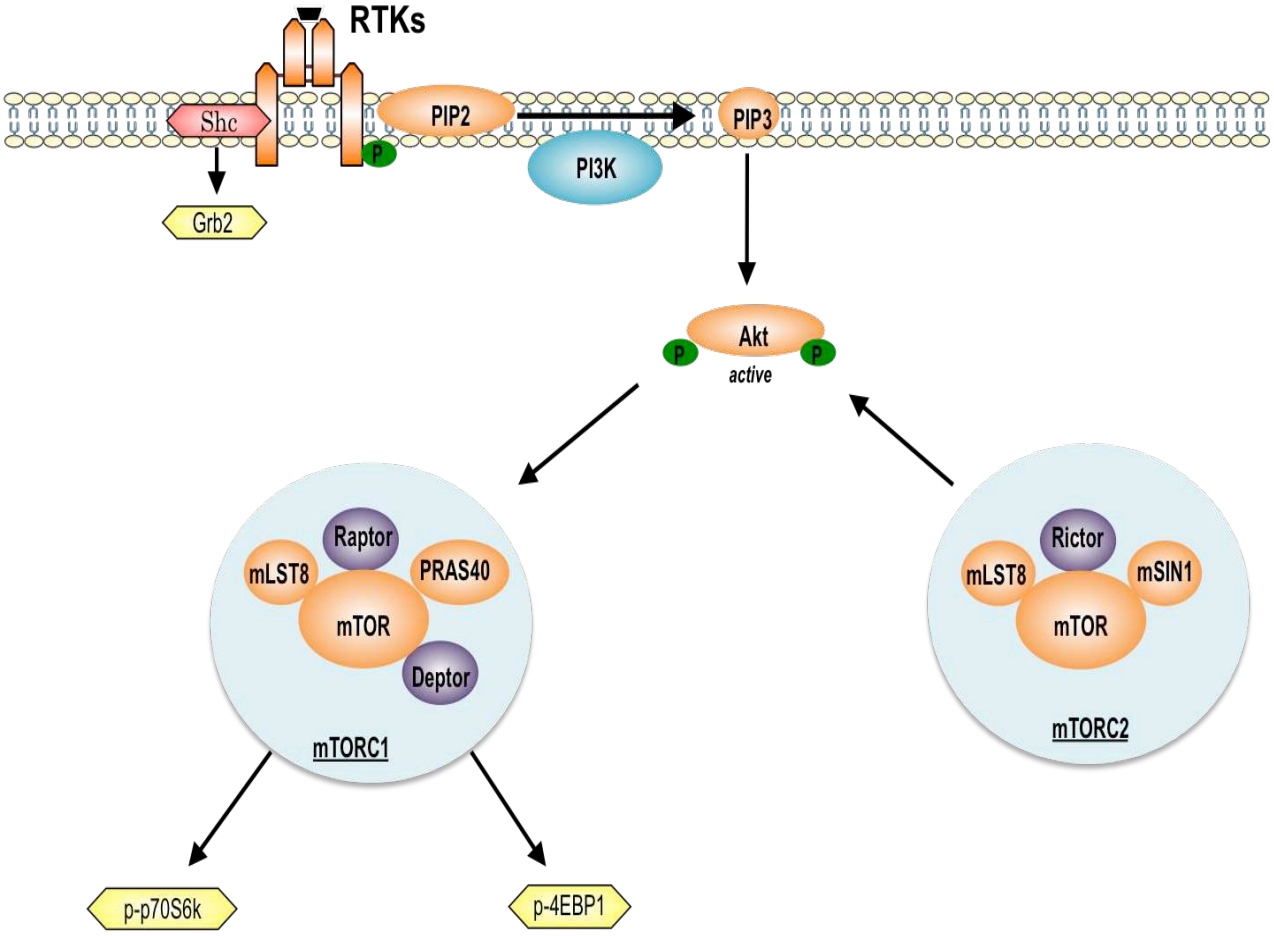


Figure 11: Schéma représentatif de la voie de signalisation mTOR

RTK: *Récépteur tyrosine kinase,* ***Grb2***: *Growth factor Receptor-Binding protein 2;* ***Shc***: *Src Homology/Collagen;* ***PI3K***: *Phosphatidylinositol 3 Kinase;* ***PIP***: *Phosphatidylinositol Phosphate,* ***mLST8***: *mamalian Lethal with Sec13 Protein 8,* ***mSIN1***: *mamalian SAPK interacting protein,* ***mTORC***: *Mammalian Target of Rapamycine Complex,* ***4EBP***: *4E Binding Protein,* ***PRAS40***: *Proline-Rich AKT Substrate*

résidu conservé, la sérine 473, dont la phosphorylation est nécessaire pour l'activation complète d'AKT (Andjelković et al., 1997). Ainsi, l'interaction avec le PIP3 provoque des changements de conformation de la protéine AKT pour exposer plusieurs sites de phosphorylation dont la thréonine 308 et la sérine 473 (Alessi et al., 1996). La protéine PDK1, localisée au niveau de la membrane plasmique, phosphoryle ainsi la thréonine 308 permettant l'activation partielle d'AKT. La stabilité de la phosphorylation de la thréonine 308 et l'activation complète de la protéine sont alors assurées principalement par une autre kinase, le complexe protéique mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 2), en phosphorylant la sérine 473 (Sarbassov et al., 2005).

4) Les complexes mTORC1 et mTORC2

mTOR est une enzyme à activité sérine-thréonine kinase appartenant à la famille des PIKK (Phosphatidyl Inositol Kinase-related kinase) (Alayev and Holz, 2013). Elle est toujours associée à d'autres partenaires protéiques pour former les complexes mTORC1 et mTORC2 (Figure 11).

4.1) Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est formé de 6 protéines: mTOR, RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8), DEPTOR (DEP-domain-containing mTOR interacting protein), TTI1/TEL2 (KIAA0406/HCLK2), PRAS40 (Proline Rich Akt Substrate 40KDa). Il est inhibé par la rapamycine via la chaperonne FKBP12. AKT peut activer mTORC1 soit directement par une phosphorylation activatrice, soit indirectement en phosphorylant l'hétérodimère TSC1/TSC2 (Tuberous sclerosis complex-2), levant ainsi l'inhibition qu'il exerce sur le complexe mTORC1. mTORC1 a un rôle fondamental dans le contrôle du métabolisme et de la croissance cellulaire. Par phosphorylation, il active la kinase p70S6K (S6 Kinase 1) et inhibe le facteur 4E-BP1 (eucaryotic translation initation factor 4E-binding protein 1) pour stimuler la synthèse protéique. La S6K phosphoryle et inhibe l'activité de PDCD4 (Programmed Cell Death Protein 4), qui est un inhibiteur de la traduction (Saxton and Sabatini, 2017). La S6K active également la protéine ribosomale S6 et favorise donc la biogenèse des ribosomes (Laplante and Sabatini, 2012). La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 lève l'inhibition qu'il exerce sur le facteur d'élongation eIF4-E. Cela favorise la mise en place du complexe eIF4-F

permettant l'initiation de la traduction (Fingar et al., 2002). *In fine*, mTOR joue un rôle dans le contrôle de l'initiation de la traduction. De ce fait, il est finement régulé par la biodisponibilité des nutriments et plus particulièrement des acides aminés (Long et al., 2005). En effet, la présence d'acides aminés induit d'une part la fixation de RHEB sur mTORC1 et d'autre part la relocalisation de mTORC1 par les protéines RAG, favorisant ainsi l'activation du complexe (Sancak et al., 2008).

4.2) Le complexe mTORC2

Le complexe mTORC2 est composé des protéines : mLST8, DEPTOR, TTI1/TEL2, mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein) et de RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR). Ce complexe a un rôle pro-prolifératif et anti-apoptotique via ses cibles incluant SGK1 (serum and glucocorticoid-induced protein kinase), une kinase contrôlant le transport des ions et la croissance cellulaire (Alessi et al., 2008) ; et la PKC (Protein kinase C) impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Sarbassov et al., 2004; Jacinto et al., 2004). De plus, ce complexe est capable d'agir en aval de la voie PI3K/AKT/mTOR puisqu'il est responsable de la deuxième phosphorylation sur le résidu sérine 473 d'AKT.

5) Systèmes de régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR

Etant donné les rôles essentiels joués par cette voie de signalisation, plusieurs niveaux de régulation sont mis en place afin de contrôler de manière fine son activité.

5.1) Les phosphatases

Le premier niveau de régulation implique des phosphatases. Les deux principales sont PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome ten) et PHLPP1/2 (Pleckstrin Homology domain leucin-rich repeat protein phosphatases 1 and 2). PTEN est une phosphatase à double spécificité qui possède une activité tyrosine kinase et une activité lipide phosphatase (Maehama and Dixon, 1998). D'un point de vue structural, PTEN est composé de deux domaines majeurs, un site catalytique et un domaine C2 qui lui permet d'adhérer à la

membrane plasmique près de son substrat. La fonction principale de PTEN est de déphosphoryler en position 3 le noyau innositol des PIP3 et de créer le PIP2 (Georgescu, 2010). Son activité lipide phosphatase est essentielle pour son rôle de régulateur de la voie PI3K/AKT/mTOR et sa fonction suppresseur de tumeur (Shi et al., 2012). Sa mutation est associée au développement tumoral dans de nombreux cancers dont le cancer du foie (Zhou et al., 2011). Ainsi PTEN est l'un des gènes suppresseurs de tumeur les plus mutés notamment dans les CHC. Dans le même contexte, la phosphatase PHLPP1/2 déphosphoryle directement AKT au niveau de la Sérine 473. Une autre phosphatase, la PP2A (Protein Phosphatase 2A), complète cette action inhibitrice de la voie de signalisation en déphosphorylant la thréonine 308, rendant AKT complètement inactive (Bayascas and Alessi, 2005).

5.2) Les boucles de rétrocontrôle

Un autre moyen de contrôler l'activation de cette voie de signalisation est la mise en place de boucles de rétrocontrôle, à l'aide de protéines produites en réponse à l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR (Faes and Dormond, 2015). Une première boucle de rétrocontrôle est initiée au niveau du complexe mTORC1. En effet, l'activation de mTORC1 et de sa cible p70S6K entraîne la phosphorylation et la dégradation de la protéine adaptatrice IRS1. mTORC1 phosphoryle également GRB10, conduisant à l'inhibition du récepteur IGFR et par conséquent à la diminution du recrutement de la PI3K à celui-ci. Une deuxième boucle implique le complexe mTORC2 : mTORC2 phosphoryle et stabilise la protéine FBW8 (F-Box and WD Repeat Domain Containing 8), une ubiquitine ligase favorisant la dégradation d'IRS1.

6) Dérégulation de la voie PI3K/AKT dans le cadre du CHC

Comme évoqué précédemment, l'activation constitutive de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR a été maintes fois décrite comme un déterminant majeur de la croissance et de la survie des cellules tumorales dans une multitude de tumeurs solides (Chen and Wang, 2015), dont le CHC où une dérégulation de cette voie touche environ 50% des cancers du foie (Villanueva et al., 2008). Cette activation constitutive et aberrante de la voie PI3K/AKT dans le CHC peut être due à plusieurs facteurs. Dans un premier temps, l'augmentation de l'activité de cette voie de signalisation peut être due à une stimulation accrue des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, et en particulier les récepteurs IGFR et EGFR. En

effet il a été montré que l'expression des facteurs de croissance comme l'IGF et l'EGF est augmentée dans le CHC chez l'homme, entrainant une activation constitutive de leur RTKs respectifs et par conséquent de la voie de signalisation PI3K/AKT (Desbois-Mouthon et al., 2001, Cariani et al., 1988). Des anomalies du fonctionnement du suppresseur de tumeur PTEN peuvent également conduire à une hyperactivation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le CHC. Même si les mutations inactivatrices de PTEN sont rares (Zucman-Rossi et al., 2015), il est rapporté que son expression est réduite dans près de la moitié des CHC (Tian et al., 2017). De plus, l'expression de PTEN peut être inhibée directement par la protéine HBX chez les patients infectés par le HBV (Tian et al., 2017). Cette diminution de l'expression de PTEN corrèle ainsi directement avec la sévérité du cancer et une survie diminuée à cinq ans chez les patients atteints de CHC (Hu et al., 2003). De plus, la phosphorylation excessive d'AKT, associée à la déficience de PTEN, est directement impliquée dans les mécanismes de résistance aux traitements de chimiothérapie et à la récidive précoce du CHC avec traitement (Nakanishi et al., 2005). Enfin, une dérégulation de l'activité de la PI3K peut être à l'origine d'une activation constitutive de la voie PI3K/AKT. Certaines études ont ainsi mis en évidence l'existence de mutation somatiques activatrices dans les gènes PI3KCA et PI3KR1, qui codent respectivement pour la sous-unité catalytique p110α et la sous unité régulatrice p85α de la PI3K (Lee et al., 2005 ; Tanaka et al., 2006). Dans ce contexte, l'importance de p85α dans le développement du CHC a été démontrée récemment par différentes études. Par exemple, l'inhibition de p85α *in vitro*, dans différentes lignées hépatomateuses transformées, induit une diminution de leur prolifération, de leur migration et favorise également leur apoptose. Ces mécanismes sont corrélés à la diminution de la signalisation PI3K/AKT (Ai et al., 2018 ; He et al., 2017). Il est cependant important de noter que le rôle de p85α dans le développement du CHC semble être contexte-dépendant. En effet, chez la souris, l'invalidation de p85α, spécifiquement dans les hépatocytes, conduit à une augmentation paradoxale de la voie de signalisation PI3K/AKT et à un développement d'un CHC au cours du vieillissement (Taniguchi et al., 2018). Les mécanismes sous-jacents de cette tumorigenèse restent donc à être clarifiés.

7) La voie PI3K/AKT/mTOR comme cible thérapeutique dans le CHC

Au vu de son rôle majeur dans la carcinogenèse hépatique, la voie PI3K/AKT/mTOR représente une cible attractive pour la thérapie anti-cancéreuse. En plus des inhibiteurs des

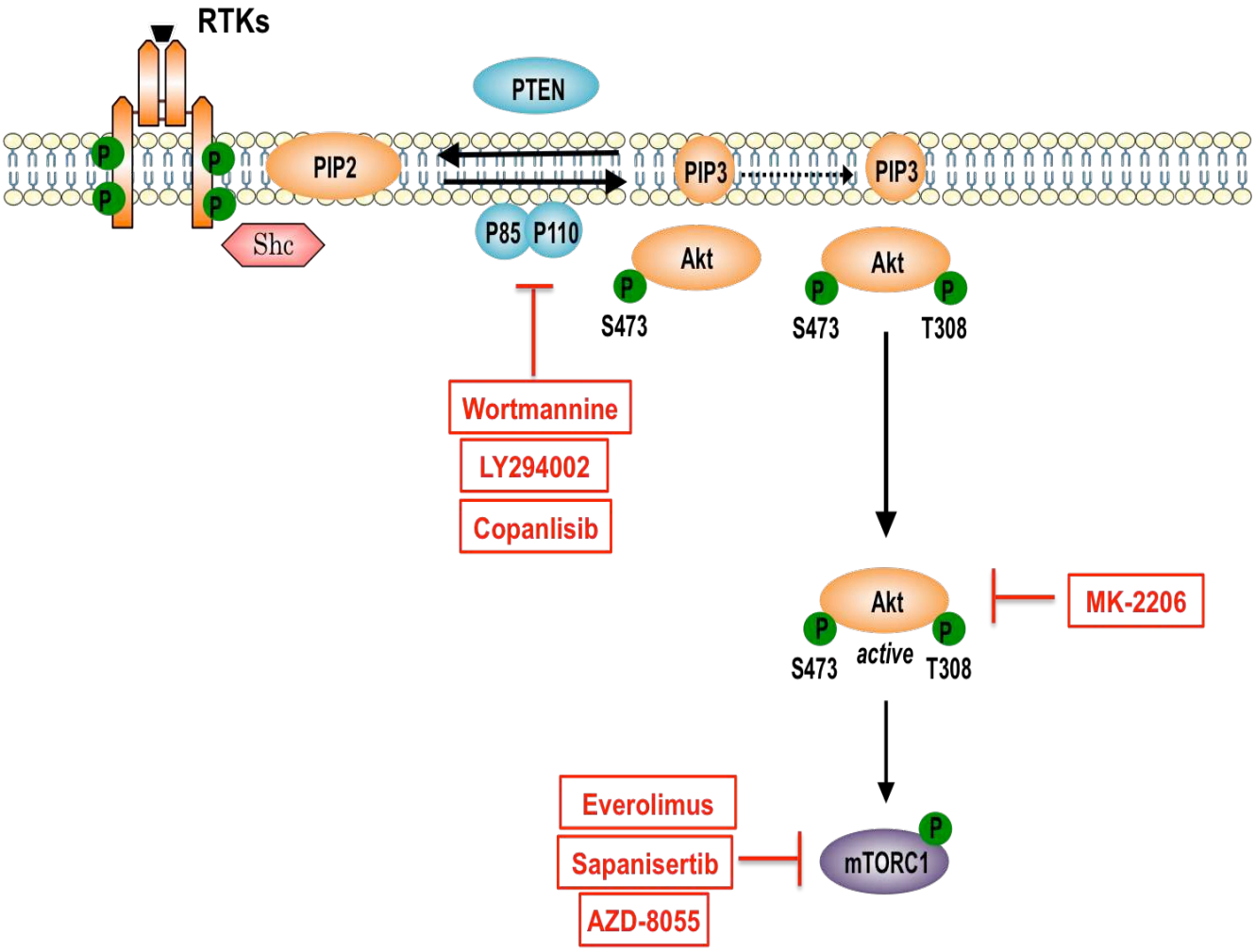


Figure 12: Vue d'ensemble des molécules pharmacologiques inhibitrices de la voie PI3K/AKT/mTOR

Parmi les molécules inhibitrices de la voie PI3K/AKT/mTOR, seule l'Everolimus, la Sapanisertib et le MK-2206 font l'objet d'études de phase clinique pour la prise en charge des CHC.

RTK: *Recepteur à activité Tyrosine Kinase,* ***PI3K****: Phosphatidylinositol 3 Kinase;* ***PIP****: Phosphatidylinositol Phosphate,* ***mTORC****: Mammalian Target of Rapamycine Complex,* ***Shc****: Src Homology/Collagen,* ***PTEN****: Phosphatase and Tensing Homolog*

RTKs que nous avons évoqué précédemment, des molécules inhibant sélectivement la voie PI3K/AKT/mTOR à différents niveaux ont ainsi été développées dans le cadre du traitement du CHC (Figure 12) : on retrouve essentiellement en essais cliniques et pré-cliniques des inhibiteurs des différentes isoformes de la PI3K, d'AKT et de mTOR. La première génération des inhibiteurs de la PI3K comprend la Wortmannine et le LY294002. Malgré leur activité anti-tumorale, leur développement n'a pas été poursuivi du fait notamment de leur faible solubilité, d'une importante toxicité dans des modèles animaux, et de propriétés pharmacocinétiques défavorables (Bauer et al., 2015). D'autres inhibiteurs de la PI3K ont par la suite été développés et plusieurs d'entre eux sont actuellement en évaluation clinique dans le cancer du poumon, le cancer colorectal ou encore le cancer du sein (Zhang et al., 2020). Certains de ces inhibiteurs comme la Copanlisib sont encore en phase pré-clinique dans le cadre du CHC et montrent des résultats prometteurs (Ye et al., 2019). Il existe différentes classes d'inhibiteurs d'AKT : les inhibiteurs de la liaison aux PIP3, les inhibiteurs compétitifs de l'ATP qui empêchent la phosphorylation par AKT de ses substrats, et les inhibiteurs allostériques qui induisent un changement conformationnel de la protéine empêchant la liaison de l'ATP sur son site et inactivant ainsi AKT. Plusieurs de ces molécules sont également en phase d'essai clinique dans plusieurs types de cancers (https://clinicaltrials.gov, Janvier 2021) (Table 1). Dans le cadre du CHC, seule le MK-2206, un inhibiteur allostérique d'AKT, a fait l'objet d'un essai clinique de phase II mais n'a pas eu de résultats probants (https://clinicaltrials.gov). Enfin, la Rapamycine (ou Sirolimus) est un inhibiteur naturel de mTORC1, provenant de la bactérie streptomyces hygroscopus. Des dérivés de la Rapamycine, nommés « rapalogues », ont été développés pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques et diminuer les effets immunosuppresseurs de la Rapamycine (Hua et al., 2019). Parmi eux, le Temsirolimus et l'Everolimus ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement du cancer du rein avancé (Pal and Figlin, 2011). Dans le cadre du CHC, l'Everolimus a montré une efficacité avérée sur la progression tumorale et la survie des patients traités (Zhu et al., 2014). D'autres molécules inhibitrices de mTORC1 comme la Sapanisertib ou l'AZD8055 sont actuellement en phase d'essai clinique et préclinique chez des patients atteints de CHC (Teng et al., 2019).

En résumé de cette seconde partie, nous avons vu que de nombreuses voies de signalisation pro oncogénique pouvaient jouer un rôle dans le développement du CHC. Parmi celles-ci, la voie PI3K/AKT/mTOR joue un rôle central dans les mécanismes de croissance, de

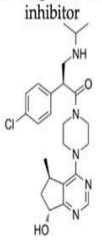
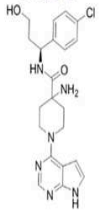
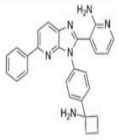
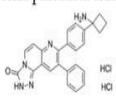
Inhibitor	Mechanism of Action, Structure	Experiment Setup	Antitumor Effect	Effect on TME	Clinical Trial
GDC-0068 [64–66]	ATP competitive AKT inhibitor 	Combination of GDC-0068 with Sorafenib in HepG2 and Huh7 sorafenib-resistant cell-lines	- synergistic antitumor effect - promotion of apoptosis - induction of autophagic cell death	Not investigated	Phase-I/II including multiple solid tumors treated by GDC-0068 in monotherapy or in association with abiraterone + prednisolone: safe and tolerable in monotherapy or in combination
AZD5363 [67,68]	ATP competitive AKT inhibitor 	Single agent in HepG2 and Huh-7 HCC cells Combination with FH535 (β-catenin inhibitor) in THH, Hep3B and HepG2	- inhibition of tumor proliferation - induction of cell-cycle arrest - promotion of apoptosis - promotion of autophagy through p53 activation	Not investigated	Phase-I, AZD5363 in monotherapy, in multiple advanced solid tumors including liver cancer (NCT01895946): safe and tolerable, no data on antitumor response Phase-I including multiple solid tumors harboring AKT mutations (NCT02465060)
ARQ 092 [69,70]	allosteric pan-AKT inhibitor 	Single agent and in combination with Sorafenib in a DEN-induced cirrhotic rat model of HCC and in Hep3B, HepG2, Huh-7, PLC/PRF, and HR4 HCC cell lines	- inhibition of tumor proliferation - promotion of apoptosis - synergistic antitumor effect when combined with sorafenib	- anti-angiogenic effect - improved liver fibrosis - decrease of intrahepatic neutrophils and macrophages	No clinical trial
ARQ 751 [71]	allosteric pan-AKT inhibitor Chemical structure of ARQ 751 is currently unavailable.	Single agent and in combination with sorafinib in DEN-induced cirrhotic rat model of HCC	- inhibition of tumor proliferation - synergistic antitumor effect when combined with sorafenib	- Improved liver fibrosis	Phase-Ib (NCT02761694) in solid tumors with PIK3CA/AKT/PTEN mutations including HCC: ongoing
MK-2206 [72,73]	allosteric pan-AKT inhibitor 	Single agent in Human Huh7, Hep3B, and HepG2 HCC cell lines	- Promotion of apoptosis - Inhibition of cell proliferation - Induction of cell cycle arrest	Not investigated	Phase-II trial, MK-2206 in monotherapy in advanced HCC previously treated (NCT01239355): discontinued due to discouraging results

Table 1 : Vue d'ensemble des différents inhibiteurs d'AKT et leur développement vers la clinique

Tiré de "Targeting Akt in Hepatocellular Carcinoma and Its TumorMicroenvironment", Mroweh et al., 2021

prolifération et d'agressivité du CHC. Cependant, bien que des inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR soient actuellement utilisés pour le traitement de plusieurs types de tumeurs solides, peu d'entre eux ont montré une réelle efficacité dans le cadre du traitement du CHC. Aujourd'hui, la recherche fondamentale s'articule autour de la synergie que pourraient avoir des inhibiteurs de cette voie de signalisation avec les traitements classiques utilisés contre le CHC (Matter et al., 2014). En effet, il a été montré que la voie PI3K/AKT joue un rôle important dans la résistance aux traitements de chimiothérapie, et plusieurs études ont pu montrer qu'une inhibition de cette voie de signalisation permettait de sensibiliser les cellules cancéreuses à la Sorafenib (Zhu et al., 2017). La recherche de nouvelles molécules inhibant cette voie représente donc un intérêt thérapeutique majeur dans le cadre du CHC.

Partie 3 : Métabolisme hépatique et reprogrammation métabolique de l'hépatocyte cancéreux

I. Métabolisme hépatique physiologique

Le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie énergétique en contrôlant entre autres le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Il contrôle en effet le métabolisme du cholestérol, de l'urée, des acides aminés et l'homéostasie des deux sources énergétiques majeures, le glucose et les acides gras, en fonction des besoins nutritifs requis pour assurer les fonctions essentielles de l'organisme.

1) Métabolisme du glucose

L'une des principales fonctions du foie est de maintenir une glycémie constante quel que soit l'état nutritionnel de l'organisme. Pour ce faire, il agit notamment en réponse aux hormones pancréatiques. Il permettra, selon l'état des besoins, d'effectuer un stockage et une mise en réserve du glucose en excès sous forme de glycogène ou de lipides lorsque le rapport insuline/glucagon augmente et, inversement, une libération dans la circulation sanguine des réserves énergétiques de glucose stocké lorsque le ratio insuline/glucagon est diminué. En période de jeûne, le rapport insuline/glucagon est faible car le manque d'approvisionnement en glucose et en acides gras favorise la production de glucagon par les cellules α du pancréas. En réponse à ce signal hyperglycémiant, le foie produit le glucose nécessaire aux organes gluco-dépendants, tels que le cerveau et les globules rouges, par activation de la voie de la glycogénolyse et/ou de la gluconéogenèse. Par ailleurs, le foie va également capter les acides gras libres circulants provenant de la lipolyse du tissu adipeux pour synthétiser des corps cétoniques qui pourront ainsi se substituer au glucose dans le maintien du potentiel énergétique. En période postprandiale, le rapport insuline/glucagon est augmenté suite à la sécrétion d'insuline produite par les cellules β du pancréas. Son action hypoglycémiante aura pour effet l'activation de voies métaboliques visant à absorber et utiliser le glucose telles que la voie de la glycolyse, pour ensuite favoriser une mise en réserve du glucose excédentaire sous la forme de glycogène ou d'acides gras respectivement grâce à la glycogénogenèse et la

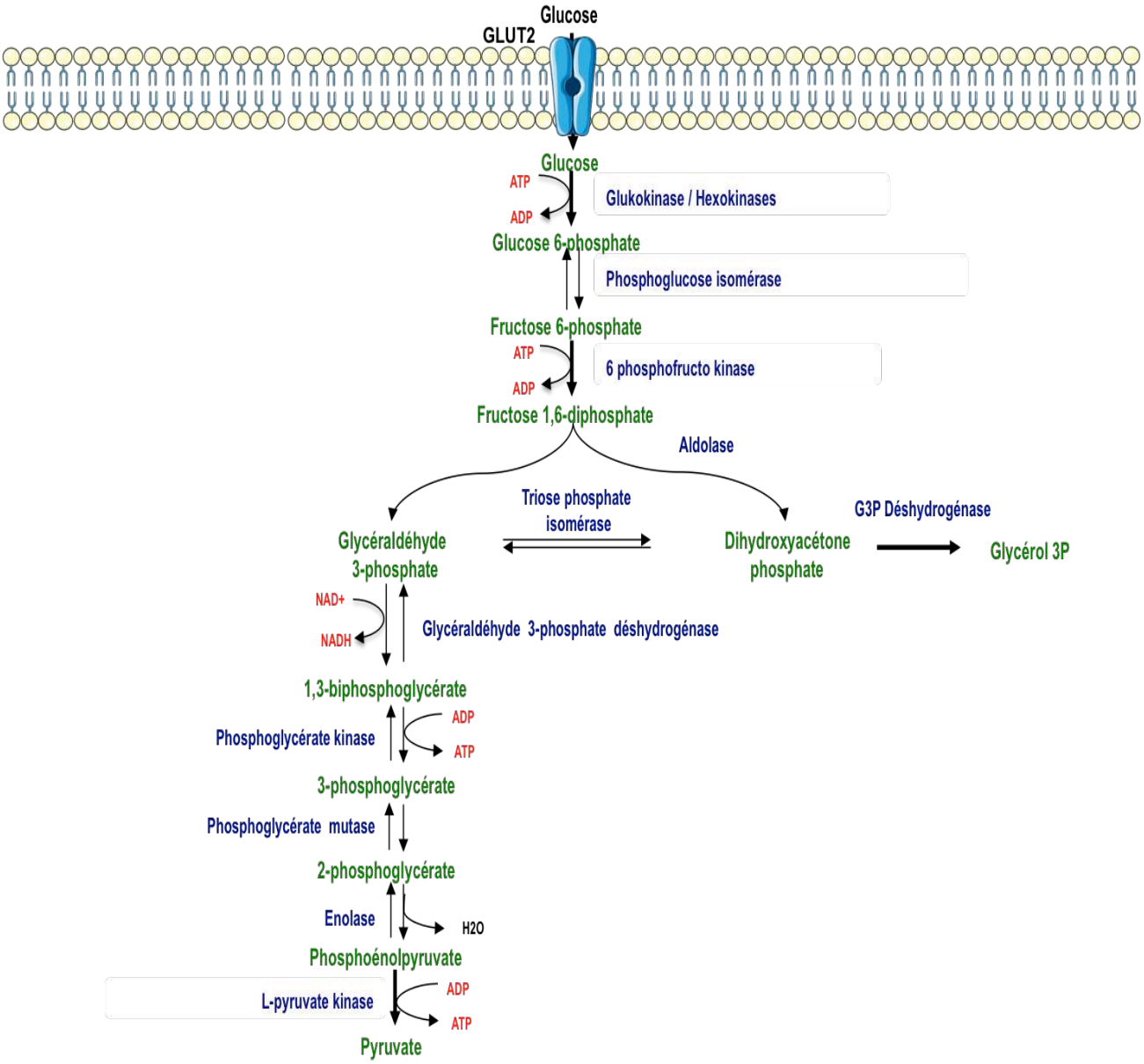


Figure 13: La glycolyse hépatique

NAD: *Nicotinamide Dinucléotide,* ***ATP***: *Adénosine TriPhosphate,* ***ADP***: *Adénosine DiPhosphate*

lipogenèse. Les acides gras issus de l'alimentation vont également être transportés et mis en réserve dans le foie sous forme de triglycérides (TG).

Dans l'hépatocyte, l'entrée ou la sortie de glucose entre le cytosol et la circulation sanguine, selon l'état nutritionnel et hormonal, sont assurées par diffusion facilitée à travers la membrane plasmique grâce au transporteur bidirectionnel de glucose GLUT2 (Slc2a2). GLUT2 appartient à la famille des transporteurs de glucose membranaire GLUT (Glucose Transporter) caractérisée par 12 domaines transmembranaires (Bécard et al., 2001; Olson and Pessin, 1996). GLUT2 se distingue des autres isoformes par son affinité faible pour le glucose et son caractère non insulino-dépendant. L'ensemble des caractéristiques de GLUT2 permet ainsi un transport du glucose non saturé dans l'hépatocyte pour des concentrations physiologiques de glucose (5 à 10 mM). Ce transport de glucose permet à l'hépatocyte d'avoir un reflet immédiat des variations des concentrations circulantes de glucose leur permettant ainsi de réagir immédiatement à toutes variations de la glycémie. Comme la glycémie portale excède rarement 10 mM et que le Km du transporteur de glucose GLUT2 est élevé, le transport de glucose n'est pas limitant ni pour l'entrée ni pour la sortie de glucose. Une fois dans la cellule, le glucose peut alors rentrer dans plusieurs voies métaboliques en fonction des besoins nutritionnels et énergétiques de l'hépatocyte.

1.1) La glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie qui a lieu dans le cytosol des hépatocytes (Petersen et al., 2017) (Figure 13). Par transformation du glucose (possédant 6 atomes de carbone) en 2 molécules distinctes de pyruvate (chacune ayant 3 atomes de carbone), la glycolyse permet la production d'énergie sous la forme de 2 molécules d'Adénosine TriPhospahte (ATP). En situation aérobie, le pyruvate généré sera par la suite transporté vers la mitochondrie en étant décarboxylé grâce au complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA ainsi généré pourra alors être utilisé par le cycle de Krebs (TCA). Les étapes successives du TCA, qui seront détaillées dans la suite de cette partie introductive, permettent de produire les équivalents réduits de Nicotine Amide Dinucleotides (NADH) et Flavine Adenine Dicluneotides (FADH2) nécessaires au fonctionnement de la chaine respiratoire qui permettra la production d'ATP. Par ailleurs, l'excès d'acétyl-CoA ainsi généré pourra également s'engager dans la voie de synthèse *de novo* des acides gras (AG) par la voie de la lipogenèse. Ces acides gras seront ensuite estérifiés en triglycérides et exportés vers le tissu adipeux sous forme de VLDL (Very Low

Density Lipoprotein) pour y être stockés. Finalement, le pyruvate peut être également réduit en lactate par la lactate deshydrogénase (LDH) en condition anaérobie, cette réaction jouant un rôle déterminant dans les processus de carcinogenèse.

D'un point de vue schématique ; la glycolyse peut être considérée comme une voie métabolique à deux phases. La première phase requiert l'utilisation de 2 molécules d'ATP afin de convertir le glucose en fructose 1,6-bisphosphate (F1,6BP) tandis que la seconde phase génère de l'énergie, produisant 4 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH en dégradant le F1,6BP en pyruvate.

La première étape de la glycolyse transforme le glucose en glucose 6-phosphate (G6P). Cette réaction de phosphorylation du glucose joue un rôle central pour l'utilisation du glucose par le foie. En effet, le G6P est un métabolite au carrefour de nombreuses voies métaboliques utilisant le glucose. Cette réaction est commune aux voies de la glycolyse, de la synthèse de glycogène, et à la voie des pentoses phosphates permettant respectivement la synthèse de lactate/pyruvate, de glycogène et de NADPH (Nicotine Amide Dinucleotides Phosphate). Par conséquent, toute variation de l'activité de phosphorylation du glucose en G6P entraînera des modifications du flux de ces différentes voies métaboliques par un effet de masse (Rajas et al., 2019). Chez les mammifères cette première étape de la glycolyse est catalysée par quatre hexokinases (HK) différentes. Les hexokinases I à III, ont une forte affinité pour différents hexoses, dont le glucose. Elles sont inhibées par des concentrations physiologiques en G6P et présentent une saturation de leur activité à de faibles concentrations de glucose. A l'opposé, l'hexokinase IV, plus communément nommée Glucokinase (GK), qui est l'isoforme majoritairement exprimée dans les hépatocytes non prolifératifs, a une affinité plus faible pour le glucose. A la différence des autres HKs, la GK n'est pas inhibée par le G6P et n'est pas saturée par le glucose. Ainsi, la GK possède une activité qui augmente avec les concentrations plasmatiques de glucose. L'ensemble de ces caractéristiques lui confère la capacité à répondre rapidement à des variations de concentrations intracellulaires en ce dernier. La GK agit donc comme senseur du glucose dans l'hépatocyte, permettant de modifier immédiatement la vitesse de synthèse du G6P destiné aux voies de la glycolyse, des pentoses phosphates ou de la synthèse du glycogène en fonction de la glycémie.

Dans le foie, la transcription de la GK est dépendante de l'état nutritionnel. A l'état nourri la transcription de la GK est stimulée par l'insuline (Foretz et al., 1999a). A l'opposé, à jeun, son expression est réprimée par le glucagon via l'augmentation des concentrations intracellulaires en AMPc (Adenosine MonoPhosphate Cyclique) (Iynedjian et al., 1989). Dans l'hépatocyte, le glucose ne semble pas moduler l'expression de la GK (Matsuda et al., 1990;

Nouspikel and Iynedjian, 1992) et le facteur de transcription SREBP-1c (Sterol Response Element Binding Protein 1c) est le principal activateur transcriptionnel de la GK en réponse à l'insuline (Foretz et al., 1999a). Au niveau post-traductionnel la GK est régulée négativement par la GKRP (Glucokinase Regulatory Protein) qui, en présence de faibles quantités de glucose, lie la GK afin de la séquestrer dans le noyau des hépatocytes (Brown et al, 1997; Shiota et al., 1999). À l'inverse, à l'état postprandial, la présence de glucose et de fructose amène à la dissociation du complexe GK/GKRP et à la libération de la GK qui pourra alors exercer son activité enzymatique de phosphorylation dans le cytosol.

La deuxième étape irréversible de la glycolyse est la transformation du G6P en F1,6BP par la PFK1 (6-Phosphofructose-Kinase-1) également appelée phosphofructokinase (PFK). Cette réaction constitue un élément déterminant dans la régulation du flux métabolique car le F1,6BP module l'activité de la L-pyruvate kinase. La PFK1 est régulée de façon allostérique. Elle est inhibée par de fortes concentrations en ATP tandis que l'AMP possède la capacité de lever cette inhibition. Ainsi, l'activité de la PFK1 est augmentée de façon inversement proportionnelle au ratio ATP/AMP. Physiologiquement la PFK1 est donc capable de stimuler la glycolyse quand la charge énergétique diminue.

La pyruvate kinase (PK) catalyse la réaction finale de la glycolyse aérobie. Cette réaction, irréversible, permet la synthèse de pyruvate et d'ATP à partir de phosphoénolpyruvate (PEP) et d'ADP (Pilkis et al., 1988). Chez les mammifères, il existe quatre isoformes de la pyruvate kinase dont l'expression varie d'un tissu à l'autre (Ye et al., 2012). Ces isoformes sont transcrites à partir de deux gènes distincts (Jurica et al., 1998). La pyruvate kinase dont l'activité est majoritaire dans le foie est la L-PK (Liver Pyruvate Kinase) (Jurica et al., 1998). La régulation de l'activité enzymatique de la L-PK se fait via des effecteurs allostériques. L'ATP et l'alanine sont des inhibiteurs de son activité, tandis qu'à l'opposé, le F1,6BP issu de la glycolyse stimule celle-ci (Pilkis and Claus, 1991). De plus, le glucagon, via l'AMPc stimule la phosphorylation de la LPK par la protéine kinase A (PKA) pour inhiber son activité en diminuant sont affinité pour son substrat, tandis qu'à l'inverse, l'insuline, en activant des phosphatases, permet sa déphosphorylation et donc la levée de son inhibition (Assimacopoulos-Jeannet and Jeanrenaud, 1990). En parallèle, l'expression génique de la L-PK est également régulée de façon nutritionnelle par les hormones et les nutriments. Son expression est diminuée en période de jeûne et est fortement stimulée par un régime riche en hydrates de carbone (Noguchi et al., 1983; Vaulont et al., 1986; Weber et al., 1984).

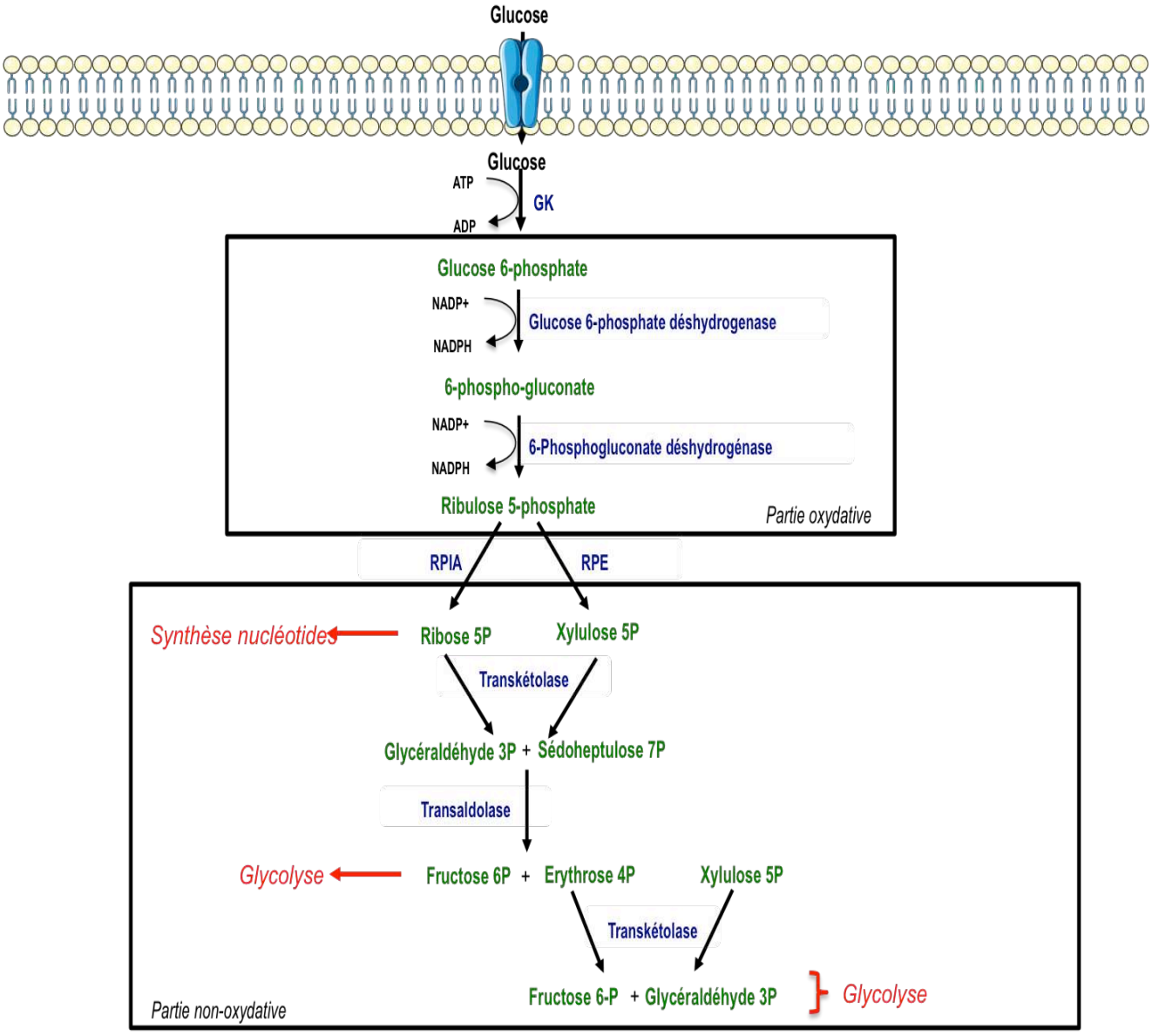


Figure 14: La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates est constituée de deux parties ayant des rôles métaboliques différents: La partie oxydative permet la synthèse de NADPH+, la partie non-oxydative permet la réintégration du ribose 5-phosphate dans la partie oxydative.

***NADP**: Nicotinamide Dicnucléotide Phosphate, **ATP**: Adénosine TriPhosphate*

1.2) La glycogénogenèse

Cette voie métabolique consiste à stocker le glucose sous forme d'un polysaccharide appelé le glycogène qui est un polymère de molécules de glucose. Cette mise en réserve, définie par le terme de glycogénogenèse, s'effectue au niveau du cytosol et fait intervenir la glycogène synthase (GS). Comme évoqué précédemment, la première réaction de phosphorylation du glucose en G6P est réalisée par la GK. Ensuite, le G6P est isomérisé par la phosphoglucomutase en glucose 1-phosphate (G1P) qui sera par la suite transformé en UDP-glucose (uridine diphosphate-glucose) par l'UDP-glucose phosphorylase. Les UPD-glucoses vont ensuite se lier les uns aux autres grâce à la GS pour former les différents polymères de glucose, caractéristiques du glycogène (Roesler and Khandelwal, 1986).

Cette voie métabolique est essentiellement contrôlée par les concentrations sanguines de glucose et donc l'état d'activation de la glycolyse, le G6P étant un activateur allostérique de la GS. Les hormones pancréatiques telles que l'insuline et le glucagon ont aussi un rôle déterminant dans la régulation de l'activité de la GS. En effet, l'insuline active la GS en empêchant son inactivation par la GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3). À l'inverse, le glucagon, via la PKA, inhibe la GS par phosphorylation et favorise la dégradation du G6P par la G6Pase (Petersen et al., 2017, Rajas et al., 2019).

1.3) La voie des pentoses phosphates (PPP)

Cette voie prend place dans le cytosol des hépatocytes et métabolise environs 29 à 38% du glucose capté par le foie (MUNTZ and MURPHY, 1957). Elle se découpe en deux parties dont la première est dite oxydative, qui permet la synthèse de deux molécules de NADPH réduit par la transformation successive du G6P en gluconate 6-phosphate puis en ribulose 5-phosphate (Figure 14). Son activité est cruciale du fait qu'elle représente la source majeure de NADPH, qui est un cofacteur indispensable pour la biosynthèse des lipides, du cholestérol, mais également pour les processus de détoxification des espèces réactives de l'oxygène en permettant la régénération du glutathion réduit. Un autre rôle important de cette voie est la synthèse du ribose 5-phosphate (R5P) qui est un précurseur de la biosynthèse du phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) et des acides nucléiques. Cette partie oxydative de la voie des PPP est sous le contrôle de deux enzymes qui sont la glucose 6-phosphate déshydrogenase (G6PDH), qui convertit le G6P en gluconate 6-phosphate (G6PG) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD) qui convertit le G6PG en R5P. La régulation de la voie des PPP porte essentiellement sur l'état nutritionnel et hormonal de la cellule. Ainsi,

l'enzyme régulatrice de cette voie, la G6PDH est essentiellement activée par une baisse du rapport NADPH/NADP+. Au niveau transcriptionnel, il a été montré que l'insuline et le glucose contrôlent également l'expression de cette enzyme (Wagle et al., 1998).

La seconde partie de cette voie métabolique est dite non-oxydative et régénératrice. Elle permet la réintégration du R5P dans la glycolyse sous forme d'hexoses phosphates, pouvant être dégradés dans la glycolyse en cas de besoin énergétique par la cellule. Cette partie est réversible, les hexoses pouvant être retransformés en pentoses. Dans le cas où les besoins de la cellule en NADPH sont importants, l'hexose phosphate sera à nouveau redirigé vers la partie oxydative de cette voie métabolique (Rajas et al., 2019). Les deux enzymes limitantes de cette partie régénératrice sont la transcétolase ou transketolase (TKT) et la ribose 5-phosphate isomérase (RPIA). La RPIA catalyse quant à elle l'isomérisation réversible du R5P en ribulose5-phosphate (Ru5P). L'engagement du G6P dans l'une de ces branches dépend du statut énergétique et hormonal de la cellule.

En conclusion, à l'état nourri, le glucose entre dans la cellule hépatique par le transporteur de glucose GLUT2, et est rapidement phosphorylé en G6P par la GK. Ce G6P est ensuite dirigé en fonction des besoins de la cellule soit vers la synthèse de glycogène, soit vers la glycolyse, soit vers la voie des PPP ; et ce en fonction du statut énergétique et hormonal de la cellule hépatique.

2) Métabolisme lipidique

Les acides gras sont des molécules aliphatiques à longues chaînes hydro-carbonées (hydrophobes) présentant une fonction acide carboxylique (hydrophile). Ils possèdent une chaîne carbonée de 4 à 36 atomes de carbones. Ils sont essentiels au fonctionnement de la cellule et jouent un rôle dans de nombreuses fonctions biologiques. Ils sont ainsi impliqués :

- Dans la synthèse d'espèces lipidiques, notamment les phospholipides (PL) qui forment les membranes autour des cellules et des organites. Ces PLs jouent un rôle déterminant dans les processus de carcinogenèse.
- Dans la signalisation intracellulaire, où ils servent de molécules de signalisation, capables d'activer ou de réprimer l'activité de protéines, et également dans la synthèse de certaines hormones, comme les hormones stéroïdiennes ou les vitamines liposolubles.

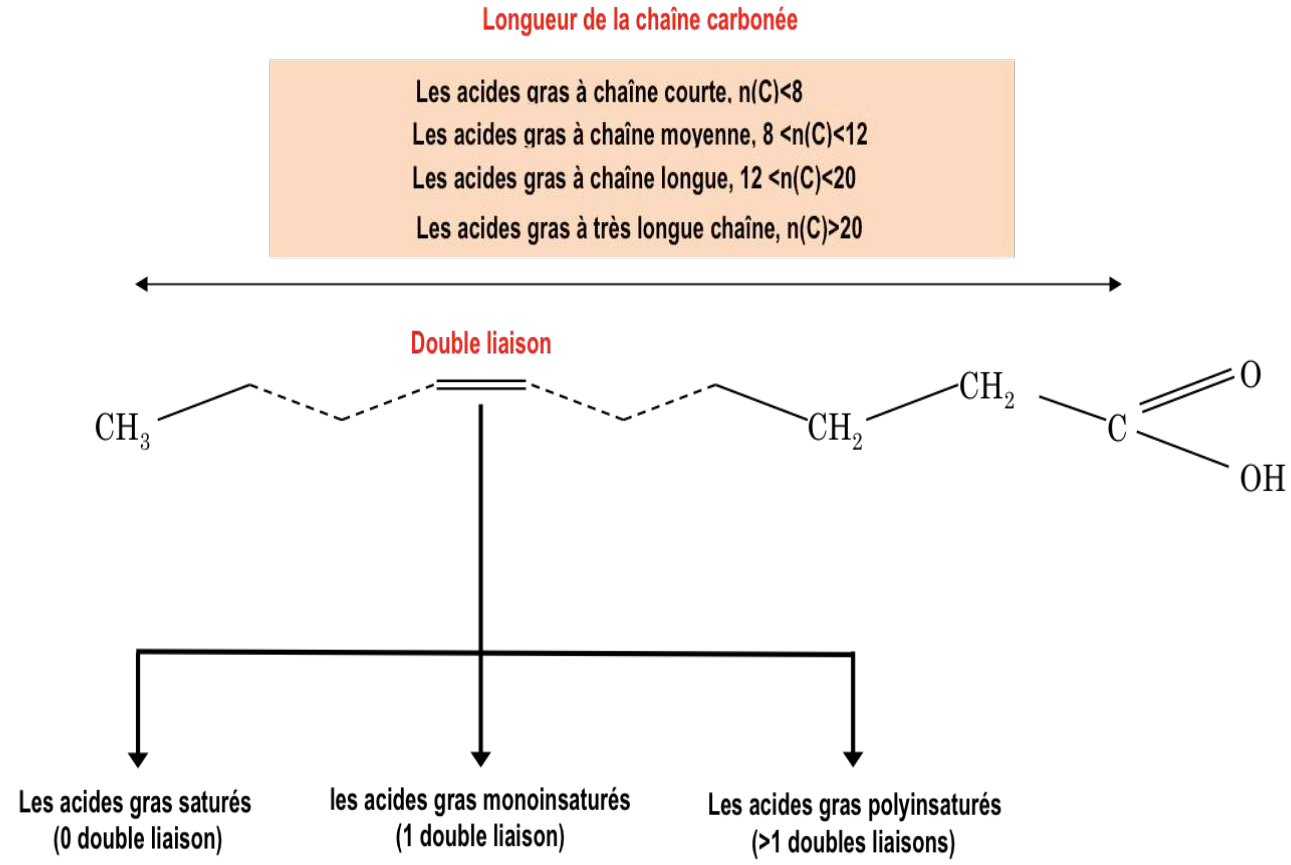


Figure 15: Structure et nomenclature des acide gras

Les acides gras sont des chaînes aliphatiques hydrocarbonées possédant une fonction acide carboxylique. On définit 4 familles d'acides gras en fonction du nombre de carbones, les acides gras à chaîne courte, à chaîne moyenne, à chaîne longue et à très longue chaîne. De même, en fonction du nombre de doubles liaisons, on définit les acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés.

- Dans le foie, ils jouent un rôle métabolique majeur car leur stockage sous forme de triglycérides sert de réserve énergétique et à l'inverse leur dégradation par la β-oxydation mitochondriale permet la synthèse de glucose et d'ATP.

2.1) Structure et classification des AG

Selon la nomenclature usuelle, le carbone porteur de la fonction carboxylique est appelé carbone n°1 (C1). Le CH3 terminal est appelé Cω. Ainsi, les différentes espèces d'AG, peuvent être classées en fonction de la longueur de leur chaîne. Selon, le nombre d'atomes de carbone de la chaîne aliphatique, on distingue les AG à chaîne courte (AGCC) dont le nombre de carbone est inférieur à 8 (C<8), les AG à chaîne moyenne (AGCM, 8<C<12), les AG à chaîne longue (AGCL, 12<C<20) et les AG à très longue chaîne (AGTCL, C>20). Outre leur taille, les AG se caractérisent également par la présence ou non de doubles liaisons (dl) qui conditionnent leur degré d'insaturation. On distingue ainsi les AG saturés (SFA) (0 dl), les AG mono-insaturés (MUFA) (1dl) et les AG polyinsaturés (PUFA) (>1dl). De plus, les AG insaturés se subdivisent en 3 grandes familles appelées ω-9, ω-6, ω-3 selon que 9, 6, ou 3 atomes de carbone séparent le Cω terminal de la dernière double liaison (Figure 15).

Les lipides ont une double origine, alimentaire et endogène. Les lipides de l'alimentation sont majoritairement constitués de TG mais également de phospholipides et de stérols. Chez l'homme, la digestion de ces lipides est sous la dépendance de différentes enzymes et des sels biliaires. Elle est réalisée en 2 étapes. Dans l'estomac, les lipides sont hydrolysés par la lipase gastrique (Moreau et al. 1988). Ensuite, dans l'intestin grêle, la TG lipase (d'origine pancréatique) conduit à la formation de 2 molécules d'AG et d'une molécule de monoacylglycérol (Mu and Porsgaard, 2005). Ces produits sont finalement émulsifiés par les sels biliaires synthétisés par le foie, ce qui permet la formation de micelles qui vont être absorbées par les entérocytes. Une fois dans l'entérocyte, les AG sont pris en charge par un transporteur spécifique, la FABP (Fatty Acid Binding Protein), pour être transportés au RE (Storch and Thumser, 2010). Les monoacylglycérols, quant à eux, vont rejoindre le RE par diffusion passive. Les AG et les monoacylglycérols sont alors de nouveau estérifiés en TG (BROWN and JOHNSTON, 1964), pour être exportés dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines, que l'on nomme les chylomicrons (Stange and Dietschy, 1985). Les lipoprotéines circulantes sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase (LPL) ancrée sur l'endothélium capillaire. Les AG résultants de cette hydrolyse sont alors captés par les tissus

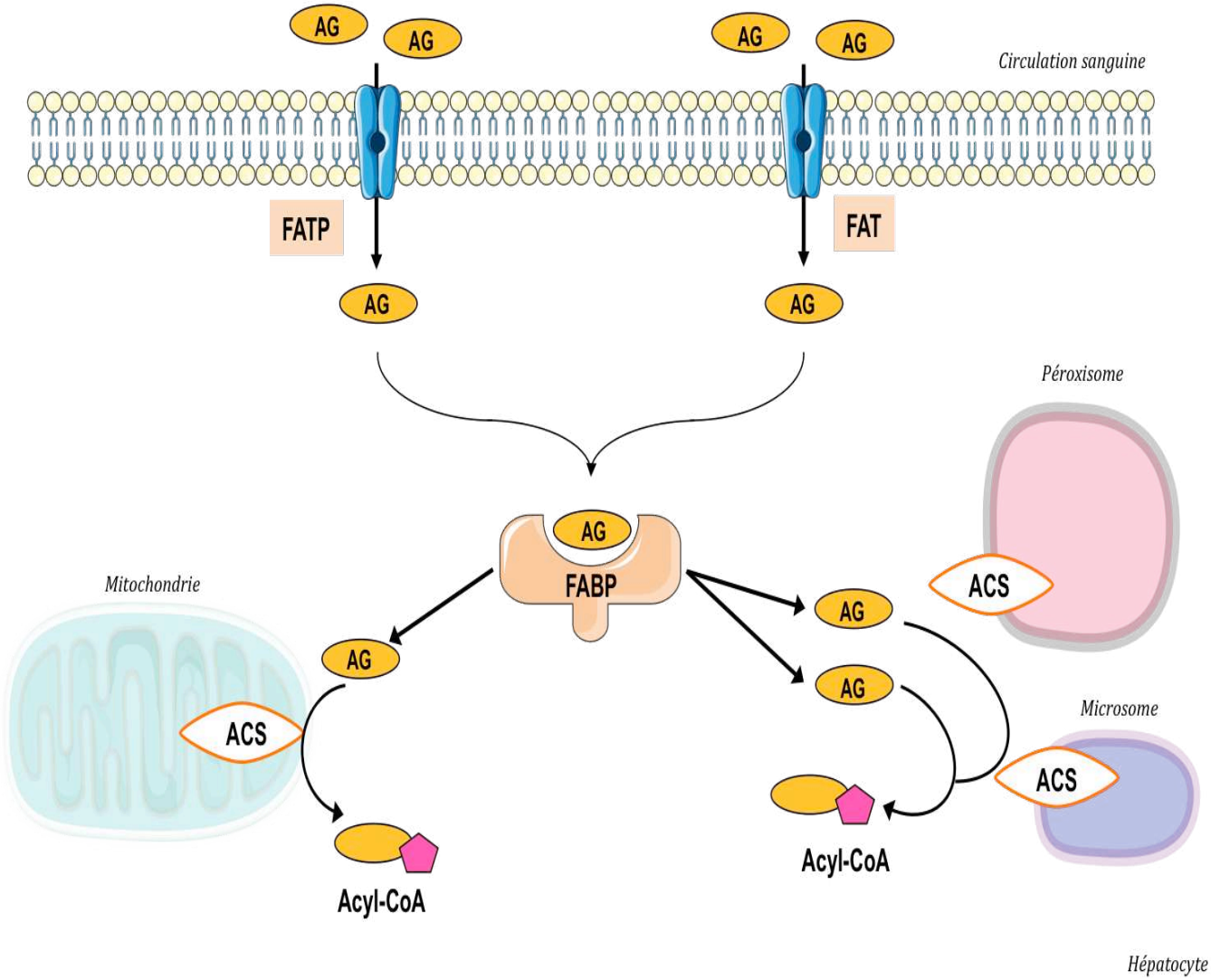


Figure 16: Prise en charge et activation des acides gras

Les acides gras extracellulaires se fixent au niveau de la membrane plasmique à des protéines telles que la FAT qui assurent leur transfert transmembranaire. Dans la cellule, les acides gras sont pris en charge par la famille des FABP qui assure leur transport intracellulaire vers leur site d'activation par les ACS.

***ACS**: Acyl-CoA synthétase; **AG**: Acides gras; **FABP**: Fatty acid binding protein; **FAT**: Fatty acid translocase; **FATP**: Fatty acid transport protein*

périphériques et plus particulièrement par le tissu adipeux, qui est le principal tissu de stockage des AG dans l'organisme (Goldberg et al., 2009).

2.2) Le captage des AG par le foie

A jeun et à l'état nourri le foie possède la capacité de capter des lipides. Le captage des AG libres par l'hépatocyte est réalisé par divers transporteurs, parmi lesquels on retrouve la famille des FATP (Fatty Acid Transporter Proteins) et des FAT (Fatty Acid Translocase). Chez les mammifères il existe six isoformes différentes de FATP. Dans le foie, la FATP2 et la FATP5 sont les isoformes majoritairement exprimées. CD36, qui est une FAT, est une protéine transmembranaire qui augmente le captage des AG par diffusion facilitée. Son expression est faible dans les hépatocytes en condition physiologique. Cependant, il a été montré que l'expression de CD36 est positivement corrélée au contenu en TG de patients présentant une stéatose hépatique non alcoolique ou un carcinome hépatocellulaire (Greco et al., 2008). Par la suite, le transport intracellulaire des AG est pris en charge par une famille de protéines cytoplasmiques, les FABPs (Fatty Acid Binding Protein) qui présentent une haute affinité de liaison pour les AG à chaîne longue. Dans le foie, les isoformes les plus exprimées sont la FABP1 et la FABP5. De manière générale, les FABPs permettent de protéger les cellules contre les effets délétères des AG et de faciliter leur orientation vers des sites intracellulaires d'utilisation tels que la mitochondrie, les microsomes ou les peroxysomes (Figure 16).

2.3) L'activation des AG en acyl-CoA

La conversion des AG en acyl-CoA est une étape essentielle dans leur métabolisme cellulaire. En effet, les acyl-CoA servent de substrats pour de nombreuses voies métaboliques, incluant la production d'énergie, mais également la formation de complexes lipidiques tels que les TG et les phospholipides. Cette activation est catalysée en deux étapes irréversibles par une famille d'enzymes membranaires nommée ACS (Acyl-Coa Synthétase), spécifique de la longueur de la chaîne carbonée de l'AG considéré. Par exemple, les AG à longue chaîne sont pris en charge par des isoformes particulières des ACS, nommées ACSL (Acyl-Coa Synthetase Long-chain) qui sont localisées au niveau des membranes mitochondriales externes, péroxysomales et microsomales. Trois des cinq ACSL spécifiques des AG à chaîne longue (ACSL1, 4 et 5) sont fortement exprimées au niveau du foie (Mashek et al., 2006).

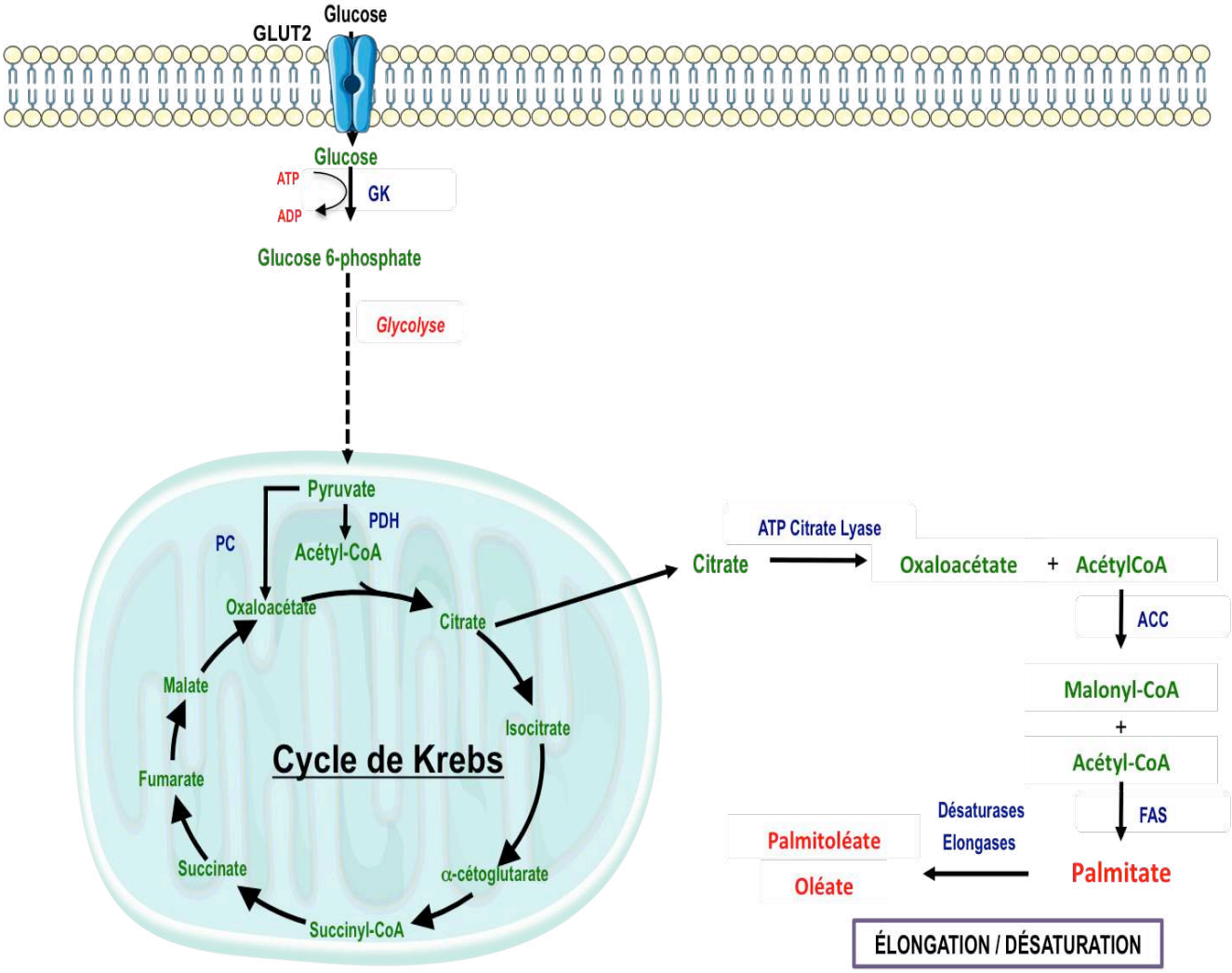


Figure 17: Synthèse *de novo* des acides gras

La lipogenèse fait suite à la glycolyse. Le pyruvate, issu de la glycolyse, est transformé en citrate dans la mitochondrie. Une fois dans le cytosol, le citrate entre dans la voie de la lipogenèse pour être converti en acides gras qui seront élongués, désaturés et estérifiés en TG.
ACC: *Acétyl-CoA Carboxylase,* ***FAS****: Fatty Acid Synthase,* ***PC****: Pyruvate Carboxylase,* ***GK****: Glucokinase,* ***PDH****: Pyruvate Déshydrogénase*

2.4) La voie de biosynthèse des acides gras

Chez les mammifères, la capacité de mise en réserve du glucose sous forme de glycogène étant limitée, le rôle principal de la lipogenèse est de transformer en AG le glucose ingéré en excès. La lipogenèse au sens strict correspond à la biosynthèse *de novo* d'AG saturés, comme le palmitate, à partir de l'acétyl-CoA, de NADPH et d'ATP (Figure 17). Les réactions de la synthèse des AG par la voie de la lipogenèse sont catalysées par deux enzymes clés, l'acétylcoenzyme A carboxylase (ACC) et la Fatty Acid Synthase (FAS). La lipogenèse est particulièrement importante dans le foie, dans le tissu adipeux blanc et dans les glandes mammaires. Cependant, l'intensité de la lipogenèse dans ces tissus varie en fonction des espèces. Chez les rongeurs, la lipogenèse a lieu dans le foie et le tissu adipeux, alors que chez l'homme il semble que la lipogenèse soit principalement hépatique.

La première étape de la lipogenèse consiste en la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, réaction catalysée par l'ACC (Barber et al., 2005). L'acétyl-CoA est synthétisé dans la mitochondrie par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) en décarboxylant le pyruvate provenant de la glycolyse. L'acétyl-CoA est ensuite converti dans le cylce de Krebs en citrate. Dans le cytosol, ce citrate sera de nouveau converti en acétyl-CoA par l'ATP-citrate lyase (ACLY) puis pris en charge par l'ACC afin d'initier la synthèse de l'AG naissant. Il est important de noter que le malonyl-CoA produit par l'ACC joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme lipidique. C'est en effet un inhibiteur physiologique de la CPT1 (Carnitine Palmitoyl Transferase 1), qui est une enzyme limitante nécessaire à la β-oxydation mitochondriale des AG à chaînes longues. Cette contre-régulation de l'activité CPT1 par le malonyl-CoA empêche donc que la synthèse des AG puisse avoir lieu en même temps que leur oxydation mitochondriale.

Le gène de l'ACC est transcrit à partir de deux promoteurs distincts, qui codent respectivement pour deux isoformes différentes, l'ACC1 et l'ACC2 (Luo et al., 1989). L'ACC1 est impliquée dans la synthèse des AG par la lipogenèse alors que l'ACC2 contrôlerait préférentiellement l'oxydation mitochondriale des AG à chaîne longue. Ainsi, la transcription de l'ACC2 prend place dans tous les tissus, tandis que la transcription de l'ACC1 est quant à elle spécifique des tissus dits « lipogéniques », c'est à dire dans lesquels le glucose peut être transformé en AG par la lipogenèse. L'expression de l'ACC1 est régulée par l'état nutritionnel. Sa transcription est activée en présence de glucose et d'insuline au cours de la réalimentation, tandis qu'elle est inhibée par le glucagon à jeun. Différents facteurs de

transcription sont impliqués dans cette régulation transcriptionnelle dans le foie, dont les facteurs SREBP-1c, ChREBP, LXR, FOXOs et PPARs (Koo et al., 2001; Wolfrum et al., 2004). L'ACC1 est également régulée au niveau post-traductionnel de façon allostérique. Son activité est potentialisée par le citrate ainsi que le glutamate provenant du cycle de Krebs et elle est inhibée par les acyl-CoA à longues chaînes (Nikawa et al., 1979). De plus, l'ACC1 est également régulée par phosphorylation. Le glucagon, via la PKA, inhibe son activité catalytique. A l'inverse, l'insuline active l'ACC en favorisant sa déphosphorylation par l'activation de protéines phosphatases spécifiques comme la PPI (protein phosphatase I) (Witters and Kemp, 1992). Finalement, en période de jeûne, l'AMPK, activée en réponse à l'augmentation du ratio AMP/ATP, inhibe également l'activité de l'ACC par phosphorylation (Titchenell et al., 2017).

Par la suite, la synthèse du palmitate, acide gras saturé à 16 atomes de carbones, est réalisée par le biais de la FAS par des condensations de Claisen successives d'unités de malonyl-CoA sur de l'acétyl-CoA. La FAS utilise le NADPH, provenant principalement de la voie des PPP, comme cofacteur à sa réaction enzymatique. Le palmitate formé par la FAS est ensuite pris en charge par différentes élongases et désaturases afin de produire des AG de longueur et de désaturation différente (Jensen-Urstad and Semenkovich, 2012). L'expression de la FAS est régulée en fonction de l'état nutritionnel. Son expression est ainsi stimulée par le glucose et l'insuline à l'état nourri et à l'opposé inhibée par le glucagon au cours du jeûne. A l'instar de l'ACC1, les effets transcriptionnels du glucose sur l'expression de la FAS sont transmis par le facteur de transcription ChREBP (Jin et al., 2010), tandis que ceux de l'insuline sont transmis par le facteur de transcription SREBP-1c (Foretz et al., 1999a).

2.5) Elongation et désaturation des AG.

Les AG issus de la lipogenèse ou de l'alimentation peuvent ensuite subir différentes transformations, notamment une élongation de leurs chaînes carbonées (Figure 17). L'élongation des AG s'effectue dans le réticum endoplamsique (RE). Cette élongation consiste en la répétition cyclique de quatre étapes permettant l'ajout de carbones provenant du malonyl-CoA (Cinti 1992). Ces étapes sont les suivantes:

1. Condensation entre un AG et un malonyl-CoA pour former le 3-kétoacyl-CoA.
2. Réduction de ce dernier pour générer du 3-hydroxyacyl-CoA.
3. Déshydratation du 3-hydroxyacyl-CoA en trans-2-aenoyl-CoA.
4. Réduction du trans-2-aenoyl-CoA pour former un AG plus long de 2 carbones.

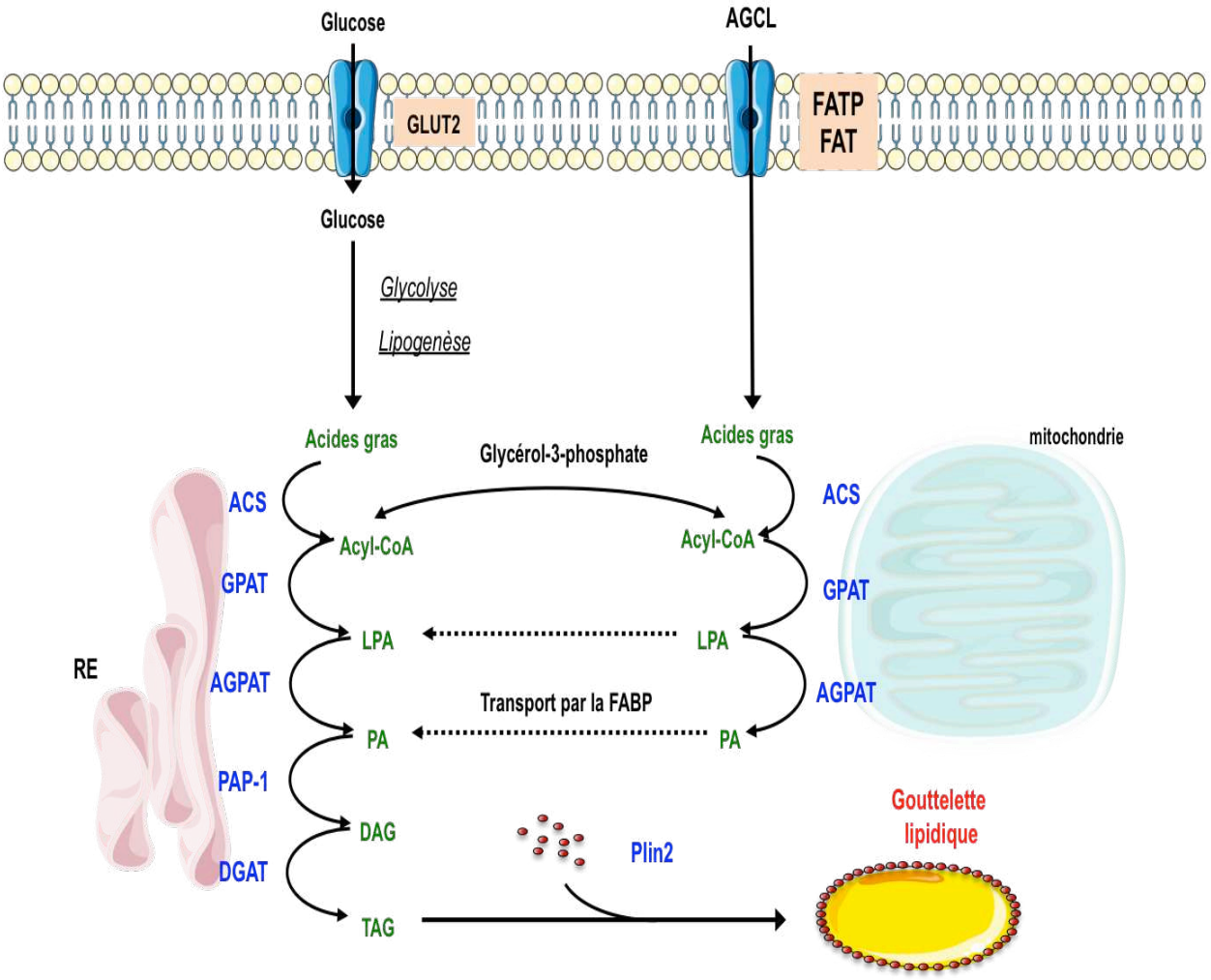


Figure 18: Estérification des acides gras

L'estérification des acides gras fait suite leur désaturation et leur élongation. Elle permet l'intégration des lipides sous forme de TG au sein des gouttelettes lipidiques.

ACS: *acyl-CoA synthétase;* ***AGPAT****: acylglycerol phosphate acyltransferase;* ***DAG****: diacylglycéride;* ***DGAT****: diacyldlycerol acyltransferase,* ***FAT****: fatty acid transport;* ***FATP****: fatty acid transport protein;* ***GPAT****: glycerol 3-phosphate acyltransferase;* ***LPA****: acide lysophosphatidique;* ***PA****: acide phosphatidique;* ***PAP-1****: phosphatidic acid phosphohydrolase 1;* ***TAG****: triglycéride*

Ces quatre étapes du processus d'élongation font intervenir des enzymes différentes, l'étape limitante étant catalysée par des enzymes de la famille des élongases ou Elovl (Elongation of very long chain fatty acid). Cette famille possède 7 membres (Elovl 1 à 7), présentant chacun des caractéristiques qui lui sont propres. Dans le foie, les isoformes 1, 2, 5 et 6 sont exprimées majoritairement (Wang 2005). Cependant seules les isoformes 5 et 6 sont régulées de manière nutritionnelle. Ainsi l'expression de ces deux isoformes est régulée positivement par le facteur de transcription SREBP-1c (Matsuzaka 2002; Moon 2009). De plus, l'expression de l'Elovl6 est également induite par le glucose et cette régulation est dépendante du facteur de transcription ChREBP (Wang 2006).

Les AG saturés provenant de l'alimentation et de la lipogenèse peuvent également subir une désaturation de leur chaîne carbonée afin de produire des AG mono-insaturés (MUFA). La désaturation des AG est assurée par une famille d'enzymes appelées SCD (Stéaroyl-CoA-Désaturases). La forme la plus exprimée dans le foie est la SCD1. Cette isoforme est fortement induite dans le foie en réponse à une alimentation riche en glucides (Ntambi 1992). En introduisant une double liaison cis en position ω9 de ses substrats, la SCD1 désature des AG dont la longueur varie de 12 à 19 carbones. Les substrats préférentiels de la SCD1 sont le palmitate (C16 :0) et le stéarate (C18 :0), qu'elle convertit en palmitoléate (C16 :1) et en oléate (C18 :1) (Flowers and Ntambi 2008). La SCD1 est finement régulée au niveau transcriptionnel. Ainsi, le glucose et l'insuline augmentent son expression (Kim 2002; Ntambi, 1992; Waters and Ntambi, 1994). A l'opposé, l'expression de la SCD1 est inhibée par le glucagon (Choi et al., 2000; Mauvoisin and Mounier, 2011; Waters and Ntambi, 1996).

2.6) Synthèse des TG

Après avoir été élongués et/ou désaturés, les AG sont stockés sous forme de triglycérides (TG) au sein de gouttelettes lipidiques. La synthèse des TG va principalement reposer sur 4 étapes successives (Figure 18):

• Premièrement, l'estérification d'un acyl-CoA sur le premier carbone du glycérol 3-phosphate sera catalysée par la glycérol 3-phosphate acyltransférase (GPAT) (Farese 2000).

• Ensuite, l'ajout d'un acyl-CoA sur le carbone 2 sera réalisée par l'acylglycérol phosphate acyltranférase (AGPAT), formant alors un acide phosphatidique (PA). Sur les dix isoformes décrites à ce jour, c'est l'isoforme 2 qui est la plus exprimée dans le foie (Takeuchi 2009).

• Par la suite, les lipines vont catalyser la déphosphorylation de cet acide phosphatidique en diacylglycéride (DAG) grâce à leur activité hydrolase. Cette étape est catalysée par la phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP-1).
• Enfin, le transfert d'un troisième acyl-CoA sur un DAG pourra alors former un TG grâce à la diacylglycerol acyltransférase (DGAT). Deux isoformes distinctes de DGAT existent, les DGAT1 et 2, avec pour chacune des fonctions bien définies : la DGAT1 tient un rôle spécifique dans l'estérification des acides gras exogènes alors que la DGAT2 permet d'incorporer les acides gras de provenance endogène dans les TG (Wurie et al., 2012, Villanueva et al., 2009)

Ces TG seront soit stockés dans des gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes, ou bien sécrétés sous forme de lipoparticules à très faible densité, les very low density lipoprotein (VLDL) (Figure 18).

2.7) Synthèse des phospholipides

Les phospholipides englobent un groupe hétérogène de lipides qui ont en commun leur rôle essentiel dans la structure des membranes, où ils participent à la formation de la matrice de la bicouche lipidique. Dans la membrane, ils sont placés de façon à présenter leur pôle hydrophile vers l'extérieur de la membrane et le pôle hydrophobe dans l'épaisseur de la membrane elle-même. Les phospholipides sont également précurseurs d'hormones comme les eicosanoïdes et de molécules de signalisation comme les produits de la dégradation des phospholipides- inositol.
Il existe ainsi deux grandes classes de phospholipides caractérisées par la nature du glycérol : Les glycérophospholipides et la sphingomyéline. Cette dernière est constituée d'une molécule de sphingosine et d'une molécule de phosphocholine et constitue le principal constituant de la gaine de myéline au niveau des neurones. Les glycérophospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par un ou plusieurs acides gras et par une molécule d'acide phosphorique qui donne un acide phosphatidique. Cet acide phosphatidique est lui-même estérifié par un groupement alcool. La nature de l'alcool permet de distinguer les différentes têtes polaires des phospholipides. Les résidus acyles fixés sur les atomes de carbone 1 et 2 peuvent également varier considérablement suivant leur origine, par exemple selon leur longueur de chaîne et leur degré d'insaturation. Selon la nature de leurs têtes hydrophobes, les phospholipides sont classés en phosphatidylcholine (PC), phosphatidylsérine (PS),

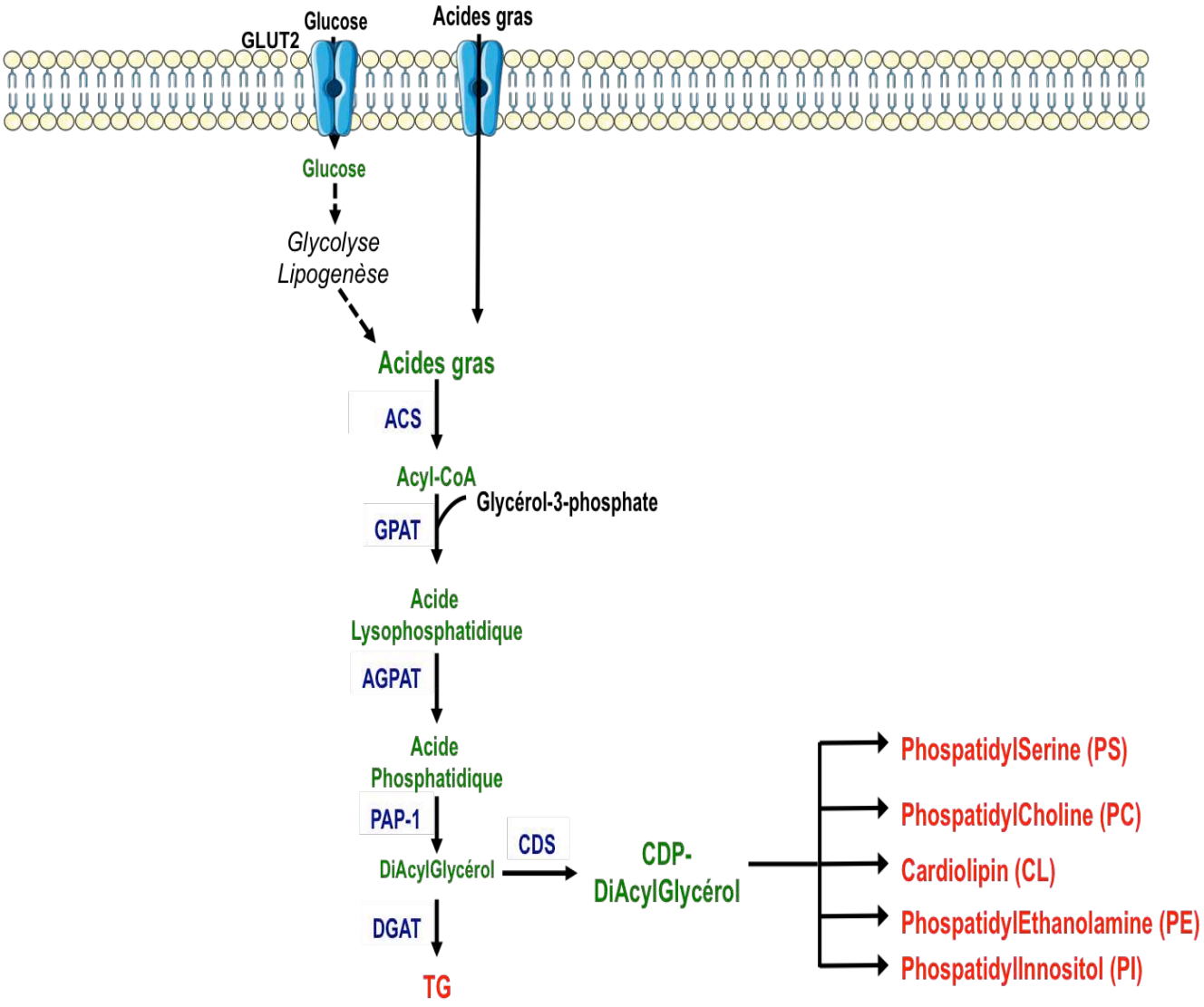


Figure 19: Synthèse des phospholipides

ACS: *acyl-CoA synthétase;* ***AGPAT****: acylglycerol phosphate acyltransferase;* ***DAG****: diacylglycéride;* ***DGAT****: diacyldlycerol acyltransferase,* ***FAT****: fatty acid transport;* ***FATP****: fatty acid transport protein;* ***GPAT****: glycerol 3-phosphate acyltransferase;* ***LPA****: acide lysophosphatidique;* ***PA****: acide phosphatidique;* ***PAP-1****: phosphatidic acid phosphohydrolase 1;* ***CDS****: CDP-DAG synthase*

phosphatidylinositol (PI), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylglycérol (PG), acide phosphatidique (PA) et cardiolipine (CL) (Figure 19).

La principale voie de biosynthèse des PLs chez les vertébrés est celle de la CDP-choline, également nommée la voie de Kennedy (Kinney and Moore, 1987). Les principaux sites cellulaires de la biosynthèse sont le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries. La première étape de la voie de synthèse la CDP-choline est la phosphorylation de la choline qui produit la phosphocholine, sous l'action enzymatique de la choline kinase. Cette enzyme est cytoplasmique et requiert l'ATP. Ensuite, la phosphocholine se lie avec une molécule de cytidine triphosphate (CTP) et forme la CDP-choline, cette réaction étant catalysée par l'enzyme choline phosphatase cytidylyltransferase, localisée dans le cytoplasme, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. L'étape finale de la biosynthèse des PL est la combinaison d'une molécule de diacylglycérol avec la CDP-choline, qui est catalysée cette fois par la choline phosphotransférase, localisée dans le réticulum endoplasmique (Grabitzki et al., 2009). Deux enzymes sont ainsi identifiées comme régulant la voie de biosynthèse CDP-choline: la choline kinase et la phosphocholine cytidylyltransferase (CTP), la CTP catalysant l'étape limitante de cette voie de synthèse (Grabitzki et al., 2009).

2.8) Oxydation des AG

L'oxydation des AG joue un rôle majeur dans la production d'énergie par l'organisme et plus particulièrement durant le jeûne où elle peut contribuer pour 80% à la production énergétique. Elle permet en autre la synthèse de corps cétoniques afin d'alimenter le cerveau au cours du jeûne, et la synthèse d'ATP, de NADH et d'acétyl-CoA nécessaires au fonctionnement de la gluconéogenèse (Lam, 2003). C'est en fait l'activation des AG et leur élongation qui va définir l'organite par lequel les AG vont être oxydés. En effet, les AG à chaînes courtes, moyennes ou longues sont oxydés exclusivement dans la mitochondrie, tandis que les AG à chaînes très longues sont oxydés dans le peroxysome.

Dans une première étape, les AG sont transportés à travers les membranes mitochondriales par un système de transport dépendant de la carnitine, incluant 3 enzymes qui sont la CPT-1, la CAT (carnitine translocase) et la CPT-2 (carnitine palmitoyl transferase-2). La CPT-1, qui est localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Murthy and Pande, 1987), permet la formation d'acylcarnitine à partir d'acyl-CoA et de carnitine. Il s'agit de l'étape

limitante de la β-oxydation des AG à chaînes longues. L'acylcarnitine est alors transporté à l'intérieur de la mitochondrie par la CAT, où il va être converti en acyl-CoA et en carnitine par la CPT-2. Ainsi, les acyl-CoA à longues chaînes entrent dans la voie de la β-oxydation que l'on nomme également hélice de Lynen. L'hélice de Lynen est un cycle dans lequel, à chaque répétition, l'acyl-CoA se voit retirer 2 atomes de carbone avec une production d'une simple molécule d'acétyl-CoA. Cette molédule d'acétyl-CoA entre ensuite soit dans le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP, soit sert à la production de glucose par la gluconéogenèse ou de corps cétoniques par la cétogenèse.

La β-oxydation est régulée à travers l'activité de la CPT-1. L'activité de cette enzyme est contrôlée par les conditions nutritionnelles. Elle est stimulée lors d'un jeûne ou lors d'un régime riche en graisse et est diminuée à l'état nourri, du fait de la production de malonyl-CoA par la lipogenèse (Park et al., 1995; Thumelin et al., 1994). Ainsi, dans le foie, le malonyl-CoA produit par l'ACC, est un inhibiteur allostérique de la CPT1, et inhibe de ce fait l'oxydation des AG à chaînes longues. La β-oxydation des AG est également régulée par le facteur de transcription PPAR α au cours du jeûne qui stimule l'expression des enzymes de la β-oxydation comme la CPT1, la CPT2 et la CAT (Stanley et al., 2005).

3) Métabolisme de la glutamine

La glutamine est l'acide aminé non essentiel le plus abondant dans la circulation. Tout comme les autres acides aminés, elle joue un rôle important en tant que constituant des protéines (Hosios, 2016) et est également le principal transporteur d'ammoniac sous sa forme non toxique (DeBerardinis, 2007). Le métabolisme de la glutamine est aussi impliqué dans la biosynthèse des bases azotées. En effet, la glutamine est un donneur indispensable de nitrogène réduit, nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques qui sera détaillée dans la suite de cette partie introductive (Hosios, 2016; Wise and Thompson, 2010). En plus de ce rôle, la glutamine, comme le glucose, est une importante source de carbone pour les besoins bioénergétiques et biosynthétiques des cellules. En effet, les intermédiaires carbonés dérivés de la glutamine interviennent dans des voies anaplérotiques, en particulier le cycle de Krebs (Altman, 2016; DeBerardinis, 2007), comme source alternative au glucose, pour produire de l'ATP. La glutamine sert également à la production de précurseurs essentiels à la synthèse des acides gras (Metallo, 2011).

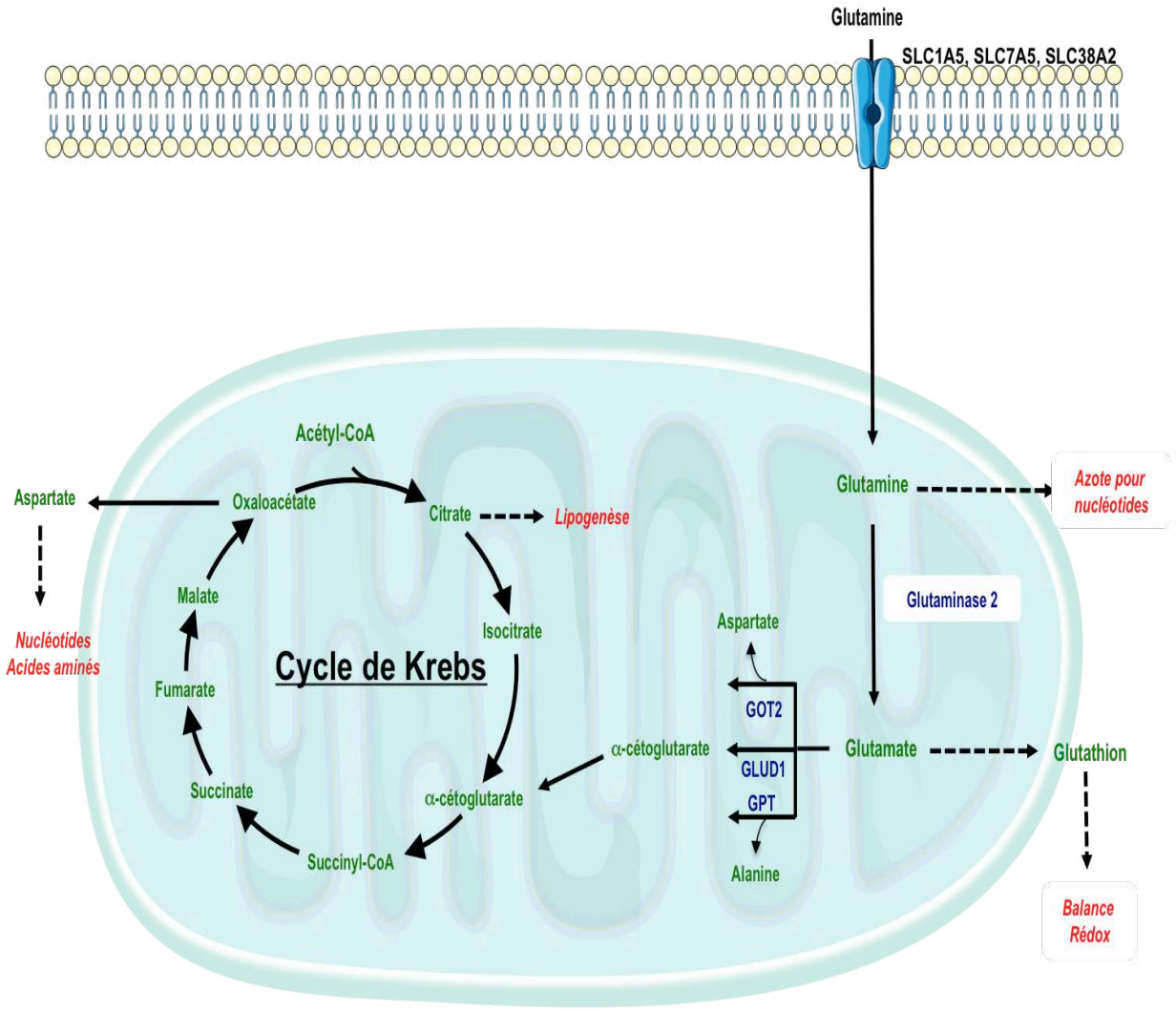


Figure 20: Vue d'ensemble du métabolisme de la glutamine

Après son entrée dans la cellule, la glutamine peut être utilisée pour la synthèse de nucléotides, la synthèse d'acides aminés, la lipogenèse, la synthèse de glutathion et la production d'énergie.

GOT2*: Glutamate-Oxaloacetate Transaminase 2 ;* ***GLUD1****: Glutamate Deshydrogenase 1 ;* ***GPT****: Glutamate-Pyruvate Transaminase*

Les étapes de la glutaminolyse se déroulent dans la mitochondrie, de ce fait la glutamine doit en premier temps entrer dans la cellule puis dans la mitochondrie pour être dégradée. Les transporteurs principaux de glutamine dans le foie sont Slc1a5 (ASCT2) et ou Slc38A7 (SNAT7) (Bhutia 2015; Pochini 2014). Une fois dans la mitochondrie, la glutamine est convertie en glutamate par la glutaminase (GLS) (Matés, 2013). Deux isformes de la GLS ont été identifiées à ce jour, les isoformes GLS1 et GLS2. Dans le foie, l'isoforme majoritairement exprimée est la GLS2 (DeBerardinis et al ., 2007). Le glutamate est ensuite converti en α-cétoglutarate (α-KG) par deux classes d'enzymes distinctes qui produiront des intermédiaires différents en fonction des besoins de la cellule (Wise and Thompson, 2010; Yang et al., 2017). La première classe d'enzyme regroupe des transaminases, incluant la glutamate–oxaloacétate transaminase (GOT), la glutamate–pyruvate transaminase (GPT), et la phosphosérine transaminase (PSAT). Ces enzymes sont capables de générer, à partir du glutamate, de l'α-KG. La deuxième enzyme capable de métaboliser le glutamate en α-cétoglutarate est la glutamate déshydrogénase (GLUD). Cette réaction s'accompagne de la production de cofacteurs NADH ou NADPH. L'α-cétoglutarate généré sert principalement de substrat anaplérotique dans le cycle de Krebs pour produire de l'ATP et régénérer des cofacteurs par les oxydations phosphorylantes (OXPHOS) (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011). L'α-cétoglutarate peut également être carboxylé en citrate par l'isocitrate déshydrogénase 1 ou 2, respectivement dans le cytoplasme et la matrice mitochondriale. Ce citrate pourra, comme vu précédemment, être utilisé dans la lipogenèse pour la synthèse *de novo* d'acides gras (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). Les autres métabolites du cycle de Krebs dérivant de la glutaminolyse peuvent également être utilisés dans d'autres réactions. C'est, par exemple le cas du malate qui, dans le cytoplasme, peut être transformé en pyruvate par l'enzyme malique (ME) (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). L'oxaloacétate peut également être converti en aspartate puis en asparagine et être consommé dans la voie de synthèse des nucléotides (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010).

L'anaplérose de la glutamine dans le cycle de Krebs fournit donc des précurseurs indispensables pour l'OXPHOS, la synthèse d'acides aminés non essentiels, de nucléotides et de lipides (Figure 20). La glutaminolyse est donc un processus se mettant en place dans le cas où le niveau énergétique cellulaire est insuffisant. Quand les cellules ont un niveau d'énergie très élevé (forte concentration d'ATP, de NADPH et d'α-cétoglutarate), elles se mettent préférentiellement à synthétiser de la glutamine plutôt que de la cataboliser. La glutamine est synthétisée de manière endogène à partir de l'α-cétoglutarate, via la glutamate

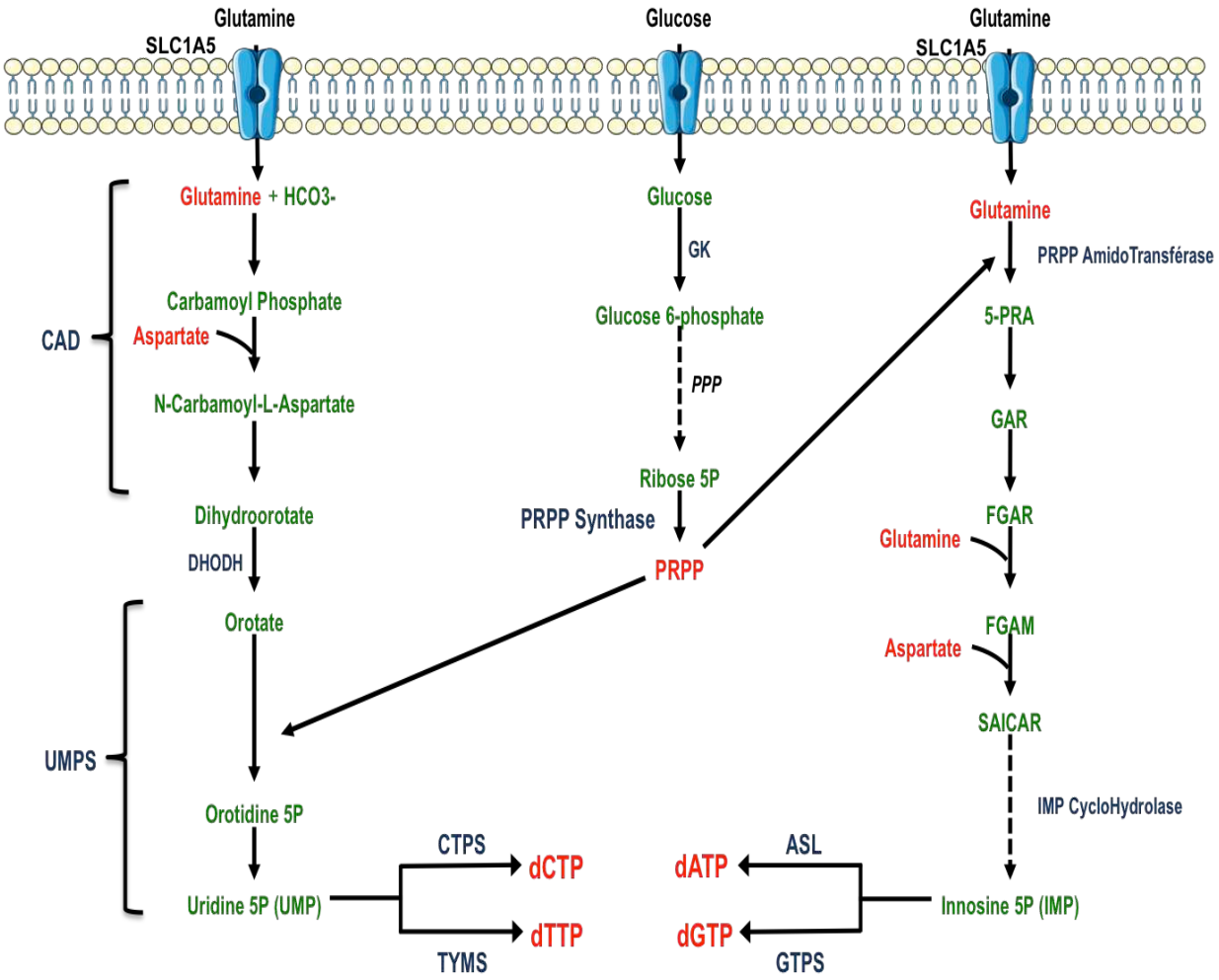


Figure 21: Synthèse des purines et des pyrimidines

Les métabolismes de la glutamine et du glucose sont requis pour la synthèse *de novo* des purines et des pyrimidines.
***PRPP**: Phosphoribosylpyrophosphate, **PPP**: Pentose Phosphate Pathway, **IMP**: Innositol Monophosphate, **UMPS**: Uridine MonoPhosphate Synthase, **DHODH**: Dihydroorotate déshydrogénase, **CTPS**: CTP synthase, **TYMS**: Thymidilate Synthase, **ASL**: Adenylosuccinate Lyase, **GTPS**: GTP Synthase, **TYMS**: Thimidylate Synthase, **CAD**: Carbamyl Phospate Synthase + Aspartate Carbamoyl Transferase + Dihydroorotase*

déshydrogénase qui aboutit à la formation de glutamate. Ce dernier est métabolisé en glutamine grâce à la glutamine synthase (GS). Cependant, quand les cellules sont hautement prolifératives, les besoins en glutamine augmentent et la synthèse intracellulaire de glutamine ne suffit plus, la glutamine doit donc être absorbée de façon exogène (Altman et al., 2016), ce qui fait que cet acide aminé peut devenir limitant dans certaines conditions.

4) Voies de biosynthèse des nucléotides

Les nucléotides ont comme rôle principal d'être les précurseurs des acides nucléiques (ARN et ADN). De plus, ces nucléotides, principalement sous forme d'ATP, fournissent de l'énergie aux systèmes biologiques et interviennent dans la synthèse de coenzymes essentielles, telles que le NAD et l'acétylcoenzyme A. Enfin, ils jouent le rôle de régulateurs métaboliques, par exemple, l'AMP cyclique est un médiateur intracellulaire impliqué dans le fonctionnement de nombreuses hormones et le GTP, comme l'ATP interviennent dans la transduction du signal.
Un nucléotide est composé d'une base azotée, d'un sucre (pentose) et d'un ou de plusieurs groupements phosphates. Le pentose peut être le ribose pour les ribonucléotides, précurseurs de l'ARN, ou le 2'-déoxyribose pour les déoxyribonucléotides, précurseurs de l'ADN. En fonction de la nature de la base azotée, les nucléotides sont séparés en deux catégories: les purines et les pyrimidines (Figure 21). Les bases puriques sont l'adénine et la guanine qui se retrouvent dans l'ADN et l'ARN. Les bases pyrimidiques sont la cytosine et la thymine dans l'ADN, l'uracile et la cytosine dans l'ARN.

4.1) Voie de biosynthèse des purines

Le noyau purique est formé à partir de plusieurs précurseurs: la glycine, la glutamine, l'acide aspartique, des dérivés de l'acide tétrahydrofolique et du CO_2. La première étape qui caractérise la voie de synthèse *de novo* des nucléotides puriques est la formation de phosphoribosylamine à partir de PRPP, catalysée par l'amidophosphoribosyl transférase. Ensuite, une succession de réactions aboutissent à la formation d'un premier nucléotide, l'acide inosinique (IMP), dont la base est l'hypoxanthine. L'acide inosinique est un précurseur de l'AMP et du GMP. Ensuite, l'AMP est phosphorylé en ADP et ATP, et le GMP en GDP et GTP. Cette phosphorylation se fait en présence respectivement de l'adénylate kinase et de la guanylate kinase.

4.2) Voie de biosynthèse des pyrimidines

Les précurseurs du noyau pyrimidique sont la glutamine, l'acide aspartique et le CO_2. La première étape de cette voie de synthèse est la formation du carbamylphosphate, catalysée par la carbamylphosphate synthétase (CPS). Ensuite la protéine trifonctionnelle CAD, possédant 3 activités enzymatiques différentes (carbamoyl-phosphate synthetase (CPS1), aspartate transcarbamylase (ACTA), et dihydroorotase) catalyse la condensation du carbamyl phosphate avec une molécule d'aspartate pour former du dihydro-orotate puis de l'orotate. Ainsi, l'ACTA catalyse la formation du carbamylaspartate. La fermeture du cycle du noyau pyrimidique se fait avec la formation d'acide dihydroorotique, puis d'acide orotique. L'acide orotique réagit ensuite avec le PRPP pour donner le premier nucléotide, l'orotidine 5'-monophosphate (OMP). La formation d'UMP à partir d'OMP est catalysée par l'orotidine 5'-monophosphate décarboxylase (OMP décarboxylase); l'UMP est ensuite transformé en UDP et UTP par l'uridine monophosphate kinase (UMPK). La formation des déoxyribonucléotides fait intervenir la réduction du ribose en déoxyribose. La réaction qui se produit au niveau des nucléotides diphosphate est catalysée par la ribonucléoside diphosphate réductase (RR) (DeBerardinis et al ., 2008).

L'une des étapes limitantes de cette voie de biosynthèse fait intervenir l'uridine monophosphate synthétase (UMPS). L'UMPS, complexe enzymatique qui regroupe l'orotate phosphoribosyltransférase (OPRT) et l'orotate 5'-monophosphate décarboxylase (OMPDC), catalyse la formation d'UMP à partir d'acide orotique. La première réaction est le transfert d'un ribose 5-phosphate, fourni par le PRPP, sur l'acide orotique et aboutit à la formation du premier nucléotide dans la voie de synthèse de novo des nucléotides pyrimidiques : l'orotidine 5'-monophosphate (OMP).

La CAD, enzyme limitante du métabolisme des pyrimidines, est activée par un niveau élevé d'ATP. Il a également été montré que les pyrimidines inhibaient de manière allostérique la CAD, alors que le PRPP produit par la voie des PPP pouvait augmenter l'activité de la CAD (Sigoillot et al., 2003). Au niveau post traductionnel, il a été montré que la P70S6K de la voie PI3K AKT mTOR pouvait directement phosphoryler la CAD afin d'augmenter son activité (Sigoillot et al., 2003).

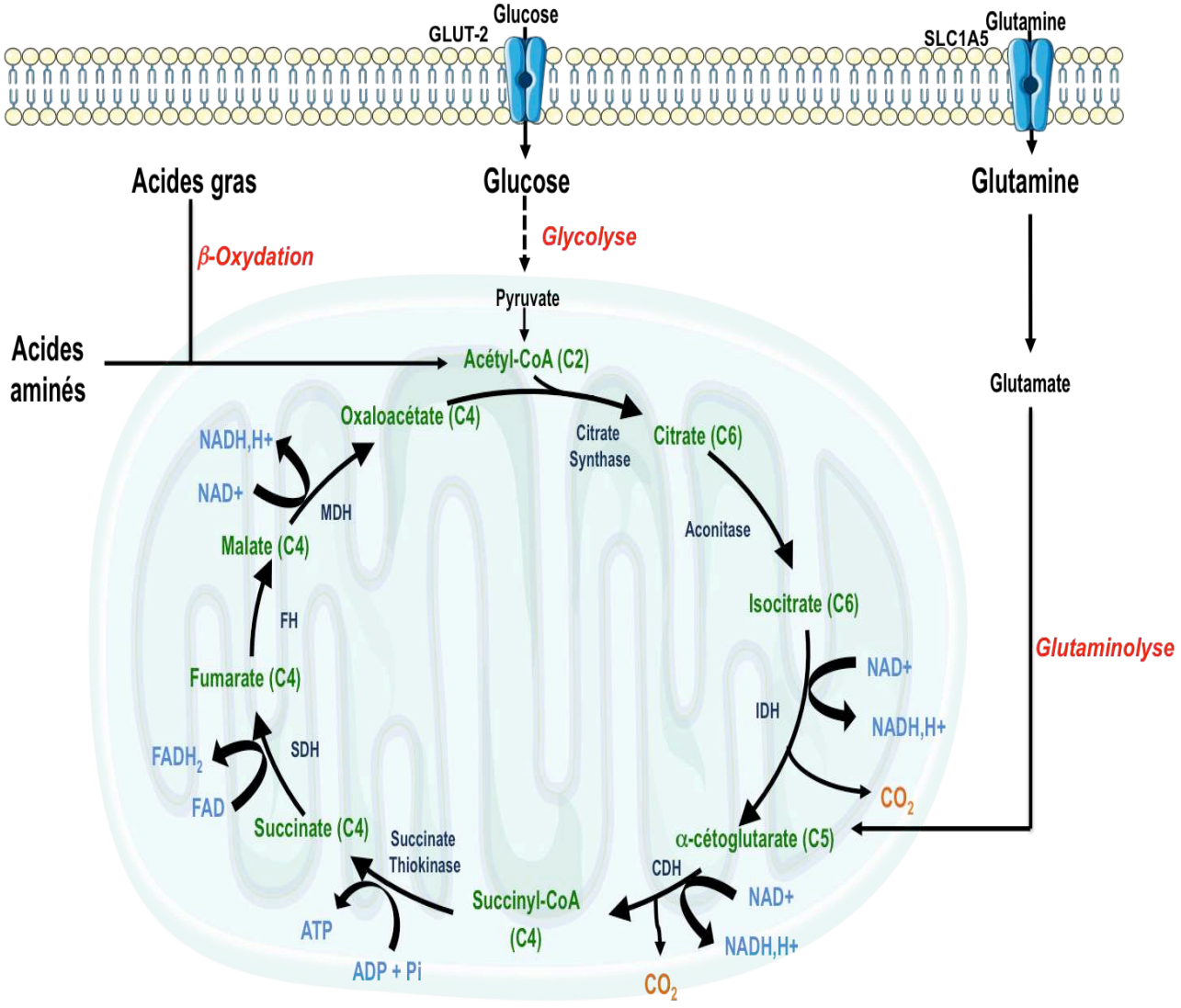


Figure 22: Le cycle de Krebs

***MDH**: Malate déshydrogénase, **FH**: Fumarate Hydratase, **SDH**: Succinate Déshydrogénase, **CDH**: Cétoglutarate Déshydrogénase, **IDH**: Isocitrate Déshydrogénase, **NAD**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide, **FAD**: Flavine Adénine Dinucléotide*

5) Le cycle de Krebs

Les voies de la glycolyse, de la β-oxydation ou le catabolisme de certains acides aminés va produire de l'acétyl-CoA, utilisé comme substrat par le cycle de Krebs. La glutamine quant à elle va pouvoir alimenter le cycle de Krebs via sa conversion en α-cétoglutarate comme évoqué précédemment. Le cycle de Krebs est composé de 8 réactions successives se déroulant dans la matrice mitochondriale et permet de produire à partir d'un acétyl-CoA trois $NADH,H^+$; un $FADH_2$, deux CO_2 et un GTP (Kornberg, 2000 ou autre). Les équivalents réduits NADH, H^+ et $FADH_2$ seront utilisés par la chaine respiratoire pour produire de l'ATP. Le déroulement du cycle de Krebs est le suivant (Figure 22):

1- La citrate synthase (CS) permet la condensation de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate pour produire du citrate.

2- L'aconitase catalyse la formation du citrate en isocitrate.

3- L'isocitrate déshydrogénase (IDH) transforme l'isocitrate en α-cétoglutarate, et permet la production de $NADH,H^+$ et la libération d'un CO2

4- Le complexe de l'α-cétoglutarate déshydrogénase catalyse la transformation de l'α-cétoglutarate en succinyl-CoA au cours de laquelle du $NADH,H^+$ est produit et un CO2 libéré.

5- Le succinyl-CoA est alors transformé en succinate par la succinyl-CoA thiokinase. Un guanosine triphosphate (GTP) est produit au cours de cette étape.

6- Le fumarate est alors produit à partir du succinate par la succinate déshydrogénase (SDH). Cette réaction aboutit à la formation de $FADH_2$.

7- La fumarase transforme ensuite le fumarate en malate

8- Et enfin, la malate déshydrogénase permet de régénérer de l'oxaloacétate et de produire du $NADH,H^+$.

Dans la mitochondrie, les coenzymes $NADH,H^+$ et $FADH_2$ produits par la glycolyse, la β-oxydation et le cycle de Krebs, permettent finalement d'alimenter la chaîne respiratoire. Les enzymes impliquées dans ce processus sont localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Le $NADH ;H^+$ et le $FADH_2$ sont réoxydés et transfèrent leurs électrons aux complexes I et II de la chaîne respiratoire. Le flux d'électrons migrant le long de cette chaîne entraine l'export de protons par les complexes I, III et IV dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, créant ainsi un gradient électrochimique entre la matrice et l'espace inter-membranaire mitochondrial. Ce gradient entraine la formation d'ATP au niveau de l'ATP

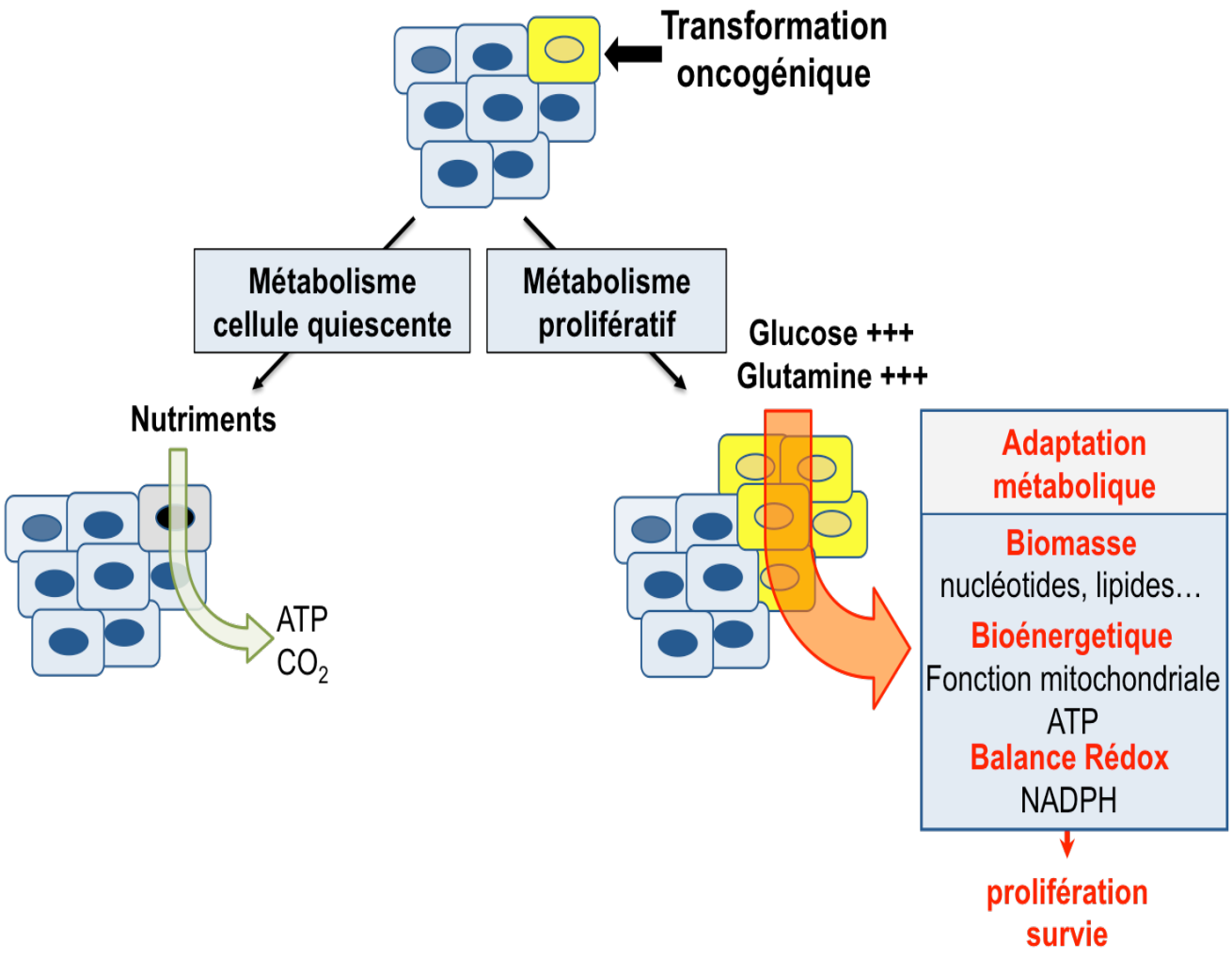


Figure 23: La reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse

Contrairement aux cellules quiescentes qui utilisent les nutriments principalement pour produire de l'énergie, les cellules cancéreuses vont réorienter leur métabolisme vers la synthèse de biomasse et vont équilibrer leur balance rédox afin de soutenir leur potentiel de prolifération.
***NADP**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate*

synthase (complexe V de la chaîne respiratoire). Au-delà de son rôle dans la production d'énergie, le cycle de Krebs est un véritable carrefour métabolique intervenant également dans la synthèse *de novo* d'acides aminés et d'acides gras.

II. Métabolisme tumoral du CHC

1) La reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse

Alors que les premières observations sur les altérations métaboliques des tumeurs ont été décrites pour la première fois il y a près d'un siècle, le domaine du métabolisme du cancer est devenu un sujet d'intérêt majeur au cours de la dernière décennie. Ainsi, afin de répondre aux exigences biosynthétiques liées à leur prolifération accrue, une cellule cancéreuse doit augmenter l'utilisation de nutriments provenant de l'environnement extracellulaire. Comme nous l'avons décrit précédemment, les deux principaux nutriments soutenant la survie et la biosynthèse dans les cellules de mammifères sont le glucose et la glutamine (Boroughs et DeBerardinis, 2015). Grâce au catabolisme du glucose et de la glutamine, une cellule cancéreuse est ainsi capable de maintenir des pools de carbone suffisants qui seront par la suite utilisés comme éléments de base pour l'assemblage de diverses macromolécules. Le métabolisme accru du glucose et de la glutamine génère également de l'ATP, pour les besoins énergétiques de la cellule, et du NADPH qui participe, en qualité de cofacteur, à de nombreuses réactions de biosynthèses anaboliques et au maintien d'un bon équilibre redox (Figure 23). Cette modification du métabolisme cancéreux est donc la résultante d'un ensemble de facteurs environnementaux et génétiques qui ont pour objectif principal de maintenir un haut potentiel de prolifération cellulaire. *In fine*, la compréhension du métabolisme tumoral est importante d'une part pour la mise en place d'outils de diagnostic mais également pour le développement de nouveaux traitements ciblés.

1.1) L'adapation métabolique des tumeurs : l'effet Warburg

Dans les années 1920, le biochimiste Otto Warburg (1883-1970) fut le premier à montrer qu'en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses n'oxydaient pas le pyruvate issu de la glycolyse via les phosphorylations oxydatives mitochondriales, mais le convertissaient majoritairement en lactate (Figure 24) (Warburg, 1925). Ses recherches ultérieures l'ont

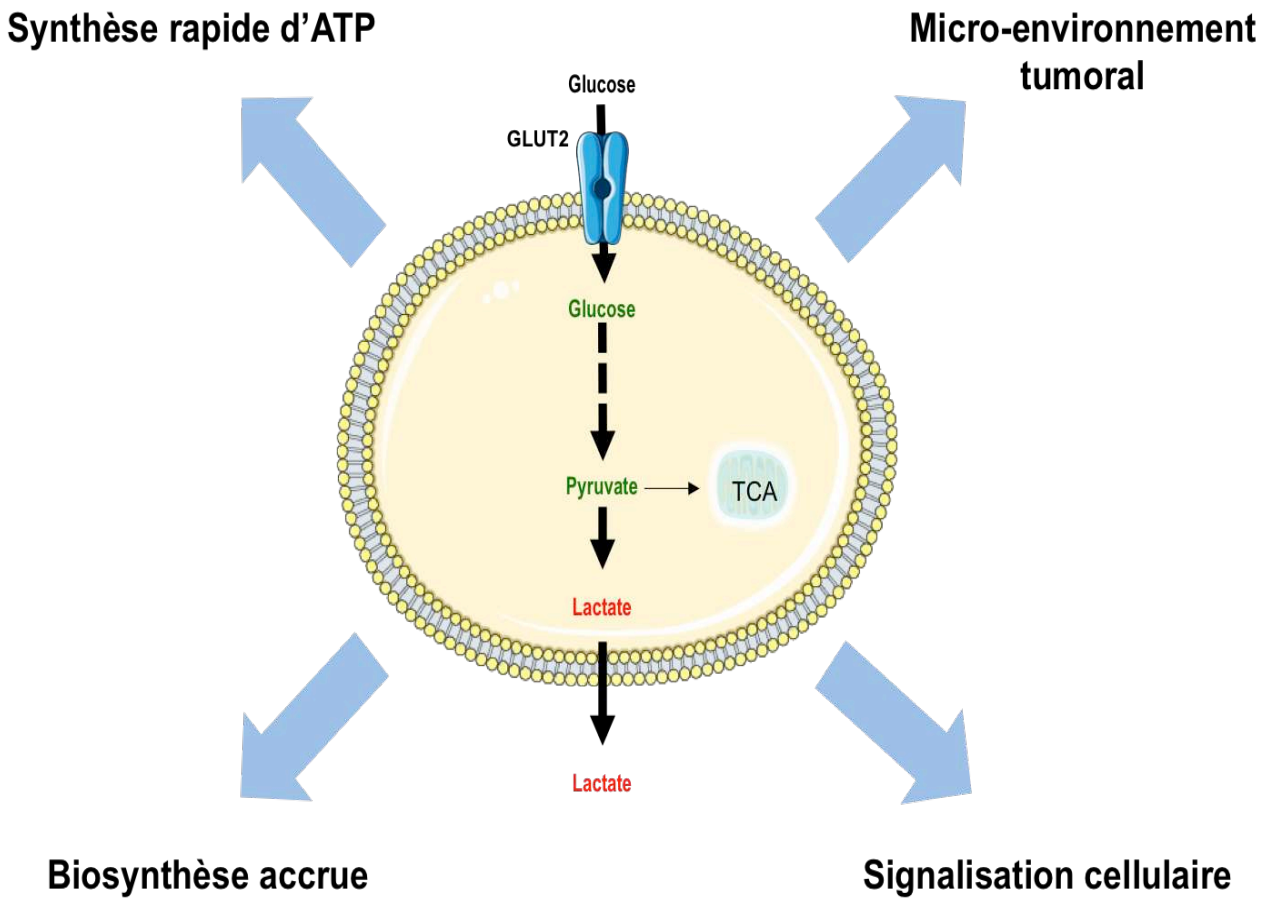


Figure 24: L'effet Warburg

TCA: *Cycle de Krebs*

convaincu que cette altération du métabolisme énergétique était au cœur des processus oncogéniques, une hypothèse ignorée pendant plus d'une cinquantaine d'années, tant et si bien que le métabolisme ne faisait pas partie des « Hallmarks of cancer » répertoriées dans la célèbre revue de Douglas Hanahan et Robert Weinberg publiée en 2000 (Hanahan et Weinberg, 2000). La redécouverte récente des travaux pionniers d'Otto Warburg a cependant ouvert un nouveau champ disciplinaire extrêmement dynamique visant à comprendre comment la reprogrammation métabolique, considérée aujourd'hui comme une propriété fondamentale des cellules malignes (et intégrée en 2011 dans la mise à jour des « Hallmarks of cancer » (Hanahan et Weinberg, 2011)), constitue une étape incontournable du processus de transformation oncogénique (Figure 25). Depuis, cette nette augmentation de la consommation de glucose par la tumeur comparée à un tissu adjacent non tumoral a été confirmée dans une grande variété de tumeurs et est associée en général à un mauvais pronostic clinique. Aujourd'hui, cette caractéristique des cellules cancéreuses est particulièrement utilisée comme outil de diagnostic en utilisant l'imagerie par tomographie par émission de positrons (TEP) et le 18F-fluorodésoxyglucose (18F-FDG). Cette caractéristique des cellules cancéreuses permet entre autres de réaliser la stratification des tumeurs glycolytiques, ainsi que le suivi de la réactivité à un traitement (Dose Schwarz et al., 2005).

1.2) De l'effet Warburg à la meilleure compréhension du métabolisme tumoral

En l'honneur de son découvreur, l'activation de la glycolyse en condition aérobie a été baptisée « effet Warburg », et en même temps que ce processus était admis, il est devenu un paradoxe à résoudre : pourquoi les cellules malignes ayant, a priori, un besoin accru en ATP pour proliférer, n'utilisent-elles pas la voie des OXPHOS, dont le rendement énergétique est nettement supérieur ? Ainsi, des données récentes montrent que la reprogrammation métabolique est en fin de compte un phénomène beaucoup plus complexe et hétérogène (Koppenol et al., 2011 ; Nakajima et Van Houten, 2013). On sait aujourd'hui que l'explication ne réside pas dans une altération de la fonction mitochondriale, comme le pensait Warburg. En effet, les mitochondries respirent dans la plupart des types de cellules cancéreuses, et elles fournissent les intermédiaires carbonés du cycle de Krebs nécessaires aux diverses biosynthèses (un processus appelé cataplérose) indispensables pour les cellules cancéreuses (Gentric et al., 2017). En contrepartie, le cycle de Krebs doit être constamment réapprovisionné, en particulier en oxaloacéate via la pyruvate carboxylase (PC), et en alpha-cétoglutarate par le catabolisme de la glutamine (processus dit d'anaplérose). Une des

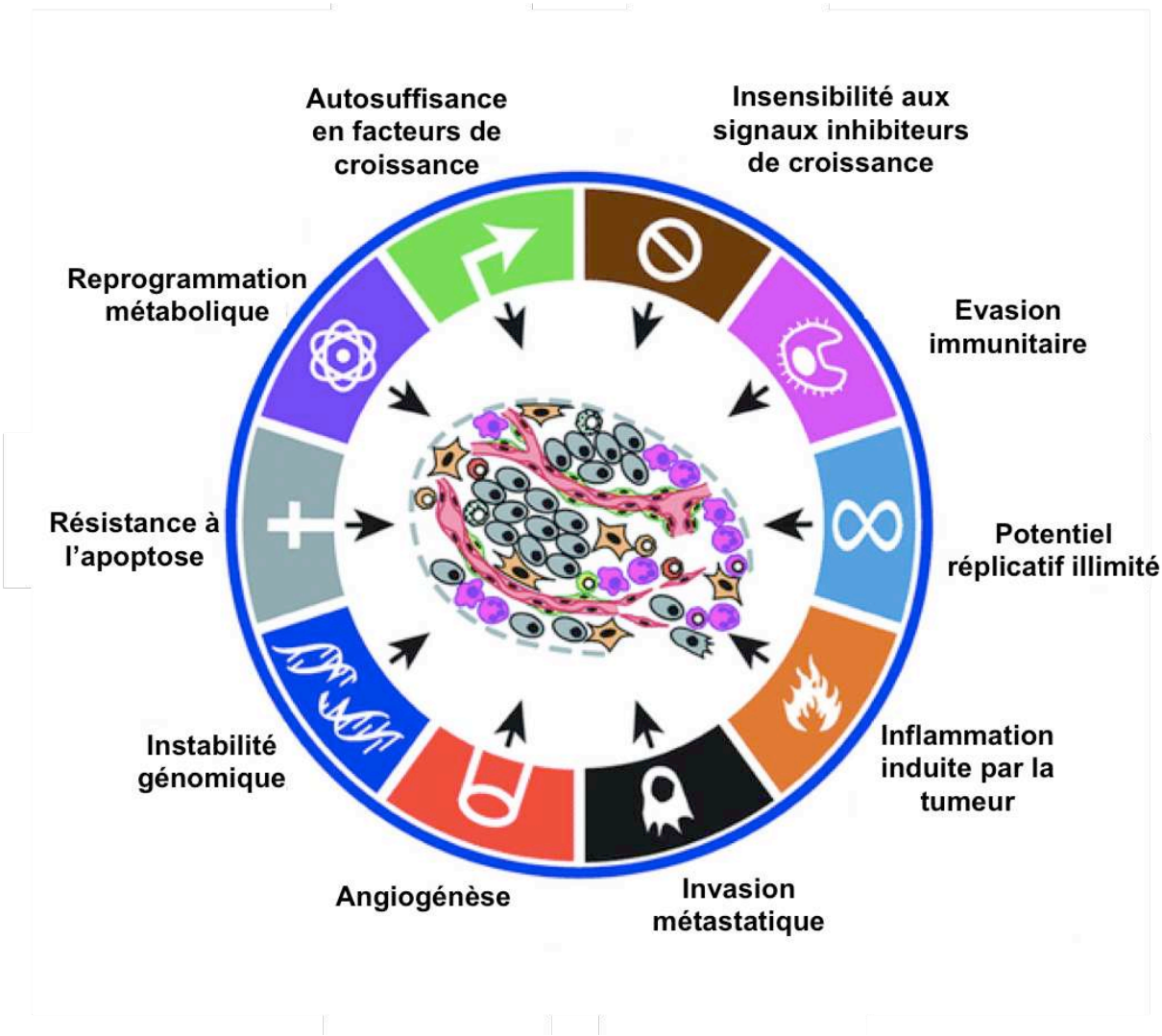


Figure 25: Les « Hallmarks » des cancers *(adapté de Hanahan et Weinberg, 2011)*

Les Hallmarks des cancers décrivent les caractéristiques communes à tous les cancers. Parmi celles-ci, trois ont récemment été identifiée: la reprogrammation métabolique, l'évasion immunitaire et l'inflammation induite par la tumeur

explications avancées à l'effet Warbug est que la glycolyse aérobie confère aux cellules malignes un avantage sélectif résultant d'une adaptation aux fluctuations du niveau d'oxygène de leur microenvironnement. De fait, l'hypoxie stabilise le facteur de transcription HIF1 qui active l'expression des gènes codant les transporteurs de glucose (GLUT1 et 3) et plusieurs enzymes glycolytiques (Barron et al., 2016). Cependant, ce n'est certainement pas la seule raison à l'effet Warburg car certaines cellules cancéreuses peuvent fonctionner en glycolyse aérobie bien qu'elles ne soient pas confrontées à des conditions hypoxiques. De plus, même à des concentrations en oxygène dix fois inférieures à la normale, le transport des électrons dans la mitochondrie n'est réduit que d'un tiers. L'explication communément admise est que l'effet Warburg représente la traduction biochimique d'une réorientation du métabolisme des cellules en division vers la production, au cours de la glycolyse, de précurseurs carbonés qui sont nécessaires aux biosynthèses des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Pavlova et Thompson, 2016). La glycolyse permet ainsi la transformation du glucose en deux molécules de pyruvate, avec la production concomitante de deux molécules d'ATP. Comme nous l'avons introduit précédemment, cette voie métabolique est connectée à plusieurs voies de biosynthèse, dont celles des pentoses phosphates, des phospholipides, des triglycérides, du cholestérol, du glycogène et des acides aminés. La glycolyse permet aussi la génération de molécules dotées de propriétés anti-oxydantes, comme le NADPH via la voie des pentoses phosphates (Pavlova et Thompson, 2016). La production de lactate à partir du pyruvate, catalysée par la lactate déshydogénase permet de réoxyder les équivalents réduits du $NADH,H^+$ générés lors de la glycolyse, et donc de maintenir l'homéostasie redox. Les cellules tumorales compensent le faible rendement énergétique de la glycolyse en captant avidement le glucose. De plus, la vitesse de production de l'ATP par la glycolyse est environ 100 fois plus importante que celle impliquant le métabolisme oxydatif. La question fondamentale que doivent résoudre les cellules tumorales est donc moins celle concernant la production d'ATP que celle de son utilisation (Zu et Guppy, 2004). En effet, afin de maintenir le flux glycolytique soutenu nécessaire aux biosynthèses, les cellules en division doivent consommer activement l'ATP car ce composé agit comme un inhibiteur allostérique de la phosphofructokinase et de la pyruvate kinase (PKM), deux régulateurs clefs de la glycolyse (Kallinowski et al., 1989).

Un autre élément important à prendre en compte dans le remodelage métabolique des tumeurs est leur microenvironnement. Pour les tumeurs solides, celui-ci est en effet constitué par de nombreux types cellulaires qui peuvent représenter jusqu'à 50 % de la masse tumorale, dont

les CAF (fibroblastes associés au cancer), les structures vasculaires et péri-vasculaires, les cellules effectrices du système immunitaire et parfois les adipocytes (Chang et al., 2015). Il est bien établi aujourd'hui que l'interaction des cellules tumorales avec leur microenvironnement contribue au processus tumoral. Les cellules néoplasiques refaçonnent ainsi leur microenvironnement et les propriétés des cellules infiltrant la tumeur. Le lactate, produit par les cellules cancéreuse, inhibe par exemple la survie et la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK (natural killer) ou encore la polarisation des macrophages infiltrant la tumeur (TAM), facilitant l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance (Colegio et al., 2014). Ainsi, la glycolyse aérobie serait un moyen pour la tumeur de soutenir une immunité pro-tumorale tout en inhibant l'immunité anti-tumorale. De plus, il a été montré que l'acidité du micro-environnement associée à la production de lactate pouvait remodeler la matrice extracellulaire favorisant la mise en place des mécanismes d'invasion tumorale (Chang et al., 2015).

L'effet Warburg est ainsi passé de sa relégation dans l'oubli à une présence ubiquitaire, devenant le paradigme incontournable des articles et des revues traitant du métabolisme tumoral. Cependant, cette focalisation sur la glycolyse aérobie a eu pour conséquence d'occulter un fait établi : les tumeurs peuvent également oxyder d'autres molécules que le glucose pour produire l'ATP nécessaire aux biosynthèses, en particulier la glutamine, les acides gras et l'acétate (Pavlova et Thompson, 2016). En effet, dans ce type de métabolisme glycolytique, le pyruvate n'assure plus la production des intermédiaires du cycle de Krebs et la glutamine devient alors un substrat majeur de cette production d'intermédiaires à la place du glucose. Dans le cycle de Krebs, la glutamine permet à la fois de synthétiser les différents intermédiaires du cycle de Krebs mais également de produire des équivalents réduits permettant d'alimenter la chaine respiratoire (DeBerardinis et al., 2008). Cette flexibilité métabolique des cellules malignes, qui peuvent utiliser des sources carbonées autres que le glucose, constitue donc une limitation majeure à l'efficacité d'interventions nutritionnelles visant à limiter l'apport en sucres comme approche thérapeutique des cancers.

Rapidement, nous sommes donc passés progressivement d'une vision unique du métabolisme centrée sur l'effet Warburg à une conception plus intégrée prenant en compte les dialogues métaboliques établis entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement tumoral. Ainsi, les nouveaux outils biologiques, moléculaires ont élargi notre compréhension des mécanismes

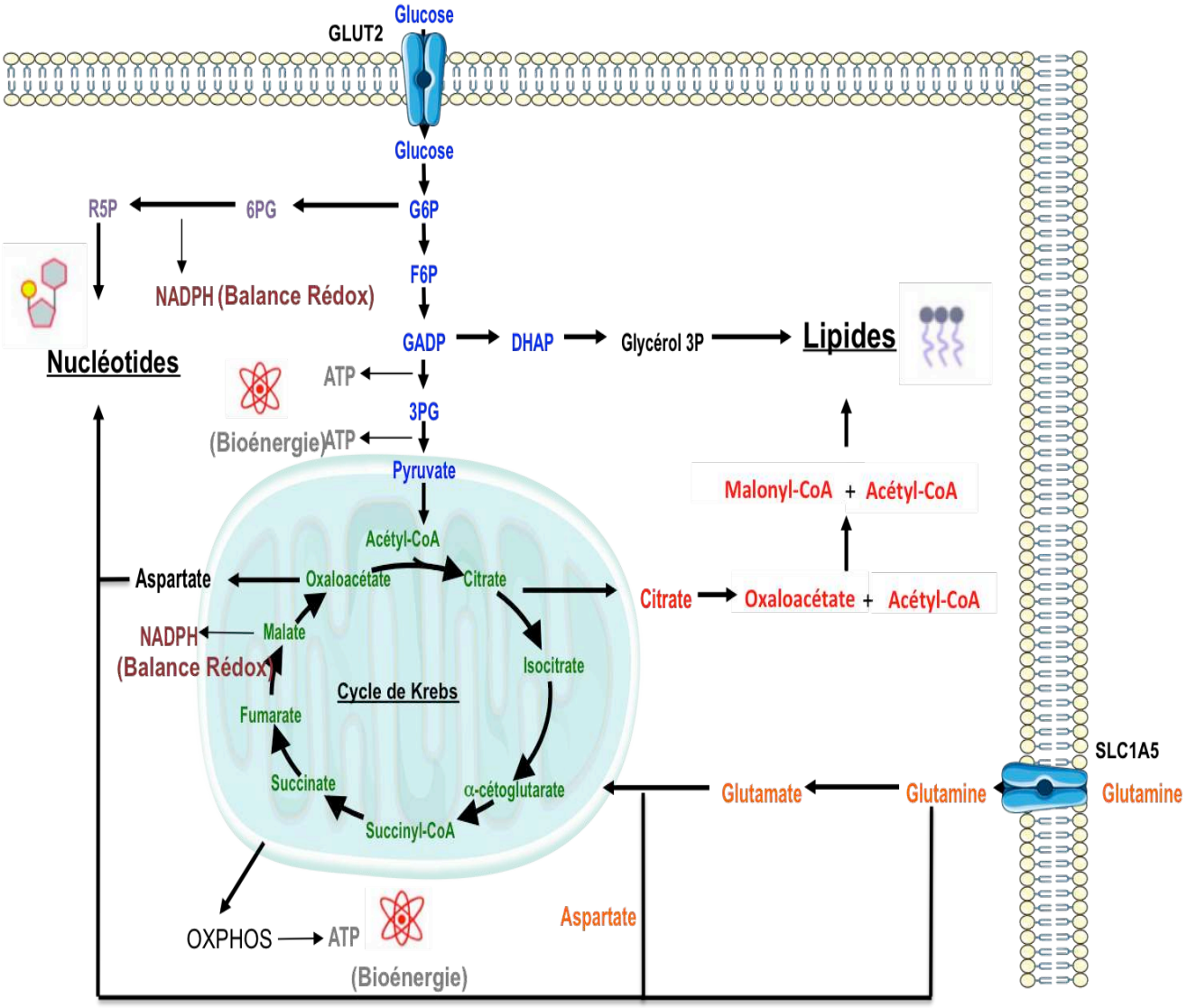


Figure 26: La reprogrammation du métabolisme du glucose et de la glutamine dans la cellule cancéreuse

NB : La glutaminolyse a lieu dans la mitochondrie (voir Figure 19)

***G6P**: Glucose 6-Phosphate, **F6P**: Fructose 6-Phosphate, **GADP**: Glycéraldéhyde phosphate, **DHAP**: DiHydroxyAcétone Phosphate, **3PG**: 3-PhosphoGlycérate, **6PG**: 6-PhosphoGluconate, **R5P**: Ribose 5-Phospate, **OXPHOS**: Phosphorylation Oxydative, **NADP**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, **NADPH**: Nicotinamide Dinucleotide Phosphate.*

et des conséquences fonctionnelles des altérations métaboliques associées aux tumeurs et font apparaître une vision beaucoup plus complexe du métabolisme tumoral (Kim et DeBerardinis, 2019). Dans ce contexte, le développement des marquages isotopiques a été, à cet égard, un apport majeur pour la compréhension des processus bioénergétiques tumoraux dans un contexte *in vivo* intégré. Nul doute aussi que ces nouvelles données constitueront la base de nouveaux traitements comme le laisse présager, entre autres, le décryptage des mécanismes métaboliques de chimiorésistance (Kaushik et DeBerardinis, 2018). Il y a donc fort à parier que notre cadre théorique expliquant le métabolisme tumoral soit encore très incomplet et que les avancées prochaines dans ce domaine très actif de la recherche nous forcent à reconsidérer ce que nous tenions pour acquis. Nous présenterons dans la suite de cette partie, les principales altérations métaboliques rencontrées dans le développement du CHC.

2) Altérations des voies métaboliques dans le CHC

Dans le CHC, les processus métaboliques associés à l'utilisation du glucose, des acides aminés et des acides gras sont considérablement modifiés (Figure 26) (Vander Heiden, 2011). Comme nous l'avons décrit précédemment, ces altérations servent à augmenter la capacité de la tumeur à se développer et à former des métastases. Depuis la dernière décennie, un certain nombre de voies métaboliques ont été étudiées dans le CHC pour mieux comprendre leurs rôles dans la tumorigenèse hépatique et ainsi ouvrir la voie à l'identification de nouvelles cibles à visée thérapeutique.

2.1) Altérations de la glycolyse

À l'instar de la majorité des cancers, la reprogrammation majeure du métabolisme des CHC est la reprogrammation du catabolisme du glucose vers la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative. Ainsi, dans la majorité des CHC, les analyses métaboliques d'imagerie utilisant le 18-FDG ont mis en évidence une corrélation étroite entre cette augmentation de la demande en glucose et des caractéristiques histologiques de mauvais pronostic (Nwosu et al., 2017). Pour répondre à cette demande importante, les cellules cancéreuses augmentent ainsi leur captage de glucose, en stimulant l'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT2 (Kim et al., 2017). Dans le même temps, l'expression des enzymes clefs de la glycolyse, comme HK2, la GAPDH ou encore PKM2, est également augmentée (Wong et al., 2014). Ces dérégulations favorisent l'utilisation du glucose à travers la voie de la glycolyse. Alors que GK est exprimée dans l'hépatocyte

quiescent, l'isoforme HK2 est généralement réexprimée dans le CHC et son expression corrèle avec un mauvais pronostic clinique (DeWaal et al., 2018). Il a ainsi été montré que l'inhibition d'HK2 dans des cellules d'hépatocarcinomes restaure le métabolisme oxydatif du glucose et augmente la sensibilité à des inducteurs de mort cellulaire (DeWaal et al., 2018). De la même manière, cette inhibition de l'expression d'HK2 dans des cellules hépatomateuses transformées entraîne une diminution du développement de xénogreffes *in vivo* ainsi que des mécanismes de l'angiogenèse (DeWaal et al., 2018). A l'inverse, une surexpression d'HK2 dans ces cellules induit une augmentation de la prolifération cellulaire et du développement tumoral (Dai et al., 2015. Une autre étape glycolytique significativement modifiée dans le CHC est la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate par la PKM2. De la même manière que HK2, alors que la LPK est exprimée dans l'hépatocyte quiescent, l'isoforme PKM2 est généralement réexprimée dans le CHC et son expression corrèle également avec un mauvais pronostic clinique (Wong et al., 2014). La réexpression d'enzymes comme HK2 et PKM2, au profit de la GK et la LPK, a été expliquée d'une part par la dérégulation d'oncogènes et de suppresseur de tumeurs comme nous le verrons dans la suite du manuscrit. Par la suite, la production préférentielle du lactate à partir du pyruvate est assurée par une augmentation de l'expression de la LDH dans le CHC. Finalement, il a été observé que certains isoformes des transporteurs de monocarboxylate (MCTs), comme MCT4, responsables de l'export du lactate dans le milieu extracellulaire, étaient surexprimés dans les CHC (Zhao et al., 2019).

2.2) Altération du métabolisme de la glutamine

Il a été montré que la plupart des cancers, incluant le CHC, consomment beaucoup plus de glutamine par rapport aux autres acides aminés et sont souvent dépendantes de la glutamine extracellulaire pour leur survie (DeBerardinis and Cheng, 2010). La glutamine est donc, avec le glucose, le principal nutriment supportant la survie et la demande biosynthétiques dans les cellules cancéreuses hautement prolifératives (Figure 26). En effet, durant la rapide prolifération des cellules tumorales, le citrate (dérivant du glucose) est continuellement exporté du cycle de Krebs en faveur de la biosynthèse des lipides (Vander Heiden et al., 2009). Donc pour remédier à cette redirection des flux de glucose hors du cycle de Krebs, la glutamine, via l'anaplérose, réapprovisionne généralement celui-ci en dérivés carbonés permettant entre autres de soutenir la synthèse des intermédiaires du cycle de Krebs (DeBerardinis et al., 2007, 2008). De plus, dans le CHC présentant un effet Warburg, il a été montré que la glutamine est utilisée comme substituant du glucose pour produire du NADH et

du FADH par le cycle de Krebs afin de générer de l'ATP par l'OXPHOS (DeBerardinis and Cheng, 2010).

Il a particulièrement été démontré dans le CHC que l'expression du transporteur ASCT2 (SCL1A5) est augmentée et constitue souvent un marqueur de mauvais pronostic (Bungard et McGivan, 2005). Son expression est régulée en aval de plusieurs voies de signalisation pro-oncogéniques, comme l'EGF via les MAPK ou par la voie PI3K/AKT/mTOR (Avissar et al., 2008). La régulation de SLC1A5 la plus clairement identifiée dans les cancers est celle exercée également par l'oncogène C-MYC (Wise et al., 2008). De plus, c-myc favorise également l'expression des enzymes du métabolisme de la glutamine telles que la glutaminase GLS1 (qui catalyse la transformation de la glutamine en glutamate). Ainsi, une récente étude réalisée au sein d'une cohorte de 90 patients a d'ailleurs montré qu'une augmentation de l'expression de c-myc était corrélée avec la surexpression de ASCT2 et de la GLS1, et que cette association était de mauvais pronostic (van Geldermalsen et al., 2016).

Comme nous l'avons vu, le glutamate peut être converti en α-cétoglutarate soit par GLUD1, soit par des aminotransférases (Figure 20). Ces dernières sont des enzymes qui convertissent le glutamate en α-cétoglutarate. Comme nous l'avons décrit précedemment, ces transaminases sont au nombre de trois. La première, la glutamate-pyruvate transaminase (GPT, aussi connue sous le nom d'alanine aminotransferase), transfère l'azote du glutamate au pyruvate, pour synthétiser de l'alanine et de l'α-cétoglutarate. La GPT est encodée par deux gènes, une forme cytoplasmique, GPT1, et une forme mitochondriale, GPT2. Récemment, il a été montré que GPT2 est surexprimée dans le CHC (Hao et al., 2016; Xu et al., 2016). La seconde transaminase est la glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT, aussi connue sous le nom d'aspartate aminotransférase) qui transfère l'azote du glutamate à l'oxaloacétate pour produire de l'aspartate et de l'α-cétoglutarate. Elle possède aussi une isoforme cytoplasmique (GOT1) et une isoforme mitochondriale (GOT2). Dans le cancer du foie, il a été montré que l'isoforme GOT1 est surexprimée (Xu et al., 2016). Enfin, la troisième transaminase est la phosphosérine aminotransférase 1, qui transfère l'azote du glutamate au 3-phosphohydroxypyruvate pour donner de la phosphosérine et de l'α-cétoglutarate. L'expression de ces différentes aminotransférases varie en fonction du tissu considéré, mais il apparait que PSAT1 soit surexprimée dans les tumeurs (Wulfert and Krueger, 2018). En effet, la surexpression de PSAT1 confère un avantage de croissance et de résistance à la chimiothérapie dans différents types de cancer (Vié et al., 2008). Ainsi, les réactions de transamination permettent à elles seules de générer l'alanine, l'aspartate, ainsi que de la phosphosérine à partir du glutamate. En dehors des mécanismes de transamination, le

glutamate fournit également de l'azote nécessaire à la biosynthèse *de novo* de nucléotides ainsi que du carbone nécessaire pour la biosynthèse de la proline, qui a notamment un rôle dans la production du collagène. Il est intéressant de noter que parmi les nombreux acides aminés dérivés de la glutamine contribuant à la survie des cellules cancéreuses, la biosynthèse d'aspartate est cruciale en raison de son rôle clé dans la synthèse des purines et des pyrimidines, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit.

2.3) Reprogrammation du métabolisme des lipides

Les lipides sont indispensables à la cellule cancéreuse pour la synthèse de nouvelles membranes et également à certaines voies de signalisation telles que celles médiées par des récepteurs nucléaires ou des récepteurs de surface. Ainsi, les cellules cancéreuses prolifératives présentent une forte avidité en lipides et en cholestérol, qu'elles satisfont soit en augmentant l'absorption des lipides et des lipoprotéines exogènes, soit en augmentant leur synthèse endogène (Snaebjornsson et al., 2020). Au cours de la carcinogenèse, il apparait que 95% des AG proviennent de la synthèse *de novo* dans les cellules cancéreuses, en dépit d'un apport abondant en AG extracellulaires (Snaebjornsson et al., 2020). Dans ce cas, les carbones du citrate, provenant du cycle de Krebs, vont être rediriger vers la voie de la lipogenèse (Figure 26). En condition physiologique, la lipogenèse se fait à partir du glucose. Cependant, dans un certain nombre de cancers présentant un effet Warburg, le pyruvate issu de la glycolyse est orienté préférentiellement vers la production de lactate plutôt que vers l'acétyl-CoA. Dans ce cas, la glutamine joue un rôle important dans la lipogenèse en permettant la production de citrate par son entrée dans le cycle de Krebs (DeBerardinis and Cheng, 2010). On parle dans ce cas de la carboxylation réductive de la glutamine qui représente un processus consommateur de NADPH par lequel l'α-cétoglutarate dérivé de la glutamine est réduit en citrate par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) (Ward et al., 2010). La carboxylation réductive de la glutamine apparait donc pour la cellules cancéreuse comme une source majeure de carbone pour la synthèse de lipides dans le CHC (Gameiro et al., 2013; Sun and Denko, 2014).

La glycolyse intervient également dans la lipogenèse en produisant le glycérol 3-phosphate à partir de dihydroxyacétone, nécessaire à la synthèse des TG (Figure 17). Dans ce contexte, l'augmentation de l'expression des enzymes de la lipogenèse, telles que l'ACLY, l'ACC, la FAS ou la SCD1, représente une altération phénotypique quasi universelle dans la plupart des CHC et le plus souvent associée à des cancers de mauvais pronostics. (Menendez et Lupu, 2007 ; Kuhajda, 2006 ; Nelson et al., 2017). Ainsi, plusieurs études ont pu mettre en évidence

qu'une inhibition des enzymes de la lipogenèse permettait de limiter la croissance tumorale en diminuant la prolifération et/ou en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses (Hatzivassiliou et al., 2005 ; Kridel et al., 2004 ; Nelson et al., 2017).

Il est intéressant de noter que la synthèse *de novo* des AG privilégiée dans la tumeur est la synthèse d'AG monoinsaturés au détriment des acides gras polyinsaturés (Loizides-Mangold, 2013). Cette modification est observée dans de nombreux cancers dont le CHC. Dans la cellule cancéreuse, les MUFA, issus de la lipogenèse, entrent dans la composition de lipides complexes tels que les phospholipides, les TG et les esters de cholestérol, pour répondre aux besoins liés à la prolifération. L'un des avantages de la synthèse de MUFA serait d'empêcher une accumulation d'acides gras saturés, comme le palmitate, responsables d'une lipotoxicité via la mise en place du stress du réticulum endoplasmique et des voies de signalisation apoptotiques (Peck et Shulz, 2016). De plus, il a été rapporté qu'une augmentation des phospholipides mono-insaturés au détriment des phospholipides saturés améliore la fluidité de la membrane plasmique dans les cellules de CHC, ayant pour conséquence fonctionnelle une meilleure absorption du glucose et une augmentation des capacités métastatiques de cellules cancéreuses (Lin et al., 2017). La composition lipidique des tumeurs de CHC, associée à un enrichissement en C16 :1 (palmitoléate) et C18 :1 (oléate), suggère donc une augmentation de l'expression de la SCD1, afin de favoriser la synthèse de ces lipides complexes. Ainsi, il a été montré que la SCD1 est fortement exprimée dans différents cancers chez l'homme et plus particulièrement dans le CHC. Cette surexpression est corrélée à une forte agressivité tumorale et un taux de survie plus court des patients atteints d'un CHC (Budhu et al., 2013). Dans ce contexte, une étude a pu montrer que l'inhibition pharmacologique de SCD1 par le SSI-4 permettait de lever la résistance à la Sorafénib dans le cadre du CHC (Ma et al., 2017).

2.4) Les acides nucléiques

Les cellules cancéreuses en prolifération ont une demande métabolique accrue en nucléotides (purines et pyrimidines) qui s'incorporeront entre autre dans les nouvelles molécules d'ARN et d'ADN. Comme pour les lipides, les altérations des voies de synthèse de nucléotides sont quasiment universelles dans les tumeurs (Uhlen et al., 2017). Dans ce contexte, le glucose et la glutamine sont des substrats essentiels aux cellules cancéreuses pour cette synthèse *de novo* de nucléotides (Figure 26). En ce qui concerne le glucose, la voie des pentoses phosphates est particulièrement importante pour les cellules cancéreuses en permettant la production de PRPP qui est un précurseur important dans la synthèse des purines et des pyrimidines. Supportant cette hypothèse, la concentration intracellulaire de certains métabolites clés de la

voie des PPP comme le ribulose 5-phosphate et le ribose 5-phosphate sont généralement diminués dans le CHC, suggérant que ces métabolites sont rapidement utilisés par les enzymes de la voie des PPP pour alimenter la synthèse de PRPP et celle de NADPH (Satriano et al., 2019). Dans ce contexte, trois des intermédiaires de la glycolyse, le fructose 6-phosphate, le glucose 6-phosphate et le glyceraldéhyde 3-phosphate peuvent s'engager dans la voie des pentoses phosphates et participer à la production de R5P, précurseur du PRPP. Ces observations démontrent l'importance de la glycolyse et de son interconnexion avec la voie de biosynthèse des nucléotides. Ainsi, l'expression des enzymes limitantes de cette voie métabolique, comme la G6PDH, la RPIA, la TKT ou la 6PGD est directement corrélée au développement tumoral dans différents types de cancers dont le CHC (Uhlen et al., 2017 ; Nwosu et al., 2017). L'augmentation de l'expression de la G6PDH ou de la TKT est par exemple associée à la migration, à l'invasion, à la chimiorésistance et donc à une diminution de la survie chez les patients atteints du CHC (Kowalik et al., 2016 ; Lu et al., 2018). A l'opposé, l'inhibition pharmacologique de ces enzymes, permet de réduire le développement tumoral (Xu et al., 2016).

Outre la glycolyse, le métabolisme de la glutamine joue un rôle important pour la synthèse de nucléotides. En effet, comme introduit précédemment, une partie des carbones des pyrimidines et des purines provient de l'aspartate qui peut être synthétisé à partir de l'oxaloacétate et du glutamate par la transaminase GOT2 (Michalak et al., 2015; Vander Heiden, 2011; Wise and Thompson, 2010). De plus, la glutamine est également un donneur d'azote pour la synthèse des nucléotides. La glutamine fournit donc à la fois des carbones et des azotes pour la synthèse des nucléotides et plusieurs études ont montré que la glutamine est nécessaire à la prolifération cellulaire via son rôle dans la synthèse d'ADN (Tardito et al., 2015). Les bases pyrimidiques et puriques contiennent en effet respectivement 1 et 2 groupements amides issus de la glutamine. L'importance de la glutamine en tant que fournisseur d'azote réduit est soulignée par le fait que des cellules cancéreuses présentant un arrêt de cycle cellulaire à la suite d'une déprivation en glutamine peuvent être sauvées par l'ajout de nucléotides exogènes (Patel et al., 2016).

De plus, indépendamment de la réorientation des flux de glucose et de glutamine dans les cellules cancéreuses, il a été montré que l'expression d'un certain nombre de gènes du métabolisme des purines (comme la désoxythymidylate kinase (DTYMK), la thymidylate synthase (TYMS) ou la thymidine kinase 1 (TK1)) et des pyrimidines (comme la carbamoyl phosphate synthétase 2, l'aspartate transcarbamylase ou la dihydroorotase), est augmentée

dans le CHC (Tenen et al., 202 ; Liu et al., 2011 ; Yeh et al., 2017). L'augmentation de l'expression de ces gènes est généralement associée à des CHC de mauvais pronostics. D'un point de vue moléculaire, l'oncogène c-myc stimule l'expression d'un bon nombre d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des nucléotides, notamment PRPS2 qui permet la synthèse du PRPP, l'inosine monophosphate deshydrogenase 1/2 (IMPDH 1/2), la carbamoyl phosphate synthetase II (CPSII, faisant partie du complexe CAD) ou la thymidylate synthase (Tenen et al., 2020 ; Liu et al., 2011 ; Yeh et al., 2017). L'augmentation de l'expression de ces gènes est généralement associée à des CHC de mauvais pronostics. Ainsi c-myc facilite non seulement le captage et l'utilisation de la glutamine dans les cellules cancéreuses, mais réoriente également son utilisation vers la synthèse des purines et des pyrimidines. De même, les cellules cancéreuses portant une mutation sur le suppresseur de tumeur p53 présentent elles aussi une dérégulation de gènes impliqués dans la biosynthèse des nucléotides, notamment IMPDH 1/2, et la GMP synthétase (GMPS) (Kollareddy et al., 2015). Enfin, l'activité de l'enzyme CAD, impliquée dans la synthèse des pyrimidines, est régulée notamment par la S6 kinase dépendante de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Ben-Sahra et al., 2013; Robitaille et al., 2013). De cette manière, l'activité de la CAD, dépendante de mTORC1, permet à la cellule de réguler la biosynthèse des pyrimidines en fonction du niveau intracellulaire de glutamine, étant donné que cette dernière contribue à l'activation de mTORC1 (Duran et al., 2012; Jewell et al., 2015).

Pour conclure, l'étude de la reprogrammation métabolique et le développement de méthodes permettant de définir les différentes voies métaboliques dérégulées dans les cancers sont des enjeux majeurs du développement de nouvelles thérapies ciblées. Bien que la reprogrammation métabolique soit une caractéristique commune aux cellules tumorales, les études montrent qu'il n'existe pas un phénotype métabolique que l'on puisse généraliser à tous les cancers. Comme évoqué précédemment, il s'avère qu'il existe une forte hétérogénéité entre les différents types des tumeurs. De manière générale, ces altérations métaboliques retrouvées dans le CHC sont le plus souvent dues à l'activation d'oncogènes ou à la perte d'activité de suppresseur de tumeurs. En effet, ces derniers ont pour cibles plusieurs voies métaboliques. On peut donc considérer aujourd'hui que la reprogrammation métabolique est une caractéristique inhérente à l'activation de ces oncogènes ou à la perte de ces suppresseurs de tumeurs (Figure 27).

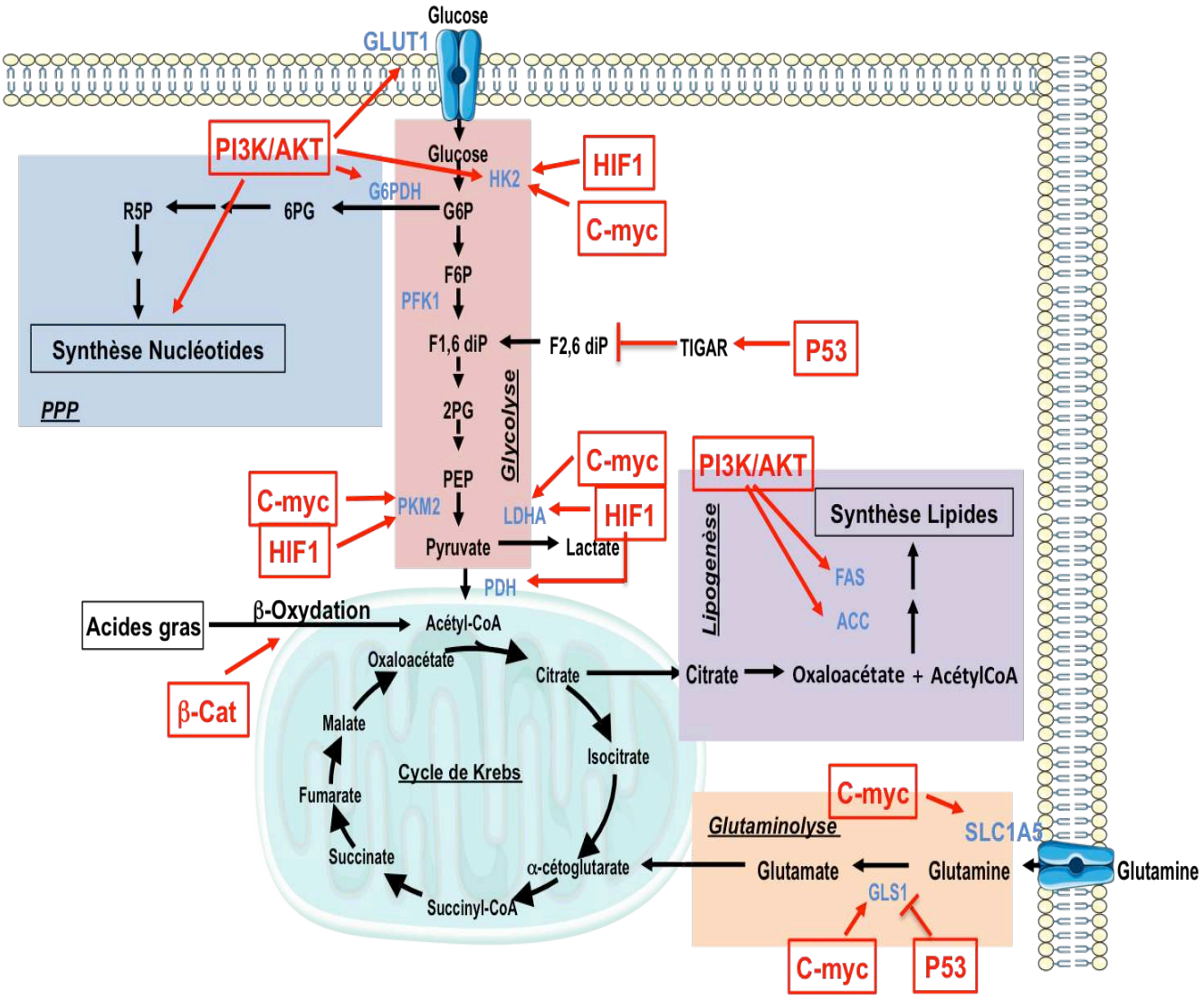


Figure 27 : Vue schématique des différents oncogènes et suppresseurs de tumeurs impliqués dans la reprogrammation métabolique du CHC

NB : La glutaminolyse a lieu dans la mitochondrie (voir Figure 19)

HIF1*: Hypoxia Inducible Factor 1,* β*-cat:* β*-Caténine,* ***TIGAR****: TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator*

3) Rôle des oncogènes et suppresseurs de tumeur dans la reprogrammation métabolique du CHC

3.1) La β-caténine

Des mutations somatiques activatrices du gène CTNB1, codant la β-caténine, ont été identifiées dans 10 à 32% des CHC et sont associées au sous-groupe S3 de la classification de ces CHC (Zucman-Rossi et al., 2007). Ces mutations induisent l'accumulation de la β-caténine dans le noyau des hépatocytes. Les tumeurs mutées pour la β-caténine sont moins prolifératives, plus différenciées, et présentent surtout un morphotype métabolique particulier, puisque, contrairement aux autres classes de CHC, elles ne sont jamais stéatosées. De plus, il a été montré que les CHC de la classe S3, mutées pour β-caténine, ne sont pas glycolytiques : elles ne présentent pas de différence dans l'oxydation du glucose, ni d'altération dans la production de lactate. En revanche la β-oxydation des acides gras à chaines longues est fortement induite. Ces données montrent donc que ce sous-groupe de CHC présente un métabolisme oxydatif à partir des acides gras. Ainsi, dans ce type de tumeurs, il a été clairement démontré que l'inhibition de la β-oxydation permet de réduire de manière significative le développement tumoral (Figure 27) (Senni et al., 2019).

3.2) TP53

L'invalidation du gène suppresseur de tumeurs TP53 est retrouvé dans près de 70% des CHC et est associée aux sous classes S1 et S2. De manière intéressante, la perte de TP53 entraine une modification du métabolisme tumoral, mais sensiblement différentes de celle associée à la classe S3. TP53 est un gène impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN, l'apoptose, la sénescence et le métabolisme. Si les effets de p53 sur le métabolisme restent encore mal compris, plusieurs observations convergent pour suggérer que p53 inhibe en effet la glycolyse via différents mécanismes (Figure 27). Les effets de p53 sur la glycolyse impliquent la répression transcriptionnelle directe ou indirecte des transporteurs du glucose Glut1, Glut3 et Glut4 (Figure 27) (Shen et al., 2012), mais aussi l'activation transcriptionnelle de TIGAR (tumor protein 53-induced glycolysis and apoptosis regulator), une fructose 2,6-bisphophatase qui favorise le flux d'intermédiaires de la glycolyse vers la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates (Shen et al., 2012). Ainsi, la perte de p53 permet de lever l'inhibition exercée par TIGAR sur le F2,6BP et d'activer la glycolyse menant à des tumeurs glycolytiques (Lacroix et al., 2013). De façon vraisemblablement coordonnée, p53 favorise

également la respiration mitochondriale à travers l'activation de l'enzyme SCO2 (synthesis of cytochrome c oxydase), ainsi que la biosynthèse et le bon fonctionnement des mitochondries en régulant directement le facteur de transcription TFAM (transcription factor A, mitochondrial) et la polymérase gamma. À ce titre, certains auteurs ont suggéré que l'inactivation de p53 au cours de la transformation cellulaire pourrait participer à l'effet Warburg en inhibant la phosphorylation oxydative tout en favorisant la glycolyse (Levine et Puzio-Kuter, 2010). p53 est également au coeur de boucles de rétrocontrôle impliquées dans le contrôle du métabolisme des lipides. De fait, p53 favorise l'utilisation des lipides comme source de production d'énergie par la mitochondrie (β-oxydation des acides gras) dans des situations de carence en glucose ou au cours d'une période de jeûne, notamment en régulant la transcription de plusieurs carnitine acyl transferases, dont la CPT1 (Sanchez-Macedo et al., 2013). p53 a également des effets sur la biosynthèse des lipides en régulant négativement SREBP1c (sterol regulatory element-binding protein 1c), un facteur de transcription agissant sur plusieurs gènes essentiels à la biosynthèse des lipides comme la FAS ou l'ACLY (Rueda-Rincon et al., 2015). Par ailleurs, en réprimant la transcription des gènes codant pour les enzymes maliques 1 et 2, p53 est un régulateur important de la production d'équivalents réducteurs, tels que le NADPH qui participe à la biosynthèse des lipides (Jiang et al., 2013). Certaines études d'immunoprécipation de chromatine suggèrent également que p53 intervient vraisemblablement dans d'autres voies métaboliques. Parmi celles-ci, on trouve la glutaminolyse par l'intermédiaire de la régulation de GLS2 ou encore la voie de synthèse de la sérine. Ainsi, une perte de P53 entraine une diminution de l'expression de la GLS2 au profit de la GLS1, favorisant ainsi la reprogrammation du métabolisme de la glutamine observée dans des CHC de mauvais pronostics (Hu et al., 2010).

3.3) HIF1α

Lors de l'hypoxie, le programme transcriptionnel activé par HIF1α tend à mettre en adéquation la consommation d'oxygène par la cellule cancéreuse avec la baisse de son approvisionnement. Dans ce contexte, l'expression de HIF1α est augmentée dans le CHC et il a été démontré qu'il favorisait la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose en stimulant directement l'expression de FOXM1 (Chen et Lou, 2017). Même si HIF1α est activé dans des conditions hypoxiques, plusieurs études ont montré de manière intéressante qu'il pouvait être activé par la voie de signalisation PI3K/AKTmTOR dans des conditions normoxiques (Wang et al., 2016 ; Zhong et al., 2000). HIF1α augmente l'expression des

gènes impliqués dans le transport du glucose et les enzymes de la glycolyse (Figure 27). En effet, il a été démontré que HIF1α induit l'expression et la translocation à la membrane plasmique du transporteur de forte affinité du glucose GLUT1. D'autre part, HIF1α contrôle également de manière directe l'expression des enzymes glycolytiques telles qu'HK1, HK2, LDHA et PKM2 (Hamaguchi et al., 2008). Dans ce contexte, il est particulièrement intéressant de souligner l'action coordonnée de HIF1α sur la voie de la glycolyse de part son rôle dans l'induction de l'expression de la lactate déshydrogenase-A (Semenza et al., 1994) et de son rôle dans l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase (HIF1α stimule l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) (Kim et al., 2006). De ce fait, HIF1α inhibe l'entrée de pyruvate dans le TCA et le redirige vers sa conversion en lactate (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). L'inhibition du TCA a le principal avantage d'économiser l'oxygène limitant, majoritairement consommé par l'OXPHOS (Papandreou et al., 2006), le réservant pour d'autres réactions d'oxydation cellulaire essentielles, non productrice d'énergie (Leach and Treacher, 1998). Enfin, HIF1α réoriente une partie du métabolisme de la glutamine vers la production de citrate dans le cycle de Krebs qui, après transformation en acétyl-coA dans le cytoplasme, est utilisé par la cellule cancéreuse pour son anabolisme.

3.4) c-MYC

c-MYC joue un rôle important et direct dans la mise en place de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses (Goetzman and Prochownik, 2018), en activant plusieurs transporteurs du glucose comme GLUT1 (Osthus et al., 2000), des enzymes glycolytiques (Kim et al., 2004; Osthus et al., 2000), en particulier HK2 (Kim et al., 2007), PFK, ENO1 et PKM2 (Kim et al., 2004; Osthus et al., 2000) et en favorisant également la conversion du pyruvate en lactate, en stimulant l'expression de la LDHA (Lewis et al., 1997; Shim et al., 1997) (Figure 27). c-MYC est également connu pour avoir un rôle majeur dans la régulation et dans l'augmentation de la glutaminolyse dans les cellules tumorales (Dang, 2013; Goetzman and Prochownik, 2018; Miller et al., 2012). Il permet de produire des macromolécules et des antioxydants nécessaires à la croissance cellulaire (Wise et al., 2008). En effet, la surexpression de l'oncogène c-MYC augmente l'absorption de glutamine dans les cellules tumorales en induisant de façon direct l'expression des transporteurs de la glutamine : SLC5A1 et SLC7A1 (Gao et al., 2009). c-MYC induit également l'expression de la glutaminase GLS1, l'enzyme limitante du catabolisme de la glutamine dans les tumeurs (Figure 27) (Dang et al., 2009 ; Curthoys and Watford, 1995). Il a été montré que les cellules

tumorales surexprimant c-MYC sont totalement dépendantes de la glutamine pour leur survie et leur prolifération (Reitzer et al., 1979). En effet, la déprivation en glutamine ou l'inhibition pharmacologique de la GLS dans les cellules tumorales transformées par c-MYC suffit à déclencher l'apoptose des cellules tumorales (Klimberg and McClellan, 1996; Yuneva et al., 2007). Donc les cellules tumorales dépendantes de la glutaminolyse induite par c-MYC reprogramment leur métabolisme mitochondrial pour soutenir l'anaplérose du cycle de Krebs et leur viabilité cellulaire (Kuehl et Bergsagel, 2012; Yuneva et al., 2007). En condition d'hypoxie et/ou de déficience en glucose, c-MYC maintient également le métabolisme de la glutamine pour faire tourner le cycle de Krebs et permettre ainsi la survie cellulaire (Dang et al., 2008; Miller et al., 2012). Dans ces conditions, c-MYC augmente la conversion de la glutamine en glutathion afin de limiter l'accumulation des ROS mitochondriaux (Miller et al., 2012).

3.5) PI3K/AKT/mTOR

Des mutations génétiques activatrices de la sous-unité PIK3CA, TSC1/2 et des mutations inactivatrices de PTEN sont également récurrentes dans les CHC associés aux classes S1 et S2, conduisant à une activation constitutive de la voie PI3K/Akt/mTOR. Cette voie, en plus de contrôler la prolifération hépatocytaire, joue un rôle important dans la reprogrammation métabolique de l'hépatocyte. Ainsi, il a été montré qu'une activation constitutive de la voie de signalisation PI3K/AKT dans les CHC a comme conséquence fonctionnelle l'augmentation de l'utilisation du glucose via une augmentation de la translocation de GLUT1 à la membrane plasmique. La signalisation PI3K/AKT augmente aussi l'activité et la transcription de gènes codant les enzymes clés de la glycolyse et de la lipogenèse comme HK2, la FAS ou l'ACC (Figure 27) (Wieman et al., 2007 ; Matter et al., 2014). De plus, il a été montré qu'un dialogue entre l'oncogène c-myc et la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR pouvait jouer sur le métabolisme de la glutamine. En effet, la P70S6K augmente l'efficacité de la traduction du facteur de transcription c-myc qui va alors activer la transcription de la GLS. Ces deux voies pro-oncogéniques vont ainsi favoriser de manière synergique les voies anaboliques à partir de la glutamine (Wieman et al., 2007).

En conclusion, il apparaît que la reprogrammation métabolique observée dans les CHC est caractérisée par un ensemble d'altérations et d'adaptations leur permettant de subvenir aux besoins nécessaires à la prolifération cellulaire (Figure 26). Cet ensemble d'altérations correspond à une combinaison d'évènements génétiques et non génétiques qui confèrent une

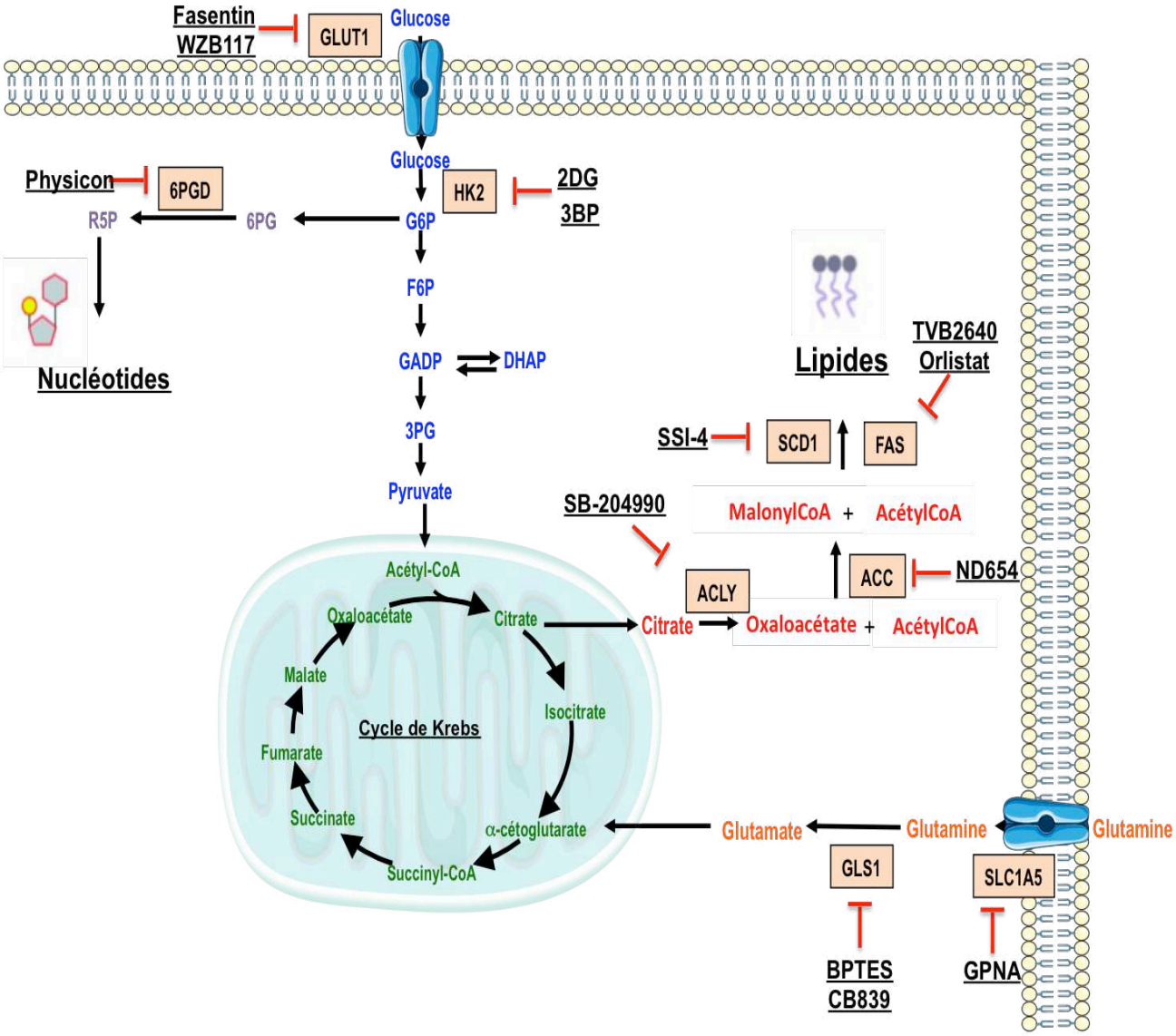


Figure 28 : Vue d'ensemble des différents inhibiteurs pharmacologiques ciblant le métabolisme tumoral

NB : La glutaminolyse a lieu dans la mitochondrie (voir Figure 19)

signature métabolique propre à chaque classe de CHC. Ainsi, de manière générale, les CHC de classe S3 s'orienteront vers un métabolisme oxydatif des acides gras alors que les sous classes S1 et S2 présentent en général un métabolisme glycolytique plus marqué avec une plus grande dépendance à la glutamine.

4) La reprogrammation métabolique comme cible thérapeutique

La reprogrammation métabolique apparait donc aujourd'hui comme une cible intéressante dans le traitement du cancer et notamment du CHC. En effet, la perturbation du métabolisme tumoral par l'utilisation de drogues ciblant des enzymes clefs de la reprogrammation métabolique, permettrait de couper les ressources nécessaires à la prolifération et à la dissémination des cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple des antifolates qui ciblent la synthèse de nucléotides et d'ADN. Bien que les antifolates, comme la methotrexate par exemple, présentent une certaine toxicité vis-à-vis des tissus prolifératifs normaux, ils ont néanmoins montré de très bons résultats sur des lymphomes, des leucémies et des cancers du poumon entre autres (Visentin et al., 2012). Ils sont aujourd'hui couramment utilisés en thérapeutique dans certains cancers et ont donné lieu au développement de nouvelles molécules ciblant la synthèse d'acides nucléiques, comme le 5-fluorouracil, également approuvé comme traitement anticancéreux (Wilson et al., 2014).
Une autre stratégie potentielle, pourrait être de cibler directement l'OXPHOS. La metformine, antidiabétique très largement utilisé dans le traitement du diabète de type 2, a montré des propriétés anticancéreuses dans différentes études. Ces propriétés ont été attribuées à la capacité de la metformine à inhiber le complexe I de la chaine respiratoire et donc à bloquer la production d'énergie par la mitochondrie dans les cellules cancéreuses (Hadad et al., 2011; Wheaton et al., 2014).

Néanmoins, il existe aujourd'hui encore peu de drogues ciblant le métabolisme qui ont été approuvées en tant qu'agents anticancéreux. Certaines d'entre elles ont cependant montré des résultats prometteurs dans des modèles murins ou dans des essais pré-cliniques chez l'homme (Figure 28).
Le 2-désoxy-D-glucose (2-DG), un analogue du glucose capable de réduire la glycolyse en inhibant de manière compétitive HK2, a montré un effet sur l'inhibition de la croissance tumorale du CHC (Aft et al., 2002). De plus, l'association d'un traitement conventionnel de type Sorafenib et du 2-DG a démontré une action synergique intéressante dans le cadre du

traitement du CHC (Tesori et al., 2015). Le 3-bromopyruvate (3-BP) est une autre molécule qui inhibe directement l'activité de HK2 et la voie de la glycolyse. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré les effets anticancéreux du 3-BP sur le CHC et, par conséquent, cette molécule pharmacologique a été approuvée par la FDA dans la prise en charge des CHC (Ko et al., 2012). De plus, des études ont montré que de petites molécules ciblant GLUT1, comme la fasentine et le WZB117, inhibent la croissance des cellules cancéreuses en réduisant l'absorption de glucose *in vitro* et *in vivo* (Wood et al., 2008 ; Liu et al., 2012). Enfin, une étude a pu mettre en évidence que l'inhibition pharmacologique de la 6PGD dans la voie des PPP permettait d'améliorer l'efficacité d'agents de chimiothérapie classiques comme la Sorafenib dans des modèles murins de CHC (Chen et al., 2019).

Pour ce qui est du ciblage de la reprogrammation métabolique des lipides, plusieurs cibles sont là aussi en cours d'étude. D'une part, plusieurs inhibiteurs naturels et synthétiques de l'ACLY existent et ont démontré des effets anti-prolifératifs sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Hatzivassiliou et al., 2005). De plus, ces dernières années, il a été montré que les inhibiteurs pharmacologiques de la SCD1 présentaient des propriétés anticancéreuses et inhibaient la croissance tumorale. Ainsi, une étude a pu démontrer que l'inhibition pharmacologique de la SCD1 avec un nouveau composé, le SSI-4, dans une lignée cellulaire de CHC résistante à la Sorafenib, atténuait efficacement la résistance à la chimiothérapie par l'induction d'un stress du ER et de l'apoptose (Ma et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs ont également montré que le traitement combiné Sorafenib/SSI-4 montrait une grande efficacité anti-tumorale *in vivo* (Ma et al., 2017). Enfin, des inhibiteurs de l'ACC et de la FAS ont également été développés au cours de ces dernières années. Les inhibiteurs d'ACC montrent des résultats prometteurs sur des modèles de CHC induits chez des rats, mais peu de données chez l'homme sont disponibles (Sugimoto et al., 2007 ; Lally et al., 2019). Les nombreux inhibiteurs de la FAS tels que le C75, C93, l'Orlistat, GSK2194069 et GSK837149A ont aussi démontré une activité anti-tumorale dans des études précliniques (Flavin et al., 2010 ; Zhou et al., 2003 ; Lee et al., 2017). Malheureusement, beaucoup de ces composés ont démontré une toxicité cellulaire importante chez l'homme, les empêchant de devenir des traitements de références dans le cadre du CHC. Cependant récemment, une nouvelle molécule inhibitrice de la FAS, le TVB-2640, a montré des effets prometteurs dans des essais cliniques sur des cancers du sein ou du poumon, ouvrant peut-être un espoir pour une application dans le CHC (Pope et al., 2019).

Enfin, des inhibiteurs ciblant le métabolisme de la glutamine ont également été développé. Ainsi, il existe des inhibiteurs de SLC1A5 (GPNA), des inhibiteurs des GLS (BPTES, CB-839) ainsi que des inhibiteurs des amino-transférases (AOA). Cependant, même si tous ces inhibiteurs montrent des effets anti tumoraux sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de CHC en pré clinique (Chen et Cui, 2015), seul le CB-839, un inhibiteur spécifique de GLS1, est actuellement en phase d'essai clinique de phase I dans des cancers du sein chez l'homme (Gross et al., 2014).

En résumé, même si de nombreuses molécules ciblant le métabolisme ont vu le jour ces dernières années, certaines faisant même l'objet d'études cliniques chez l'homme (Figure 28), les obstacles majeurs dans le ciblage thérapeutique du métabolisme sont l'hétérogénéité intra et inter tumoral, ainsi que la plasticité du métabolisme tumoral. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, de nombreux types de métabolisme sont associés au CHC, il est donc important de bien connaître le métabolisme de la tumeur à traiter afin de choisir la bonne stratégie métabolique à visée thérapeutique. De plus, de nombreuses études ont montré que les cellules cancéreuses peuvent modifier leur métabolisme au cours du développement tumoral ou en réponse à un traitement ciblant une voie métabolique particulière, rajoutant ainsi un niveau de complexité supplémentaire dans le ciblage du métabolisme tumoral (Kim et DeBerardinis, 2019). Afin de prévenir le développement de cette éventuelle résistance, la recherche de combinaison de molécules ciblant plusieurs voies métaboliques, ou l'identification de nouveaux oncogènes régulant plusieurs étapes déterminantes de cette reprogrammation pourraient être une stratégie intéressante pour contourner cette plasticité tumorale.

Partie IV : Le facteur de transcription ChREBP

I. Structure et régulation de l'activité de ChREBP

En 2001, l'étude du docteur Yamashita et de ses collaborateurs décrit pour la première fois un nouveau facteur de transcription induit par le glucose permettant de transmettre les effets transcriptionnels de celui-ci sur les voies de la glycolyse et de la lipogenèse dans le foie : le facteur de transcription ChREBP pour « Carbohydrate Responsive Element Binding Protein » (Yamashita et al., 2001). On sait aujourd'hui que ChREBP est bien conservé dans l'évolution et est exprimé dans plusieurs autres tissus comme le tissu adipeux blanc et brun, le pancréas, ou encore l'intestin. En réponse au glucose, ChREBP se fixe sous la forme d'un hétérodimère avec son partenaire d'hétérodimérisation transcriptionnel Mlx (Max Like Protein) sur des éléments de réponse spécifiques de type ChoRE (Carbohydrate Response Element) situés au niveau des promoteurs de ses gènes cibles. Le ChoRE consiste en une séquence de deux boîtes E (CACGTG) séparées par 5 paires de bases. Dans ce contexte, une analyse globale par « ChIP-sequencing » a montré que ChREBP se lie sur une large variété de promoteurs dans le génome, et induit majoritairement la transcription de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique, la réponse à l'insuline mais aussi dans les mécanismes de la prolifération cellulaire et de la carcinogenèse (Poungvarin et al., 2015). L'homologue de ChREBP chez l'homme, connu sous le nom WBSCR14 (williams-beuren syndrome chromosomal region 14) ou MondoB, est impliqué dans le syndrome de Williams-Beuren, qui se caractérise par une intolérance au glucose sévère dans 75% des cas (Cherniske et al., 2004; Bayés et al., 2003).

1) Structure

Les homologues de ChREBP appartiennent à la famille Mondo et sont présents autant chez les nématodes (Caenorhabditis. elegans) que les insectes (Drosophila. melanogaster) et les mammifères (Homo sapiens). Dans cette famille, deux gènes paralogues ont été identifiés chez les vertébrés : mlx interacting protein like (mlxipl) localisé sur le chromosome 12, le

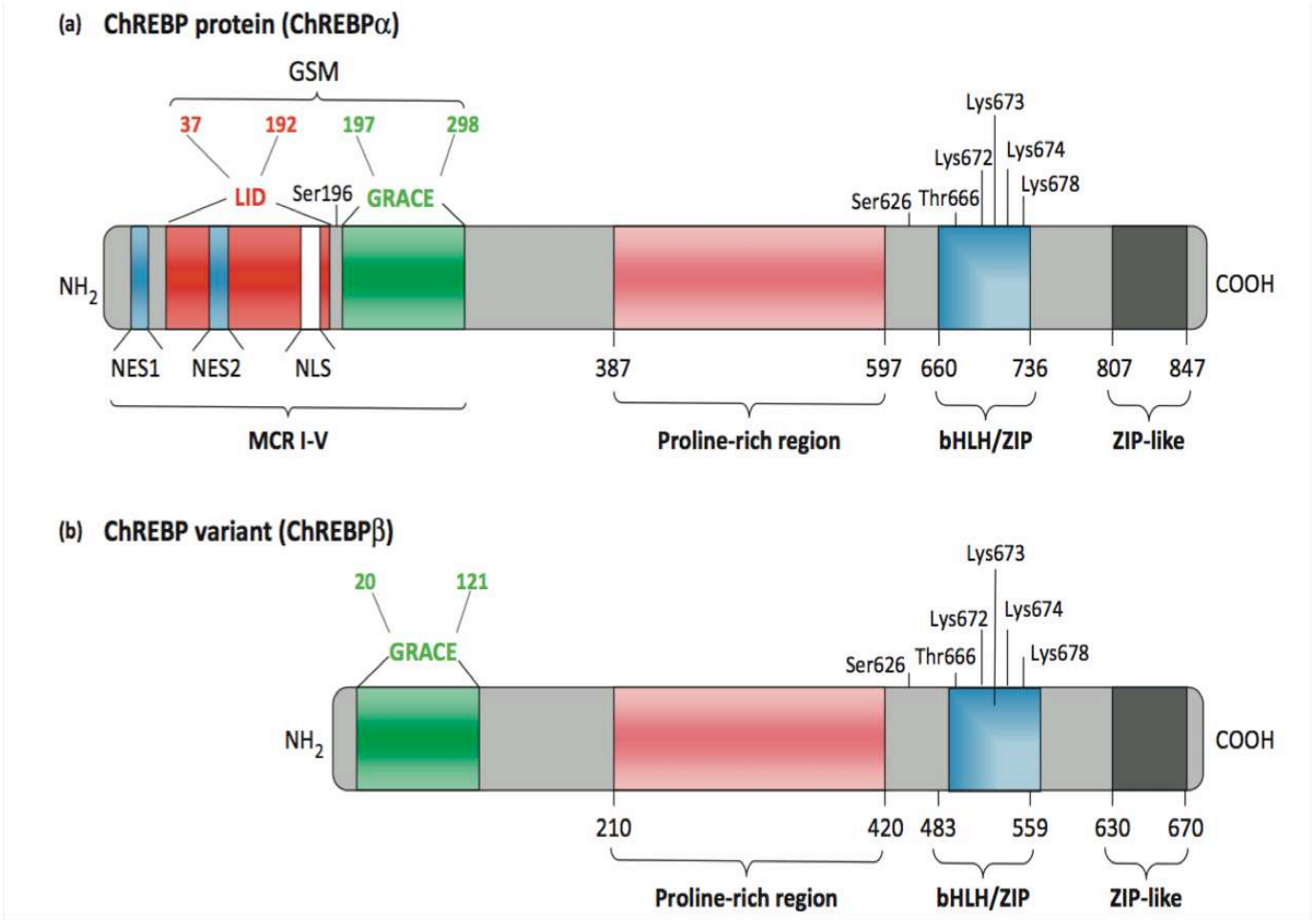


Figure 29: Schéma représentatif de la structure du facteur de transcription ChREBP et de son variant ChREBPβ *(Fihoulaud et al, 2013)*

***MCR**: Mondo conserved region; **NES:** Nuclear export signal; **NLS**: Nuclear localisation signal; **LID**: Low glucose inhibitory domain; **GRACE**: Glucose-response activation conserved element; **GSM**: Glucose sensing module; Pro-rich: domaine polyproline; **bHLH-LZ**: domaine de liaison à l'ADN et d'hétérodimérisation; **ZIP-like**: domaine en glissière de leucine; **PKA**: Protéine kinase A; **p300**: histone acétyltransférase.*

bras q et dans la région 24.31 (12q24.31) qui code la protéine MondoB/ChREBP et mlx interacting protein (mlxip) présent sur le chromosome 7, le bras q et dans la région 11.23 (7q11.23) qui code la protéine MondoA (919 AA). Un seul gène code la protéine MondoB/ChREBP chez les espèces non vertébrées (Singh et Irwin, 2016). Bien que ces deux protéines possèdent des similarités de structure, l'activité de ChREBP est principalement impliquée dans l'activation de la synthèse de lipides par la lipogenèse hépatique et adipocytaire, tandis que MondoA contribue à l'utilisation énergétique du glucose dans le muscle (Davies et al., 2008; Sans et al., 2006).

ChREBP appartient à la famille des facteurs de transcription de type b-HLH-LZ de la superfamille de type Myc/Max/Mad. C'est une protéine de 95 kDa comportant 864 acides aminés divisée en différents domaines structuraux. En partie N-terminale, on retrouve un domaine de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signal) (acides aminé 158-173) et deux domaines d'export nucléaire NES (Nuclear Export Signal), formant ainsi le MCR (Mondo Conserved Region) en fonction de son homologie de séquence avec son paralogue MondoA. C'est dans le MCR que l'on retrouve également un domaine nommé GSM (Glucose Sensing Module) jouant un rôle crucial dans les mécanismes d'activation de ChREBP par le glucose. Le GSM est composé de deux domaines: le LID (Low-glucose Inhibitory Domain) et le GRACE (Glucose Response Conserved Element), dont nous aurons l'occasion de détailler le rôle plus en détail dans la suite de ce manuscrit. En partie C-terminale, ChREBP contient un domaine bHLH/LZ (acides aminé 660-736) qui permet sa fixation à l'ADN et un domaine Zip-Like (leucine-zipper-like). ChREBP possède également un domaine poly-proline et de nombreux sites de modifications post-traductionnelles qui jouent un rôle important dans la régulation de son activité transactivatrice (Figure 29) (Abdul-Wahed et al., 2017 ; Baraille et al., 2015).

Deux isoformes de ChREBP ont été décrites à ce jour. L'isoforme longue de ChREBP, rebaptisée ChREBP-α (864 AA), est produite à partir du site d'initiation de la transcription localisé dans l'exon 1a. ChREBP-β est quant à lui transcrit à partir de l'exon 1b dont le promoteur alternatif est localisé à 17kb en amont de l'exon 1a du gène mlxipl. L'ARNm codant ChREBP-β subit un épissage alternatif de l'exon 1b à l'exon 2 et sa traduction à partir du codon ATG dans l'exon 4 (Herman et al., 2012) produit une protéine ChREBP tronquée du domaine LID, lui conférant ainsi une activité constitutive (Figure 29). Cette seconde isoforme plus courte de ChREBP est très active dans le tissu adipeux blanc tissu (WAT) de souris.

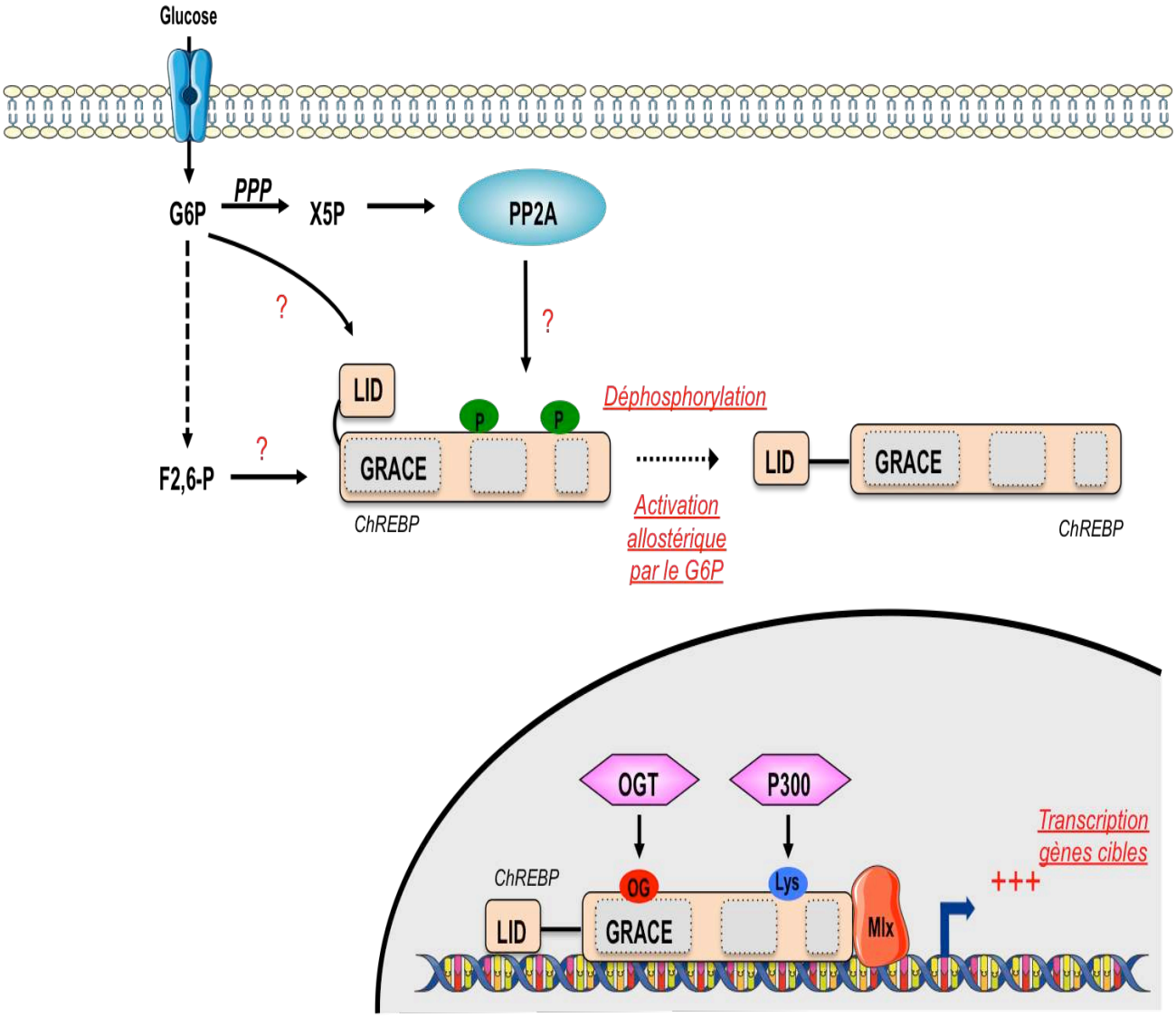


Figure 30: Mécanisme d'activation de ChREBP par le glucose

L'activité de ChREBP est contrôlée par différentes modifications post-traductionnelles. ***G6P***: *Glucose-6Phosphate,* ***F2,6P***: *Fructose 2,6-Phosphate,* ***X5P***: *Xylulose 5 Phosphate,* ***PPP***: *Pentose Phosphate Pathway,* ***PP2A***: *Protein Phosphatase 2A,* ***LID***: *Low glucose inhibitory domain;* ***GRACE***: *Glucose-response activation conserved element,* ***OGT***: *O-N-Acétylglucoseaminyltransférase*

Ainsi, il a été montré que l'isoforme ChREBPβ est environ vingt fois plus active au niveau transcriptionnel que l'isoforme ChREBPα et que son activité est élevée quelles que soient les concentrations de glucose dans la cellule. Aujourd'hui, même si des études ont proposé un nouveau mécanisme de régulation impliquant les deux isoformes α et β, le rôle de l'isoforme ChREBPβ et son interaction avec ChREBPα reste encore mal compris. C'est pourquoi dans la suite de ce manuscrit nous appellerons ChREBP, l'isoforme ChREBPα qui est l'isoforme que nous avons étudié au cours de ce projet de thèse.

2) Régulation de l'activité de ChREBP dans le foie

2.1) Régulation de la transcription de ChREBP

Dans le foie, l'expression de ChREBP est contrôlée principalement par l'état nutritionnel. En effet, il est bien établi que son expression est diminuée à jeun et fortement augmentée à l'état nourri en réponse au métabolisme du glucose. Cependant à ce jour, la régulation de la transcription de ChREBP par le glucose n'a pas encore été élucidée. D'autres régulateurs transcriptionnels comme LXR (Liver X receptor) et TR (Thyroid Hormone Receptor) sont également impliqués dans la régulation positive de son expression. En effet, le promoteur de ChREBP possède 2 éléments de réponse à LXR et il a été montré que le récepteur au hormones thyroïdiennes TR se fixe à l'un d'entre eux (Gauthier et al., 2010; Cha et Repa, 2007).

2.2) Régulation activatrice de l'activité de ChREBP

A l'état nourri, les mécanismes précis d'activation de ChREBP par le glucose restent encore mal compris et assez discutés. Cependant, différentes équipes ont démontré que ce mécanisme d'activation de ChREBP par le glucose impliquait une translocation nucléaire de la protéine, des changements conformationnels induits par différents métabolites de la glycolyse et des modifications post transcriptionnelles (Figure 30).

Le premier modèle proposé pour l'activation de ChREBP par le glucose repose sur un mécanisme de régulation de sa déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A, qui contrôle sa localisation subcellulaire, sa liaison à l'ADN et donc son activité

transcriptionnelle sur ses gènes cibles. Dans ce modèle, il a été constaté qu'un métabolite issu du métabolisme du glucose, plutôt que le glucose lui-même, était responsable du signal d'activation de ChREBP (Girard et al., 1997). Ainsi, le premier candidat proposé est le xylulose 5-phosphate (X5P), qui dérive du métabolisme du glucose par la voie des pentoses phosphates (Kabashima et al., 2003). Selon ces études, le X5P, en activant la protéine phosphatase 2A, conduit à une déphosphorylation des résidus Ser196, Ser626 et Thr666 de ChREBP, résidus situés à proximité de la séquence NLS. Cette déphosphorylation conduit à sa dissociation avec la protéine 14-3-3 et favorise aussi la liaison de l'importin-α (facteur d'importation nucléaire) à sa séquence NLS, ce qui permet à terme sa translocation nucléaire (Li et al., 2010; Sakiyama et al., 2008). À l'inverse, en situation de faible concentration de glucose, la phosphorylation nucléaire de ChREBP par la protéine kinase A conduit à sa relocalisation dans le cytosol via le facteur d'exportation nucléaire CRM1 se liant à la séquence d'export nucléaire NES, inactivant ainsi ChREBP (Burke et al., 2009; Sakiyama et al., 2008). Ces résultats ont été confirmés par des expériences de mutagenèse dirigées contre ces sites de phosphorylation, montrant qu'un mutant mimant la phosphorylation de ChREBP sur la Ser196 (S196D) est maintenu dans le cytosol des hépatocytes en réponse au glucose, tandis qu'un mutant non phosphorylable (S196A) migre naturellement dans le noyau des hépatocytes en absence de stimulation (Sakiyama et al., 2008).

Au fil des années ce modèle a cependant souvent été remis en question (Kabashima et al., 2003; Tsatsos & Towle, 2006). En effet, des recherches plus récentes ont proposé que le premier intermédiaire du métabolisme du glucose, le G6P, plutôt que le X5P, est responsable de la translocation nucléaire de ChREBP dans les hépatocytes, indépendamment de son état de phosphorylation. Ainsi, une première étude rapporte qu'en réponse au glucose, la triple mutation des résidus de phosphorylation Ser196, Ser626 et Thr666 de ChREBP n'affecte pas l'activité transactivatrice de celui-ci, suggérant un autre mécanisme d'activation par le glucose (Tsatsos & Towle, 2006). Plus tard, deux autres études ont ainsi démontré que le G6P issu de la phosphorylation du glucose par la GK, serait un métabolite signal déterminant dans l'activation de ChREBP (Dentin et al., 2012; Li et al., 2010). En effet, l'inhibition de la PP2A dans la lignée hépatomateuse HepG2 n'affecte pas l'activité de ChREBP en réponse au glucose et, dans les hépatocytes murins, la déphosphorylation de la Ser196 est insuffisante à l'importation nucléaire de ChREBP. De plus, il a été démontré que la surexpression de la G6PDH, la première enzyme de la voie des pentoses phosphates, permet de réorienter le flux de glucose à travers cette voie métabolique, ayant pour conséquence une augmentation des

concentrations intracellulaires de X5P au détriment du G6P. Dans cette situation, ChREBP n'est plus transloqué dans le noyau des hépatocytes malgré l'augmentation significatives des concentrations en X5P (Dentin et al., 2012). Le rôle possible du G6P est encore renforcé par l'identification d'un motif de reconnaissance du G6P dans le domaine GRACE soulevant la possibilité d'une régulation allostérique de ChREBP par liaison directe du G6P à ce motif. Dans cette modélisation mathématique, l'activation de ChREBP impliquerait une inhibition intramoléculaire entre les deux domaines de régulation GRACE et LID de ChREBP. En situation de faible concentration de glucose et donc de G6P, le domaine LID inhibe l'activité transactivatrice de ChREBP conférée par le domaine GRACE, entrainant un changement conformationnel de la protéine à l'origine de son inactivation. À l'inverse, en présence de forte concentration de glucose, l'inhibition du domaine LID sur le domaine GRACE est levée conduisant à l'activation de ChREBP (Li et al., 2006). Ainsi, dans ce modèle, l'augmentation des concentrations intracellulaires en G6P va entrainer un changement de conformation de la protéine et lever l'inhibition du LID sur le GRACE. Conformément à ces résultats, une forme tronquée de ChREBP appelée ChREBP-CA (ChREBP constitutivement actif), délétée des 196 premiers acides aminés de la partie N-terminal du domaine LID, est constitutivement active même à de faibles concentrations de glucose (Davies et al., 2010).

La controverse dans l'identification du principal métabolite du glucose a été en partie attribuée au fait que le réseau métabolique glucidique est complexe et fortement interconnecté. Une étude a ainsi proposé que le X5P et le G6P jouaient en fin de compte tous les deux un rôle dans la modulation de l'activité transcriptionnelle de ChREBP, suggérant que l'activation de ChREBP pourrait être contexte-dépendante (Diaz-Moralli et al., 2012). De plus, une autre étude a pu montrer que le fructose 2,6-bisphosphate (F2,6P) est également impliqué dans l'activation de ChREBP en réponse au glucose dans les cellules hépatiques. Ainsi, dans des hépatocytes primaires de rats en culture, l'activité transactivatrice de ChREBP induite par le G6P et le X5P est en effet inférieure à celle induite par le glucose. De plus, l'inhibition sélective de la 6-PFK- 2/FBPase-2 conduit à une diminution de l'expression en ARNm de la G6Pase (gène cible de ChREBP) et une inhibition du recrutement de ChREBP sur le promoteur de ses gènes cibles en réponse au glucose (Arden et al., 2012).

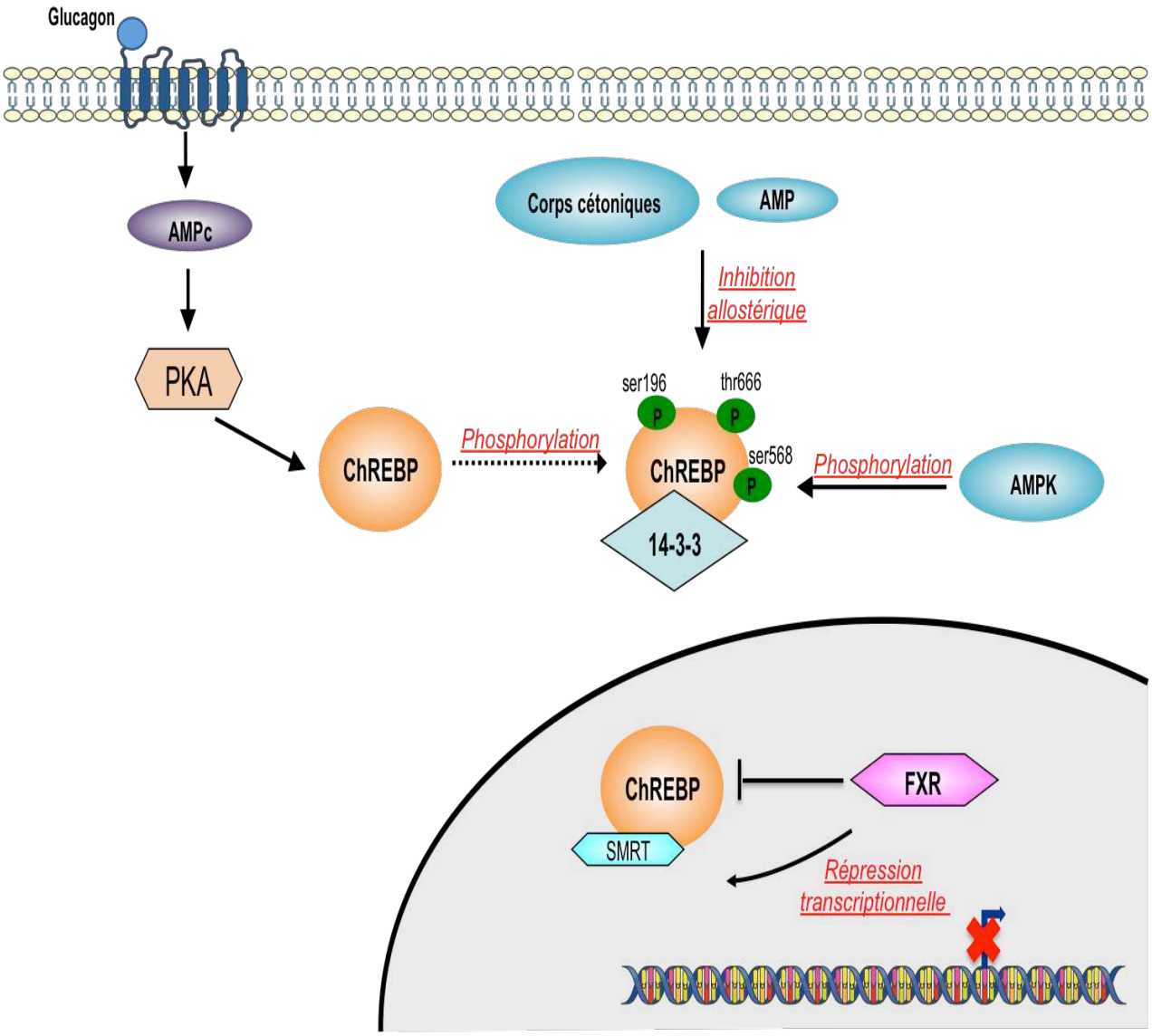


Figure 31: Mécanisme d'inhibition de l'activité de ChREBP lors d'une baisse de la charge énergétique

Lors du jeûne, ChREBP est phosphorylé par plusieurs effecteurs, ce qui va renforcer son interaction avec la protéine 14-3-3 et favoriser sa rétention dans le cytoplasme. ***AMPc:*** *Adénosine Monophosphate cyclique,* ***PKA****: Protéine Kinase A,* ***AMPK****: AMP-activated protein kinase,* ***AMP****: Adénosine Monophosphate,* ***FXR****: Farnesoid X Receptor,* ***SMRT****: Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptor*

2.3) Régulation inhibitrice de l'activité de ChREBP

Des modifications de l'état nutritionnel nécessitent une coordination entre les flux métaboliques et l'expression des gènes pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule. Ainsi, à l'état post absorptif, plusieurs mécanismes peuvent inhiber l'activité de ChREBP. Dans ce contexte, la rétention de ChREBP dans le cytoplasme par phosphorylation a été identifiée comme le principal mécanisme inhibiteur de ChREBP (Figure 31). Lors du jeûne, le glucagon va induire la phosphorylation de ChREBP sur le résidu sérine 196 *via* l'augmentation de l'activité de la Proteine Kinase A, conduisant à la liaison de ChREBP à la protéine 14-3-3 et à sa rétention cytoplasmique. La PKA phosphoryle également ChREBP sur le résidu Thréonine 666 situé dans le domaine de la liaison à l'ADN, entraînant une perte d'activité de liaison à l'ADN. De plus, il a été montré que l'AMPK pouvait également phosphoryler ChREBP sur un résidu sérine 568, empêchant sa liaison sur le promoteur de ses gènes cibles (Denechaud et al., 2008 ; Sakiyama et al., 2008). Une autre étude a pu montrer que l'activité de ChREBP pourrait également être inhibée par le récepteur nucléaire des acides biliaires, le récepteur nucléaire farnésoïde X (FXR) (Caron et al., 2013). En effet, en réponse à une activation pharmacologique, FXR inhibe l'expression de plusieurs gènes du métabolisme glucidique en inhibant notamment le recrutement de ChREBP sur la chromatine. Plus récemment, il a été suggéré que certains métabolites, comme l'AMP ou les corps cétoniques, pouvaient inhiber ChREBP de manière allostérique au cours du jeûne en renforçant la stabilisation du complexe ChREBP/14-3-3 (Sato et al., 2016).

2.4) Autres modifications post-traductionnelles et partenaires de ChREBP

- **L'acétylation**

Outre la translocation nucléo-cytoplasmique et la déphosphorylation, d'autres modifications post-traductionnnelles stimulent l'activité transcriptionnelle de ChREBP. Ainsi, des travaux de notre équipe ont montré que l'acétylation de ChREBP sur la lysine 672 (Lys672) par le co-activateur de transcription p300, via son domaine à activité histone acétyltransférase (HAT), augmente son activité transcriptionnelle en favorisant son recrutement sur le promoteur de ses gènes cibles (Bricambert et al., 2010). Dans ce modèle d'activation, la mutation ciblée de la Lys672 abolit totalement l'activation de ChREBP induite par le glucose (Bricambert et al., 2010). Il a également démontré que ce mécanisme de régulation par acétylation peut être

réprimé par la sérine/thréonine kinase SIK2 (Salt-Inducible Kinase 2) qui, en inhibant p300 par phosphorylation directe sur la sérine 89 (Ser89), conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Bricambert et al., 2010). De manière intéressante, la surexpression hépatique de SIK2 en parallèle de celle de p300, protège le foie d'une accumulation excessive d'acides gras tandis que son inhibition chez des souris invalidées spécifiquement pour SIK2 dans le foie favorise le développement d'une stéatose hépatique, d'une résistance à l'insuline et d'une inflammation (Bricambert et al., 2010).

- **La O-GlcNAcylation**

Cette réaction est dépendante du glucose et correspond à l'addition de la N-Acétylglucosamine sur les résidus Sérine et Thréonine par l'O-GlcNac transférase (OGT) grâce à l'utilisation du substrat uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc). La réaction est réversible et est assurée par l'enzyme O-GlcNAcase (OGA) (Hart & Akimoto, 2009). Dans la cellule, 2 à 5% du glucose consommé emprunte en effet la voie de biosynthèse des hexosamines qui assure la production de l'UDP-GlcNAc. L'étape limitante de cette voie est assurée par la glutamine fructose amidotransférase (GFAT), qui convertit le fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate. Dans ce contexte, des expériences réalisées sur des cellules hépatiques issues de souris sauvages et stimulées par des concentrations élevées de glucose (25mM) ont montré que ChREBP est O-GlcNacylé. La surexpression hépatique de l'OGT augmente l'expression des gènes cibles de ChREBP (ACC, FAS, SCD1) (Guinez et al., 2011). Enfin, plusieurs sites de O-GlcNAcylation ont été identifiés à l'extrémité C-terminale de la protéine ChREBP: la sérine 614 (Ser614), la thréonine 517 (Thr517) et la sérine 839 (Ser839) (Yang et al., 2017). La O-GlcNAcylation de ChREBP sur la Ser839 est particulièrement importante pour assurer son export nucléaire en renforçant son interaction avec la protéine 14-3-3. D'autre part cette modification participe aussi au maintien de l'activité transcriptionnelle de ChREBP en maintenant son hétérodimérisation avec son partenaire MLX (Yang et al., 2017).

- **L'hydroxylation :**

Très récemment, une nouvelle forme de modification post-traductionnelle de ChREBP en réponse au glucose a été décrite. Il s'agit de l'hydroxylation de l'isoforme ChREBPα sur les résidus Pro536 et Pro141 situés dans le domaine LID. Cette modification, dépendante du glucose, semble être indispensable pour induire l'expression des gènes cibles de ChREBP

dans les hépatocytes (Heidenreich et al., 2020). Contrairement aux modifications précédemment décrites, la modification par hydroxylation est irréversible. Les auteurs ont aussi identifié que les hydroxylases de Proline qui interagissent directement avec ChREBP appartiennent à la famille Egln (Egl-9 family hydroxia inducible factor) (Heidenreich et al., 2020).

- **Les cofacteurs et partenaires de ChREBP :**

Comme nous l'avons décrit dans cette partie du manuscrit, l'activation de ChREBP nécessite sont hétérodimérisation avec son partenaire MLX pour se fixer spécifiquement aux séquences ChoRE sur le promoteur de ses gènes cibles (Yamashita et al., 2001, Stoeckman et al., 2004). Comme pour ChREBP, MLX est un membre de la famille des facteurs de transcription Myc/Mac/Mad impliqués dans la régulation transcriptionnelle de gènes de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose (Grandori et al., 2000). En 2004, l'équipe du professeur Howard C. Towle a décrit que MLX est un partenaire obligatoire des fonctions biologiques de ChREBP dans l'hépatocyte (Stoeckman et al., 2004). Cette hypothèse a été confirmée par l'observation qu'un dominant négatif de MLX inhibe l'activité de ChREBP sur ses gènes cibles (Iizuka et al., 2009). Plusieurs études ont par la suite démontré que ChREBP interagit dans le foie avec d'autres protéines nucléaires telles que le récepteur nucléaire LXRα (Cha et Repa, 2007) et HNF4-α (Adamson et al., 2006). Ces interactions augmentent l'activité de ChREBP. A l'inverse ChREBP interagit également avec FXR (Caron et al., 2013) et PGC-1β (K. T. Chambers et al., 2013). Ces interactions spécifiques inhibent dans ces deux cas l'activité de ChREBP. Finalement, nous avons identifié plus récemment que l'histone déméthylase Phf2 (Plant Homeodomain Finger 2), qui appartient à la famille KDM7 des histones déméthylases, est un coactivateur de ChREBP sur le promoteur de ses gènes cibles. L'interaction entre Phf2 et ChREBP améliore l'activité transcriptionnelle de ChREBP en permettant la déméthylation de la marque épigénétique inhibitrice H3K9me2 sur le promoteur de ses gènes cibles (Bricambert et al., 2018).

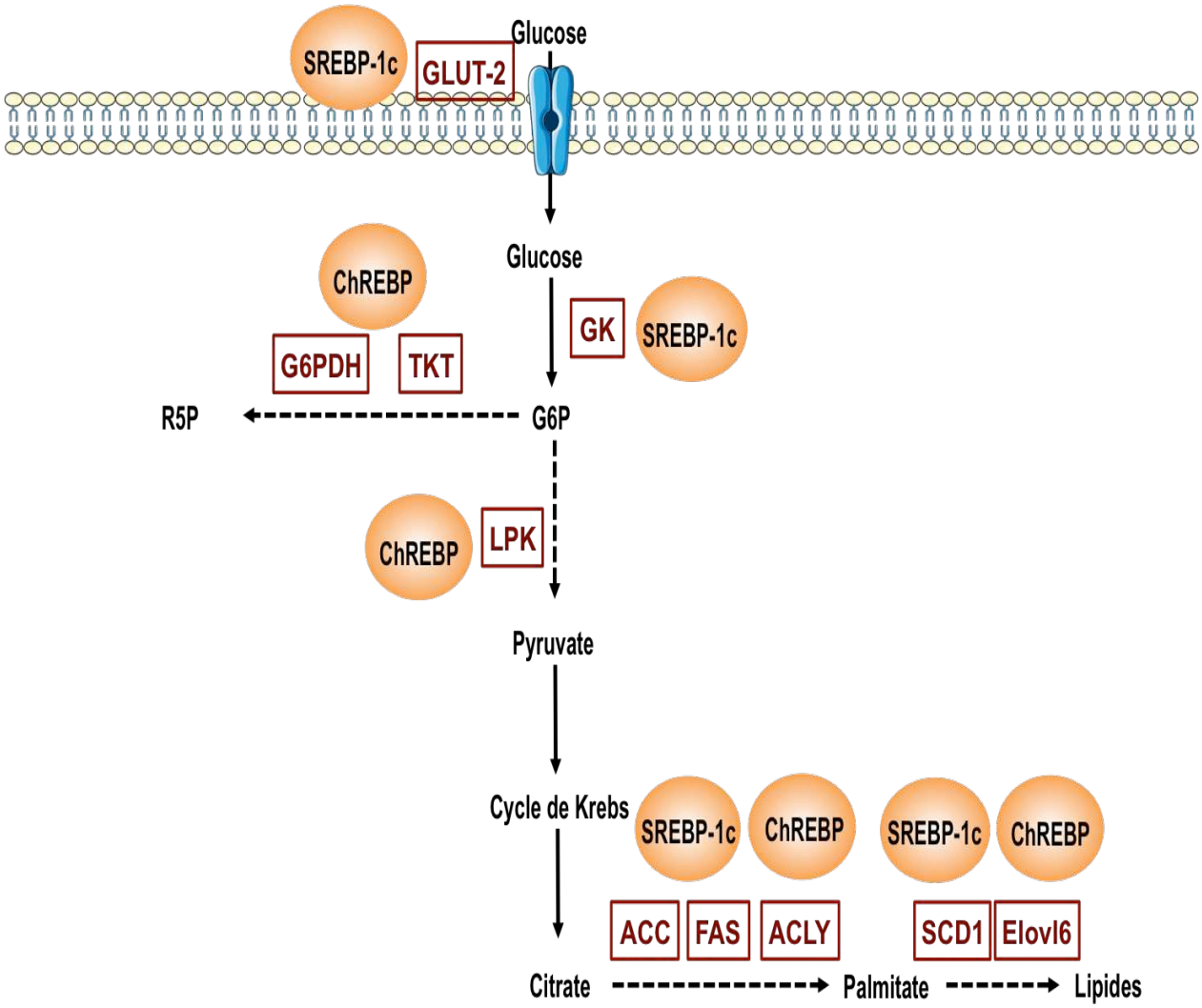


Figure 32: Régulation des voies de la glycolyse et de la lipogénèse par SREBP-1c et ChREBP dans le foie

Les enzymes de la glycolyse, de la voie des PPP et de la lipogenèse sont régulées dans le foie au niveau transcriptionnel par le glucose et l'insuline via les facteurs de transcription ChREBP et SREBP-1c. ***SREBP-1c****: Sterol Regulatory Element Binding protein 1c,* ***Glut2****: Glucose Transporter 2,* ***R5P****: Ribose 5-Phospate,* ***FAS****: FAtty Acid Synthase,* ***ACC****: Acétyl-CoA Carboxylase,* ***GK****: Glucokinase,* ***LPK****: Liver Pyruvate Kinase,* ***ACLY****: ATP Citrate Lyase,* ***SCD1****: Stéaroyl-CoA Désaturase,* ***ELOVL****: Elongase Very Long Chain 6,* ***TKT****: Transketolase,* ***G6P*** *: Glucose 6-Phosphate,* ***G6PDH****: Glucose 6-Phosphate Déshydrogénase*

II. Rôle physiologique de ChREBP et implication dans les mécanismes de carcinogenèse

1) Rôle de ChREBP dans le foie

1.1) Gènes cibles de ChREBP

Depuis sa découverte en 2001, l'analyse globale des sites de fixation de ChREBP sur la chromatique par ChIP-sequencing a permis de déterminer son implication dans la physiologie du foie. Il a été ainsi démontré que ChREBP travaille de concert avec le facteur de transcription SREBP-1c, qui lui est induit par la signalisation de l'insuline. Ces deux facteurs de transcription jouent un rôle synergique et crucial dans le maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique en régulant l'expression de gènes codant les enzymes clés de la glycolyse et de la lipogenèse comme GLUT2, la LPK, l'ACLY, l'ACC, la FAS ou SCD1 (Figure 32) (Kawaguchi et al., 2002; Yamashita et al., 2001 ; Ishii et al., 2004). Dans ce contexte, il a ainsi été démontré que l'invalidation de ChREBP dans le foie de souris C57Bl6/J entraîne une diminution de l'expression de ces gènes ayant pour conséquence fonctionnelle une diminution de la synthèse *de novo* des acides gras par la lipogenèse (Dentin et al., 2004; Ishii et al., 2004). Parmi les autres cibles hépatiques directes de ChREBP, on peut également citer le gène codant FGF21, une hépatokine contribuant à l'amélioration de la dyslipidémie et de l'hyperglycémie chez l'homme et la souris (Markan et al., 2014 ; Reitman, 2013 ; Iroz et al., 2017). ChREBP participe également au métabolisme du fructose en induisant l'expression de la fructokinase et de la cétohexokinase et à la voie des PPP en régulant l'expression des gènes de la G6PDH et de la TKT (Izuka et al., 2004 ; Izuka et Horikawa, 2008).

On sait également aujourd'hui que ChREBP peut jouer le rôle de répresseur transcriptionnel (Jeong et al., 2011). Dans l'hépatocyte, le recrutement de ChREBP sur le promoteur de la PEPCK inhibe son expression en réponse au glucose. Une autre cible intéressante, négativement régulée par ChREBP et impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique en réponse au jeûne est la lysine désacétylase SIRT1 (Sirtuin 1) (Noriega et al., 2011). Cependant, les mécanismes précis par lesquels ChREBP régule négativement l'expression de certains gènes restent encore inconnus à ce jour.

1.2) Rôle de ChREBP dans le métabolisme glucidique et lipidique

La compréhension des mécanismes d'action de ChREBP dans l'organisme et le foie a été rendue possible par le développement de souris invalidées de manière ubiquitaire ou tissu spécifique pour ChREBP. Dans ce contexte, sous régime standard, l'invalidation totale de ChREBP chez la souris (ChREBP-/-) conduit à une diminution de l'expression hépatique des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse. Les conséquences fonctionnelles de cette invalidation sont une accumulation locale de glycogène et une diminution de la synthèse et de la sécrétion d'acides gras libres par le foie dans la circulation plasmatique. Ces souris ChREBP-/-, lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en saccharose (70%), présentent également une hypothermie progressive, signe d'une intolérance au saccharose. De même, lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en amidon, les souris invalidées pour ChREBP présentent une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline modérée (Iizuka et al., 2004). Par ailleurs, le croisement de souris ChREBP-/- avec des souris génétiquement obèses ob/ob a montré que l'invalidation de ChREBP diminuait la synthèse des triglycérides hépatiques avec une normalisation des niveaux d'acides gras libres et triglycérides plasmatiques comparés aux souris ob/ob (Iizuka et al., 2006).

Dans un contexte physiopathologique, la dérégulation du métabolisme énergétique, liée aux pathologies de l'obésité et du diabète de type 2, peut conduire dans le foie à l'accumulation excessive de triglycérides et au développement d'une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (Birkenfeld & Shulman, 2014; Perry et al., 2014). La stéatose hépatique peut ainsi résulter de plusieurs altérations du métabolisme lipidique, à savoir : (1) une augmentation de l'absorption des acides gras et de leur estérification en triglycérides, (2) une augmentation de la lipogenèse et une altération de la β-oxydation des hépatocytes et, (3) une réduction de l'exportation des triglycérides (Birkenfeld & Shulman, 2014). Tandis que les niveaux hépatiques d'ARNm codant les isoformes de ChREBP-α et ChREBP-β sont faibles à jeun, ils sont significativement augmentés (en particulier pour l'isoforme ChREBP-β) lors de la réalimentation avec un régime riche en hydrates de carbone (Stamatikos et al., 2016). En conditions pathologiques, l'expression hépatique de ChREBP-β est considérablement augmentée dans le foie de patients obèses, et encore davantage chez les patients obèses diabétiques comparativement aux patients témoins minces (Eissing et al., 2013; Hurtado del Pozo et al., 2011). Par ailleurs, dans les biopsies de foie de patients présentant une stéatose hépatique, l'expression de *mlxipl* est positivement corrélée à celle de ses gènes cibles comme

la LPK ou la FAS (Kim et al., 2016). De manière intéressante, il a été montré que la surexpression de ChREBP dans le foie de souris induit le développement d'une stéatose hépatique via l'activation transcriptionnelle des gènes de la lipogenèse et de l'estérification des acides gras, sans que celle-ci soit cependant associée au développement d'une résistance à l'insuline (Benhamed et al., 2012). Cet effet protecteur de ChREBP s'expliquerait en effet par une modification de la nature des acides gras hépatiques avec une augmentation sélective des acides gras mono-insaturés (MUFA) aux dépens des acides saturés (SFA) (Benhamed et al., 2012). Des études récentes effectuées sur le foie de patients atteints de stéatose hépatique confirment l'augmentation du rapport MUFA/SFA, comme en témoigne l'augmentation de l'activité de la désaturase SCD-1 (Bricambert et al., 2018). Par ailleurs, la surexpression de ChREBP dans un modèle d'obésité induit par un régime hyperlipidique, exacerbe la stéatose hépatique mais améliore la sensibilité à l'insuline (Benhamed et al., 2012). Dans l'ensemble, ChREBP en contrôlant la qualité des acides gras synthétisés par le foie (enrichissement en MUFA) favorise le développement d'une stéatose hépatique bénigne associée à un maintien de la sensibilité à l'insuline hépatique.

2) Fonctions et régulation de ChREBP dans d'autres tissus

2.1) Implication de ChREBP dans le pancréas endocrine

ChREBP est également exprimé dans les cellules β du pancréas. Dans ces cellules, ChREBP est régulé de la même façon que dans le foie. Ainsi, son expression et sa translocation au noyau sont augmentées en réponse au glucose. ChREBP possède également des fonctions similaires vis à vis de la voie de la glycolyse et de la lipogenèse (da Silva Xavier et al., 2006; Wang et al., 2005a). En plus de ses fonctions dans le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique, ChREBP joue un rôle important dans la différentiation et la prolifération des cellules progénitrices de la lignée endocrine du pancréas. En effet, ChREBP est exprimé dans ces cellules embryonnaires progénitrices et son expression augmente avec leur différenciation (Soggia et al., 2012). Ainsi, l'inhibition de ChREBP conduit à une réduction de la différenciation des cellules β (Soggia et al., 2012). De plus, une autre étude a montré que l'invalidation de son expression dans les cellules β pancréatiques entraîne une inhibition de la prolifération de ces cellules qui est corrélée à une diminution de l'expression de gènes

impliqués dans le cycle cellulaire comme les cyclines Ccnd2, Ccna2 et Ccne1 (Metukuri et al., 2012).

En plus de son rôle dans la différenciation des cellules β, il a également été montré que ChREBP participe aux mécanismes de glucotoxicité dans le pancréas endocrine. Dans ce contexte, des études démontrent que la surexpression de ChREBP est suffisante pour favoriser le stress oxydant via l'activation de la transcription du gène txnip conduisant à l'apoptose des cellules β pancréatiques par les caspases 3/7 et la baisse de la production d'insuline (Poungvarin et al., 2012). En effet, TxNIP est une protéine qui exerce des effets pro-inflammatoires (Oslowski et al., 2013) en induisant l'apoptose des cellules β pancréatique induite par l'hyperglycémie et le stress oxydatif (Chen et al., 2008). De plus, il a également été montré que l'inhibition de ChREBP dans la lignée cellulaire β pancréatique MIN6 conduit à la diminution de l'accumulation des TG et à une amélioration de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (da Silva Xavier et al., 2006). D'un point de vue moléculaire, il a été démontré que la surexpression de ChREBP dans des îlots de Langherans conduit, en présence de faible concentration de glucose, à une diminution de l'expression des gènes de l'insuline (Ins1 et Ins2) ainsi que des facteurs de transcription PDX1, MafA, ARNT/HIF-1b qui sont directement impliqués dans la différenciation pancréatique et dans la production d'insuline (da Silva Xavier et al., 2010; Soggia et al., 2012). L'ensemble de ces données démontre donc pour le moment un rôle plutôt délétère de ChREBP sur la physiologie et la fonctionnalité de la cellule β, et en particulier dans l'inhibition de la sécrétion de l'insuline en présence de fortes concentrations de glucose (Noordeen et al., 2010; Poungvarin et al., 2012).

2.2) L'implication de ChREBP dans le tissu adipeux

La régulation de ChREBP dans le tissu adipeux est proche de celle que l'on retrouve dans le foie, c'est à dire que son activité est stimulée par le glucose qui est transporté dans l'adipocyte par l'isoforme GLUT4. Dans le tissu adipeux, ChREBP stimule la voie de la lipogenèse via l'induction de ses gènes cibles (Hurtado del Pozo et al., 2011). Herman et al ont pu montrer que l'expression de ChREBP et de ses gènes cibles est augmentée dans le tissu adipeux de souris surexprimant GLUT4 spécifiquement dans les adipocytes (Herman et al., 2012). De façon intéressante, ces souris, bien qu'obèses, présentent une meilleure tolérance au glucose et une meilleure sensibilité à l'insuline. De plus, l'invalidation de ChREBP dans ces mêmes souris surexprimant GLUT4 induit une diminution de la lipogénèse couplée à une diminution

de la sensibilité à l'insuline. En accord avec ces données, l'invalidation spécifique de ChREBP dans le tissu adipeux blanc s'accompagne d'une diminution de la lipogenèse *de novo* et des concentrations adipocytaires et circulantes de PAHSAs (palmitic acid esters of hydroxy stearic acids), un acide gras insulinosensibilisateur (Vijayakumar et al., 2017). Ces souris surexprimant GLUT4 et invalidées pour ChREBP dans le tissu adipeux développent une résistance à l'action de l'insuline associée à une inflammation adipocytaire (Vijayakumar et al., 2017). Les PAHSAs ont été rapportés comme exerçant des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose en stimulant la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques, en favorisant l'absorption du glucose dans les tissus périphériques et en diminuant la réponse inflammatoire (Yore et al., 2014).

En plus de son rôle dans l'homéostasie glucidique du tissu adipeux, ChREBP est également impliqué dans le processus de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. En effet, il a été montré que dans la lignée adipocytaire 3T3-L1 que les niveaux d'ARNm de ChREBP sont augmentés en réponse à de fortes concentrations de glucose (He et al., 2004). De plus, une autre étude a rapporté que l'expression de ChREBP était augmentée pendant la différenciation des pré-adipocytes chez l'Homme (Hurtado del Pozo et al., 2011). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que l'expression de ChREBP est diminuée dans le tissu adipeux abdominal et sous-cutané de patients obèses et résistants à l'insuline, démontrant son rôle potentiellement important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique du tissu adipeux au cours de l'obésité (Eissing et al., 2013).

3) Implication de ChREBP dans la tumorigenèse

Comme évoqué précédemment, la reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse est une caractéristique commune à tous les cancers. Ces cellules cancéreuses présentent le plus souvent une augmentation des flux de glucose à travers les voies de la glycolyse, de la synthèse *de novo* d'acides gras et de biosynthèse des nucléotidiques pour permettre la croissance et la prolifération des cellules tumorales. De manière intéressante et comme nous l'avons vu plus haut, ChREBP joue un rôle central dans la régulation de ces voies métaboliques indispensables aux cellules cancéreuses. C'est pourquoi il apparaît donc logique d'étudier son rôle dans la carcinogenèse.

Dans un premier temps l'étude de Tong et de ses collaborateurs ont pu montrer l'importance

de ChREBP dans la reprogrammation métabolique des lignées cellulaires hépatomateuses HepG2 et colorectales HT116 (Tong et al., 2009). En effet, cette étude montre que la suppression de ChREBP dans ces lignées conduit à un switch métabolique d'une glycolyse aérobie (effet Warburg) à une respiration mitochondriale, couplé à une lipogenèse et une synthèse nucléotidiques réduites. L'inhibition de CHREBP dans ces lignées est de plus associée à une diminution du potentiel prolifératif *in vitro* et de la tumorigènese *in vivo* dans un modèle de xénogreffe (Tong et al., 2009). Au niveau mécanistique, les auteurs suggèrent que l'inhibition de ChREBP stimule l'expression et l'activité du suppresseur de tumeur P53. Un peu plus tard, ces résultats ont été confirmés par l'étude de Chen et ses collaborateurs qui montrent également que l'inhibition de ChREBP dans ces deux lignées cellulaires cancéreuses réduit significativement la prolifération cellulaire induite par les produits de glycation avancée au cours du diabète, suggérant un rôle important de ChREBP dans la carcinogenèse chez les patients diabétiques (Chen et al., 2014). Plus récemment, Yu Lei et al. ont également pu confirmer ces résultats en montrant que l'inhibition de ChREBP dans plusieurs lignées de cancer colorectales (HT29, DLD1 et SW480) diminuait la prolifération de ces cellules en activant également P53 (Lei et al., 2020). En plus du cancer du foie et du colon, des résultats similaires ont également été rapportés dans le cancer de la prostate métastatique dans lequel il a été montré que CHREBP et la voie de signalisation PI3K/AKT jouaient un rôle dans les mécanismes de la prolifération cellulaire, la progression et l'agressivité du cancer de la prostate (Castration Resistant Prostate Cancer) *in vitro* et *in vivo* (Kaushik et al., 2016).

Dans le cadre du CHC, deux études ont récemment pu montrer un lien entre les niveaux d'expression de ChREBP et la carcinogénèse hépatique. Ainsi, Wang et al. ont pu montrer que ChREBP coopérait avec l'oncogène c-myc pour induire une reprogrammation métabolique favorisant la prolifération des hépatocytes cancéreux (Wang et al., 2018). L'importance de ChREBP dans la progression du CHC a été également confirmée par l'étude de Ribback et ses collaborateurs, dans laquelle l'invalidation de ChREBP dans un modèle murin de CHC induit par une activation constitutive de la voie de signalisation PI3K/AKT spécifiquement dans le foie, entraine un ralentissement significatif de la croissance et de la progression tumorale (Ribback et al., 2018). Chez l'homme, certaines études suggèrent également une implication de ChREBP dans les processus de carcinogenèse. Ainsi, plusieurs études montrent que l'expression de ChREBP est augmentée dans les CHC humains comparé à du tissu hépatique non tumoral (Wang et al., 2018). L'augmentation de l'expression de ChREBP a également été reportée dans des cancer du sein triple négatifs, avec une corrélation

claire entre l'expression de ChREBP et la progression maligne de ces cancers (Airley et al., 2014). Enfin, une dernière étude a pu montrer que l'expression de ChREBP est significativement augmentée dans des tumeurs de patients atteints du cancer du côlon par rapport aux tissus adjacents sains et que son expression est positivement corrélée à l'agressivité du cancer colorectal (Lei et al., 2020).

En résumé, ChREBP est un facteur de transcription sensible au glucose, dont les mécanismes précis d'activation sont encore mal connus. En condition physiologique, ChREBP joue un rôle central dans l'homéostasie énergétique de l'hépatocyte quiescent. Étant donné son rôle dans plusieurs voies favorisant la synthèse de composants importants pour les cellules cancéreuses, comme les lipides ou les nucléotides, le rôle de ChREBP dans les processus de la carcinogenèse est de plus en plus étudié, en particulier au niveau du foie où il est fortement exprimé. Cependant à ce jour, les mécanismes moléculaires reliant ce facteur de transcription aux étapes d'initiation et de développement du CHC ainsi que son rôle en tant que cible thérapeutique restent inconnus.

Résultats

Objectifs

Justificatif de travail

Le cancer primitif du foie est devenu une des tumeurs malignes humaines les plus courantes et les plus mortelles, ce qui en fait un enjeu de santé publique majeur. Parmi les différents cancers primitifs du foie, le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente plus de 80% de ces derniers. Alors que la résection chirurgicale et la transplantation hépatique sont des options efficaces dans le traitement du CHC à un stade précoce, les approches thérapeutiques à un stade avancé restent aujourd'hui très limitées. Le processus de transformation maligne vers le CHC est complexe et encore peu compris. Ainsi, l'identification des mécanismes moléculaires à l'origine des étapes d'initiation et de progression du CHC est impérative pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes pour mieux combattre cette maladie.

Comme nous l'avons développé dans la partie introductive de ce manuscrit, la reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse est une des caractéristiques communes à tous les cancers. Ce domaine d'étude du métabolisme du cancer est basé sur le principe que les activités métaboliques sont modifiées dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, et que ces altérations favorisent l'acquisition et le maintien de propriétés malignes de ces cellules. Plus précisément, les modifications de la bioénergétique des tumeurs, consistant en une augmentation de la glycolyse, du métabolisme des lipides, des acides aminés, de la glutamine et de l'activité mitochondriale, sont presque universellement détectées dans la plupart des types de cancer et souvent négativement corrélées au pronostic de survie. Dans ce contexte, les différences dans les caractéristiques bioénergétiques entre les cellules normales et cancéreuses pourraient entraîner une dépendance métabolique spécifique de ces cellules tumorales et nous permettre d'envisager la possibilité de cibler de manière sélective les voies métaboliques associées au développement du CHC. Dans l'ensemble, les questions clés qui motivent la recherche dans ce domaine sont consacrées à l'identification de candidats métaboliques dont l'inactivation pourrait inhiber la carcinogenèse hépatique tout en épargnant les cellules normales.

Dans ce contexte, il a été précédemment établi que le facteur de transcription sensible au glucose ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) joue un rôle central dans la régulation de multiples voies métaboliques dans les hépatocytes. En effet, comme vu précédemment, ChREBP a été décrit comme un médiateur majeur de l'action du glucose sur l'expression des gènes de la glycolyse (L-PK), de la voie des pentoses phosphates (G6PDH, TKT) et de la lipogenèse (ACC, FAS). De manière intéressante, comme évoqué plus haut, toutes ces voies jouent un rôle important dans le développement tumoral en fournissant aux cellules cancéreuses de la biomassse et de l'énergie. En conséquence, ChREBP pourrait représenter dans les cellules malignes, un nouveau fournisseur des substrats nécessaires à la génération de cette biomasse, en redirigeant une fraction significative des carbones du glucose et/ou de la glutamine vers la lipogenèse et la biosynthèse des nucléotides.
Cependant, à ce jour, l'implication directe de ChREBP dans l'initiation et la progression du CHC reste mal définie. De façon globale, l'objectif de ce travail de thèse aura été de déterminer:

1. Si ChREBP pouvait initier le développement tumoral et s'il pouvait participer à la croissance de la tumeur.
2. Les mécanismes moléculaires par lesquels ChREBP est impliqué dans l'initiation et / ou la progression des tumeurs.
3. Si l'expression et / ou l'activité de ChREBP était positivement ou négativement corrélée à la carcinogenèse du CHC chez l'homme et si son inhibition pharmacologique pouvait ainsi représenter une stratégie thérapeutique potentiellement intéressante pour améliorer la résistance aux traitements systémiques existants pour le CHC.

Résumé des résultats obtenus

NB : Les figures citées dans cette section des résultats font référence aux figures de l'article actuellement en révision.

Chez l'homme, l'expression de ChREBP ainsi que celle de ses gènes cibles sont augmentées dans le CHC et sont associées à des tumeurs agressives de mauvais pronostic. Chez l'homme, la pertinence clinique de ChREBP au cours de la carcinogenèse hépatique a été évaluée en utilisant 8 bases de données publiquement disponibles de transcriptomes de CHC humains (Tableau S1). Ainsi, par rapport aux tissus adjacents correspondants, l'expression de ChREBP ainsi que l'expression de ses gènes cibles, comme la LPK, la FAS ou l'ACC, est augmentée dans ces 8 cohortes de CHC humains (Figure 1a). Renforçant ces résultats, l'analyse par Western Blot, effectuée à partir de 12 échantillons provenant de CHC humain (T) ainsi que de leurs tissus adjacents respectifs non tumoraux (N), a démontré que l'expression de ChREBP, au niveau protéique, est également significativement augmentée dans les tumeurs humaines (Figure 1b). L'analyse bio-informatique de ces bases de données a de plus démontré que l'expression de ChREBP dans ces tumeurs est positivement corrélée avec l'expression de gènes préalablement validés pour leur association avec des CHC de mauvais pronostic (Figure 1c) (Hoshida et al., 2008). De manière intéressante, en se basant sur les données cliniques et biologiques disponibles pour ces cohortes, les tumeurs se développant sur une étiologie de NAFLD et de NASH sont celles qui expriment les niveaux les plus élevés de ChREBP, et sont celles associées à des CHC de mauvais pronostics (Figure 1c). Ces résultats ont également été confirmés en évaluant la relation entre l'expression de ChREBP et les données clinico-biologiques de patients dans deux larges cohortes de CHC indépendantes, à savoir la LIHC et la LICA-FR, disponibles sur la base de données Oncomine (Tableau S2). Comme décrit précédemment pour les 8 autres cohortes, les cohortes LIHC et LICA-FR expriment des niveaux élevés de ChREBP dans les tumeurs (Figure 1d). Plus important encore, l'expression de ChREBP est significativement plus élevée dans les échantillons de CHC de mauvais pronostic (Figure 1e). En conséquence, une augmentation de l'expression de ChREBP dans ces tumeurs est associée à un pourcentage de survie plus faible des patients dans les cohortes LIHC et LICA-FR sur 5 ans (Figure 1f). En résumé, ces données démontrent pour la première fois que l'expression de ChREBP est

positivement associée aux CHC de mauvais pronostic chez l'homme.

La surexpression stable et spécifique de ChREBP dans le foie induit l'initiation et le développement du CHC. Afin d'étudier son rôle oncogénique, ChREBP a d'abord été surexprimé pendant 3 semaines spécifiquement dans le foie de souris C57BL6/J par stratégie adénovirale (Pei et al., 2020). En conséquence, la surexpression de ChREBP a permis comme attendu le développement d'une stéatose hépatique, caractérisée par une augmentation du poids et de la taille du foie (Figure 2a). Cette hypertrophie hépatique est associée à une hyperprolifération des hépatocytes, comme le montre l'augmentation du nombre d'hépatocytes positifs au BrdU, et l'augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire en comparaison des souris surexprimant la GFP (Figures 2b et c). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation à court terme de l'activité de ChREBP est suffisante pour favoriser l'apparition de foyers prolifératifs pré-tumoraux dans le foie. Par conséquent, pour étudier plus en détail sa contribution à l'initiation et / ou à la progression de l'hépatocarcinogenèse, ChREBP a été surexprimé de manière stable dans le foie de souris FVB/N par la technique non virale de transfert de gène par transposon appelée « Sleeping Beauty » (SB) (Figure supplémentaire 1a) (Kebriaei et al., 2017). Cette technique permet d'intégrer de manière stable une forme active de ChREBP dans 3 à 4% des hépatocytes du foie, mimant ainsi l'apparition de foyers néoplasiques. Pour suivre la prolifération des hépatocytes et le développement de la tumeur de manière longitudinale, la luciférase a été également surexprimée de manière stable, seule (vecteur vide) ou avec ChREBP. Alors que la surexpression du vecteur vide n'induit pas de changements dans l'activité de la luciférase au cours du temps (Figure 2d), la surexpression stable de ChREBP conduit à l'inverse à une augmentation progressive et continue de l'activité bioluminescente, suggérant ainsi un taux élevé de prolifération hépatocytaire (Figure 2d). En conséquence, ChREBP induit, chez 100% des souris traitées, l'initiation et le développement de petits adénomes qui progressent progressivement vers un CHC entre 6 et 12 mois (Figure 2e). Ces tumeurs sont riches en lipides, ce qui est en accord avec le rôle de ChREBP dans la régulation de la synthèse des lipides par la voie de la lipogenèse (Figure 2f). Ces CHC sont hyperprolifératifs comme en témoigne l'augmentation du nombre d'hépatocytes positifs au Ki67 (Figure 2g) et l'augmentation de l'expression de protéines spécifiques du cycle cellulaire (Figures 2h). De manière générale, ces résultats fournissent pour la première fois la preuve que ChREBP constitue un nouvel oncogène clé dans les étapes d'initiation et de développement du CHC.

Les tumeurs induites par ChREBP sont associées à des sous-classes de CHC de mauvais

pronostic. Pour identifier les événements précoces par lesquels l'augmentation de l'activité de ChREBP favorise le développement du CHC, une analyse bioinformatique croisée des données de transcriptome des foies surexprimant ChREBP pendant 3 semaines (modèle pré-tumoral) ou des tumeurs induites par ChREBP (modèle tumoral) a été réalisée. Cette analyse a permis l'identification d'une signature spécifique commune à ces deux modèles comportant 324 gènes qui pourrait expliquer le rôle oncogénique primaire de ChREBP dans le foie (Figure supplémentaire 1d). Ces gènes sont spécifiquement impliqués dans la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, la division cellulaire ou les processus métaboliques (Figure 2i et Figure supplémentaire 1e). Dans ce contexte, une analyse par GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) montre que les tumeurs surexprimant ChREBP sont associées aux sous-classes de CHC humains G1, G2 et G3, prolifératifs, invasifs et de mauvais pronostic (Figure 2j). Ainsi, l'expression de gènes associés à des CHC de mauvais pronostic chez l'homme, comme l'*afp*, *hk2*, *tff3*, *cenpf* ou *ly6d*, est augmentée de manière significative dans toutes les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure supplémentaire 1f). Dans leur ensemble, nos résultats démontrent pour la première fois que ChREBP agit comme un oncogène favorisant l'initiation et le développement du CHC. De plus, les profils génétiques de ces tumeurs sont associés aux sous-classes de CHC prolifératifs et de mauvais pronostic chez l'homme.

La voie de signalisation PI3K/AKT est responsable des effets pro-prolifératifs de ChREBP dans un mécanisme dépendant de la sous-unité régulatrice p85α de la PI3K. L'analyse bio-informatique des transcriptomes des foies surexprimant ChREBP pendant 3 semaines (modèle pré-tumoral) ou des tumeurs induites par ChREBP (modèle tumoral) a identifié la signalisation pro-oncogénique PI3K/AKT comme l'une des voies de signalisation les plus affectées dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure supplémentaire 2a et Tableau S7). D'un point de vue fonctionnel, l'analyse par Western blot et par marquage en immunohistochimie ont validé que la surexpression de ChREBP, dans ces deux modèles, stimulait de manière significative la signalisation PI3K/AKT, comme le montre l'augmentation de la phosphorylation d'AKT, de la GSK3β ou de la P70S6K (Figure 3a et Figures supplémentaires 2b et c). Par la suite, de manière à déterminer le rôle de la voie de signalisation PI3K/AKT dans les effets pro-prolifératifs de ChREBP, nous avons choisi d'inhiber l'activité de cette voie de signalisation dans notre modèle pré-tumoral en utilisant un inhibiteur sélectif de la PI3K qui est la Wortmannine. Dans ce contexte, la GFP ou ChREBP ont été surexprimés dans le foie de souris C57BL6/J par une approche adénovirale. Une semaine après l'infection, les souris surexprimant la GFP ou ChREBP, ont été traitées

quotidiennement, par injection intrapéritonéale, avec du DMSO (diméthyl sulfoxide) ou de la Wortmaninne à raison de 0.25 mg/kg/jour, pendant deux semaines. Comme nous l'avons décrit précédemment, la surexpression de ChREBP dans le foie de souris C57BL6/J stimule la prolifération hépatocytaire en comparaison des souris surexprimant la GFP. Cette prolifération est caractérisée par l'augmentation de l'expression de gènes du cycle cellulaire (Figure 3b et c et Figure supplémentaire 2d), ainsi que du pourcentage de noyaux positifs au BrdU (Figure 3c). Cette hyperprolifération des cellules hépatiques est corrélée à l'augmentation de la voie de signalisation PI3K/AKT dans le foie des souris surexprimant ChREBP (Figure 3 a et b). A l'inverse, les effets pro-prolifératifs de ChREBP sont totalement abolis lorsque la signalisation PI3K/AKT est inhibée par le traitement à la Wortmannine (Figure 3b et c et Figure supplémentaire 2d). De la même façon, ces résultats ont été validés *in vitro* dans deux lignées hépatomateuses transformées (HepG2 et Huh7) surexprimant ChREBP de manière stable. Ainsi, la surexpression stable de ChREBP dans ces deux lignées augmente la prolifération cellulaire par rapport aux cellules parentales. De plus, cette augmentation de la prolifération est également associée à la stimulation de la voie de signalisation PI3K/AKT (Figures 3d-f et Figures supplémentaires 2e-g). De la même manière qu'observée *in vivo*, le traitement à la Wortmannine inhibe en revanche de manière significative les effets pro-prolifératifs de ChREBP, renforçant l'importance de la voie de signalisation PI3K/AKT dans ses effets oncogéniques (Figures 3d-f et Figures supplémentaires 2e-g).

Par la suite nous avons souhaité identifier par une approche de ChIP-sequencing de nouveaux gènes cibles de ChREBP, impliqués dans le contrôle direct de la voie de signalisation PI3K/AKT. Cette approche a été réalisée dans des cultures primaires d'hépatocytes de souris cultivés 24h en présence de 25 mM glucose et 100 nM d'insuline, condition de culture optimale permettant le recrutement de ChREBP sur le promoteur de ses gènes cibles. Cette approche expérimentale a conduit à l'identification de 18746 sites de liaison de ChREBP sur le génome, dont environ 25% se trouvent dans les régions promotrices proximales ou distales des gènes cibles de ChREBP (Figure supplémentaire 2h). De plus, parmi ces promoteurs candidats, 1367 sont H3K4me3 et ARN-polII positifs, suggérant que ces promoteurs sont transcriptionnellement actifs (Figure supplémentaire 2j). Dans ce contexte, parmi les modulateurs directs de la signalisation PI3K/AKT précédemment décrits pour jouer un rôle important dans le développement du cancer (Bauer et al., 2015), seul le gènes *pik3r1*, qui code pour la sous-unité régulatrice p85α de la PI3K (figure 3g), a été identifié comme un gène

cible de ChREBP (Figure 3h). Par la suite, nous avons confirmé que ChREBP est recruté sur le promoteur du gène *pik3r1* en réponse à des concentrations élevées de glucose (25 mM glucose) dans des hépatocytes en culture primaire (Figure supplémentaire 2m). Ce recrutement de ChREBP sur le promoteur de *pik3r1* est bien corrélé à l'augmentation des niveaux protéiques de p85α en réponse au glucose. De plus, cet effet est bien dépendant de ChREBP puisque cette induction de l'expression de p85α est inhibée dans des hépatocytes primaires invalidés pour ChREBP (Figure supplémentaire 2n). Renforçant l'hypothèse d'un rôle direct de ChREBP dans le contrôle de la transcription du gène *pik3r1*, la surexpression transitoire de ChREBP (WT ChREBP) dans des cellules HEK293 a pour conséquence d'augmenter l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur couplé au promoteur de *pik3r1* alors que cet effet est aboli lorsqu'un dominant négative de ChREBP (DN ChREBP) est co-surexprimé (Figure 3i). En accord avec ces résultats, le recrutement de ChREBP au niveau du promoteur de *pik3r1* est augmenté dans nos tumeurs surexprimant ChREBP en comparaison du tissu adjacent non tumoral (Figure 3j). La conséquence fonctionnelle de cette régulation transcriptionnelle est une augmentation de l'expression de p85α dans ces tumeurs (Figure 3k). L'expression de P85α est également significativement augmentée dans notre modèle pré-tumoral lorsque ChREBP est surexprimé pendant 3 semaines dans le foie de souris C57BL6/J (Figure supplémentaire 2o).

Finalement, de manière à démontrer l'importance du contrôle de P85α par ChREBP dans ses effets pro-prolifératifs, nous avons choisi d'inhiber l'expression de P85α dans nos modèles cellulaires *in vitro* et notre modèle de prolifération hépatocytaire *in vivo*. Dans un premier temps, l'invalidation stable de *pik3r1,* par une approche de CRISPR/Cas9, dans nos cellules Huh7 surexprimant ChREBP, a pour effet de bloquer l'augmentation de la signalisation PI3K/AKT induite par ChREBP (Figures 3l-n et Figure supplémentaire 2p). La conséquence fonctionnelle est que la surexpression de ChREBP est incapable de stimuler la prolifération cellulaire en comparaison des cellules parentales (Figures 3l-n et Figure supplémentaire 2p). Supportant cette observation, l'inhibition de p85α a également pour effet d'inhiber la prolifération hépatocytaire lorsque ChREBP est surexprimée pendant 3 semaines dans le foie de souris C57BL6/J *in vivo* (Figures 3o et p et Figure supplémentaire 2q). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que la régulation de l'expression de p85α par ChREBP entraîne le développement et/ou la progression du CHC au moins en partie par l'induction de la signalisation PI3K/AKT.

ChREBP favorise la synthèse *de novo* d'acides gras mono-insaturés pour soutenir la croissance tumorale. L'analyse ontologique réalisée sur l'ensemble nos données de transcriptomes et de ChIP-seq, indique également que l'augmentation de l'activité transactivatrice de ChREBP affecte l'expression de gènes impliqués la régulation du métabolisme énergétique comme ceux de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates, de la synthèse des lipides, du métabolisme de la glutamine et de la synthèse de pyrimidine (Figure 4a et Figure supplémentaire 2l). Tout d'abord, nous avons mesuré l'absorption du glucose *in vivo* grâce à une méthode originale basée sur la bioluminescence (Maric et al., 2019). Cette méthode consiste à injecter une sonde contenant la luciférine, la CLP (Caged Luciferin Triarylphosphine) et qui va réagir avec un analogue du glucose modifié, le Gaz4 (Glucose Azido-modified), ce qui va avoir pour effet de libérer la luciférine. De manière intéressante, nous avons observé que le captage du glucose est significativement augmentée dans le foie des souris surexprimant ChREBP (Figure 4b), celui-ci étant corrélée à l'augmentation de l'expression de ses transporteurs *slc2a2* (GLUT2) et *slc2a3* (GLUT3) (Figure supplémentaire 3a). Nos résultats démontrent également que l'expression d'enzymes catalysant des étapes limitantes de la glycolyse comme *hk2*, *gpi*, *pfk*, *aldoa* ou *pkm2* est augmentée dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure 4c et Figure supplémentaire 3a). Cependant, malgré l'augmentation de l'absorption du glucose et de l'activation de son catabolisme, la concentration de tous les intermédiaires de la glycolyse, déterminée par une analyse en spectrométrie de masse, est réduite dans ces tumeurs (Figure 4d). Ces résultats suggèrent que ces différents substrats de la glycolyse sont rapidement consommés en réponse à la surexpression de ChREBP. Dans ce contexte, de manière à déterminer le devenir intracellulaire de ce glucose, nous avons par la suite réalisé des analyses de flux métabolique à partir d'explants de CHC surexprimant ChREBP et en utilisant comme substrat du glucose uniformément marqué au carbone 14 (U-glucose ^{14}C). Nos résultats montrent que l'oxydation du glucose est diminuée dans la tumeur en comparaison du tissu adjacent non tumoral (Figure supplémentaire 3b), malgré une augmentation de l'expression et de l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de la pyruvate carboxylase (PC) dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figures supplémentaires 3c et 3d). Cependant, comme pour le U-glucose ^{14}C, l'oxydation du pyruvate $^{14}C_2$ est diminuée (Figure supplémentaire 3b). Ces résultats démontrent que les capacités d'entrée du pyruvate dans la mitochondrie sont augmentées dans les tumeurs surexprimant ChREBP et que celui-ci n'est pas orienté vers les OXPHOS. Cela nous a conduit à émettre l'hypothèse que le métabolisme du glucose est réorienté pour alimenter des voies anaboliques spécifiques nécessaires à la prolifération cellulaire.

Soutenant cette hypothèse de travail, les carbones du U-glucose ^{14}C sont redirigés vers la synthèse *de novo* de lipides par la voie de la lipogenèse (Figure 4e). D'un point de vue moléculaire, le contrôle exercé par ChREBP sur cette voie métabolique est direct, ChREBP étant recruté fonctionnellement sur le promoteur des gènes de la lipogenèse tels que l'ACC, la FAS ou la SCD1 (Figure 4f et Figure supplémentaire 3e), afin d'augmenter leur expression dans les tumeurs (Figure 4g et Figure supplémentaire 3a). De manière intéressante, les tumeurs surexprimant ChREBP présentent également des profils lipidiques distincts par rapport au tissu adjacent non tumoral (Figure supplémentaire 4). Une analyse lipidomique globale a en effet démontré que les tumeurs surexprimant ChREBP présentent une augmentation significative du contenu en acides gras monoinsaturés dans les triglycérides et dans toutes les espèces de phospholipides (Figures supplémentaires 4a-f). Ces niveaux de MUFA sont positivement corrélés avec l'expression des gènes de la lipogenèse, et plus particulièrement de la SCD1, et avec les niveaux de métabolites impliqués dans la synthèse des PL tels que la CDP-choline (Figure supplémentaire 4f). Nos données suggèrent ainsi que la prolifération des hépatocytes cancéreux surexprimant ChREBP est liée à une augmentation de la lipogenèse *de novo* et à une augmentation de la désaturation des acides gras médiée par la SCD1. Cela a pour résultat net d'augmenter le pool de MUFA en particulier dans les PL, ce qui a été décrit comme un événement courant dans le développement du CHC en participant à la diversité des lipides membranaires (Muir et al., 2013). En accord avec ces résultats, dans les lignées hépatomateuses humaines SNU-449 et SNU-475, surexprimant ChREBP de manière stable par CRISPR/Cas9, l'utilisation d'un inhibiteur de la FAS, l'orlistat à 20µM, abolit les effets pro-prolifératifs de ChREBP (Figure supplémentaire 3f). Dans ce contexte, la supplémentation en oléate à hauteur de 400 µM dans le milieu de culture permet de rétablir les effets pro-prolifératifs de ChREBP dans ces cellules en présence d'orlistat (Figures 4i et j et Figures supplémentaires 3g et h). L'ensemble de ces résultats démontre le rôle important de la lipogenèse et des MUFA dans les effets pro-prolifératifs de ChREBP.

La réorientation du métabolisme du glucose vers la voie des PPP contribue également aux effets pro-prolifératifs de ChREBP. En plus de servir de précurseur pour la synthèse des lipides, nous avons observé que le glucose marqué au ^{14}C est également redirigé vers la synthèse *de novo* de nucléotides dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure 4k). Confirmant cette observation, l'analyse par ChIP-sequencing a révélé que ChREBP est recruté fonctionnellement sur le promoteur de la G6PDH, PGD, TKT et RPIA (Figure supplémentaire

3i). Ainsi, le recrutement de ChREBP sur les promoteurs des gènes de la voie des PPP est augmenté dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure 4l). En conséquence, l'expression de ces gènes est augmentée dans les tumeurs favorisant la réorientation des carbones du glucose à travers la voie des PPP et de la voie de biosynthèse des nucléotides (Figure 4m et Figure supplémentaire 3a). Pour déterminer la contribution de la voie des PPP dans les effets pro-prolifératifs de ChREBP, nous avons également traité les lignées hépatomateuses SNU449 et SNU475 surexprimant ChREBP avec un inhibiteur compétitif de la G6PDH, le 6-Aminonicotinamide (6-AN), à une concentration de 50µM. Le traitement au 6-AN inhibe significativement les effets pro-prolifératifs de ChREBP (Figures 4n et o et Figures supplémentaires 3j et k). Cependant, de manière intéressante, la supplémentation en dNTP (100 mM de chaque dNTP) dans le milieu de culture permet de rétablir les effets pro-prolifératifs de ChREBP en présence de 6-AN, démontrant ainsi l'importance de la voie des PPP et de la synthèse de nucléotides dans ses effets pro-prolifératifs (Figure 4o et Figure supplémentaire 3k).

Finalement, chez l'homme, l'importance de ChREBP dans la réorientation métabolique du glucose a été confirmée en étudiant l'expression de gènes du métabolisme du glucose dans les 8 cohortes de CHC humains présentées plus haut (Tableau S1). Dans ces cohortes, un total de 286 gènes, intervenant dans des processus tels que la glycolyse, la voie des PPP, la synthèse de nucléotides et le métabolisme des lipides sont surexprimés dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus adjacents non tumoraux (Tableau S9). Par conséquent, l'ensemble de ces données renforce le rôle de ChREBP dans le re-routage des carbones du glucose à travers les voies de la glycolyse, des PPP et de la lipogenèse dans le contexte de la carcinogenèse hépatique humaine (Figure 4p).

ChREBP favorise également la croissance tumorale en redirigeant le métabolisme de la glutamine vers la production d'aspartate. Notre analyse ontologique des gènes exprimés de manière différentielle dans les tumeurs surexprimant ChREBP a également révélé que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme de la glutamine sont affectés par rapport aux tissus adjacents non tumoraux (Figure 4a). Ces observations suggèrent que ChREBP pourrait avoir un rôle dans la régulation du métabolisme de la glutamine, rôle non documenté à ce jour. Dans ce contexte, l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la glutamine tels que Scl1a5, Gls1 et GOT2 est en effet augmentée dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure 5a et Figure supplémentaire 5a). De plus, la concentration

d'intermédiaires clés du métabolisme de la glutamine, comme la N-acétylglutamine, le N-acétylglutamate ou l'aspartate est également augmentée (Figure supplémentaire 5b). Nous avons également observé que les lignées cellulaires SNU-449 et SNU-475 surexprimant ChREBP sont sensibles à la privation en glutamine et à l'inhibition de la GLS par la 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), ces deux traitements réduisant les effets pro-prolifératifs de ChREBP (Figure 5b et Figure supplémentaire 5c). De manière intéressante, la supplémentation en glutamate dans le milieu de culture permet de restaurer l'effet de ChREBP sur la prolifération cellulaire dans les deux conditions, démontant ainsi l'importance de la conversion de la glutamine en glutamate dans ses effets pro-prolifératifs. Comme nous l'avons expliqué dans la partie introductive de ce manuscrit, le glutamate peut ensuite être converti dans les cellules cancéreuses en α-cétoglutarate (α-KG) pour alimenter le cycle de Krebs à travers 3 réactions différentes: soit par la glutamate déshydrogénase (GLUD1), la glutamate-pyruvate transaminase 2 (GPT2) ou la glutamate-oxaloacétate transaminase 2 (GOT2) (Figure supplémentaire 5d). Malgré le fait que de nombreuses cellules cancéreuses dépendent de la déamination du glutamate par GLUD1 pour alimenter le cycle de Krebs, l'EGCG (gallate d'épigallocatéchine), un inhibiteur de GLUD1, utilisé à la concentration de 30μM, n'a aucun effet sur les effets pro-prolifératifs de ChREBP dans les lignées SNU-449 et SNU-475 (Figure 5c et Figure supplémentaire 5e). De plus, le diméthyl α-KG, une forme perméable aux cellules de l'α-KG, ne permet pas de restaurer la croissance cellulaire lors de la privation en glutamine (Figure 5c et Figure supplémentaire 5e). Confirmant cette observation que la conversion du glutamate en α-KG n'est pas responsable des effets pro-prolifératifs ChREBP, l'oxydation complète de la glutamine à travers le cycle de Krebs est réduite et la lipogenèse *de novo* réalisée à partir de la glutamine n'est pas affectée dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figures supplémentaires 5f et g). De manière générale, ces données démontrent que les cellules hépatiques cancéreuses surexprimant ChREBP utilisent la glutamine d'une manière différente des modèles classiquement décrits et que les différentes transaminases impliquées dans le métabolisme de la glutamine pourraient jouer un rôle critique dans ce processus. Pour confirmer cette hypothèse de travail, les cellules SNU-449 et SNU-475 surexprimant ChREBP ont été traitées avec 0,5 mM d'aminooxyacétate (AOA), un inhibiteur non spécifique des transaminases. Dans ce contexte, le traitement par l'AOA permet d'inhiber de manière significative la croissance des cellules surexprimant ChREBP (Figure 5d et Figure supplémentaire 5h). De plus, seule la supplémentation en aspartate (5mM), mais pas en alanine (5mM), qui sont respectivement les produits des enzymes GOT2 et GPT, a permis de rétablir les effets pro-prolifératifs de ChREBP (Figure 5d et Figure

supplémentaire 5h). Au niveau moléculaire, notre analyse par ChIP-sequencing des sites de fixation de ChREBP sur la chromatine a révélé que ChREBP est recruté fonctionnellement sur le promoteur de la GLS1 et de GOT2 (Figure supplémentaire 5i). Ces résultats ont été validés par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) qui montrent que le recrutement de ChREBP sur ces deux promoteurs est augmenté dans les tumeurs surexprimant ChREBP par rapport au tissu adjacent non tumoral (Figure 5e). En conséquence, l'expression de la GSL1 et de GOT2 est augmentée dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure 5a et Figure supplémentaire 5a). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que ChREBP, en régulant directement l'expression de la GLS1 et de GOT2, redirige le flux des carbones de la glutamine vers la production d'aspartate afin de soutenir la prolifération des cellules cancéreuses (Figure 5f).

La réoriontation des flux de carbones de la glutamine vers la synthèse d'aspartate permet d'alimenter la synthèse *de novo* pyrimidine. Comme décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, la glutamine fournit non seulement des sources de carbone pour le cycle de Krebs, mais également pour soutenir d'autres processus anaboliques. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que la conversion du glutamate en aspartate par GOT2 pouvait participer à la synthèse des nucléotides grâce à la voie de biosynthèse de pyrimidine ; l'aspartate jouant le rôle de donneur de carbone dans ce processus (Figure supplémentaire 5j). Renforçant notre hypothèse de travail, l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse *de novo* de pyrimidines telles que PRPS2, l'UMPS ou CTPS1, est augmentée en réponse à la surexpression de ChREBP (Figures 5g et h). De plus, au niveau moléculaire, nos résultats montrent pour la première fois que ChREBP est fonctionnellement recruté sur le promoteur de l'UMPS et de CPTS1 pour induire leur expression dans les tumeurs (Figure 5i et Figure supplémentaire S5k). En conséquence, la concentration des intermédiaires clés de la synthèse des pyrimidines est augmentée dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure supplémentaire 5l). De plus, la synthèse *de novo* de nucléotides à partir de glutamine ou d'aspartate uniformément marqués au ^{14}C est augmentée dans ces tumeurs, renforçant le rôle de la glutamine dans la production de nucléotides en réponse à une augmentation de l'activité de ChREBP dans le CHC (Figure 5j). En accord avec ces résultats, les pools de pyrimidine dCTP et dTTP, mesurés par HPLC, sont également augmentés dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure supplémentaire 5m). L'importance de la synthèse des pyrimidines dans les effets pro-prolifératifs de ChREBP est renforcée par le fait qu'une supplémentation en dNTP (100mM) permet de restaurer les effets pro-prolifératifs de ChREBP lors d'un traitement par

l'AOA (0,5 mM) (Figure 5k et Figure supplémentaire 5n). Finalement, nous avons pu démontrer que l'expression des gènes cibles de ChREBP nouvellement identifiés (GLS1, GOT2, UMPS et CTPS1) est également augmentée dans les 8 cohortes de CHC humains utilisés dans cette étude (Tableau S9). De manière générale, ces données montrent que l'altération du métabolisme de la glutamine et de la synthèse de pyrimidine est également présente dans les cohortes humaines de CHC pour lesquelles l'activité transactivatrice de ChREBP est augmentée (Figure 5l).

ChREBP représente une cible thérapeutique de choix dans le traitement du CHC. Dans l'ensemble, nos données démontrent que l'action oncogénique de ChREBP se fait via l'induction de la voie de signalisation PI3K/AKT et via la réorientation du métabolisme du glucose et de la glutamine vers des voies anaboliques, afin de soutenir cette croissance. Ce rôle, au carrefour de la régulation des voies de signalisation oncogéniques et de la reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse, en fait une cible de choix pour le développement de nouvelle stratégie thérapeutique au CHC. Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord déterminé s'il existait, chez l'homme, une corrélation entre les niveaux d'expression de ChREBP dans le CHC et la dérégulation des voies de la glycolyse, des PPP, de la lipogenèse, de la glutaminolyse, de la synthèse de pyrimidine ainsi que de la voie de signalisation PI3K/AKT. Pour se faire, nous avons utilisé la cohorte TCGA-LIHC pour laquelle les données de séquençage du génome sont disponibles. Les altérations de ces voies ont été définies par les altérations génétiques (événements d'activation ou d'inactivation) des intermédiaires qui composent ces voies. Si un ou plusieurs gènes de ces voies contient une altération récurrente ou connue, la tumeur du patient est considérée comme altérée pour ces voies. Notre analyse bio-informatique démontre ainsi que les altérations des voies de la glycolyse, des PPP, de la lipogenèse, de la glutaminolyse, de la synthèse de pyrimidine ainsi que de la voie de signalisation PI3K/AKT sont fréquemment retrouvées dans le CHC chez l'homme. De plus, de manière intéressante, ces altérations se retrouvent principalement dans les tumeurs où l'expression de ChREBP est augmentée (Figure 6a). Ces résultats suggèrent donc pour la première fois que le ciblage thérapeutique de ChREBP est en effet pertinent chez l'humain dans une indication de traitement du CHC. Pour tester cette hypothèse, l'expression de ChREBP a d'abord été inhibée de manière stable dans les lignées hépatomateuses humaines SNU-475, Huh7 et BNL CL.2. Pour ces 3 lignées cellulaires, l'inhibition de ChREBP réduit significativement la prolifération cellulaire *in vitro* et inhibe également la croissance de xénogreffes *in vivo* (Figures 6b-e et Figures supplémentaires 6a-h). De manière

intéressante, l'inhibition de l'expression de ChREBP dans les cellules Huh7, déficientes pour le suppresseur de tumeur PTEN, entraîne également la réduction de la prolifération cellulaire et du développement des xénogreffes malgré l'induction constitutive de la voie de signalisation PI3K/AKT (Figures supplémentaires 6i-k). Ces résultats mettent en évidence le bénéfice thérapeutique de cibler ChREBP dans le traitement du CHC lorsque ces voies oncogéniques sont modifiées. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons également surexprimé une forme constitutivement active d'AKT1 (myr-AKT1) de manière stable dans le foie de souris de sauvage (WT) ou invalidées pour ChREBP spécifiquement dans l'hépatocyte (hKO-ChREBP), en utilisant le système de transposition par sleeping beauty (SB). Chez les souris sauvages, la surexpression de myr-AKT1 est suffisante pour induire dans 100% des cas le développement d'un CHC entre 3 et 6 mois (Figures 6f et g). Cependant, de manière spectaculaire, aucun développement de tumeur n'a été observé chez les souris hKO-ChREBP à 3 mois et seules des lésions pré-néoplasiques dispersées ont été détectées à 6 mois (Figures 6f et g). Finalement, seulement 14,8% des souris hKO-ChREBP surexprimant myr-AKT1 ont développé de petits adénomes alors que toutes les souris WT ont développé un CHC. Ces résultats démontrent donc que l'inhibition de ChREBP permet de limiter efficacement la prolifération cellulaire et la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*.

L'inhibiteur pharmacologique de ChREBP, le SBI-993, inhibe efficacement la prolifération cellulaire et le développement tumoral. Pour étudier le bénéfice potentiel de l'inhibition pharmacologique de ChREBP pendant le développement du CHC, nous avons également testé l'efficacité du SBI-993, récemment identifié comme un inhibiteur de l'activité de MondoA, un homologue de ChREBP dans le muscle (Ahn et al., 2016). Nous avons tout d'abord montré que le traitement par le SBI-993 (40µM) inhibe la translocation nucléaire de ChREBP en réponse au glucose dans des cultures primaires d'hépatocyte et par conséquent inhibe l'induction de ses gènes cibles (Figure supplémentaire 6l-n). Nous avons également montré que cet effet du SBI-993 est spécifique de ChREBP puisque les effets de celui-ci sont perdus dans les hépatocytes de souris invalidée pour ChREBP (Figure supplémentaire 6n). De plus, le SBI-993 réduit significativement la prolifération des cellules hépatomateuses humaines SNU-449 de manière dose-dépendante sans induire l'apoptose cellulaire même lorsqu'il est utilisé à des concentrations de 300 µM (Figures supplémentaires 6o et p). Soutenant l'hypothèse selon laquelle l'inhibition pharmacologique de ChREBP serait intéressante pour le traitement du CHC, nous avons montré que le SBI-993, à une concentration de 40µM, réduit significativement la prolifération cellulaire des lignées SNU-

475, Huh7 et BNL CL2. Dans ce contexte, un traitement quotidien avec 50 mg/kg de SBI-993 pendant 3 semaines réduit le développement de xénogreffes réalisées avec ces mêmes lignées cellulaires (Figures 6i-k et Figures supplémentaires 6q et r). De la même manière, ce traitement quotidien par le SBI-993 (50mg/kg) permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de ChREBP lorsque celui-ci est surexprimé par stratégie adénovirale dans le foie de souris C57BL6/J (Figure 6l). Dans ce contexte, le SBI-993 permet d'inhiber l'induction de tous les gènes cibles pro-oncogéniques identifiés de ChREBP et par conséquent diminue significativement ses effets pro-prolifératifs dans le foie (Figures 6m et n). Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence le potentiel des inhibiteurs pharmacologiques de ChREBP, et plus spécifiquement le SBI-993, en tant que molécules thérapeutiques anticancéreuses.

L'expression de ChREBP est inversement corrélée à la sensibilité du CHC au Sorafenib et son inhibition par le SBI-993 permet de lever cette résistance au traitement. La résistance ou l'échappement aux traitements qui sont utilisés dans la lutte contre le cancer est un autre facteur important qui détermine le mauvais pronostic des patients atteints de CHC. Alors que le Sorafenib est une des molécules de chimiothérapie de référence pour le traitement des patients atteints de CHC à un stade avancé, son efficacité est grandement affectée par l'apparition d'une résistance à ce traitement. Dans ce contexte, cette résistance à l'action du Sorafenib a été attribuée à une signalisation aberrante de la voie de signalisation PI3K/AKT (Zhang et al., 2018). Étant donné que le développement du CHC sous le contrôle de ChREBP implique une induction de la signalisation PI3K/AKT, dépendante de la sous-unité régulatrice p85α de la PI3K, l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité transactivatrice de ChREBP pourrait participer au développement de cette résistance. De manière à répondre à cette question, dans une cohorte de patients atteints de CHC, nous avons dans un premier temps déterminé s'il existait une corrélation entre les niveaux d'expression de ChREBP et le développement d'une résistance à l'action du Sorafenib. Dans cette cohorte, dont les données cliniques et biologiques sont publiquement accessibles sous le numéro d'accession GSE109211, les patients ont été subdivisés en deux catégories, ceux étant sensibles ou résistants au traitement. Dans ce contexte, nos résultats montrent que l'expression de ChREBP et de p85α est significativement augmentée chez les patients résistants au Sorafenib par rapport aux patients sensibles à l'action anti-proliférative de cette drogue (Figure 7a). De plus, nos résultats montrent également que l'expression de gènes, préalablement associés au développement de la résistance au Sorafenib chez l'homme, tels que ZWILCH, CDC14A, MTA3 ou TCF4, est augmentée dans les tumeurs surexprimant

ChREBP (Figure 7b). Ainsi, nos lignées hépatomateuses transformées SNU-475 et SNU-449 surexprimant ChREBP sont résistantes à l'apoptose cellulaire induite par le Sorafenib, lorsque ce dernier est utilisé pendant 24h à une concentration de 15μM (Figure 7c). Ces données suggèrent donc que l'augmentation de l'activité de ChREBP dans l'hépatocyte cancéreux peut participer en partie au développement de la résistance au Sorafenib. De manière à répondre définitivement à cette question, nous avons finalement développé une lignée cellulaire hépatomateuse transformée, la lignée SK-Hep-1, résistante au sorafenib. Cette résistance a été développée en traitant pendant 8 mois les cellules parentales SK-Hep-1 avec des doses croissantes de Sorafenib. L'objectif était de sélectionner progressivement les clones SK-Hep-1 résistants (SK-Hep-1-SR) à ces doses croissantes de Sorafenib (Figure 7d-f). Dans ce modèle, la résistance des cellules SK-Hep1-SR à l'apoptose induite par le Sorafenib est positivement corrélée à l'augmentation de l'expression de ChREBP et de celle de p85α et par conséquent à l'augmentation de la signalisation PI3K/AKT (Figure 7g). Ainsi, l'inhibition stable de l'expression de ChREBP dans les cellules SK-Hep1-SR par stratégie lentivirale, permet de lever cette résistance au Sorafenib et de ré-induire l'apoptose de ces cellules en réponse au traitement. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'expression de ChREBP est directement corrélée avec la résistance au Sorafenib chez les patients atteints de CHC et que son inhibition pharmacologique, par le SBI-993 par exemple, pourrait représenter une piste thérapeutique de choix pour combattre cette résistance. Dans cet objectif thérapeutique, l'efficacité du SBI-993 en tant qu'adjuvant potentiel au Sorafenib a été testée sur les lignées hépatomateuses parentales SNU-475 et Huh7. Dans ces 2 lignées, le traitement avec le SBI-993 (40μM) réduit significativement l'expression de p85α, la signalisation PI3K/AKT (Figures 7h et k) et permet de manière plus importante de potentialiser l'activité pro-apoptotique du Sorafenib (15μM) dans ces cellules (Figures 7h-m). Par conséquent, l'ensemble de ces résultats identifie ChREBP comme un nouveau marqueur fiable de la résistance au Sorafenib et montre que l'inhibition pharmacologique de son activité pourrait avoir un effet synergique anti-prolifératif et pro-apoptotique lors d'un traitement combiné avec le Sorafenib.

Discussion

Cibler des voies métaboliques spécifiques dont l'activité est requise pour la croissance tumorale est une approche thérapeutique émergente en oncologie clinique. En effet, afin de soutenir leur potentiel de prolifération accru, la plupart des cellules cancéreuses doivent adapter leur métabolisme intermédiaire de manière à favoriser leur survie. En particulier, il est maintenant bien démontré que des voies métaboliques telles que la glycolyse, la lipogenèse, la voie des pentoses phosphates, de la glutaminolyse et de la biosynthèse *de novo* de nucléotides constituent des acteurs essentiels de la transformation maligne (Kato et al., 2018 ; Phan et al., 2014). Ainsi, l'identification de nouveaux gènes qui soutiennent la croissance tumorale en contrôlant la reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse est d'une importance primordiale pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses, spécifiques et efficaces. Dans ce contexte, ChREBP apparaît comme un véritable acteur du développement tumoral, car il possède un rôle central dans la régulation de plusieurs voies métaboliques et ce dans divers types de cellules en réponse à des stimuli environnementaux et hormonaux (Abdul-Wahed et al., 2016). Dans ce contexte, même si certaines études ont pu attribuer un rôle de ChREBP dans plusieurs types de cancer, les mécanismes moléculaires sous-jacents de son effet carcinogène restent encore largement inconnus. Durant cette thèse, nous avons pu fournir pour la première fois la preuve de concept que ChREBP représente un nouvel oncogène à l'origine de l'initiation et du développement du CHC. De plus, notre travail montre que cette fonction oncogénique de CHREBP est pertinente chez l'homme en mettant en évidence que son activité est systématiquement augmentée dans les CHC de mauvais pronostic. Nos données révèlent enfin que ChREBP représente un nouveau biomarqueur moléculaire pouvant prédire la résistance aux traitements de chimiothérapie utilisés dans le cadre du CHC, comme le sorafenib. Finalement nos données démontrent pour la première fois que ChREBP représente une cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient être utilisées seules ou en combinaison avec d'autres molécules de références du traitement du CHC.

D'un point de vue moléculaire, nous avons tout d'abord montré que l'activation de ChREBP favorise la reprogrammation du métabolisme du glucose et de la glutamine, deux substrats majeurs utilisés par les cellules cancéreuses afin de soutenir les étapes d'initiation et de développement du CHC. Nos données montrent que ChREBP coordonne l'utilisation de ces

deux substrats énergétiques afin de les rediriger vers les voies de biosynthèse de lipides et de nucléotides qui sont indispensables au bon développement tumoral.

Dans ce contexte, notre étude montre que l'augmentation de l'activité transactivatrice de ChREBP permet d'induire directement l'expression des gènes clés du métabolisme des lipides tels que l'ACC, la FAS ou la SCD1, afin de soutenir le développement et la progression du CHC. De plus, nous avons pu observer que l'augmentation des capacités de désaturations des acides gras néo-synthétisés entraine un enrichissement spécifique en acides gras mono-insaturés (MUFA) dans toutes les espèces de phospholipides. Cette augmentation des MUFA peut conférer plusieurs avantages aux cellules cancéreuses hautement prolifératives (Hall et al., 2021). Un de ces avantages serait d'empêcher l'accumulation d'acides gras saturés (SFA) associée à l'augmentation de la lipogenèse, ce qui pourrait déclencher des voies de signalisation apoptotiques (Peck et Schulze, 2016). De plus, les phospholipides riches en MUFA permettent également d'augmenter la fluidité de la membrane plasmique dans plusieurs types de cancer, favorisant l'activation aberrante de voies de signalisation oncogéniques spécifiques pour soutenir la croissance tumorale, comme la voie de signalisation PI3K/AKT (Tutino et al., 2020). A ce stade, nos données restent cependant corrélatives et ne démontrent pas directement si ces MUFAs participent aux effets pro-prolifératifs de ChREBP. Il serait donc intéressant dans la suite de ce travail de diminuer les capacités de désaturation des hépatocytes surexprimant ChREBP, en inhibant l'activité des SCD. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des SCD pourrait ainsi se révéler pertinente dans nos modèles de surexpression de ChREBP, afin de démontrer si ces MUFAs peuvent modifier ou non l'activité de la voie de signalisation PI3K/AKT ou affecter les mécanismes d'apoptose des cellules cancéreuses surexprimant ChREBP. De manière générale, nos résultats sont donc en accord avec de nombreuses études qui montrent que le métabolisme des lipides est aujourd'hui considéré comme universellement dérégulé dans le cadre du cancer, et plus particulièrement dans le CHC (Snaebjornsson et al., 2020). Le ciblage du métabolisme lipidique est donc devenu au fils des années une stratégie thérapeutique attractive dans le traitement du CHC (Sugimoto et al., 2007 ; Lally et al., 2019, Flavin et al., 2010). En conséquence, il a particulièrement été démontré que l'inhibition ciblée et individuelle des enzymes de la lipogenèse comme la FAS, l'ACC ou la SCD1 diminue de manière significative le développement de différents types de cancer dont le CHC (Tutino et al., 2020, Lally et al., 2019). ChREBP, en contrôlant l'expression de plusieurs gènes clés de la reprogrammation du métabolisme lipidique, pourrait donc constituer une cible de choix pour

diminuer cette reprogrammation du métabolisme lipidique essentielle aux cellules cancéreuses.

Renforçant cette hypothèse de travail, notre étude montre pour la première fois qu'en plus de la régulation du métabolisme des acides gras, ChREBP coordonne également l'utilisation du glucose et de la glutamine pour soutenir la synthèse *de novo* de nucléotides dans le CHC. En effet, nos résultats montrent qu'en régulant directement l'expression d'enzymes clés de la voie des PPP, comme la G6PDH, la RPIA ou la TKT, ChREBP favorise l'utilisation des carbones du glucose pour soutenir la synthèse *de novo* de nucléotides. Ces observations sont particulièrement importantes car les altérations de la voie des PPP jouent un rôle important dans la prolifération et la survie de plusieurs types de cancer, en particulier dans le CHC, où l'expression des enzymes de la voie des PPP est systématiquement augmentée (Kowalik, et al., 2017). Dans nos tumeurs surexprimant ChREBP, cet effet pro-prolifératif est principalement médié par l'augmentation de la production de ribose 5-phosphate (R5P) et de sa transformation en PRPP utilisé comme précurseur pour la synthèse de nucléotides. Dans le même temps, l'une des observations les plus importantes de notre étude est le fait que ChREBP coordonne cette utilisation du glucose avec celle de la glutamine pour soutenir la synthèse *de novo* de pyrimidines. Ainsi, nous démontrons pour la première fois que l'activation de ChREBP, en contrôlant l'expression des gènes du catabolisme de la glutamine et de la biosynthèse des pyrimidines comme la GLS1, GOT2, CTPS1 ou UMPS, favorise la transformation de la glutamine en glutamate puis sa conversion en aspartate. Dans cette réorientation métabolique, l'aspartate est ensuite converti en N-carbamoylaspartate pour servir de substrat à la synthèse des pyrimidines, en coordination avec le PRPP provenant de la voie des PPP. Dans ce contexte, nos résultats renforcent l'idée que l'inhibition pharmacologique de ChREBP, en bloquant la réorientation du métabolisme du glucose et de la glutamine, représente également une approche intéressante pour diminuer la synthèse de nucléotidique dans les cellules cancéreuses hautement prolifératives.

Cependant, deux questions importantes, concernant cette réorientation du métabolisme du glucose et de la glutamine, demeurent. La première concerne l'activité du cycle de Krebs dans notre modèle. Comme nous l'avons introduit précédemment, au sein des cellules cancéreuses présentant un effet Warburg, le glucose est redirigé vers la production de lactate. Dans ce cas c'est la glutamine qui est utilisée pour réapprovisionner les intermédiaires du cycle de Krebs (DeBerardinis et Cheng, 2010). Or dans notre modèle, nous avons montré que l'oxydation du

glucose et de la glutamine était diminuée dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure supplémentaire 3b et 5f). De plus, nous avons récemment pu montrer que l'oxydation des acides gras à chaine longue, autres substrats énergétiques majeurs, impliqués dans le développement du CHC (Rebouissou et Nault, 2020), était également inchangée dans notre modèle (résultats non présentés). La question qui découle de ces données est donc de comprendre comment le cycle de Krebs est alimenté dans les tumeurs qui surexpriment ChREBP. Dans ce contexte, une hypothèse qui mériterait d'être étudier plus sérieusement est le rôle de la pyruvate carboxylase (PC) dans les effets pro-prolifératifs de ChREBP. Pour rappel, la PC catalyse la conversion du pyruvate en oxaloacétate (OAA) avec consommation d'une molécule d'ATP. De manière intéressante, plusieurs études montrent que la PC joue en effet un rôle important dans la réalimentation du cycle de Krebs, surtout dans les cellules cancéreuses étant dans l'incapacité d'utiliser la glutamine pour l'anaplérose (Cheng et al., 2011 ; Christen et al., 2016 ; Kiesel et al., 2021 ; Linares et al., 2017). Ainsi, dans notre modèle tumoral surexprimant ChREBP, nous avons pu montrer que l'expression et l'activité de la PC étaient augmentées dans les tissus tumoraux (Figure supplémentaire 3c et d). Ainsi, le pyruvate produit par la glycolyse serait utilisé à la fois pour la production d'acétyl-CoA par la PDH, et pour la production d'OAA par la PC, permettant une alimentation continue du cycle de Krebs pour fournir les intermédiaires essentiels aux cellules cancéreuses comme le citrate pour la biosynthèse de lipides, et l'OAA pour la synthèse des acides aminés non essentiels et des nucléotides. Cependant, des expériences de fluxomique, utilisant du glucose marqué au C^{13} sont nécessaires pour valider définitivement cette réorientation métabolique du glucose sous le contrôle de ChREBP.

La deuxième question qui demeure concerne l'utilisation de l' α-cétoglutarate dans un contexte ou l'activité de ChREBP est augmentée. En effet, dans notre modèle, la glutamine est convertie en glutamate par la GLS1, glutamate qui sera ensuite transaminé en aspartate par GOT2 (Figure 5l). Dans plusieurs types de cancers, notamment celui du foie, il est bien décrit que l' α-cétoglutarate, produit par le catabolisme de la glutamine, est généralement utilisé pour la production d'énergie par le cycle de Krebs (oxydation), ou redirigé vers la voie de biosynthèse de lipides par la lipogenèse (DeBerardinis and Cheng, 2010). Cependant et de manière surprenante, nous avons montré que l'oxydation de la glutamine est diminuée et que la synthèse de lipides à partir celle-ci est inchangée dans les tumeurs surexprimant ChREBP (Figure supplémentaire 5f et g). L'utilisation de l' α-cétoglutarate, produit par GOT2, dans

nos tumeurs surexprimant ChREBP reste donc indéterminée. Dans ce contexte, plusieurs études ont démontré que l'α-KG, indépendamment de son rôle métabolique dans le TCA, joue un rôle plus large dans les cellules cancéreuses. Il a par exemple été montré que l'α-KG peut réguler l'activation de la voie NF-κb contrôlant les mécanismes de la survie et à la prolifération cellulaire (Cummins et al., 2006). En effet, l'α-KG va directement inhiber par allostérie la prolyl hydroxylase PHD1, ce qui va avoir pour effet d'activer la kinase IKKβ qui à son tour va permettre la libération de NF-κB (Abla et al., 2020). De plus, il a été montré que l'α-KG est également impliqué dans le contrôle de modifications épigénétiques importantes pour la cellule cancéreuse, comme la déméthylation de l'ADN. L'α-KG va en effet servir de co-facteur pour des enzymes impliquées dans cette déméthylation comme les TET (Ten-eleven Translocation) ou les JHDMs (JmjC Domain Containing Histone Demethylases) (Abla et al., 2020). Enfin, l'α-KG est impliqué dans la synthèse d'acides aminés comme l'arginine et la proline, qui jouent des rôles importants dans la cellule cancéreuse comme le remodelage de la matrice extra-cellulaire ou encore la suppression de l'immunité anti-tumorale (Abla et al., 2020 ; D'Aniello et al., 2020). De manière intéressante, l'analyse métabolomique des tumeurs surxprimant ChREBP montre que la concentration intracellulaire de ces deux acides aminés est significativement augmentée (résultats non présentés). L'ensemble de ces hypothèses de travail devra donc être étudié si nous voulons mieux comprendre le devenir intracellulaire de l'α-KG dans nos tumeurs.

ChREBP apparaît donc comme un régulateur essentiel de nombreuses voies métaboliques nécessaires au développement tumoral. Dans ce contexte, nos résultats sont en accords avec les quelques études publiées à ce jour montrant que ChREBP, en contrôlant la reprogrammation du métabolisme du glucose, participe bien au développement tumoral. Ainsi, dans l'étude publiée par Tong et ses collaborateurs en 2009, l'inhibition de ChREBP dans des lignées cellulaires humaines de cancer colorectal (HCT11) diminue la prolifération et la viabilité cellulaire, en diminuant les flux de glucose à travers les voies de la glycolyse, de la synthèse de lipides et de nucléotides (Tong et al., 2009). D'un point de vue moléculaire, les auteurs montrent que ChREBP exerce ses effets pro-prolifératifs en inhibant l'activité du suppresseur de tumeur p53 et en contrôlant les niveaux intracellulaires de glutathion. Ce rôle de ChREBP dans le maintien de l'équilibre rédox et dans la lutte contre le stress oxydatif, a bien été documenté par notre groupe de recherche dans le cadre de la protection contre le développement de la stéatohépatite inflammatoire (NASH) et de la fibrose dans les

pathologies de l'obésité et du diabète de type 2 (Bricambert et al., 2010). Dans notre étude, l'activation de ChREBP par son coactivateur Phf2 (Plant Homeodomain Finger 2), réoriente les carbones du glucose à travers la voie de biosynthèse de sérine et de glutathion. De plus, l'augmentation des flux de glucose à travers la voie des PPP permet la synthèse de NADPH essentiel aux défenses anti-oxydantes du foie. Ainsi, l'augmentation de l'activité transactivatrice de ChREBP, en inhibant l'expression de p53, et en augmentant les défenses anti-oxydantes, permettrait de protéger la cellule cancéreuse de l'apoptose et des effets délétères des ROS, favorisant à terme le développement tumoral. Enfin, de manière plus récente, Wang et ses collaborateurs ont montré que ChREBP agit en coopération sur le promoteur de gènes cibles de l'oncogène c-myc pour favoriser la reprogrammation du métabolisme du glucose et des lipides (Wang et al., 2018). Ainsi, le rôle pléiotropique exercé par ChREBP sur le contrôle du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse pourrait se révéler très intéressant dans la lutte contre la plasticité et l'adaptabilité tumorale. En effet, comme nous l'avons abordé dans la partie introductive de ce manuscrit, la capacité des tumeurs à réorienter leur métabolisme intermédiaire de manière à contourner les effets de traitements métaboliques, est à l'origine des écueils rencontrés dans le cadre du développement de molécules ciblant le métabolisme tumoral (Kim et DeBerardinis, 2019 ; Yoshida, 2015 ; Fendt et al., 2020). Dans ce contexte, l'inhibition de l'activité de ChREBP, qui est au cœur de la régulation de nombreuses voies métaboliques étroitement intriquées et universellement dérégulées dans le cadre du cancer, pourrait permettre de diminuer ces niveaux d'adaptabilité métabolique de la cellule cancéreuse pour augmenter significativement l'efficacité de traitements métaboliques anti-tumoraux.

De manière intéressante, nos résultats démontrent également que ChREBP coordonne cette reprogrammation du métabolisme intermédiaire du glucose et de la glutamine avec le contrôle de la voie de signalisation pro-oncogénique PI3K/AKT. Le contrôle de cette voie de signalisation par ChREBP est responsable des effets pro-prolifératifs de dernier dans le CHC. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant que cette voie de signalisation est souvent affectée dans les CHC humains de mauvais pronostics et que son activation constitutive est souvent associée à l'apparition de résistances aux traitements de chimiothérapie (Zhou et al., 2011). Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu montrer que ChREBP stimule la voie de signalisation PI3K/AKT en contrôlant l'expression du gène *pik3r1*, qui code pour la sous-unité régulatrice p85α de la PI3K (Khotskaya et al., 2017). De manière intéressante, différentes études ont récemment suggéré que p85α agit comme un

oncogène à l'origine de l'initiation et de la progression de différents types de cancer, car des mutations de p85α sont fréquemment détectées dans les cancers du côlon ou de l'endomètre primaire par exemple (Jaiswal et al., 2009 ; Urick et al., 2011 ; Sun et al., 2010). Dans le cadre du CHC, l'expression de *pik3r1* est également augmentée corrélant avec l'amplification de la voie de signalisation PI3K/AKT, de la prolifération et de la migration cellulaire (Ai et al., 2018 ; He et al., 2017). De manière globale nos résultats apportent la preuve de concept que l'inhibition de ChREBP permet de limiter l'activité de cette voie de signalisation pro-oncogénique. Cependant, il serait intéressant de mieux caractériser le dialogue existant entre cette voie de signalisation et l'activité de ChREBP. En effet, la voie PI3K/AKT, en contrôlant directement l'expression d'HK2 par SREBP-1c, joue un rôle prépondérant dans l'activation de ChREBP en réponse au glucose, l'activation de sa phosphorylation en G6P étant indispensable à la translocation nucléaire de ChREBP (Davies et al., 2008). Ces données suggèrent ainsi qu'une boucle de rétrocontrôle positive pourrait se mettre en place dans la carcinogénèse hépatique. Dans ce modèle, la voie PI3K/AKT augmenterait l'activité transactivatrice de ChREBP d'une part, et ChREBP, en réponse à l'augmentation du métabolisme du glucose, amplifierait l'activité de cette voie de signalisation *via* le contrôle de l'expression de P85α.

Dans l'ensemble, ChREBP apparaît donc au carrefour de nombreuses voies métaboliques et processus biologiques qui sont impliqués dans la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, une inhibition de ChREBP permettrait dans un premier temps de réduire l'activité de signaux oncogéniques pro-prolifératifs, anti-apoptotiques et pro-métastatiques qui sont mis en place par l'activation constitutive de la signalisation PI3K/AKT, dans les CHC des sous-classes G1, G2 et G3 de mauvais pronostic. De plus, cela permettrait d'empêcher la réorientation du métabolisme du glucose et de la glutamine, bloquant de manière globale plusieurs processus essentiels au fonctionnement et à la prolifération des cellules cancéreuses. L'inhibition de ChREBP offre ainsi une opportunité unique pour le développement de nouvelles thérapies ciblées dans le cadre du traitement du CHC. Ces dernières années, des stratégies récentes ont émergé pour inhiber l'activité de ChREBP. Une stratégie visant à interrompre la stabilisation du complexe ChREBP-importine α, et par conséquent la translocation de ChREBP dans le noyau des hépatocytes, a été développée par le groupe du professeur Uyeda (Jung et al., 2020). De même, un stabilisateur de l'interaction entre la protéine 14-3-3 et ChREBP a également prouvé son efficacité pour inhiber l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Sijbesma et al., 2020). Ces études soutiennent la faisabilité de

développer des inhibiteurs efficaces et spécifiques de ChREBP. Cependant, à ce jour, la preuve de leur efficacité *in vivo* fait encore défaut, en particulier dans le cadre du traitement du cancer. Dans ce contexte de développement thérapeutique, nous avons eu la chance de montrer que le SBI-993 représente un inhibiteur pharmacologique prometteur de ChREBP possédant un potentiel anti-tumoral significatif associé à une bonne tolérance *in vivo*. Dans l'ensemble, tous ces inhibiteurs de ChREBP pourraient également représenter des outils pharmacologiques importants pour réduire la résistance aux traitements de référence utilisés dans le traitement du CHC (Zahan et al., 2020 ; Chen et al., 2020). Ainsi, nos résultats montrent clairement l'inhibition pharmacologique de ChREBP par le SBI-993, en bloquant la reprogrammation métabolique et l'activation de la voie PI3K/AKT, permet de sensibiliser les hépatocytes cancéreux à l'action de la Sorafenib, traitement encore utilisé dans le cadre du CHC. De manière générale, notre étude propose que le ciblage de l'activité ChREBP constitue ainsi une stratégie anti-néoplasique prometteuse pour contrer le développement de la résistance au Sorafenib pendant le traitement du CHC.

La démonstration du rôle oncogénique de ChREBP se base sur l'utilisation d'un modèle de développement tumoral au cours duquel nous avons surexprimé ChREBP de façon stable dans le foie par la technique de transfert de gène non virale appelée sleeping beauty. Au cours de la dernière décennie, cette technique a été développée pour permettre l'intégration d'un gène d'intérêt dans le cadre du développement de la thérapie génique. Dans l'étude de la carcinogénèse, elle présente plusieurs avantages : tout d'abord, c'est une technique d'insertion génique non virale, limitant les possibles biais de développement tumoral qui serait associé à l'utilisation de vecteurs viraux (Chen et al., 2019). Ensuite, cette technique a permis d'intégrer ChREBP dans le génome des hépatocytes de façon stable et à long terme, ce qui est indispensable au développement tumoral. Enfin, cette technique, en intégrant le gène d'intérêt dans seulement 3 à 4% de la population hépatocytaire totale, permet de mimer l'apparition de foyer pré-néoplasiques, ce qui se rapproche le plus des mécanismes physiopathologiques de développement de différents cancers chez l'homme (Chen et al., 2019). Cependant, la principale limitation de ce modèle dans le cadre du CHC vient du fait que l'on induit génétiquement la carcinogénèse sur un foie sain. Or, chez l'homme, les CHC se développent dans la grande majorité des cas sur un foie cirrhotique ou fibrotique comme nous l'avons expliqué en partie introductive de ce manuscrit (Szabo and Petrasek, 2015). De plus, sachant que nous avons montré chez l'homme, que l'expression de ChREBP est positivement corrélée à des CHC se développant sur des foies atteints de NAFLD et NASH, la caractérisation du

rôle de ChREBP dans la carcinogenèse hépatique à partir de modèles de CHC induit par la NASH s'avère pertinente, si l'on veut se rapprocher le plus possible des mécanismes physiopathologiques mimant les étapes d'initiation et de développement du CHC. Plusieurs modèles de développement du CHC induits chimiquement et nutritionnellement existent. Le principal modèle consiste en l'injection d'un agent transformant, le diethylnitrosamine (DEN) chez la souris. Les souris sont ensuite placées sur différents régimes nutritionnels favorisant le développement de la NASH ou la fibrose. On peut citer entre autres l'utilisation de régimes riches en lipides (régime high fat) ou déficients en méthionine et choline (régime MCD) (Febbraio et al., 2019). La combinaison de l'agent transformant et des régimes nutritionnels mime donc l'étape d'initiation tumorale dans un contexte inflammatoire de NASH ou de fibrose. Dans ce contexte, il nous parait donc intéressant d'étudier le rôle oncogénique de ChREBP ainsi que les effets de son inhibition dans ces différents modèles de CHC pour avoir la plus grande pertinence possible avec les mécanismes physiopathologiques de développement du CHC chez l'homme.

Nos résultats montrent enfin que ChREBP représente un nouveau biomarqueur moléculaire qui prédit non seulement les CHC de mauvais pronostics, mais aussi la sensibilité du traitement à la Sorafenib. L'utilisation de ChREBP en tant que biomarqueur apparaît donc prometteuse. En effet, chez l'homme, il existe à ce stade peu de marqueurs fiables prédisant l'évolution des CHC ainsi que la réponse aux traitements thérapeutiques. Comme expliqué dans la partie introductive de ce manuscrit, les niveaux d'AFP constituent le marqueur le plus utilisé pour surveiller la progression ou le risque de récidive de la tumeur (Fujiyama, 2002). Certaines études ont également pu montrer que les niveaux circulants de VEGF2 sont prédictifs d'une mauvaise réponse au traitement par la Sorafenib chez des patients atteints de CHC avancés (Negri et al., 2015). De même, la phosphorylation de ERK est inversement corrélée à la survie (Personeni et al., 2013). Il est intéressant de noter que le traitement avec la Regorafenib, qui est approuvé pour le traitement de deuxième ligne du CHC, ne dispose toujours pas de biomarqueur prédictif disponible à ce jour. Ainsi, l'expression de ChREBP dans des biopsies de patients atteints de CHC pourrait constituer un marqueur de mauvais pronostic, au même titre que l'AFP. De plus, nos travaux suggèrent que les niveaux d'expression de ChREBP pourraient être utilisés dans le suivi des réponses aux patients traités avec la Sorafenib.

Perspectives de travail

De manière tout à fait récente, un changement de paradigme est en train d'avoir lieu dans la prise en charge des patients atteints de CHC au stade avancé. En effet, un nouveau traitement de référence a vu le jour, composé d'un cocktail de Bevacizumab, un inhibiteur de RTKs et d'Atezolizumab, un inhibiteur du checkpoint immunitaire anti-PDL1 (Finn et al., 2020). Ce changement de paradigme prend place dans un contexte où l'immunothérapie est au cœur de nombreuses études et essais cliniques dans le cadre du traitement du CHC (Waldman et al., 2020). Cependant, malgré des résultats précliniques prometteurs, l'immunothérapie ne s'est pas avérée aussi efficace chez tous patients atteints de cancer (Waldman et al., 2020). Dans ce contexte, il semblerait donc que les traitements d'immunothérapie aient atteint un plateau, qui ne peut être franchi sans une meilleure compréhension des mécanismes adaptatifs sous-jacents à la résistance des cellules cancéreuses au traitement. Dans ce cadre, il apparaît que la reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse joue un rôle prépondérant dans ces mécanismes de résistance à l'immunothérapie. En effet, il a été clairement établi qu'une compétition pour le glucose et la glutamine se mettait en place entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement de la tumeur (TME). Ainsi, il a parfaitement été décrit que la tumeur à la capacité de priver les cellules immunitaires, comme les cellules NK ou les lymphocytes T CD8, responsables de l'immunité anti-tumorale, de substrats essentiels à leur fonctionnement, limitant ainsi à terme l'efficacité des traitements par l'immunothérapie (Cascone et al., 2018 ; Geltink et al., 2020). On parle dans ce cas d'immunosuppression qui est exercée par les cellules tumorales primaires. Dans l'ensemble, l'amélioration de la réponse immunitaire anti-tumorale constitue donc un objectif majeur dans l'amélioration du traitement par l'immunothérapie. De ce fait, de nombreuses études ont récemment démontré que l'inhibition du métabolisme tumoral permet de lever cette immunosuppression et par conséquent l'évasion des tumeurs à ces traitements (Leone et al., 2019 ; Steggerda et al., 2017 ; Cha et al., 2018). On pourra citer par exemple la récente autorisation réglementaire de l'utilisation d'une combinaison d'un traitement métabolique anti-folate et de l'immunothérapie pour le cancer du poumon ou de l'ovaire qui confirme la stratégie anticancéreuse de l'immuno-métabolisme (Schaer et al., 2019). Dans ce contexte et concernant les perspectives de mon travail de thèse, nous souhaiterions donc étudier plus en détail le rôle du facteur de transcription ChREBP sur l'immunité anti-tumorale et déterminer si son inhibition pharmacologique pourrait également jouer un rôle sur l'efficacité des

traitements d'immunothérapie. Il serait ainsi intéressant dans un premier temps d'étudier par cytométrie en flux les différentes populations immunitaires dans notre modèle tumoral induit par ChREBP, afin de mettre en évidence un potentiel déséquilibre de la balance de l'immunité anti-tumorale vers une immunité pro-tumorale. De plus, notre laboratoire dispose d'une lignée de souris invalidée pour ChREBP spécifiquement dans les macrophages (LysM-Cre). Or, plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la polarisation des macrophages et leur activité pro ou anti-tumorale (Najafi et al., 2019 ; Dijkgraaf et al., 2013). L'utilisation d'un modèle de carcinogénèse hépatique induite chez ces souris permettrait ainsi d'explorer et de comprendre le rôle de ChREBP au sein des macrophages dans le cadre du développement du CHC. Enfin à terme, il serait pertinent, dans un modèle de xénogreffes avec nos lignées surexprimant ChREBP, d'évaluer si un traitement à base d'anticorps anti-PDL1 et d'un inhibiteur pharmacologique de ChREBP, comme le SBI-993, pourrait avoir un effet synergique dans le traitement du CHC. Dans l'ensemble, ChREBP pourrait ainsi constituer une cible intéressante dans le cadre du développement de nouvelles stratégies anticancéreuses alternatives, constituées d'un traitement d'immunothérapie couplé à un traitement métabolique.

Article

The Transcription Factor ChREBP Orchestrates Liver Carcinogenesis at the Interface of the Oncogenic PI3K/AKT Signaling and Cancer Cell Metabolism

Emmanuel Benichou*[1], Bolaji Seffou*[1], Selin Topcu*[1], Véronique Lenoir[1], Julien Planchais[1], Caroline Bonner[2, 3, 4, 5], Catherine Postic[1], Carina Prip-Buus[1], Marie-Clotilde Alves-Guerra[1], Sandra Guilmeau[1] and Renaud Dentin[1, 6]

[1] Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS,

[2]Institut Pasteur de Lille, Lille, France

[3]INSERM, U1011, Lille

[4]European Genomic Institute for Diabetes, Lille, France

[5]University of Lille, Lille, France.

[6] Lead Contact

[*] These authors contributed equally

Address correspondence to:

Renaud Dentin, Institut Cochin, Département d'Endocrinologie, Métabolisme et Diabète, Faculté de santé 3ème étage, 24 Rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. Phone : 33-1-53-73-27-20; Fax: 33-1-53-73-27-03 ; E-mail: renaud.dentin@inserm.fr

Interest disclosure: The authors declare no competing interests.

Abstract

Cancer cells must integrate multiple biosynthetic demands to drive indefinite proliferation. How these key cellular processes crosstalk to fuel cancer cell growth is still not fully understood. Here, we uncover the mechanisms by which the transcription factor ChREBP acts as a new oncogene for hepatocellular carcinoma (HCC) initiation and progression and as a limiting factor of chemotherapy efficiency. Mechanistically, ChREBP activation directly triggered the expression of the regulatory subunit p85α of the PI3K, to sustain the activity of the pro-oncogenic PI3K/AKT signaling in HCC. In parallel, elevated ChREBP activity, by controlling the expression of key genes of the pentose phosphate shunt, *de novo* lipogenesis, glutamine metabolism and *de novo* pyrimidine biosynthesis, reroutes glucose and glutamine metabolic fluxes into fatty acid and nucleic acid synthesis to support PI3K/AKT-mediated HCC growth. Therefore, these findings delineate an undescribed ChREBP-regulating circuitry through which HCC cells ensure balanced coordination between PI3K/AKT signal transduction and appropriate cell anabolism to initiate and support HCC development. Importantly, pharmacological targeting of ChREBP by the small molecule SBI-993 robustly suppressed HCC cell proliferation and the growth of tumor xenografts. Altogether, these data demonstrate that targeting ChREBP through the use of specific inhibitors offers an attractive therapeutic window for HCC treatment.

Key words: ChREBP, hepatocellular carcinoma, HCC, metabolism, metabolic reprogramming, lipogenesis, glucose, glutamine, nucleotides, pyrimidine, PI3K/AKT signaling, PIK3R1, p85α, sorafenib, chemotherapy resistance, HCC treatment, SBI-993.

Introduction

Primary liver cancer is a global public health concern as it represents one of the most common and lethal human malignancies observed worldwide. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for more than 80% of primary liver cancers and represents the third most common cause of cancer mortality. While surgical resection and liver transplantation are effective options in the treatment of early-stage disease, therapeutic approaches for advanced HCC are very limited. As a matter of fact, the story of systemic therapy for HCC looks like a battlefield with few survivors as a result of a positive outcome [1]. Only multikinase inhibitors, such as sorafenib in first line and regorafenib in second line are being approved for late-stage HCC treatment, with unfortunately modest benefits for the patients in terms of survival [1].Thus, the elucidation of the molecular pathogenesis of HCC is imperative for the development of alternative therapeutic strategies with improved potency.

Because specific altered metabolic features are altered across many cancer types, reprogrammed metabolism is considered a hallmark of cancer [2]. Specifically, changes in tumor bioenergetics, consisting of elevation of glycolysis, upregulation of lipid and amino acid metabolism and induction of the pentose phosphate pathway, are detected in most cancer types and often negatively correlated with survival prognosis [3]. In particular, tumor cells use glycolysis for their metabolic needs regardless of oxygen concentrations, a phenomenon known as the Warburg effect or aerobic glycolysis [4]. In HCC, the dysregulation of two specific glycolytic enzymes known as pyruvate kinase M2 (PKM2) and hexokinase 2 (HK2), allows this metabolic switch required for hepatocyte proliferation and partly for tumorigenesis [5]. As a consequence, excessive aerobic glycolysis is commonly associated with HCC invasiveness and poor prognosis [6]. Furthermore, while energy-providing lipids come almost exclusively from dietary lipids in non-proliferative cells, a marked induction of *de novo* lipid synthesis (lipogenesis) occurs in cancer cells and often correlates with HCC initiation and cancer progression [7]. Thus, the major differences in bioenergetic features between normal and cancer cells may open new therapeutic avenues to selectively target these related metabolic pathways in early stages of HCC treatment [8]. Overall, the key question driving research in the field is to identify key metabolic candidates whose inactivation will impair hepatocarcinogenesis while sparing normal cells for therapeutic benefits.

In this context, we have previously established that the glucose responsive transcription factor ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) plays a central role in the

regulation of multiple metabolic pathways in nonproliferating hepatocytes [9,10]. ChREBP is a major mediator of glucose action on glycolytic (*pklr*), pentose phosphate pathway (*g6pdh*, *tkt*) and lipogenic (*acc*, *fasn*) gene expression [11-13]. Therefore, given its key role in the control of hepatic energy metabolism, ChREBP may thus represent a promising candidate for targeted therapies during HCC treatment. This study overall demonstrates that enhanced ChREBP activity in hepatocyte is sufficient to initiate the development and progression of HCC, unraveling its oncogenic function in the liver. In agreement, ChREBP expression signs HCC with poor outcome in human. At the molecular level, our study first unravels that ChREBP activation enhances in a p85α-dependent manner the PI3K/AKT signaling, which in turn contributes to its pro-proliferative effect. In addition, ChREBP coordinately rewires both glucose and glutamine metabolic fluxes to enhance *de novo* nucleotide and fatty acid synthesis in order to sustain cell proliferation. Altogether, these results report a new mechanism by which ChREBP activation contributes to tumorigenicity during HCC development. Finally, the characterization of the small molecule probe SBI-993 as a potent inhibitor of ChREBP activity, cell proliferation and adjuvant of chemotherapy treatment, demonstrates that ChREBP represents a strong candidate for pharmacological intervention during HCC treatment.

Results

ChREBP expression is increased is human liver HCC and is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis. The clinical relevance of ChREBP expression levels during human liver carcinogenesis was evaluated by using 8 publicly available datasets of human liver HCC (Supplementary Table 1) [14-21]. Compared with corresponding normal tissues, ChREBP expression was increased in all 8 HCC datasets along with the expression of its well-characterized target genes (Figure 1a). Supporting these results, western blot analysis performed from 12 pairs of human liver cancer (T) and adjacent normal liver tissue (N) demonstrated that ChREBP protein level is also elevated in most of the tumor samples (Figure 1b). Next, the correlation between ChREBP expression with a list of 40 genes, previously validated for their association with good or poor HCC prognosis was addressed (Figure 1c) [22]. This analysis demonstrates that high ChREBP expression levels systematically sign HCC tumors with poor prognosis (Figure 1c). Interestingly, based on clinical data available from these datasets, NAFLD/NASH-affected HCC tumors, which express high levels of ChREBP, accumulated on the higher risk side. These results were also confirmed by assessing the relationship between ChREBP expression and patient's clinicopathological records in two other independent HCC cohorts, namely LIHC and LICA-FR, for which clinical data were available (Supplementary Tables 2, 3 and 4). As previously described for the 8 other cohorts (Figure 1a), both LIHC and LICA-FR datasets express high levels of ChREBP within the tumor (Figure 1d). More importantly, ChREBP expression was significantly more elevated in HCC samples with poor prognosis when compared with those having a better outcome (Figure 1e). Accordingly, increased ChREBP expression within the tumor correlates with lower patient's survival rate in both LIHC and LICA-FR cohorts (Figure 1f). In summary, these data demonstrate that ChREBP expression is positively associated with HCC with poor prognosis in human.

Liver-specific and stable ChREBP overexpression promotes HCC initiation and development. To test its potential oncogenic function, ChREBP was first overexpressed for 3 weeks in the liver of C57BL6/J mice through adenoviral gene delivery. As a result, ChREBP promoted hepatic steatosis development, characterized by increased liver weight and size (Figure 2a). This liver hypertrophy was associated with hepatocytes hyperproliferation rate as evidenced by increased number of BrdU positive hepatocytes and enhanced expression of specific cell cycle proteins (Figures 2b and c). This suggests that short-term increased in

ChREBP activity is sufficient to promote the appearance of pre-tumoral hyperproliferative foci in liver. Consequently, to further investigate its contribution to the initiation and/or progression of hepatocarcinogenesis, ChREBP (HA-tagged) was stably overexpressed in the liver of FVB/N mice by combining hydrodynamic injection with the use of the non-viral sleeping beauty (SB) transposon system (Supplementary Figure 1a). To follow hepatocyte proliferation and tumor development, the firefly luciferase was stably overexpressed alone (empty vector) or with ChREBP. Successful integration of the luciferase in both cases was validated 7 days post-injection (Supplementary Figure 1b). While overexpression of the empty vector did not induce changes in luciferase activity over time (Figure 2d), stable ChREBP overexpression led in contrast to a time-dependent increase in bioluminescence activity, suggesting high rate of hepatocyte proliferation (Figure 2d). As a result, ChREBP promoted, in 100% of treated mice, the initiation and development of small hepatocellular adenoma that gradually progress to HCC between 6 and 12 months (Figures 2e). These tumors contain high lipid content, in agreement with the role of ChREBP in regulating lipid synthesis (Figure 2f). These HCC were also hyperproliferative as evidenced by increased number of Ki67 positive hepatocytes (Figure 2g) and enhanced expression of specific cell cycle proteins (Figures 2h). All together, these results provide the first evidence that ChREBP constitutes a key driver in HCC initiation and development.

ChREBP tumors cluster human HCC subclasses with poor prognosis signatures. To identify the early events by which enhanced ChREBP transcriptional activity favor HCC development, bioinformatic analysis of transcriptomic datasets from liver overexpressing ChREBP for 3 weeks (pre-tumoral model) and from ChREBP tumors was then performed. This allowed the identification of a specific signature, including 324 genes shared between the two models, that may explain the primary oncogenic role of ChREBP in the liver (Supplementary Figure 1d). These genes are specifically involved in cell proliferation, cell cycle, cell division or metabolic processes, all known markers of HCC (Figure 2i and Supplementary Figure 1e). Accordingly, GSEA analysis revealed an enrichment in gene signatures specific for HCC subclasses previously associated with a proliferative and invasive phenotype together with a worse outcome (Figure 2j and Supplementary Table 5). In addition, we found a significant enrichment in tumor signatures associated with invasion, stemness and poor prognostic features (Figure 2j and Supplementary Table 5). Finally, the expression of genes known to be associated with HCC with poor prognosis in human as well as the expression of fetal genes that signed undifferentiated tumors, were also significantly induced

in all ChREBP tumors (Supplementary Figure 1f). As a result, ChREBP-mediated HCC initiation and progression correlated with lower mice survival rate (Figure 2k). Taken together, our results demonstrate for the first time that ChREBP acts as an oncogene to promote HCC initiation and development. Furthermore, the genomic profiles of these ChREBP tumors recapitulate those of proliferative subclass of human HCC with a poor clinical outcome.

The induction of the regulatory subunit p85α of the PI3K drives the stimulatory effects of ChREBP on PI3K/AKT signaling and hepatocyte proliferation. Additional bioinformatic analysis identified the IR / IGF1 receptor-mediated regulation of the pro-oncogenic PI3K/AKT signaling as the most affected pathway in ChREBP tumors (Supplementary Figure 2a and Supplementary Tables 6 and 7). Western blot analysis and immunostaining of liver sections validated that ChREBP overexpression enhanced the PI3K/AKT signaling in our pre-tumoral and tumoral models (Figure 3a and Supplementary Figures 2b and c). Therefore, to determine whether enhanced ChREBP activity drives hepatocyte proliferation in a PI3K/AKT-dependent manner, we conducted experiments using the selective PI3K inhibitor wortmannin (Wort) in mice overexpressing ChREBP in the liver for 3 weeks. We observed that the effect of ChREBP on hepatocyte proliferation was totally blunted when the PI3K/AKT signaling was inhibited by wortmannin (Figure 3b). In this setting, ChREBP overexpression was no longer able to enhance the expression of cell cycle genes (Figure 3b and Supplementary Figure 2d) and as a consequence cell proliferation (Figure 3c). In the same line of evidence, wortmannin treatment, also significantly impaired the capacity of ChREBP, stably overexpressed in HepG2 and Huh7 hepatoma cell lines, to increase the PI3K/AKT signaling and consequently cell proliferation *in vitro* (Figures 3d-f and Supplementary Figures 2e-g). We next addressed whether the expression of direct modulators of the PI3K/AKT signaling, shown to drive tumor growth in cancer, could be directly controlled by ChREBP. ChREBP ChIP-sequencing experiment, performed in primary cultured hepatocytes, led to the identification of 18,746 ChREBP binding sites, which about half of them (48.95%) are found within the genes (Supplementary Figure 2h). These binding sites are enriched in the close vicinity region of the transcription start site (TSS) of 3826 potential ChREBP target genes (Supplementary Figure 2i). Among them, 1367 were also H3K4me3 and RNA-polII positive, suggesting that they were either “poised” for transcription or transcriptionally active (Supplementary Figure 2j). Furthermore, for genes enriched in the top 1000 intervals, the insulin signaling pathway was among the top 3 pathways with

significant numbers of genes exhibiting ChREBP binding (Supplementary Figures 2k and l and Supplementary Table 8). Interestingly, among the direct modulators of the PI3K/AKT signaling previously described to play an important role in cancer development, only *Pik3r1*, which encodes the p85α regulatory subunit of the PI3K (Figure 3g), was identified as potential ChREBP regulated gene (Figure 3h). We confirmed that ChREBP was functionally recruited to the promoter of *Pik3r1* gene in response to high glucose concentrations in primary cultured hepatocytes (Supplementary Figure 2m). As a result, p85α expression was increased in response to high glucose and this effect was abolished upon ChREBP silencing (Supplementary Figure 2n). Further supporting a direct role of ChREBP in the control of *Pik3r1* gene transcription, transient overexpression of ChREBP (WT ChREBP) in HEK293 cells increased the transcriptional activity of a 2.5kb *Pik3r1* promoter reporter construct whereas this effect was abolished when of a dominant negative form of ChREBP (DN ChREBP) was co-overexpressed (Figure 3i). In agreement, ChREBP recruitment to the promoter of *Pik3r1* was enhanced in ChREBP tumors (Figure 3j), which led to increased p85α expression in these tumors (Figure 3k). P85α expression was also significantly increased in our pre-tumoral model when ChREBP is overexpressed for 3 weeks in the liver of C57BL6/J mice (Supplementary Figure 2o). Importantly, *Pik3r1* gene silencing by CRISPR/Cas9 in ChREBP overexpressing Huh7 cells abolished PI3K/AKT signaling activation and hepatocyte proliferation (Figures 3l-n and Supplementary Figure 2p). Moreover, inhibiting p85α through a shRNA strategy blunted ChREBP-mediated hepatocyte proliferation *in vivo* when ChREBP is overexpressed for 3 weeks in the liver (Figures 3o and p and Supplementary Figure 2q). Altogether, these results demonstrate that ChREBP-mediated regulation of *Pik3r1* expression drives the development and/or progression of HCC at least in part *via* enhancing the PI3K/AKT signaling in the liver.

ChREBP favors *de novo* monounsaturated fatty acids synthesis to sustain tumor growth. Gene ontology analysis, performed on our transcriptomic and ChIP-seq datasets, further indicated that ChREBP activation affected the expression of genes involved in glycolysis, pentose phosphate shunt (PPP), lipid synthesis, glutamine and pyrimidine metabolism (Figure 4a and Supplementary Figure 2l). Accordingly, we observed that glucose uptake was greatly potentiated in the liver of ChREBP overexpressing mice (Figure 4b) and correlated with an increase in *slc2a2* (GLUT2) and *slc2a3* (GLUT3) gene expression (Supplementary Figure 3a). In addition, the expression of key glycolytic enzymes including *hk2*, *gpi*, *pfk*, *aldoa* or

pkm2 was potentiated in ChREBP tumors (Figure 4c and Supplementary Figure 3a). However, despite the increase in glucose uptake and subsequent activation of glycolysis, the concentration of all glycolytic intermediates was reduced in these tumors (Figure 4d), suggesting that these substrates were rapidly consumed in response to ChREBP-mediated activation of glucose metabolism. Intriguingly however, mitochondrial oxidation of ^{14}C-labelled glucose or $^{14}C_1$-labelled pyruvate was also reduced (Supplementary Figure 3b) despite increased in expression and activity of both pyruvate dehydrogenase (PDH) and pyruvate carboxylase (PC) in ChREBP tumors (Supplementary Figures 3c and d). This led to the hypothesis that glucose metabolism of ChREBP tumors is rerouted away from oxidation to feed specific anabolic pathways required for cell proliferation. Supporting this hypothesis, we observed that ^{14}C-labelled glucose was redirected towards enhanced *de novo* lipid synthesis in ChREBP tumors (Figure 4e). At the molecular level, ChREBP was functionally recruited to the promoter of key lipogenic genes such as ACC, FAS or SCD1 (Figure 4f and Supplementary Figure 3e), to increase their expression in tumors (Figure 4g and Supplementary Figure 3a). As a result, proliferating tumors had distinct lipid profiles compared to their corresponding non tumoral control group (Supplementary Figure 4). A significant increase in the ratio of monounsaturated fatty acid (MUFA) in triglycerides (TGs) and all species of phospholipids (PLs) was observed in ChREBP tumors (Supplementary Figures 4a-z), which is consistent with enhanced *de novo* lipogenesis and desaturation of lipid species by SCD1 (Figures 4g and h). Considering the lipid-related pathways, MUFA-PLs were positively correlated with the expression of lipogenic genes and with levels of metabolites involved in PLs synthesis such as CDP-choline (Supplementary Figure 4f). Our data suggest that proliferation of ChREBP overexpressing hepatocytes is linked to increase *de novo* lipogenesis and increased SCD-mediated desaturation of fatty acids. This has the net result of increasing the MUFA pool, and MUFA-PLs in particular, which may be a common event in HCC development by participating to membrane lipid diversity. In agreement, the FAS inhibitor orlistat impaired the capacity of ChREBP, stably overexpressed by CRISPR/Cas9 in SNU-449 and SNU-475 HCC cell lines (Supplementary Figure 3f), to increase cell proliferation whereas oleate supplementation was able to rescue this inhibition (Figures 4i and j and Supplementary Figures 3g and h).

Rewiring of glucose metabolism into the PPP also contributes to ChREBP pro-proliferative effects. In addition to serve as a precursor for lipid synthesis, we observed that ^{14}C-labelled glucose is also redirected towards enhanced *de novo* nucleotides synthesis in

ChREBP tumors (Figure 4k). Supporting this observation, ChIP-seq analysis revealed that ChREBP is functionally recruited to the promoter of the G6PDH, PGD, TKT and RPIA (Supplementary Figure 3i). Accordingly, we observed that the recruitment of ChREBP to the promoter of these PPP genes was enhanced in ChREBP tumors (Figure 4l) to increase their expression (Figure 4m and Supplementary Figure 3a). Next, to determine the contribution of the PPP in ChREBP pro-proliferative effects, we treated ChREBP overexpressing SNU449 and SNU475 hepatoma cells with the G6PDH competitive inhibitor 6-Aminonicotinamide (6-AN). 6-AN treatment significantly impaired the capacity of ChREBP overexpression to increase SNU-449 and SNU-475 cell proliferation (Figures 4n and o and Supplementary Figures 3j and k). Of note, dNTPs supplementation was able to rescue ChREBP-mediated increase in cell proliferation after 6-AN treatment, supporting the importance of the PPP and nucleotide synthesis in ChREBP pro-proliferative effects (Figure 4o and Supplementary Figure 3k). In humans, the importance of ChREBP in mediating glucose metabolic rewiring was finally confirmed by assessing the expression of metabolic genes in the 8 independent HCC microarray datasets used in this study (Supplementary Table 1). A total of 286 genes, belonging to processes such as glycolysis, PPP, nucleotide synthesis and lipid metabolism and that overlap in our study with newly identified ChREBP-regulated genes were upregulated in tumors compared to non-tumoral adjacent tissue (Supplementary Table 9). Therefore, these data demonstrate that alterations in glycolysis, PPP and *de novo* lipogenesis are consistent across clinical cohorts and reinforce the role of ChREBP in rewiring glucose metabolism in the context of human liver carcinogenesis (Figure 4p).

ChREBP favors tumor growth by redirecting glutamine metabolism into aspartate production. Gene ontology analysis finally revealed that genes involved in the regulation of the "non-essential" amino acid glutamine (Gln) are differentially affected in ChREBP tumors, suggesting that the function of ChREBP may not be restricted to glucose metabolic rewiring (Figure 4a). Accordingly, the expression of key genes involved in Gln handling and processing such as Scl1a5, Gls1 and GOT2 was increased in ChREBP tumors (Figure 5a and Supplementary Figure 5a) along with the concentration of key intermediates of Gln metabolism including N-acetylglutamine, N-acetylglutamate or aspartate (Supplementary Figure 5b). Supporting a role for Gln processing in ChREBP-mediated HCC cell proliferation, SNU-449 and SNU-475 cell lines overexpressing ChREBP were found sensitive to Gln deprivation or GLS inhibition by the 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) (Figure 5b and Supplementary Figure 5c). Interestingly, glutamate (Glu) was able to rescue growth of these

ChREBP overexpressing cells in Gln-free media or upon DON treatment. Glu can be then converted in cancer cells into α-ketoglutarate (α-KG) to fuel the TCA cycle through 3 different reactions: either by the glutamate dehydrogenase (GLUD1), the glutamic-pyruvic transaminase 2 (GPT2) or the glutamic-oxaloacetic transaminase 2 (GOT2) (Supplementary Figure 5d). Surprisingly, despite the fact that many cancer cells rely on GLUD1-mediated Glu deamination to replenish the Krebs cycle, epigallocatechin gallate (EGCG), a GLUD1 inhibitor, had no effect on ChREBP-mediated increased of SNU-449 and SNU-475 proliferation (Figure 5c and Supplementary Figure 5e). Furthermore, the cell permeable dimethyl α-KG did not restore growth upon Gln deprivation. Supporting the observation that processing of Glu by GLUD1 does not mediates ChREBP pro-proliferating effects, Gln oxidation through the TCA cycle was reduced and *de novo* lipogenesis from Gln was not affected in ChREBP tumors (Supplementary Figures 5f and g). Together, these data indicate that ChREBP overexpressing HCC cells metabolize Gln in a different manner than canonical models and that transaminases may be critical in this process. To confirm their importance in mediating ChREBP pro-proliferative effects, SNU-449 and SNU-475 cell overexpressing ChREBP were treated with aminooxyacetate (AOA), a pan transaminase inhibitor. AOA treatment significantly inhibited the growth of ChREBP overexpressing cells (Figure 5d and Supplementary Figure 5h). Interestingly only aspartate (Asp) supplementation, but not alanine (Ala), respectively the output of GOT2 and GPT, was able to rescue ChREBP effect on cell proliferation. At the molecular level, ChIP-seq analysis revealed that ChREBP is functionally recruited to the promoter of GLS1 and GOT2 (Supplementary Figure 5i). These results were validated in ChIP experiments showing enhanced recruitment of ChREBP on GLS1 and GOT2 promoter in ChREBP tumors (Figure 5e). As a result, GSL1 and GOT2 expression were found increased in ChREBP tumors (Figure 5a and Supplementary Figure 5a). Overall, these results report that ChREBP, by directly regulating the expression of GLS1 and GOT2, reroutes Gln metabolism to fuel Asp production in order to support high proliferation rate of HCC cancer cells (Figure 5f).

ChREBP activation orchestrates the convergence of Gln and glucose metabolisms to fuel *de novo* pyrimidine synthesis. Gln not only provides carbon sources for the TCA cycle but also to support anabolic processes. In this context, we speculated that the GOT2-mediated conversion of Glu into Asp may generate nucleotides through *de novo* pyrimidine biosynthesis, Asp being the carbon donor (Supplementary Figure 5j). Interestingly, the

expression of key enzymes involved in *de novo* pyrimidine synthesis such as PRPS2, UMPS, CTPS1, were increased in response to ChREBP overexpression (Figures 5g and h). At the molecular level, ChIP-seq experiment and ChIP-qPCR validation in ChREBP tumors revealed that ChREBP is recruited to the promoter of UMPS and CTPS1 (Figure 5i and Supplementary Figure S5k). Accordingly, the abundance of key intermediates of *de novo* pyrimidine synthesis was increased in ChREBP tumors (Supplementary Figure 5l). In addition, the abundance of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP), a metabolite linking the PPP with the upstream steps of pyrimidine synthesis, was also increased in ChREBP tumors (Supplementary Figure 5l). As a result, *de novo* nucleotide synthesis from ^{14}C-labelled Gln or ^{14}C-labelled Asp was enhanced in these tumors (Figure 6j). Consistently, dCTP and dTTP pyrimidine pools, measured by HPLC, are increased in ChREBP tumors (Supplementary Figure 5m). The importance of pyrimidine synthesis in ChREBP action was also reinforced by the fact that dNTPs supplementation was able to rescue ChREBP-mediated increased in cell proliferation after AOA treatment (Figure 5k and Supplementary Figure 5n). Finally, these newly identified ChREBP target genes (GLS1, GOT2, UMPS and CTPS1) have their expression upregulated along with ChREBP across the 8 human datasets used in this study (Supplementary Table 9). Altogether, these data demonstrate that alteration in glutamine metabolism and pyrimidine synthesis are consistent across HCC clinical cohorts and strengthen the role of ChREBP in rewiring glutamine metabolism during human liver carcinogenesis (Figure 5l).

Targeting ChREBP represents an innovative and promising strategy for HCC treatment. Because these data demonstrate that ChREBP serves as a molecular link between growth signals and acute control over HCC cell energy metabolism, the importance of ChREBP as a potential target for pharmacological intervention, was then analyzed in the TCGA - LIHC dataset, by assessing the correlation between ChREBP expression with deregulation of the canonical PI3K, glycolysis, PPP, lipogenesis, glutaminolysis and pyrimidine synthesis pathways. Alterations in these canonical pathways were defined by the genetic alterations (activating or inactivating events) of their pathway members. If one or more genes in these pathways contained a recurrent or known driver alteration, the tumor was considered as altered. Consistently, the PI3K, glycolysis, PPP, lipogenesis, glutaminolysis and pyrimidine synthesis pathways are notably altered in human HCC tumors (Figure 6a). Importantly, ChREBP mRNA levels were significantly increased among HCC tumors harboring alterations in these pathways (Figure 6a), suggesting that targeting ChREBP might

provide invaluable chemical probes and potential anti-cancer therapeutics. To test this hypothesis, ChREBP expression was first stably inhibited in SNU-475, Huh7 and BNL CL.2 cell lines. For these 3 cell lines, ChREBP silencing significantly reduced cell proliferation *in vitro* and also suppressed xenograft tumor growth *in vivo* (Figures 6b-e and Supplementary Figures 6a-h). Interestingly, inhibiting ChREBP expression in Huh7 cells, deficient for the tumor suppressor PTEN, also resulted in the reduction of cell proliferation and xenograft tumor development despite sustained activation of the PI3K/AKT signaling (Supplementary Figures 6i-k). This further highlights the potential therapeutic benefit of targeting ChREBP during cancer treatment when classical canonical oncogenic pathways are altered in HCC. Then, to evaluate whether ChREBP was mandatory for PI3K/AKT-mediated induction of hepatocarcinogenesis, myr-AKT1 was stably overexpressed in the liver of wild-type (WT) or ChREBP knockout mice (ChREBP KO) with the use of the sleeping beauty (SB) transposon system. As a result, overexpression of myr-AKT1 was sufficient to induce HCC development in WT mice between 3 and 6 months (Figures 6f and g). However, no macroscopic tumor development was observed in ChREBP KO mice at 3 months and only scattered liver preneoplastic lesions were detected at 6 months (Figures 6f and g). In fact, only 14.8% of ChREBP KO mice overexpressing myr-AKT1 developed small adenomas in contrast to WT mice that all developed HCC. Consequently, ChREBP deficiency improved the overall survival rate of myr-AKT1 overexpressing mice (Figure 6h).

The ChREBP pharmacological inhibitor SBI-993 effectively suppresses cell proliferation and tumor development. To investigate the potential benefit of inhibiting ChREBP activity during HCC development, we took advantage of the small-molecule probe SBI-993, recently identified as a potent inhibitor of ChREBP activity in hepatocyte [23]. We first showed that SBI-993 treatment inhibited ChREBP nuclear translocation, ChREBP activity and consequently the glucose-mediated induction of its target genes (Supplementary Figure 6l-n). This effect of SBI-993 was specific to ChREBP since it was lost in ChREBP KO hepatocytes (Supplementary Figure 6n). More importantly, SBI-993 significantly reduced SNU-449 cell proliferation in a dose-dependent manner without inducing cell apoptosis when used up to 300 μM (Supplementary Figures 6o and p). Supporting the hypothesis that pharmacological inhibition of ChREBP activity is of interest for cancer treatment, SBI-993 significantly reduced SNU-475, Huh7 and BNL CL.2 cell proliferation and xenograft tumor development when nude mice were treated daily with 50 mg/kg of SBI-993 for 3 consecutive weeks (Figures 6i-k and Supplementary Figures 6q and r). In the same line of evidence, daily

injection of SBI-993 at 50 mg/kg for 3 weeks, inhibited ChREBP transcriptional activity when this transcription factor was overexpressed through adenoviral gene delivery in the liver of WT mice (Figure 6l). In this context, SBI-993 abolished the induction of all identified pro-oncogenic ChREBP target genes and as a consequence impaired ChREBP pro-proliferative effect (Figures 6m and n). Importantly, 3 weeks challenge with SBI-993 at 50 mg/kg, IP administered daily for toxicology analysis, revealed apparent good tolerability, as illustrated by normal complete blood count and differential, normal blood chemistry and normal kidney or liver function (Supplementary Table 10). Altogether, these findings highlight the potential of ChREBP small-molecule inhibitors, and more specifically SBI-993, as chemical probes and possible anti-cancer therapeutics with good tolerability.

ChREBP expression is inversely correlated with HCC sensitivity to sorafenib and its inhibition by SBI-993 reverses this drug resistance. Drug resistance is an additional important factor that determines poor prognosis of HCC patients. While sorafenib is the gold standard chemotherapeutic drug for treating advanced stage HCC patients, its efficacy is severely affected by drug resistance. Sorafenib resistance has been particularly attributed to aberrant PI3K/AKT signaling. Because ChREBP-mediated HCC development involves enhanced PI3K/AKT signaling in a p85α dependent-manner, the correlation between ChREBP and p85α expression with sorafenib resistance was analyzed from the publicly available dataset GSE109211 [24]. The expression of ChREBP and p85α was significantly increased in non-responder (sorafenib-resistant) compared to responder (sorafenib-sensitive) patients (Figure 7a and Supplementary Table 11). Furthermore, the expression of genes previously associated to sorafenib resistance in human, was enhanced in ChREBP tumors (Figure 7b), suggesting that upregulation of ChREBP activity may also account for sorafenib resistance. Accordingly, SNU-475 and SNU-449 cell lines overexpressing ChREBP are resistant to sorafenib-induced cell apoptosis (Figure 7c). Additionally, an *in vitro* model that recapitulates sorafenib resistance was used to investigate the role of ChREBP in this process. Thus, 8 months treatment of parental SK-Hep1 HCC cells with increased concentration of sorafenib generated SK-Hep1-SR resistant clones against sorafenib mediated cell-induced apoptosis (Figure 7d-f). Interestingly, resistance against cell apoptosis of SK-Hep1-SR cells was correlated with increased ChREBP and p85α expression and with enhanced PI3K/AKT signaling (Figure 7g). However, stable inhibition of ChREBP expression in SK-Hep1-SR cells, through CrispR/Cas9, reversed this resistance against sorafenib-mediated cell apoptosis.

This effect paralleled with reduced p85α expression and PI3K/AKT signaling (Figures 7e-g). Altogether, these results demonstrate that ChREBP expression correlates with drug resistance in HCC patients and that inhibition of ChREBP activity results in enhanced sensitivity against chemotherapy treatment. To challenge this hypothesis, the efficacity of SBI-993 as a potential adjuvant for sorafenib treatment was tested in SNU-475 and Huh7 cell lines. In these 2 cell lines, SBI-993 treatment significantly reduced the expression of p85α and of PI3K/AKT signaling (Figures 7h and k). More importantly, SBI-993 treatment potentiated the pro-apoptotic activity of sorafenib in both SNU-475 and Huh7 cells (Figures 7h-m). Therefore, our results identify ChREBP as a valuable indicator of sorafenib responsiveness and a useful marker for the clinical identification of patients who would benefit from sorafenib treatment.

Discussion

Targeting specific metabolic pathways whose activity is required for tumor growth is an emerging therapeutic approach in experimental and clinical oncology. To support their unrelenting cell division associated with uncontrolled oncogenic signaling pathways, most cancer cells have to cope with specific metabolic adaptations in order to promote their survival. In particular, emerging evidence suggests that aberrant glycolysis, *de novo* lipogenesis, pentose phosphate shunt, glutaminolysis and *de novo* pyrimidine biosynthesis act as critical supporters for malignant transformation [2,3,25]. Thus, the identification of genes whose properties sustain cancer growth by controlling cell metabolic fitness is of prime importance for the development of novel, specific, and effective antineoplastic therapies. In this scenario, ChREBP appears as a potential driver of cancer development, as it represents a central regulator of metabolism in various cell types in response to environmental and hormonal stimuli [26]. However, these studies have underscored the multifaceted role of ChREBP in controlling HCC initiation and development. The current study provides the first evidence that ChREBP represents a new oncogene in liver cancers. The human relevance of ChREBP oncogenic function is further reinforced by the observation that ChREBP activity is enhanced in HCC from multiple patient datasets, especially in tumors characterized by an unfavorable outcome. Importantly, our data reveals that ChREBP represents a new molecular biomarker that negatively predicts chemotherapy responsiveness during HCC treatment.

At the molecular level, we provide evidence that ChREBP is required for appropriate reprogramming of cellular glucose and glutamine metabolism in order to support HCC tumor growth. We report that ChREBP coordinates glucose sensing with glutamine utilization and subsequent downstream biosynthetic pathways to sustain tumor growth. ChREBP downstream metabolic effectors identified in this study first include those involved in *de novo* lipid biosynthesis and fatty acid desaturation. Interestingly, since the inhibition of enzymes involved in these metabolic processes attenuates cancer cell growth, targeting lipid metabolism is increasingly attracting for therapeutic strategy in HCC treatment [27]. Our study is in accordance with this concept since ChREBP overexpressing tumors reroute glucose carbons toward lipid synthesis with a specific enrichment of MUFA in all classes of phospholipids. This increase in MUFA may confer several advantages to highly proliferative cancer cells where ChREBP activity is enhanced [28]. One such advantage would be to prevent saturated fatty acid accumulation from increased lipogenesis, which could trigger otherwise apoptotic signaling pathways [27]. Furthermore, MUFA-PLs have been also reported to increase

membrane fluidity in several cancer types, resulting in enhanced activation of specific oncogenic signaling pathways to sustain tumor growth [29]. Our study reinforces the concept that changes in the abundance of multiple lipid metabolic genes, in response to ChREBP activation, are associated with the development and progression of HCC.

In addition to the regulation of fatty acid synthesis, our study also demonstrates that ChREBP coordinates glucose and glutamine utilization to support *de novo* nucleotides synthesis in HCC. In this process, ChREBP activation, by directly regulating the expression of key enzymes of the PPP, first reroutes glucose metabolic fluxes to sustain *de novo* nucleotides synthesis. These observations are particularly important since alterations in the PPP play an important role in metabolic reprogramming and survival of several cancer types, particularly in HCC where the expression of all of these PPP enzymes is often increased [30]. This pro-proliferative effect is mainly mediated through the production of ribose 5-phosphate (R5P) and its subsequent transformation into PRPP which in turn is used as a precursor for nucleotide production [31]. In this context, while ChREBP's connection with, and dependency upon enhanced pentose phosphate shunt was previously suggested, one important observation of our work was to identify ChREBP as a major player of glutaminolysis and *de novo* pyrimidine biosynthesis [32]. Our study describes that ChREBP-driven HCC cancer cells also depend on glutamine metabolism for proliferation. ChREBP activation, through the direct transcriptional regulation of GLS1, GOT2, CTPS1 and UMPS, facilitates the conversion of glutamine to glutamate, leading preferentially to cytosolic conversion of aspartate into N-carbamoylaspartate to serve as substrate with PRPP for pyrimidine synthesis. Collectively, our data describe a unique metabolic circuitry under the control of ChREBP that maintains nucleotide biosynthesis to support HCC development. Interestingly, in a context of therapeutic treatment, individual inhibition of these newly identified ChREBP target genes were shown to impact pyrimidine synthesis and cancer development [33]. In this context, our data highlight that ChREBP inhibition is an interesting approach to inhibit nucleotide synthesis in proliferating cancer cells.

This specific reprogramming of glucose and glutamine metabolism under the control of ChREBP seems to involve a shared and limited set of pathways that commonly support tumor growth. Interestingly, it has been proposed that these metabolic modifications not only support cancer cells survival and proliferation but also interact with oncogenic signaling pathways such as the PI3K/AKT signaling, to enhance the invasive and metastatic properties

of cancer cells [34]. In this line of evidence, pathway screening also identifies the PI3K/AKT cascade as the major downstream signaling mechanism underlying the oncogenic effect of ChREBP in HCC initiation and development. Ectopic expression of ChREBP markedly activated the PI3K/AKT pathway in a mechanism that relies on the transcriptional control of PIK3R1, which encodes the regulatory subunit p85α of the class 1A PI3K [35]. Recent studies have suggested that p85α acts as an oncogene, since mutations in the inter-Src homology-2 (iSH2) domain of p85α isoform are frequently detected in colon and primary endometrial cancers [36-38]. Furthermore, the expression of PIK3R1 is also significantly increased during HCC development, thus facilitating cell proliferation and migration in a PI3K/AKT dependent manner [39,40]. Consequently, controlling p85α expression may overcome such activation of the PI3K/AKT signaling during cancer development. Supporting this hypothesis, inhibiting PIK3R1 expression in ChREBP tumors abolished ChREBP-mediated increase in PI3K/AKT signaling and cell proliferation. As a consequence, inhibition of ChREBP transcriptional activity might be very effective in combinatorial treatments with PI3K inhibitors to achieve synergistic effect in treating such PI3K/AKT activated tumors.

Overall, ChREBP appears at the crossroads of many important biological pathways and processes involved in neoplastic cell growth and proliferation. Our study demonstrates that ChREBP serves as a molecular link between growth signals (PI3K/AKT signaling) and acute control over determinant intertwined metabolic pathways (Figure 7N). The fact that ChREBP activation is an important feature of hepatic cancer cell proliferation and survival, thus provides a unique opportunity for the development of new therapeutics for HCC treatment. Interestingly, recent strategies have emerged to inhibit ChREBP function. One strategy directed toward interrupting ChREBP-importin α complex stabilization, and consequently blocking ChREBP function, has been developed by the group of Professor Uyeda [41]. Similarly, a potent stabilizer of the interaction between the 14-3-3 protein and ChREBP also proved its efficiency to inhibit ChREBP transcriptional activity [42]. These studies support the feasibility of developing effective and specific inhibitors of ChREBP. However, evidence for *in vivo* efficacy was lacking, in particular in the context of cancer treatment. Our study unravels that SBI-993, with a potent inhibitory effect on ChREBP activity in HCC cells, represents a promising chemical probe with significant *in vivo* anti-tumor potential with good tolerability [23]. Moreover, our study supports the clinical development of ChREBP inhibitors as a therapy for the treatment of human cancers in which ChREBP plays a critical role. Such

inhibitors could also represent important pharmacological tools to overcome classical chemotherapy resistance as we demonstrate that ChREBP represents in HCC a new molecular biomarker that predict sorafenib responsiveness. In this context, SBI-993-mediated ChREBP inhibition, by preventing the activation of oncogenic signaling pathways and compensatory cell metabolic rewiring, is likely to contribute to sensitize cancer cells to chemotherapy treatment. In conclusion, our study proposes that targeting ChREBP activity may serve as anti-neoplastic strategy and as a promising approach to counteract sorafenib resistance during HCC treatment (Figure 7n).

REFERENCES

1 Jindal, A., Thadi, A. & Shailubhai, K. Hepatocellular Carcinoma: Etiology and Current and Future Drugs. *J Clin Exp Hepatol* **9**, 221-232, doi:10.1016/j.jceh.2019.01.004 (2019).

2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).

3 Kato, Y., Maeda, T., Suzuki, A. & Baba, Y. Cancer metabolism: New insights into classic characteristics. *Jpn Dent Sci Rev* **54**, 8-21, doi:10.1016/j.jdsr.2017.08.003 (2018).

4 Luengo, A., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol* **24**, 1161-1180, doi:10.1016/j.chembiol.2017.08.028 (2017).

5 Jang, M., Kim, S. S. & Lee, J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med* **45**, e45, doi:10.1038/emm.2013.85 (2013).

6 Mikawa, T. *et al.* Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci* **72**, 1881-1892, doi:10.1007/s00018-015-1840-3 (2015).

7 Calvisi, D. F. *et al.* Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **140**, 1071-1083, doi:S0016-5085(10)01810-X [pii]
10.1053/j.gastro.2010.12.006 (2011).

8 Kowalik, M. A. *et al.* Metabolic reprogramming identifies the most aggressive lesions at early phases of hepatic carcinogenesis. *Oncotarget* **7**, 32375-32393, doi:10.18632/oncotarget.8632 (2016).

9 Bricambert, J. *et al.* Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* **120**, 4316-4331, doi:41624 [pii]
10.1172/JCI41624 (2012).

10 Bricambert, J. *et al.* The histone demethylase Phf2 acts as a molecular checkpoint to prevent NAFLD progression during obesity. *Nat Commun* **9**, 2092, doi:10.1038/s41467-018-04361-y (2018).

11 Dentin, R. *et al.* Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* **55**, 2159-2170, doi:55/8/2159 [pii]
10.2337/db06-0200 (2006).

12 Dentin, R. *et al.* Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* **279**, 20314-20326, doi:10.1074/jbc.M312475200 (2004).

13 Iizuka, K. Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism. *Endocr J* **60**, 543-555 (2013).

14 Roessler, S. *et al.* A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res* **70**, 10202-10212, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2607 (2010).

15 Kim, J. H. *et al.* Genomic predictors for recurrence patterns of hepatocellular carcinoma: model derivation and validation. *PLoS Med* **11**, e1001770, doi:10.1371/journal.pmed.1001770 (2014).

16 Mah, W. C. *et al.* Methylation profiles reveal distinct subgroup of hepatocellular carcinoma patients with poor prognosis. *PLoS One* **9**, e104158, doi:10.1371/journal.pone.0104158 (2014).

17 Lim, H. Y. *et al.* Prediction of disease-free survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Ann Surg Oncol* **20**, 3747-3753, doi:10.1245/s10434-013-3070-y (2013).

18 Mas, V. R. *et al.* Genes involved in viral carcinogenesis and tumor initiation in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Mol Med* **15**, 85-94, doi:10.2119/molmed.2008.00110 (2009).
19 Wang, Y. H. *et al.* Plasmalemmal Vesicle Associated Protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **14**, 815, doi:10.1186/1471-2407-14-815 (2014).
20 Wurmbach, E. *et al.* Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **45**, 938-947, doi:10.1002/hep.21622 (2007).
21 Schulze, K. *et al.* Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* **47**, 505-511, doi:10.1038/ng.3252 (2015).
22 Hoshida, Y. *et al.* Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**, 1995-2004, doi:10.1056/NEJMoa0804525 (2008).
23 Ahn, B. *et al.* MondoA coordinately regulates skeletal myocyte lipid homeostasis and insulin signaling. *J Clin Invest* **126**, 3567-3579, doi:10.1172/JCI87382 (2016).
24 Pinyol, R. *et al.* Molecular predictors of prevention of recurrence in HCC with sorafenib as adjuvant treatment and prognostic factors in the phase 3 STORM trial. *Gut* **68**, 1065-1075, doi:10.1136/gutjnl-2018-316408 (2019).
25 Phan, L. M., Yeung, S. C. & Lee, M. H. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med* **11**, 1-19, doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001 (2014).
26 Abdul-Wahed, A., Guilmeau, S. & Postic, C. Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metab* **26**, 324-341, doi:10.1016/j.cmet.2017.07.004 (2017).
27 Peck, B. & Schulze, A. Lipid desaturation - the next step in targeting lipogenesis in cancer? *FEBS J* **283**, 2767-2778, doi:10.1111/febs.13681 (2016).
28 Hall, Z. *et al.* Lipid remodelling in hepatocyte proliferation and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, doi:10.1002/hep.31391 (2020).
29 Tutino, V. *et al.* Stearoyl-CoA Desaturase-1 Enzyme Inhibition by Grape Skin Extracts Affects Membrane Fluidity in Human Colon Cancer Cell Lines. *Nutrients* **12**, doi:10.3390/nu12030693 (2020).
30 Kowalik, M. A., Columbano, A. & Perra, A. Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol* **7**, 87, doi:10.3389/fonc.2017.00087 (2017).
31 Villa, E., Ali, E. S., Sahu, U. & Ben-Sahra, I. Cancer Cells Tune the Signaling Pathways to Empower de Novo Synthesis of Nucleotides. *Cancers (Basel)* **11**, doi:10.3390/cancers11050688 (2019).
32 Tong, X., Zhao, F., Mancuso, A., Gruber, J. J. & Thompson, C. B. The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21660-21665, doi:0911316106 [pii] 10.1073/pnas.0911316106 (2009).
33 Akins, N. S., Nielson, T. C. & Le, H. V. Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. *Curr Top Med Chem* **18**, 494-504, doi:10.2174/1568026618666180523111351 (2018).
34 Hirschey, M. D. *et al.* Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **35 Suppl**, S129-S150, doi:10.1016/j.semcancer.2015.10.002 (2015).
35 Khotskaya, Y. B. *et al.* Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther* **173**, 58-66, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.006 (2017).
36 Jaiswal, B. S. *et al.* Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell* **16**, 463-474, doi:10.1016/j.ccr.2009.10.016 (2009).

37 Urick, M. E. *et al.* PIK3R1 (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer Res* **71**, 4061-4067, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0549 (2011).
38 Sun, M., Hillmann, P., Hofmann, B. T., Hart, J. R. & Vogt, P. K. Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85alpha of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15547-15552, doi:10.1073/pnas.1009652107 (2010).
39 Ai, X. *et al.* Overexpression of PIK3R1 promotes hepatocellular carcinoma progression. *Biol Res* **51**, 52, doi:10.1186/s40659-018-0202-7 (2018).
40 He, S., Zhang, J., Zhang, W., Chen, F. & Luo, R. FOXA1 inhibits hepatocellular carcinoma progression by suppressing PIK3R1 expression in male patients. *J Exp Clin Cancer Res* **36**, 175, doi:10.1186/s13046-017-0646-6 (2017).
41 Jung, H. *et al.* The structure of importin alpha and the nuclear localization peptide of ChREBP, and small compound inhibitors of ChREBP-importin alpha interactions. *Biochem J* **477**, 3253-3269, doi:10.1042/BCJ20200520 (2020).
42 Sijbesma, E. *et al.* Structure-based evolution of a promiscuous inhibitor to a selective stabilizer of protein-protein interactions. *Nat Commun* **11**, 3954, doi:10.1038/s41467-020-17741-0 (2020).
43 Bayard, Q. *et al.* Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. *Nat Commun* **9**, 5235, doi:10.1038/s41467-018-07552-9 (2018).
44 Possemato, R. *et al.* Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* **476**, 346-350, doi:10.1038/nature10350 (2011).
45 Chen, X. & Calvisi, D. F. Hydrodynamic transfection for generation of novel mouse models for liver cancer research. *Am J Pathol* **184**, 912-923, doi:10.1016/j.ajpath.2013.12.002 (2014).
46 Iroz, A. *et al.* A Specific ChREBP and PPARalpha Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21 Response. *Cell Rep* **21**, 403-416, doi:10.1016/j.celrep.2017.09.065 (2017).
47 Bruix, J., Boix, L., Sala, M. & Llovet, J. M. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **5**, 215-219, doi:10.1016/s1535-6108(04)00058-3 (2004).
48 Payne, J. & Morris, J. G. Pyruvate carboxylase in Rhodopseudomonas spheroides. *J Gen Microbiol* **59**, 97-101, doi:10.1099/00221287-59-1-97 (1969).
49 Cavard, C. *et al.* Overexpression of regenerating islet-derived 1 alpha and 3 alpha genes in human primary liver tumors with beta-catenin mutations. *Oncogene* **25**, 599-608, doi:10.1038/sj.onc.1208860 (2006).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Research Council (ERC) under the European Union's FP7 research and innovation program (ERC-2013-StG-336629, LIPIDOLIV, R.D), by grants from the French organizations "La Ligue contre le Cancer" (RS14/75-89) and the "Fondation ARC" (SFI20121205630, R.D), by the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (Inserm), by the "Centre National de la Recherche Scientifique" (CNRS), and by the University of Paris. Funders had no role in the design of the study and data collection, analysis and interpretation, or manuscript writing. E.B was supported by a doctoral fellowship from the University of Paris and by the French organization "La Ligue contre le Cancer". J.P was supported by a post-doctoral fellowship from the French organization "La Ligue contre le Cancer". C.B was supported by a post-doctoral fellowship from the European Research Council (ERC-2013-StG-336629, LIPIDOLIV, R.D). We thank the GENOM'IC, HISTIM and IMAG'IC platforms of the Cochin institute (Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS, France) for their help. The authors would like to particularly thank Sébastien Jacques from the Cochin institute GENOM'IC core facility for microarray and bioinformatic analysis. We grateful thank all the members of the Frédéric Bouillaud team (Institut Cochin) for helpful discussion and support of this project. The authors would like to also thank Dr Catherine Postic and Pascale Bossard for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

Author contributions

R.D. and E.B. conceived of the hypothesis and designed the experiments. E.B., B.S., S.T., V.L., J.P., C.B.C., C.P, M.C.A.G., C.P.B., S.G., and R.D. performed the experiments. E.B., S.G., and R.D. analyzed and interpreted the data. E.B. and R.D. wrote the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript

Figure Legends

Figure 1. ChREBP expression is increased in human HCC and signs tumors with poor prognosis. **(a)** Expression levels of ChREBP and ChREBP-regulated genes between normal/adjacent liver tissues and HCC tumors from 8 publicly available datasets (Table S1). **(b)** Expression profile of ChREBP protein content in 12 paired HCC (T) and adjacent non-tumoral tissues (N). **(c)** Heatmap of a 40-HCC gene signature, which classified the patients (n=521) with either poor or better prognosis depending on ChREBP expression in tumors. Black bars on top indicate HCC etiology for each patient when available. **(d)** Data mining of ChREBP gene expression level between HCC (T) and normal liver tissues (N) from the LIHC and LICA-FR Oncomine datasets. **(e)** ChREBP expression in HCC based on individual tumor grade from the LIHC and LICA-FR Oncomine datasets. **(f)** Kaplan–Meier analysis from the LIHC and LICA-FR Oncomine datasets depicting the overall survival rate of patients with low or high ChREBP expression levels within tumors.

Figure 2. ChREBP overexpression promotes HCC initiation and development in mice. **(a-c)** C57BL6/J mice were injected with either GFP or ChREBP overexpressing adenovirus and were studied 3 weeks later. **(a)** ChREBP overexpressing mice exhibit hepatomegaly as shown by the increase in the ratio of liver weight / body weight. **(b)** Staining and quantification of liver sections with BrdU from GFP or ChREBP mice (n = 10 per group). Scale bars = 100 µm. **(c)** Western blot analysis of proteins of the cell cycle (n = 40 per group). **(d)** Bioluminescent imaging depicting tumor development over time after stable ChREBP overexpression (n = 80 mice per group). **(e)** Stepwise development of HCC in ChREBP overexpressing mice (n = 10 per group). **(f)** Staining of liver sections with H&E, oil red O and specific antibodies against HA-tag (ChREBP) from ChREBP overexpressing mice (n = 10 per group). NT, non-tumoral; T, tumor. Scale bar = 5 mm. **(g)** Tumors proliferation index determined by Ki67 immunostaining (n = 10 per group). Scale bar from magnifications of NT and T areas = 20 mm. Quantification is shown in Figure S1C. **(h)** Western blot analysis of proteins of the cell cycle (n = 30 mice per group). **(i)** Top ten enriched biological processes from gene ontology analysis performed from a list of 324 genes differentially expressed in ChREBP tumors (n = 12 per group). **(j)** Heatmap indicating gene-sets significantly affected in ChREBP tumors (n = 5 per group). Full list of significantly enriched gene-sets can be found in Table S5. **(k)** Kaplan-Meier analysis depicting the survival rate of ChREBP overexpressing mice (n = 80 per group). All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using unpaired t-test. *P < 0.01.

Figure 3. p85α drives the stimulatory effects of ChREBP on PI3K/AKT signaling and hepatocyte proliferation. **(a)** Western blot analysis of the activity of the PI3K/AKT signaling in ChREBP tumors (n = 20 per group). **(b and c)** Mice, injected with either GFP or ChREBP overexpressing adenovirus, were daily injected with DMSO or with wortmannin (wort) for 3 weeks. **(b)** Western blot analysis of the PI3K/AKT signaling and proteins of the cell cycle (n = 12 per group). **(c)** Staining of liver sections with BrdU (left panel). Quantification is shown (right panel) (n = 10 per group). Scale bars = 100 μm. **(d-f)** HepG2, stably overexpressing ChREBP, were treated with DMSO or with wortmannin for 24h. **(d)** Western blot analysis of proteins of the PI3K/AKT signaling and cell cycle (n=3). **(e)** Clonogenic assay shown (n=3). **(f)** Cell proliferation index determined by measuring the % of BrdU positive cells (n=3). **(g)** Schematic representation of the role of p85a in controlling PI3K/AKT signaling. **(h)** UCSC genome browser image illustrating normalized tag counts for ChREBP, H3K4me3, H3K9me2 and RNA polII at the *Pik3r1* gene promoter. **(i)** *Pik3r1* promoter activity measured in HEK 293 cells after ChREBP overexpression. A dominant negative form of ChREBP (DN ChREBP) was co-overexpressed to antagonize ChREBP action on *Pik3r1* promoter (n = 3). **(j)** ChIP experiments measuring ChREBP occupancy at the *Pik3r1* promoter in ChREBP tumors (n = 6 per group). **(k)** (Top panel) western blot analysis of p85α protein in ChREBP tumors (n = 12 per group). (Bottom panel) staining of liver sections with p85 α antibody from ChREBP tumors (n = 10 per group). NT, non-tumoral tissue; T, tumors. Scale bar = 5 mm. **(l-n)** P85a was stably inhibited in Huh7 cell line overexpressing ChREBP through Crispr/Cas9. **(l)** Western blot analysis of PI3K/AKT signaling (n =5). **(m)** Clonogenic assays shown (n = 8). **(n)** Cell proliferation index determined by measuring the % of BrdU positive Huh7 cells (n= 5). **(o and p)** P85 α expression was inhibited in the liver of ChREBP overexpressing mice through adenoviral-mediated ShRNA delivery. **(o)** Western blot analysis of PI3K/AKT signaling and cell cycle (n = 12 per group). **(p)** Staining of liver sections with BrdU (top panel). Quantification of the BrdU staining is shown (bottom panel) (n = 12 per group). Scale bars = 100 μm. All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using ANOVA, followed by Bonferonni's test. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

Figure 4. Metabolic rewiring of glucose metabolism participates to ChREBP pro-proliferative effects. **(a)** Top ten enriched metabolic pathways from gene ontology analysis performed from from ChREBP tumors (n = 12 per group). **(b)** Image of liver glucose uptake of ChREBP overexpressing mice with BiGluc probe as described in (Maric et al., 2019) (n=5 per group). **(c)** Western blot analysis of glycolytic enzymes (n = 20 per group). **(d)** Heatmap of

glycolytic, PPP and TCA cycle metabolic intermediates of between NT and T samples (n = 15 per group). **(e)** *De novo* lipid synthesis from ^{14}C-labelled glucose in ChREBP tumors (n=3 per group). **(f)** ChIP experiments measuring ChREBP occupancy at the promoter of ACC, FAS and SCD1 in ChREBP tumors (n = 6 per group). **(g)** Western blot analysis of proteins of the lipogenic pathway (n = 20 per group). (**h)** Measurement of SCD1 activity in ChREBP tumors (n=15 per group). **(i and j)** ChREBP was stably overexpressed in SNU-449 hepatoma cell line by using Crispr/Cas9 approach. Effect of orlistat treatment and oleate rescue on cell proliferation was studied. **(i)** Clonogenic assays (n=7). **(j)** Cell proliferation index from xCELLigence experiment (n=3). **(k)** *De novo* nucleotide synthesis from ^{14}C-labelled glucose in ChREBP tumors (n=3 per group). **(l)** ChIP experiments measuring the occupancy of ChREBP at the promoter of G6PDH, PGD, TKT and RPIA in ChREBP tumors (n = 6 per group). **(m)** Western blot analysis of proteins of the PPP pathway (n = 20 per group). **(n and o)** Effect of 6-AN treatment and dNTPs rescue on ChREBP-mediated increase in hepatocyte proliferation was studied in ChREBP overexpressing SNU-449 hepatoma cells. **(n)** Clonogenic assays shown (n=7). **(o)** Cell proliferation index from xCELLigence experiment (n=3). **(p)** Schematic representation of glucose metabolic rewiring observed in ChREBP tumors. All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using ANOVA, followed by Bonferonni's test. * $P < 0.01$. ** $P < 0.05$.

Figure 5. ChREBP favors tumor growth by channeling glutamine metabolism into *de novo* pyrimidine synthesis. **(a)** Western blot analysis of proteins involved in Gln processing (n = 20 per group). **(b)** Proliferation index of SNU-449 cells overexpressing ChREBP after Gln deprivation or GLS inhibition (n=3). Glutamate (Glu) 4 mM. **(c)** Proliferation index of SNU-449 cells overexpressing ChREBP after GLUD1 inhibition (n=3). Dimethyl-aKG (aKG) 2 mM. **(d)** Proliferation index of SNU-449 cells overexpressing ChREBP after AOA treatment (n=3). Aspartate (Asp) or Alanine (Ala) (0.1 mM). **(e)** ChIP experiment measuring the recruitment of ChREBP on the promoter of GLS1 or GOT2 in ChREBP tumors (T) (n= 10 per group). **(f)** Schematic representation of Gln metabolic rerouting in response to ChREBP activation. **(g)** Expression of genes involved in purine and pyrimidine synthesis (n = 12 per group). **(h)** Western blot analysis of proteins involved in *de novo* pyrimidine synthesis (n = 20 per group). **(i)** ChIP experiment measuring the enrichment of ChREBP on the promoter of UMPS and CTPS1 in ChREBP tumors (T) (n= 10 per group). **(j)** Measurement of *de novo* nucleotide synthesis from ^{14}C-labelled Gln and ^{14}C-labelled Asp in ChREBP tumors (n=3). **(k)** Proliferation index of SNU-449 cells overexpressing ChREBP after dNTPs

supplementation (100mM) and AOA treatment (n=3). **(l)** Illustration of the role of ChREBP in controlling glucose, Gln and Asp metabolism to support *de novo* pyrimidine synthesis. All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using ANOVA, followed by Bonferonni's test. * $P < 0.01$. ** $P < 0.05$.

Figure 6. ChREBP represents a promising target for HCC treatment. **(a)** In the TCGA-LIHC cohort, correlation of ChREBP expression between tumors with or without alterations in PI3K/AKT pathway, glycolysis, PPP, lipogenesis, glutaminolysis and pyrimidine synthesis. Upper panel displays alteration frequencies of the canonical pathways. Bottom panel demonstrates that HCC tissues carrying alteration of these pathways exhibited higher ChREBP expression levels. **(b)** Western blot analysis of cell cycle proteins in SNU-475 cells in which ChREBP expression was stably inhibiting by Crispr/Cas9 (n=3). **(c)** Proliferation index of ChREBP deficient SNU-475 cells (n=3). **(d)** Clonogenic assays from ChREBP deficient cells (n =7). **(e)** Xenograft mouse model using parental and ChREBP deficient SNU-475 cells. Image of xenograft tumor (left) and tumor weight (right) shown at 3 weeks (n = 10). **(f)** Bioluminescence imaging of HCC development 6 months after stable overexpression of Myr-Akt1 in the liver of either WT or ChREBP KO mice (n = 15 per group). **(g)** Macroscopic images of HCC of 6-months old WT or ChREBP KO mice overexpressing Myr-Akt1 (n = 15 per group). **(h)** Survival rate of WT or ChREBP KO mice overexpressing Myr-Akt1 (n = 15 per group). **(i)** Western blot analysis of cell cycle proteins in SNU-475 cells treated with 40 mM of SBI-993 for 24h (n=3). **(j)** Proliferation index and clonogenic assays of SNU-475 hepatoma cells treated with SBI-993 (n=5). **(k)** Xenograft mouse models of HCC were established in nude mice using parental SNU-475, Huh7 and BNL CL2 cells. After subcutaneous inoculation, mice were daily IP injected with either DMSO or SBI-993 (50mg/kg) for 3 consecutive weeks. Xenograft tumor weight shown at 3 weeks (n = 10 mice per group). **(l-n)** C57Bl6/J mice, infected with either GFP or ChREBP overexpressing adenovirus, were daily IP injected with either DMSO or SBI-993 (50mg/kg) for 3 consecutive weeks. **(l)** ChREBP transcriptional activity on Chore-luc reporter construct (n=6). **(m)** Expression of ChREBP-regulated genes from mice treated with SBI-993 in the form of an heatmap (n=12). **(n)** Staining of liver sections with BrdU (left panel). Quantification of the BrdU staining (right panel) (n = 12 per group). Scale bars = 100 μm. All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using unpaired t-test. *$P < 0.01$. **$P < 0.05$.

Figure 7. ChREBP participates to sorafenib resistance. **(a)** Data mining of ChREBP and *pik3r1* gene expression level between sorafenib responder and non-responder patients from the dataset GSE109211. **(b)** Expression of genes associated with sorafenib resistance, in the form of an heatmap, in responder and non-responder patients and in ChREBP tumors (T) compared to non-tumoral tissues (NT). **(c)** Caspase 3/7 activity measured in SNU-475 (left panel) and SNU-449 (right panel) cell lines overexpressing ChREBP in response to 15 mM sorafenib treatment for 24h (n=3). **(d)** Parental SK-Hep1 cells and sorafenib-resistant clones (SK-Hep1-SR) were incubated for 24h with various concentrations of sorafenib. CCK8 assay was used to test cell viability (n=3). **(e-g)** ChREBP expression was stably inhibited in SK-Hep1-SR cells. **(e)** Western blot analysis of caspase 3 and PARP processing in response to 15 mM sorafenib treatment for 24h (n=3). **(f)** Caspase 3/7 activity measured in SK-Hep1 and SK-Hep1-SR in response to 15 mM sorafenib treatment for 24h (n=3). **(g)** Western blot analysis of PI3K/AKT signaling in ChREBP deficient SK-Hep1-SR cells (n=3). **(h-m)** SNU-475 and Huh7 cell lines were treated with SBI-993 (40 mM) with or without 15 mM of sorafenib for 24h. **(h and k)** Western blot analysis of PI3K/AKT signaling in SBI-993-treated cells (n=3). **(i and l)** Caspase 3/7 activity measured in SBI-993 and sorafenib treated cells (n=3). **(j and m)** Western blot analysis of caspase 3 and PARP processing in SBI-993 and sorafenib treated cells (n=3). **(n)** Role of ChREBP during HCC initiation and development. ChREBP serves as a molecular link between growth signals (PI3K/AKT signaling) and acute control over determinant intertwined metabolic pathways that are determinant in neoplastic cell growth and proliferation. All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using unpaired t-test (A) or Anova, followed by Bonferonni's test (c, d, f, i and l). *$P < 0.01$.

Supplementary information

Online Methods

Antibodies

The following antibodies were used in this study for either western blotting, ChIP-sequencing, immunohistochemistry and chromatin immunoprecipitation. ChREBP (Novus, NB400-135), SCD1 (Cell Signaling, C12H5), LPK (Abcam, ab6191), ACC (Cell Signaling, 3662), FAS (Cell signaling, C20G5), G6PDH (Cell Signaling, 12263), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, FL-335), PKM2 (Cell Signaling, 4053), GOT1 (Cell Signaling, 344423), G6PDH (Cell Signaling, 8866), GOT2 (Novus Biologicals, NBP1-47469), HK2 (Cell Signaling, 2106), PGD (Novus Biologicals, NBP1-31589), RPIA (Novus Biologicals, NBP1-86214), ATP-Citrate Lyase (Cell Signaling, 4332), SCD1 (Cell Signaling, 2794), SLC1A5 (Novus Biologicals, NBP1-89327), Gls1 (Novus Biologicals, NBP1-89766), Gls2 (Novus Biologicals, NBP1-76544), GPT (Novus Biologicals, NBP1-89111), CAD (Cell Signaling, 11933), P-CAD Pser1859 (Cell Signaling, 12662), UMPS (Novus Biologicals, NBP1-85896), CTPS1 (Novus Biologicals, NBP1-52892), PRPS2 (Novus Biologicals, NBP1-31435), p(S473)-AKT (Cell signaling, D9E), Akt (Cell Signaling, 9272), P-p70S6K (Cell Signaling, 108D2), p70S6K (Cell Signaling, 49D7), p-GSK3β (Cell Signaling, D17D2), GSK3β (Cell Signaling, 27C10), PTEN (Cell Signaling, 9552), PI3 Kinase p85α (Cell Signaling, 13666), Afp (Cell Signaling, 4448), KI67 (Cell Signaling, 9449), Cyclin D1 (Cell Signaling, 2922). Cyclin B1 (Cell Signaling, 4138), Cyclin E (Cell Signaling, 4129), Cyclin A (Cell Signaling, 4656), PCNA (Cell Signaling, 2586), RNA PolII (Santa Cruz, sc899), HSP90 (Cell Signaling, 4874), H3K4me3 (Actif motif, 39915).

Collection of human liver cancer microarray datasets

For this study, 10 published datasets of human liver hepatocellular carcinoma were used. Eight HCC microarray datasets publicly available (Supplementary Table 1) were assembled with ArrayExpress and the Gene Expression Omnibus (GEO) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) [14-21]. mRNA expression and clinical data from 334 HCC tumors from the LIHC dataset and 50 normal control samples were also obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) (http://cancergenome.nih.gov/) and cBioportal for Cancer Genomics (http://www.cbioportal.org/). Main clinical data of this dataset are summarized in Supplementary Table 2 and 3. Finally, a series of 160 hepatocellular carcinoma (HCC)

samples and their non-tumor counterparts (LICA-FR dataset), which were collected from patients surgically treated in four French hospitals located in Bordeaux and Paris region, were also obtained from the TCGA and cBioportal. HCC developed mostly on a non-cirrhotic liver (107/160, 67%): 75 tumors developed in non-fibrotic (METAVIR F0-F1), 32 in chronic hepatitis (F2–F3) and 53 in cirrhotic liver (F4). Clinicopathological data were available for all cases (Table S2 and S4). These 160 samples were analyzed by RNA sequencing and the sequencing data have been published and deposited to the EGA (European Genome-phenome Archive) database (RNA-seq accession [EGAS00001002879]). [43] Overall, 1058 human HCC gene expression profiles were compared with 630 control liver samples (Supplementary Table 1).

Processing and identification of consistently altered genes

To eliminate analytical bias that might arise from data processing, the NCBI GEO2R tool was used to directly determine the differentially expressed genes between healthy or adjacent liver tissue samples with HCC samples in each dataset. Thereafter, the GEO2R outputs were downloaded, and all genes differentially regulated with the cut-off criteria of $P < 0.001$ and log2FC (fold-change) > 1.5 were selected. Then, to identified common altered metabolic gene signature, a previously published list of 2,752 metabolism-annotated genes was used to extract only the deregulated metabolic genes in each of the 10 datasets (Supplementary Table 9) [44]. Furthermore, the average log of fold change (logFC) of all differentially expressed genes as determined by GEO2R was calculated and used as reference to set cutoff threshold values for each dataset. This step ensured the exclusion of metabolic gene probes with very small expression changes. For onward analyses, metabolic genes with þlogFC at or above the cutoff value in the respective datasets were selected as up-regulated, whereas those with –logFC at or below cutoff value were selected as down-regulated. Following these prior steps, a metabolic gene was identified as consistently altered if it has the same expression pattern (ie, exclusively in the up-regulated or down-regulated category) in at least 8 of the 10 HCC datasets.

Kaplan-Meier overall survival analyses

The LIHC and LICA-FR dataset, which were the largest cohort analyzed in this study and which contain recorded clinical data (Supplementary Table 2, 3 and 4), were used for the overall survival analyses. Prior to the study, the expression pattern of ChREBP was confirmed to be the same in LIHC and LICA-FR dataset than described for the 8 other microarrays. To

ensure that the analyzed overall survival can be attributed to a difference in the expression of ChREBP, its expression values were used to rank the patients into lower, intermediate, and higher groups. Subsequently, patients with lower and higher expression values for ChREBP were adopted as a uniform inclusion criterion for survival prediction. Based on this criterion, overall survival was assessed, and Kaplan-Meier overall survival analysis was performed with log-rank (Mantel-Cox) test in GraphPad Prism. A statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

In vivo experiments using mice

All procedures using mice were carried out according to the French guidelines for the care and use of experimental animals (animal authorization agreement number CEEA34.RD.082.12, Paris Descartes Ethical Committee). Mice were maintained in a 12-hr light/dark cycle with water and a standard diet (65% carbohydrate, 11% fat, and 24% protein).

Vector design for sleeping beauty (SB) transposon system

To generate the pT3-EF1a-ChREBP-IRES-Luciferase vector (ChREBP-luc), the pT3-EF1A-MYC-IRES-luc was used as a donor vector. The cloning of ChREBP, with N-terminal HA tag, into the donor vector was performed by In-Fusion cloning (Takara Bio, 638910). The pT3-EF1A-MYC-IRES-luc plasmid was a gift from Amaia Lujambio (Addgene plasmid # 129775). pT3-myr-AKT-HA was a gift from Xin Chen (Addgene plasmid # 31789). The CMV-SB13 transposase plasmid was kindly provided by Dr. Scott Lowe (MSKCC, New York). All constructs were verified by nucleotide sequencing and vector integrity was confirmed by restriction enzyme digestion. Vectors for hydrodynamic delivery were produced using the QIAGEN plasmid PlusMega kit (QIAGEN, 12981). Equivalent DNA concentration between different batches of DNA was confirmed to ensure reproducibility among experiments.

Hydrodynamic injection

Hydrodynamic injection procedures were conducted as previously described [45]. FVB/N mice, obtained from Charles River, were used to determine the pro-oncogenic function of ChREBP in the liver. ChREBP deficient mice, previously characterized in [46], were used to determine the contribution of ChREBP to Myr-Akt mediated HCC initiation and development. For hydrodynamic injection, 10 μg of pT3-EF1a-ChREBP-IRES-Luciferase vector (ChREBP-luc) or pT3-myr-AKT-HA constructs, in a ratio of 1:25 with CMV-SB13 transposase, were diluted

in 2 mL of 0.9% NaCl, filtered, and injected into the penis vein of seven-week-old mice in 5 to 10 seconds. The quality of hydrodynamic injection was evaluated 7 days after the injection by monitoring the presence of appropriate bioluminescent activity in liver of injected mice (Ctrl, ChREBP or Myr-Akt mice). Injected mice were then monitored monthly through measurement of *in vivo* luciferase activity using the PhotonImager system (IVIS Spectrum, PerkinElmer) and the resulting data were analyzed using the Living Image software. Mice were anesthetized with isoflurane and were *ip* injected with 100 mg/kg of sterile firefly D-luciferin (Caliper). After 10 min, mice were imaged on the PhotonImager. The number of mice used in each experiment were selected based on the expected variations between animals and variability in hydrodynamic injection and SB-mediated target gene integration. No method of randomization or blinding was used in any of the experiments. Because two independent "hits" are required for tumor formation in FVB/N or C57BL/6 mice, only the hepatocytes that receive the two plasmids (transposon-based and transposase) will have the potential to form tumors. Therefore, mice that do not overexpressed the luciferase at day 7 were removed from the experimental cohort.

***In vivo* adenovirus injection (pre-tumoral model)**

5 x 10^8 plaque forming units (pfu) of GFP or ChREBP adenovirus (Genecust INC) were delivered to 8 weeks old male C57BL/6J (Janvier, France) by tail vein injection as previously described. [10] To determine the contribution of p85α to ChREBP pro-proliferative effect, p85α was inhibited in ChREBP overexpressing mice through adenoviral delivery of specific shRNA against p85α shRNA (5 x 10^8 pfu/mice) (Genecust INC). Effects of ChREBP overexpression with or without p85α silencing on hepatocyte proliferation were studied 3 weeks later. The number of mice used in each experiment were selected based on the expected variations between animals and variability in adenovirus injections. No method of randomization or blinding was used in any of the experiments. Mice that do not overexpressed GFP or ChREBP or do not exhibited silencing of p85α expression after adenovirus treatment were removed from the experimental cohort.

***In vivo* bioluminescence imaging**

After hydrodynamic injection, tumor development (increase in bioluminescence activity over time) was followed every month for 12 months. For imaging, mice were ip injected with 100 mg/kg of sterile firefly D-luciferin (Caliper). After 10 min, mice were anesthetized with

isoflurane and imaged with a charge coupled device (CCD) camera (IVIS Spectrum, PerkinElmer) and the resulting data were analyzed using the Living Image software. For measurement of ChREBP transcriptional activity *in vivo*, the ChoRE-luc (Carbohydrate response element of the L-pyruvate kinase promoter (ChoRE) luciferase, gift from Dr M. Vasseur) plasmid was overexpressed with the RSV β-galactosidase construct through hydrodymanic gene transfer in the liver of C57BL/6J mice (10 µg/mice) as previously descried above. Mice were studied 48 h after injection. For imaging, mice were ip injected with 100 mg/kg of sterile firefly D-luciferin (Caliper). After 10 min, mice were imaged with the IVIS Spectrum system (PerkinElmer). For *in vivo* measurement of liver glucose uptake, using the BiGluc probe (SwissLumix INC), mice were infected with adenovirus overexpressing the luciferase (5 x 10^8 pfu per mice). Mice were studied 3 weeks later and imaged. Briefly, 24 h before imaging, mice were pretreated with 100 µl of 1.5 mM CLP reagent dissolved in PBS with 0.1% BSA and fasted for 12 h. The next day, mice were given oral gavage with 100 µl of GAz4 reagent in PBS in a dose of 12 mg/kg. The mice were imaged immediately using the IVIS Spectrum system (PerkinElmer) with images acquired every minute for 10 min, continuously. The resulting data were analyzed using the Living Image software.

Mouse xenograft model

A total of 10 × 10^6 cells (HUH7, SNU475, SNU449 or BNL CL.2), suspended in PBS and matrigel (ratio 2:1), were injected subcutaneously into the flank of 6-week-old athymic nude mice. For experiments using SBI-993 (ProbeChem, #PC-61674), mice, inoculated with parental cells, were randomly assigned into two groups: vehicle-treated group (DMSO) and SBI-993-treated group. SBI-993 was dissolved in DMSO. Mice were IP injected with DMSO or SBI-993 (50 mg/kg) daily for 3 to 5 weeks depending on cell line. For each xenograft experiment, tumor width (W) and length (L) were measured each week. The tumor volume was calculated using the following formula: L × W2/2. Mice were then sacrificed, and xenograft tumor weight was also measured.

Hematology and blood chemistry analysis

Mouse peripheral blood was collected by cardiac puncture and placed in serum separator or dipotassium-EDTA tubes (BD Microtainer). Serum and whole blood were analyzed, the latter within 24h after collection, by Charles River Laboratory.

Analytical procedures

Serum ALAT, ASAT, ALP, ALB, Creatin and Bilirubin concentrations were determined using an automated Monarch device (Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Bichat, France).

Tumors histopathological analysis

Liver histopathologic analysis was performed on at least 30 experimental animals by two experienced pathologists on tissue slides stained with H&E in accordance with the criteria by Frith et al [47]. In contrast to hepatocellular tumors that were usually already visible macroscopically as white nodules, preneoplastic lesions showed no expansive growth. Liver lesions were diagnosed as hepatocellular adenomas (HCAs) if: (1.) the acinar morphology was lost; (2.) the lesion showed a normal trabecular pattern; (3.) the lesions displayed no or only mild atypia; (4.) the lesions compressed the adjacent parenchyma (expansive growth). Hepatocellular carcinomas (HCCs) were instead diagnosed if the lesion showed in addition a pseudoglandular or a macrotrabecular pattern with more than three cell layers of trabecular width in at least two different areas or frank signs of malignancy such as large areas of necrosis in combination with severe nuclear atypia, a high mitotic/apoptic rate, and/or vascular invasion. To evaluate liver lipid content, frozen sections were subjected to Oil Red O staining using a standard protocol.

Staining techniques

For histology studies, tissues were fixed in 10 % neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Then, 5 μm liver sections were cut, rehydrated through descending grades of ethanol and stained with hematoxylin eosin (HES) or were subjected to immunohistochemical analysis using antibodies against H&E, ChREBP (HA tag), Afp, Ki67, Akt, P-Akt, GSK3β, P-GSK3β, P70S6K and P-P70S6K according to the manufacturer's instructions. For the detection of neutral lipids, liver cryosections were stained with the Oil Red O technique, using 0.23 % of Oil Red O dye dissolved in 65 % isopropyl alcohol for 10 min as previously described [10]. Hepatocyte proliferation index was also evaluated using antibody against BrdU on liver sections. BrdU (Sigma) was added to the drinking water (1 mg/mL in water) for 7 consecutive days. BrdU was replaced every 3 days.

Metabolite Analysis

GC-MS metabolomic analysis was performed by Metabolon INC from ChREBP overexpressing tumors in comparison with surrounding non-tumoral tissue (15 mice per group). Metabolites were extracted by 80 % methanol at -20°C and dried by vacuum centrifugation. GC-MS analysis was performed with a Waters GCT Premier mass spectrometer fitted with an Agilent 6890 gas chromatograph and a Gerstel MPS2 autosampler. Data were collected using MassLynx 4.1 software (Waters). Metabolites were identified and their peak area was recorded using QuanLynx. Data were normalized for extraction efficiency and analytical variation by mean centering the area of D4-succinate.

Measurement of glucose, pyruvate and glutamine metabolic fluxes

Liver explants from fed GFP or ChREBP mice in addition to ChREBP overexpressing tumors with corresponding non-tumoral surrounding tissues (200 mg) were incubated in duplicate in 25 mL conical glass vial sealed with rubber caps containing plastic center wells in 3 mL of Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (pH 7.4) at 37°C for 2 hours. For glucose metabolism, oxidation, and esterification rates were assayed after incubation with 25 mM of ^{14}C-(U)-D glucose, (Perkin Elmer, #NEC042V250UC). For glutamine metabolism, oxidation, and esterification rates were assayed after incubation with 4 mM of ^{14}C-(U)-L glutamine (Perkin Elmer, #NEC451050UC). For pyruvate metabolism, oxidation, and esterification rates were assayed after incubation with 0.1 mM of ^{14}C-(2)-Pyruvic Acid, Sodium Salt (Perkin Elmer, #NEC256050UC).

$^{14}CO_2$ production measurement

At the end of the incubation time, the media is transferred to a new conical glass vial for CO_2 production measurement and the liver explants are washed three times in ice cold PBS before processing them for lipid extraction and analysis. Perchloric acid is injected into the incubation media through the rubber cap to a final concentration of 4% (v/v). Benzethonium hydroxide is injected through the rubber cap into a plastic well suspended above the incubation media. During 1 hour of vigorous shaking at 25°C, the released [^{1}4C]-CO_2 is trapped by the benzethonium hydroxide. [^{14}C]-CO_2 release is then assessed by scintillation counting.

^{14}C incorporation into intracellular lipids and TAG quantification

Fatty acid esterification rates were measured in the remaining liver piece by tracing newly synthesized triglycerides, DAG or phospholipids from ^{14}C-(U)-D glucose, ^{14}C-(2)-Pyruvic

Acid or ^{14}C-(U)-L glutamine. ^{14}C-TGs, ^{14}C-DAGs and ^{14}C-PLs were extracted using chloroform/methanol (2 : 1, v/v) and separated by thin-layer chromatography (TLC) on silica-gels plates (Merck Chemicals) using petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (85:15:0.5, v/v/v) as the mobile phase. Lipids were visualized with iodine vapor. Bands were scraped and TG, DAG and PLs were counted in scintillation liquid.

Measurement of *de novo* nucleotide synthesis from glucose, glutamine and aspartate

Liver explants from fed GFP or ChREBP mice in addition to ChREBP overexpressing tumors with corresponding non-tumoral surrounding tissues (200 mg) were incubated in duplicate in the presence of either 25 mM of ^{14}C-(U)-D glucose, (Perkin Elmer, #NEC042V250UC), 4 mM of ^{14}C-(U)-L glutamine (Perkin Elmer, #NEC451050UC) or 3mM of ^{14}C-(U)-aspartic acid (Perkin Elmer, #NEC268E050UC) for 2h. After incubation, RNAs were extracted from tissue samples using the RNeasy kit (Qiagen) based on manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using a Nanodrop spectrophotometer. Isolated RNA was added to scintillation vials and radioactivity was measured using a liquid scintillation counter. Data was normalized to total RNA concentration.

Lipidomic analysis

Fatty acid profiling was performed at the lipidomic core facility of Toulouse (INSERM, Metatoul). Briefly, after homogenization of tissue samples in methanol/5 mM EGTA (2:1 v/v), lipids corresponding to an equivalent of 1 mg of tissue were extracted in chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/v/v), in the presence of internal standards: 1,3-dimyristine (for DAG) and glyceryl trinonadecanoate (for TG). Chloroform phases were evaporated to dryness. Neutral lipids were purified over an SPE column (Macherey Nagel glass Chromabond pure silice, 200 mg): after washing cartridge with 2 mL chloroform, lipid extract was applied on the cartridge in 20 µL chloroform, and neutral lipid were eluted with chloroform/methanol (9:1, v/v; 2 mL). The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 20 µL ethyl acetate. A sample (1 µL) of the lipid extract was analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system, using Zebron-1 (Phenomenex) fused silica capillary columns (5 m × 0.32 mm inside diameter [i.d.], 0.50 µm film thickness). Oven temperature was programmed from 200°C to 350°C at a rate of 5°C per minute, and the carrier gas was hydrogen (7.25 psi). The injector and the detector were at 315°C and 345°C, respectively. To assess SCD1 activity, the Δ9 desaturation index was calculated as the abundance of SCD1 products (palmitoleic and oleic acids) relative to both SCD1 products and

substrates (palmitic and stearic acids). Phospholipids profiling was performed by metabolon, Inc. (Durham, North Carolina, USA) from 30 mg of frozen T or NT tissues.

Measurement of Pyruvate Dehydrogenase (PDH) activity

PDH activity was determined by measuring ^{14}C-(1)-Pyruvic Acid oxidation from liver explants of either fed GFP / ChREBP mice or ChREBP overexpressing tumors with corresponding non-tumoral surrounding tissues (200 mg). Liver explants were incubated for 2h in the presence of 0.1 mM of ^{14}C-(1)-Pyruvic Acid, Sodium Salt (Perkin Elmer, #NEC255050UC). At the end of the incubation time, CO_2 release, which reflects the PDH activity, was measured as previously described above.

Measurement of Pyruvate Carboxylase (PC) activity

Liver explants of either fed GFP / ChREBP mice or ChREBP overexpressing tumors with corresponding non-tumoral surrounding tissues (200 mg) were homogenized in lysis buffer containing 100 mM tris-HCl, pH 8. PC activity was then determined as described in [48]. Briefly, the oxaloacetate generated from pyruvate by the action of PC reacts with acetyl-CoA via the citrate synthase (Sigma, # C3260). The free CoA generated by this second step reacts with 5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma, D218200). The reaction product is detected at a wavelength of 412 nm during 10 minutes at 30°C. One unit (U) of pyruvate carboxylase activity is defined as the amount of enzyme required to produce 1.0 µmole of oxaloacetate in one minute.

Culture of primary hepatocytes

Mouse hepatocytes were harvested (from WT or ChREBP KO mice), cultured, and infected with adenoviruses as previously described [10]. Hepatocytes were infected with adenovirus producing specific shRNA against ChREBP (ChREBPi) (1pfu/cell) (GeneCust INC). Twenty-four hours post-infection, hepatocytes were incubated with either 5 or 25 mM glucose and 100 nM insulin for 18 h.

Cell culture

Parental Huh7, HepG2 (ATCC, # HB-8065), SNU-449 (ATCC, # CRL-2234), SNU-475 (ATCC, # CRL-2236), SK-HEP-1 (ATCC, # HTB-52), BNL CL.2 (ATCC, # TIB-73) cell lines were used in this study. Huh7 cells were obtained from Dr. Perret (Cochin Institute, Paris, France) [49]. The Huh7, HepG2, SK-HEP1 and BNL CL.2 hepatoma cell lines were

grown in Dulbecco's Modified Eagle's Glutamax Medium (DMEM Glutamax, glucose 4.5g/l) containing 10% Fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). SNU-449 and SNU-475 cell lines were grown in RPMI 1640 Glutamax Medium containing 10% Fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). Cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. All cell lines are tested in a regulatory basis (every 4 months) to rule out any mycoplasma contamination.

Generation of ChREBP overexpressing or deficient cell lines

ChREBP deficient Huh7, HepG2 and BNL CL.2 cell lines were generated using a specific ChREBP shRNA producing lentivirus. This lentivirus in addition to the control lentivirus (scramble shRNA) were produced by GeneCust (Boynes, France) using PLKO-puro lentiviral plasmid. The target sequence for human ChREBP was 5' GCAGCTCCGTAAGCCCAGCA 3'. Huh7, HepG2 and BNL CL.2 cells were infected with lentivirus and selected for antibiotic resistance with 5 μg/ml of puromycin (Gibco, # A1113802). The efficiency of the ChREBP knockdown was tested by QPCR and western blotting. The human ChREBP SNU-449 and SNU-475 knock-out cell lines were generated by CRISPR/CAS9 approach using the Edit-R predesigned All-in-one lentiviral sgRNA against ChREBP from Horizon Genomics. 3 target sequences were used to generate these 2 cell lines. These target sequences for ChREBP were 5' GCAGCTCCGTAAGCCCAGCA 3', 5' GGCCACCTGCCTTCCGCCTA 3' and 5' ACTTCATGGACATCTCAGGT 3' localized respectively in exon 5, 6 and 7 of the gene. Both SNU-449 and SNU-475 ChREBP specific knockout clones were amplified and selected based on antibiotic resistance with 5 μg/ml of puromycin (Gibco, # A1113802). The efficiency of the ChREBP deletion was tested by western blotting. ChREBP overexpressing SNU-449 and SNU-475 cell lines were generated by the VPR CRISPR activation (CRISPRa) approach from Horizon Genomics using specific lentiviral sgRNA targeting the promoter of ChREBP. These target sequences for the promoter of ChREBP were 5' CAGGTGAGAACCCGGTGCTC 3', 5' GACTCCAAGGAAAGACGGGA 3', 5' CCGCCAGAGCTCCAGAGCAC 3' and 5' CCTTACGCCAGGTGAGAACC 3'. P85α expression was stably deleted in ChREBP overexpressing SNU-449 cell line by CRISPR/CAS9 approach using the Edit-R predesigned All-in-one lentiviral sgRNA against P85α from Horizon Genomics. 3 target sequences were used to generate this cell line. These target sequences for P85α were 5' GTGATTATACTCTTACACTA 3', 5'

AGAATATACCCGCACATCCC 3' and 5' TTGAATTAATAAACCACTAC 3' localized respectively in exon 3, 4 and 5 of the gene.

Cell treatment

The following inhibitors were used in this study with indicated cell lines and culture conditions to determine how ChREBP controls cell proliferation. The PI3K/AKT signaling was inhibited with the PI3K inhibitor wortmannin at 15 μM (Sigma, # 12-338). The FAS inhibitor Orlistat was used at a final concentration of 30 μM (Sigma, # O4139). The G6PDH inhibitor 6-Aminonicotinamide (6AN) was used at 50 μM (Sigma, # A68203). The GLS inhibitor 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) was used at 5 μM (Sigma, #D2141). Cells were also treated with the transaminase inhibitor amino-oxyacetic acid (AOA) at 500 μM (Sigma, # C13408). The GLUD1 inhibitor Epigallocatechin gallate (EGCG) was used at 30 μM (Sigma, # E4143). ChREBP activity was inhibited in indicated cell lines with SBI-477 at the final concentration of 40 μM (ProbeChem, # PC-61673).

Colony formation assay

One hundred cells (HepG2, Huh7, SNU-475, SNU-449) were seeded and cultured into 6-well plates and were allowed to grow for 2 weeks with indicated culture conditions. Colonies were then stained using 1% crystal violet solution (Sigma, V5265). The plates were then air dried and scanned at 590 nm for quantitative analysis.

Assessment of proliferation by impedance measurements

Real-Time Cell Analysis (RTCA) was used for monitoring of cell proliferation using the iCELLigence device (Agilent Technologies, Inc). For each cell line, the optimal cell concentration was determined by serial dilution. For Huh7, HepG2, SNU-449, SNU-475 and BNL CL.2, 12 x 103 cells were seeded into each well of an E-plate L8 of the iCELLigence device. Impedance was monitored every 15 minutes for a period of up to 72 hours. Recorded values were presented as Cell Index (CI) calculated as a relative change in the electrical impedance according to the manufacturer's instructions.

Cell viability assay

Cells viability was assessed by the Cell Counter Kit-8(CCK-8) assay according to the manufacturer's instructions. The absorbance at 450 nm was measured with a microplate

reader. Means of 4 wells optical density (OD) in the indicated groups were used to calculated percentage of cells viability.

Measurement of CASP3/7 activity for apoptosis detection and analysis

Huh7, HepG2, SNU-449, SNU-475, SK-HEP-1 and BNL CL.2 were seeded in 96-well plates for 24 h before being treated with or without sorafenib (30 μM). CASP3/7 activity was then determined by using the Caspase-Glo® 3/7 Glo Assay according to the manufacturer's protocol (Promega). CASP3/7 activity was normalized to the total number of cells per well measured at confluence. Normalized values were related to the average of untreated sample for each cell line.

Reporter assay

The ChoRE-luc (Carbohydrate response element of the L-pyruvate kinase promoter (ChoRE) luciferase, gift from Dr M. Vasseur) was used to measure ChREBP transcriptional activity *in vitro*. The RSV β galactosidase (RSV β-gal) plasmid was used as constitutive control reporter. Hepatocytes were transiently transfected with the appropriate combination of reporters, expression vectors, and control vectors with Lipofectamine 2000® according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, luciferase assays were performed at room temperature. Experimental data are mean of at least 3 independent experiments with luciferase activity normalized to β-galactosidase activity, conducted in triplicate.

ChIP-sequencing.

All the ChIP-Seq experiments were performed using samples collected from primary hepatocytes. ChIP-Sequencing (ChIP-seq) sample preparation and computational analysis of Illumina GA I/II data were performed by Actif Motif INC. Primary hepatocytes were incubated 24 h in the presence of 25 mM glucose and 100 nM insulin and were subjected to standard ChIP, using specific antibodies. ChIP DNA-samples were then subjected to preparation for ChIP-Seq library construction: the libraries were constructed following Illumina's Chip-Seq Sample prep kit. Briefly, Chip DNA was end-blunted and added with an 'A' base so the adaptors from Illumina with a 'T' can ligate on the ends. Then 200 - 400 bp fragments are gel-isolated and purified. The library was amplified by 18 cycles of PCR. Primary analysis of ChIP-Seq data sets: the image analysis and base calling were performed by using Illumina's Genome Analysis pipeline. The sequencing reads were aligned to the

mouse genome UCSC build by using BOWTIE32 alignment programs in two ways: only uniquely aligned reads were kept or both uniquely aligned reads and the sequencing reads that align to repetitive regions were kept for downstream analysis (if a read aligns to multiple genome locations, only one location is arbitrarily chosen). The multiple reads were collapsed in order to reduce the PCR biases. The aligned reads were used for peak/island finding with MACS33. MACS peak/island predictions were adjusted for genome instabilities (amplifications, deletions) either by considering a local background area (MACS) that was used as a reference for the subsequent calculation of the enrichment scores. Annotating and comparing the ChIP-Seq peaks: the ChIP-Seq peaks were mapped on the UCSC genome browser. A peak was considered to be associated with a particular genome feature (for example, promoter, intron and exon) if the peak summit (MACS peaks) was located within 3 kb distance of TSS, or within an exon or intron. If a peak intersected with multiple genome features, all the corresponding genome features were considered when computing the genome distributions. ChREBP peaks were considered common if the predicted peaks intersected over at least 1 bp. The gene ontology analysis was carried out by using DAVID/EASE35 and the sequence motif enrichment analysis was performed by using HOMER. For motif finding, we used MEME Suite with the default settings except that the expected motif site is any repetitions and the find uncentered regions option is selected. Logos of different motifs were generated from MEME-ChIP analysis. We used Regulatory Sequence Analysis Tools to generate the final consensus sequence logo.

Chromatin immunoprecipitation.

For ChIP-seq validation, chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed as described [9]. Briefly, T or NT tissues from SB-mediated ChREBP overexpressing mice were cross-linked with 1 % formaldehyde (Sigma) and chromatin DNA was sheared to 300 - 500 bp average in size through sonication. Resultant was immunoprecipitated with control IgG or specific antibodies overnight at 4 °C and followed by incubation with protein A/G magnetic beads (Ademtech) for an additional 2 h. After washing and elution, the protein–DNA complex was reversed by heating at 65 °C overnight. Immunoprecipitated DNA was purified by using QIAquick spin columns (Qiagen) and analyzed by qPCR using a Roche Light Cycler. Primers used are specific for regions tested and their sequences are available on request. All ChIP were repeated at least three times and representative results were shown. All signals were normalized to input chromatin signals.

RNA profiling.

The microarray experiments and data normalization were performed by the Cochin Institute transcriptomic core facility. Briefly, RNA profiling was performed using Affymetrix GeneChip Human Gene 2.0 ST array, which interrogates 25.000 gene sequences. Raw data were normalized using the Robust Multichip Algorithm (RMA) in Bioconductor R software. Then, all quality controls and statistics were performed using Partek GS software. First, hierarchical clustering (Pearson's dissimilarity and average linkage) and principal composant analysis (PCA) were performed as unsupervised exploratory data analysis. Then, a classical analysis of variance (ANOVA) for each gene and pair wise Tukey's post-hoc tests between groups were conducted to find differentially expressed genes. Finally, p-values and fold changes were used to filter and select differentially expressed genes. Interactions, pathways and functional enrichment analysis were carried out through the use of IPA (Ingenuity Systems, USA www.ingenuity.com) and DAVID/EASE tools (http://david.abcc.ncifcrf.gov/).

Isolation of total RNA and analysis of mRNA expression by quantitative PCR.

Total cellular RNAs from whole liver or from primary cultured hepatocytes were extracted using the RNeasy kit (Qiagen). mRNA levels were then measured as previously described using a Roche Light Cycler [9]. Primer sequences are available on request.

Liver lysates.

Livers samples (T or NT) were frozen in liquid nitrogen and kept at –80°C until use. Mouse tissues were sonicated 3 times for 10 sec each at 4°C in lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 30 mM Sodium pyrophosphate, 30 mM Sodium Fluoride, 1% Triton x 100, and protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO)]. Lysates were centrifuged 16.000 g at 4°C for 20 minutes and supernatants were reserved for protein determination, and SDS PAGE analysis.

Western blotting.

Western blots were carried out as previously described [9]. Revelation and quantification were performed using the Chemidoc MP system instrument (Bio-Rad).

Statistical analyses

Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed with analysis of variance using GraphPad Prism software. Sample sizes (n) were reported in the corresponding figure legend.

All experiments were performed on at least three independent occasions. No statistical method was used to predetermine sample size. After the normal distribution was confirmed with the Kolmogorov–Smirnov test, statistical comparisons between two groups were performed using a student's t test followed by Mann-Whitney post hoc test. Comparisons among multiple parameters were performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc comparisons. We did not estimate variations in the data. The variances are similar between the groups that are being statistically compared. In all cases, P values less than 0.05 were considered significant.

Data availability

The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files are available from the corresponding author upon reasonable request. Microarray analysis can be found at the Gene Expression Omnibus database under accession number GSE159517 and GSE159518.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1. Stable ChREBP overexpression promotes HCC initiation and development in mice. **(a)** Schematic representation of the vectors used for the hydrodynamic injections: PGK/SB13 transposase, pT3/Caggs-luciferase (empty vector / Ctrl) and pT3/Caggs-ChREBP-luciferase (in-one). **(b)** Efficacity of the hydrodynamic injection measured by bioluminescence imaging 7 days post treatment (n = 10 mice per group). **(c)** Quantification of Ki67 immunostaining shown in Figure 2G (n = 10 per group). **(d)** Venn diagram of overlap between genes that are differentially affected in the liver of mice overexpressing ChREBP for 3 weeks and in ChREBP tumors. (n = 12 mice per group). **(e)** 324 genes that were differentially regulated in the liver of mice overexpressing ChREBP for 3 weeks and in ChREBP tumors were subjected to gene ontology enrichment analysis. Pie chart represent stepwise hierarchical tree drill down of significantly enriched terms under the heading biological process. **(f)** Relative expression of genes expressed in poor prognosis HCC measured in ChREBP tumors. (n = 12 per group). All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using unpaired t-test (A) or Anova, followed by Bonferonni's test (L). *P < 0.02 NT vs T, **P < 0.01 NT vs T.

Supplementary Figure 2. p85α drives the stimulatory effects of ChREBP on PI3K/AKT signaling and hepatocyte proliferation. **(a)** Top ten enriched signaling pathways in the liver of GFP or ChREBP overexpressing mice and in ChREBP tumors (n = 12 per group). The list of differentially expressed genes under the term PI3K signaling can be found in Table S7. **(b)** Western blot analysis of the activity of the PI3K/AKT signaling in our pre-tumoral model (n = 20 per group). **(c)** Immuno-staining evaluating levels of AKT, GSK3β and p70S6K phosphorylation in ChREBP tumors (T) compared to non-tumoral tissue (NT) (n = 20 per group). Scale bar = 5 mm. **(d)** Mice, injected with either GFP or ChREBP overexpressing adenovirus, were daily injected with DMSO or with wortmannin (wort) for 3 weeks. Heatmap presenting the expression of cell cycle genes (n = 12 per group). **(e-g)** Huh7 cells, stably overexpressing ChREBP, were treated with DMSO or with wortmannin for 24h. **(e)** Western blot analysis of the activity of the PI3K/AKT signaling and cell cycle (n=3). **(f)** Clonogenic assay shown (n=3). **(g)** Cell proliferation index determined by measuring the % of BrdU positive cells (n=3). **(h)** Genomic distribution of ChREBP peaks after ChIP-sequencing experiments from primary hepatocytes incubated with 100 nM insulin and 25 mM glucose for 24 h. **(i)** Tag density plots displaying ChREBP tags distribution relative to the transcriptional

start site (TSS). **(j)** Venn diagrams showing overlap between ChREBP-bound, RNA polII-bound and H3K4me3-marked promoters. **(k)** Top ten enriched biological processes from gene ontology analysis performed on identified ChREBP-target genes. **(l)** Top enriched pathways for the top 1000 genes with high ChREBP peak intensity within promoters. **(m)** ChIP experiment measuring the recruitment of ChREBP on the promoter of *Pik3r1* in response to glucose in cultured hepatocytes (n = 3). **(n)**. ChREBP expression was inhibited in cultured hepatocytes incubated with 5 or 25 mM glucose and with 100 nM insulin for 24h. Representative western blot of ChREBP and p85 α is shown (n = 3). **(o)** Mice, injected with either GFP or ChREBP overexpressing adenovirus, were studied 3 weeks later. Western blot analysis of p85 α protein content in the liver of ChREBP overexpressing mice (n = 12 per group). **(p)** P85 α expression was stably inhibited, through Crispr/Cas9 approach, in Huh7 cell line overexpressing ChREBP. Cell proliferation was determined by measuring the expression of cell cycle genes (n = 3). **(q)** P85 α expression was inhibited, through adenoviral-mediated shRNA delivery, in the liver of mice overexpressing ChREBP. Expression of cell cycle genes is shown (n = 12 mice per group). All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using Anova, followed by Bonferonni's test. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

Supplementary Figure 3. Metabolic rewiring of glucose metabolism participates to ChREBP pro-proliferative effects. **(a)** Expression of glycolytic, PPP, TCA cycle and lipogenic genes in ChREBP tumors. (n = 12 per group). **(b)** Glucose and pyruvate oxidation rate determined by measuring the production of $^{14}CO_2$ from ^{14}C-glucose or $^{14}C_2$-pyruvate for 4 h (n = 8 mice per group). **(c)** Western blot analysis of PDH and PC protein content in ChREBP tumors (n = 20 mice per group). **(d)** Measurement of PDH and PC activity (n = 10 mice per group). **(e)** UCSC genome browser image illustrating normalized tag counts for ChREBP, H3K4me3 and RNA polII at the promoter of G6PDH, PGD, TKT and RPIA. **(f)** ChREBP was stably overexpressed, through Crispr/Cas9 approach, in SNU-449 and SNU-475 hepatoma cell lines. Representative western blot analysis of ChREBP protein content shown (n = 5). **(g-h)** Effect of 6-AN treatment and dNTPs rescue on ChREBP-mediated increase in hepatocyte proliferation was studied in SNU-475 cell line. **(g)** Representative clonogenic assays shown (n = 7). **(h)** Cell proliferation index from xCELLigence proliferation experiment (n= 3). **(i)** UCSC genome browser image illustrating normalized tag counts for ChREBP, H3K4me3 and RNA polII at the promoter of lipogenic genes. **(j and k)** Effect of orlistat treatment and oleate

rescue on cell proliferation was studied in ChREBP overexpressing SNU-475 hepatoma cell line. **(j)** Representative clonogenic assays shown (n = 7). **(k)** Cell proliferation index from xCELLigence proliferation experiment (n= 3). All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using ANOVA, followed by Bonferonni's test. * $P < 0.01$.

Supplementary Figure 4. (a-e) Heatmap visualization of relative SFA, MUFA, and PUFA content in triglycrides (TG) **(a)** and phospholipid species including phophatidylcholine (PC) **(b)**, phosphatidylethanolamine (PE) **(c)**, phosphatidylserine (PS) **(d)** and cardiolipin (CL) **(e)** in ChREBP tumors (T) compared to non-tumoral tissue (NT). Total content of each lipid species is indicated in the first line of each heatmap (n = 15 per group). **(f)** Heatmap of metabolic intermediates of phospholipid metabolism between NT and T samples (n = 15 mice per group).

Supplementary Figure 5. ChREBP favors tumor growth by channeling glutamine metabolism into *de novo* pyrimidine synthesis. **(a)** Expression of genes involved in Gln metabolism (n = 12 per group). **(b)** Heatmap of metabolic intermediates of Gln metabolism (n = 15 mice per group). **(c)** Proliferation index of SNU-475 cells overexpressing ChREBP after Gln deprivation or GLS inhibition (n= 3). **(d)** Schematic representation of mitochondrial Glu metabolism involving GLUD1, GOT2 and GPT2. **(e)** Proliferation index of SNU-475 cells overexpressing ChREBP after GLUD1 inhibition (n= 3). **(f)** Gln oxidation rate determined by measuring the production of $^{14}CO2$ from ^{14}C-Gln for 4h (n = 6 mice per group). **(g)** Measurement of *de novo* lipid synthesis from ^{14}C-labelled Gln (n=6 mice per group). **(h)** Proliferation index of SNU-475 cells overexpressing ChREBP after AOA treatment (n= 3). **(i)** UCSC genome browser image illustrating normalized tag counts for ChREBP, H3K4me3 and RNA polII at the promoter of GLS1 and GOT2. **(j)** Sketch illustrating how Gln, Asp and glucose are used in the process of *de novo* pyrimidine synthesis, Asp being the carbon donor. **(k)** UCSC genome browser image illustrating normalized tag counts for ChREBP, H3K4me3 and RNA polII at the promoter of UMPS and CTPS1. **(l)** Heatmap of metabolic intermediates of pyrimidine synthesis (n = 15 mice per group). **(m)** dNTP pools measured by HPLC (n = 15 mice per group). **(n)** Proliferation index of SNU-475 cells overexpressing ChREBP after AOA treatment and dNTPs supplementation (n= 3). All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using Anova, followed by Bonferonni's test. * $P < 0.01$.

Supplementary Figure 6. ChREBP represents a promising target for HCC treatment. **(a)** Western blot analysis of cell cycle proteins in Huh7 hepatoma cells in which ChREBP expression was stably inhibiting using lentivirus production shRNA against ChREBP (n=3). **(b)** Proliferation index of ChREBP deficient Huh7 cells (n=3). **(c)** Clonogenic assays from ChREBP deficient Huh7cells shown (n=7). **(d)** Xenograft mouse model of HCC established in nude mice using parental and ChREBP deficient Huh7 cells. Xenograft tumor (left) and tumor weight (right) shown at 3 weeks (n = 10 mice per group). **(e)** Western blot analysis of cell cycle proteins in BNL CL2 cells in which ChREBP expression was stably inhibiting using lentivirus production shRNA against ChREBP (n=3). **(f)** Proliferation index of ChREBP deficient BNL CL2 cells (n=3). **(g)** Clonogenic assays from ChREBP deficient BNL CL2 cells shown (n =7). **(h)** Xenograft mouse model of HCC established in nude mice using parental and ChREBP deficient BNL CL2 cells. Xenograft tumor (left) and tumor weight (right) shown at 3 weeks (n = 10 mice per group). **(i)** Western blot analysis of PI3K/AKT signaling in Huh7 cells deficient for the tumor suppressor PTEN. ChREBP expression was stably inhibiting using lentivirus production shRNA in PTEN deficient cells (n=3). **(j)** Proliferation index of PTEN and ChREBP deficient Huh7 cells (n=3). **(k)** Xenograft mouse model of HCC established in nude mice using parental, PTEN deficient and PTEN/ChREBP deficient Huh7 cells. Xenograft tumor (left) and tumor weight (right) shown at 3 weeks (n = 10 mice per group). **(l)** Effect of SBI-993 on ChREBP nuclear translocation in primary cultured hepatocytes (n=3). **(m)** Measurement of ChREBP transcriptional activity in primary cultured hepatocytes in response to SBI-993 treatment (40 mM) (n=3). **(n)** Expression of ChREBP-regulated genes in response to glucose (25 mM) and/or SBI-993 (40 mM) stimulation in WT or ChREBP KO primary cultured hepatocytes (n=3). **(o)** Proliferation index of parental SNU-449 cells in response to SBI-993 treatment (n=3). **(p)** Effect of SBI-993 on SNU-449 cell viability measured using CCK8 assay (n=3). **(q)** Western blot analysis of cell cycle proteins in Huh7 and BNL CL2 cells after SBI-993 treatment (n=3). **(r)** Proliferation index of Huh7 and BNL CL2 cells after SBI-993 treatment (n=3). All error bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were made using unpaired t-test (b, f and r) or Anova, followed by Bonferonni's test (j, m and n). *$P < 0.01$. **$P < 0.05$.

Figure 1.

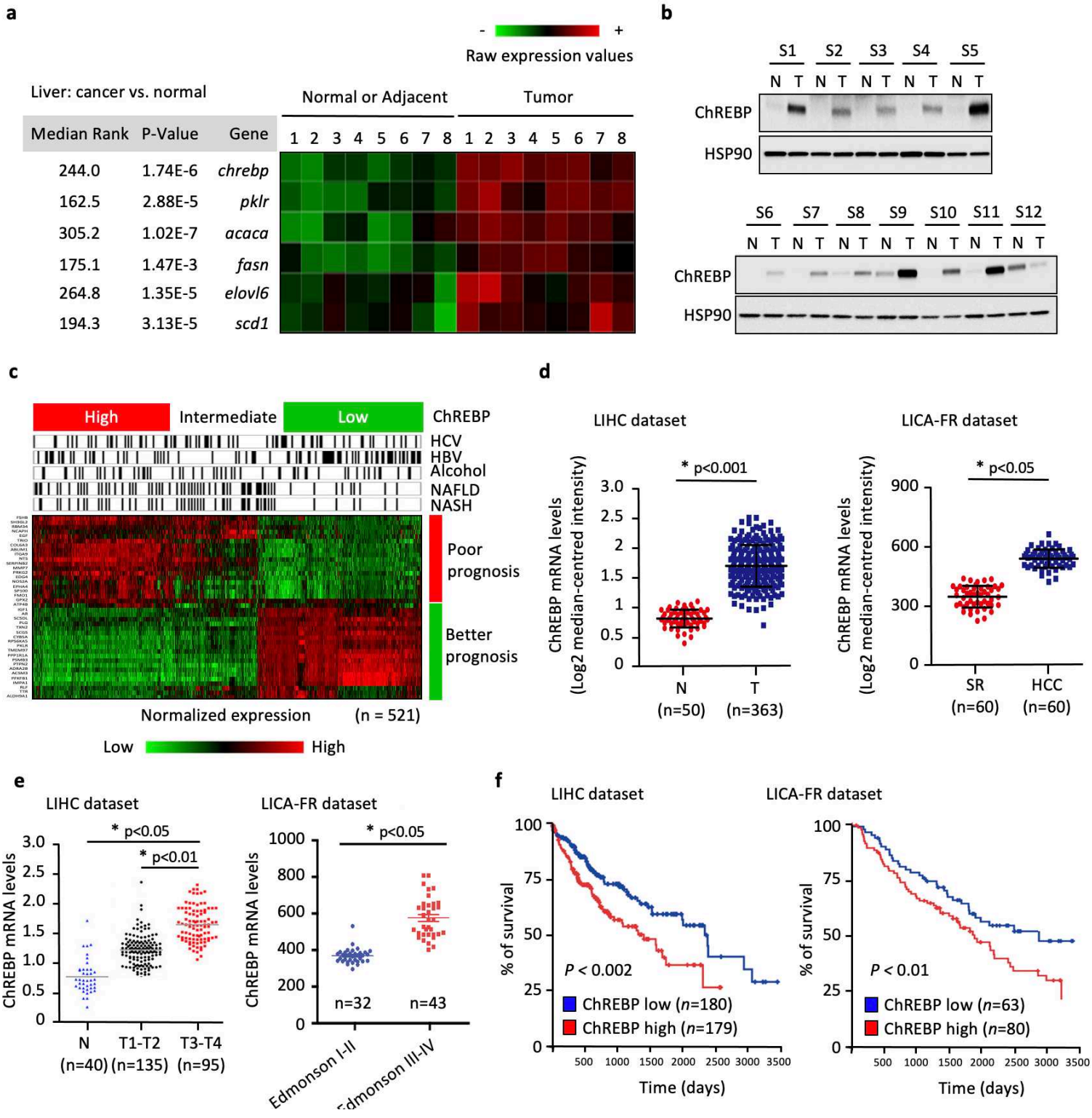

a
Raw expression values
Liver: cancer vs. normal
Normal or Adjacent
Tumor
Median Rank P-Value Gene
244.0 1.74E-6 chrebp
162.5 2.88E-5 pklr
305.2 1.02E-7 acaca
175.1 1.47E-3 fasn
264.8 1.35E-5 elovl6
194.3 3.13E-5 scd1
b
ChREBP
HSP90
c
High
Intermediate
Low
ChREBP
HCV
HBV
Alcohol
NAFLD
NASH
Poor prognosis
Better prognosis
Normalized expression
(n = 521)
d
LIHC dataset
LICA-FR dataset
ChREBP mRNA levels (Log2 median-centred intensity)
* p<0.001
* p<0.05
N (n=50)
T (n=363)
SR (n=60)
HCC (n=60)
e
LIHC dataset
LICA-FR dataset
* p<0.05
* p<0.01
N (n=40)
T1-T2 (n=135)
T3-T4 (n=95)
n=32
n=43
Edmonson I-II
Edmonson III-IV
f
LIHC dataset
LICA-FR dataset
% of survival
P < 0.002
ChREBP low (n=180)
ChREBP high (n=179)
P < 0.01
ChREBP low (n=63)
ChREBP high (n=80)
Time (days)

Figure 2.

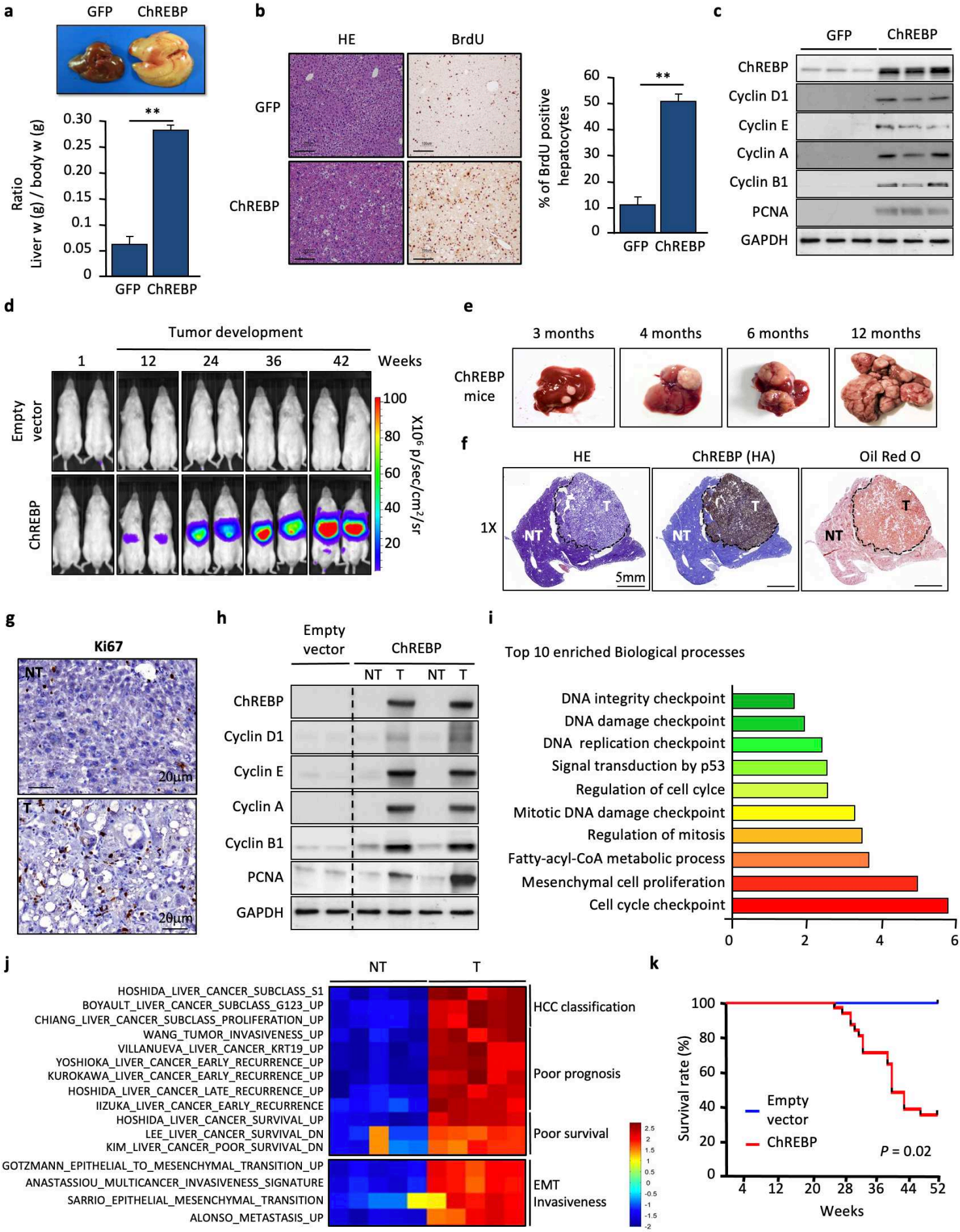

a
GFP
ChREBP
Ratio Liver w (g) / body w (g)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.1
0.05
0
**
GFP ChREBP
b
HE
BrdU
GFP
ChREBP
% of BrdU positive hepatocytes
60
50
40
30
20
10
0
**
GFP ChREBP
c
GFP
ChREBP
ChREBP
Cyclin D1
Cyclin E
Cyclin A
Cyclin B1
PCNA
GAPDH
d
Tumor development
1
12
24
36
42
Weeks
Empty vector
ChREBP
100
80
60
40
20
X10⁶ p/sec/cm²/sr
e
3 months
4 months
6 months
12 months
ChREBP mice
f
HE
ChREBP (HA)
Oil Red O
1X
NT
T
5mm
g
Ki67
NT
20μm
T
20μm
h
Empty vector
ChREBP
NT T NT T
ChREBP
Cyclin D1
Cyclin E
Cyclin A
Cyclin B1
PCNA
GAPDH
i
Top 10 enriched Biological processes
DNA integrity checkpoint
DNA damage checkpoint
DNA replication checkpoint
Signal transduction by p53
Regulation of cell cylce
Mitotic DNA damage checkpoint
Regulation of mitosis
Fatty-acyl-CoA metabolic process
Mesenchymal cell proliferation
Cell cycle checkpoint
0
2
4
6
j
NT
T
HOSHIDA_LIVER_CANCER_SUBCLASS_S1
BOYAULT_LIVER_CANCER_SUBCLASS_G123_UP
CHIANG_LIVER_CANCER_SUBCLASS_PROLIFERATION_UP
WANG_TUMOR_INVASIVENESS_UP
VILLANUEVA_LIVER_CANCER_KRT19_UP
YOSHIOKA_LIVER_CANCER_EARLY_RECURRENCE_UP
KUROKAWA_LIVER_CANCER_EARLY_RECURRENCE_UP
HOSHIDA_LIVER_CANCER_LATE_RECURRENCE_UP
IIZUKA_LIVER_CANCER_EARLY_RECURRENCE
HOSHIDA_LIVER_CANCER_SURVIVAL_UP
LEE_LIVER_CANCER_SURVIVAL_DN
KIM_LIVER_CANCER_POOR_SURVIVAL_DN
GOTZMANN_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION_UP
ANASTASSIOU_MULTICANCER_INVASIVENESS_SIGNATURE
SARRIO_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION
ALONSO_METASTASIS_UP
HCC classification
Poor prognosis
Poor survival
EMT Invasiveness
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
k
Survival rate (%)
100
80
60
40
20
0
Empty vector
ChREBP
P = 0.02
4
12
20
28
36
44
52
Weeks

Figure 3.

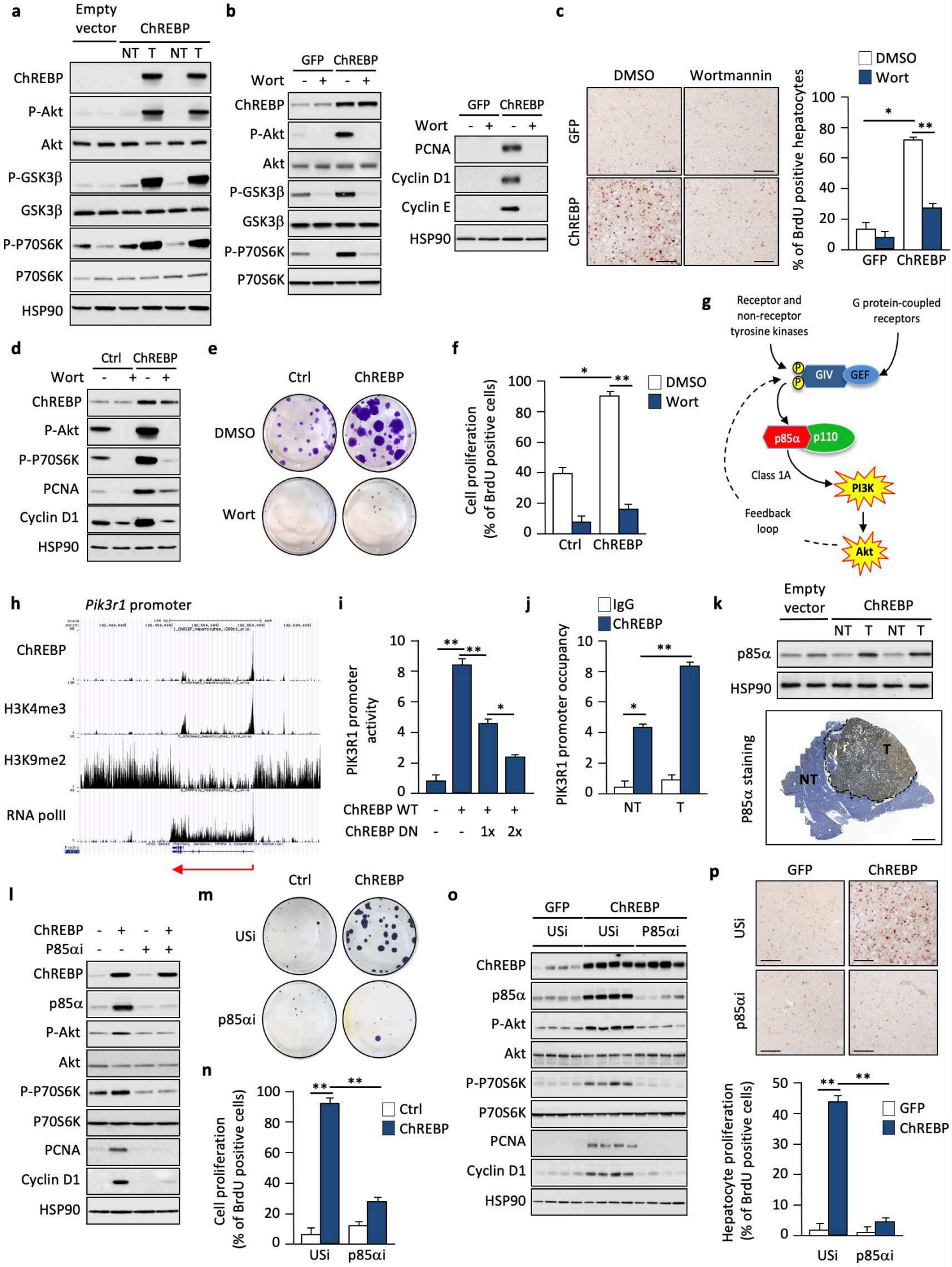

a
Empty vector
ChREBP
NT T NT T
ChREBP
P-Akt
Akt
P-GSK3β
GSK3β
P-P70S6K
P70S6K
HSP90
b
GFP ChREBP
Wort - + - +
ChREBP
P-Akt
Akt
P-GSK3β
GSK3β
P-P70S6K
P70S6K
GFP ChREBP
Wort - + - +
PCNA
Cyclin D1
Cyclin E
HSP90
c
DMSO
Wortmannin
GFP
ChREBP
DMSO
Wort
% of BrdU positive hepatocytes
100
80
60
40
20
0
*
**
GFP ChREBP
d
Ctrl ChREBP
Wort - + - +
ChREBP
P-Akt
P-P70S6K
PCNA
Cyclin D1
HSP90
e
Ctrl
ChREBP
DMSO
Wort
f
Cell proliferation (% of BrdU positive cells)
100
80
60
40
20
0
*
**
DMSO
Wort
Ctrl ChREBP
g
Receptor and non-receptor tyrosine kinases
G protein-coupled receptors
P
P
GIV
GEF
p85α
p110
Class 1A
PI3K
Feedback loop
Akt
h
Pik3r1 promoter
ChREBP
H3K4me3
H3K9me2
RNA polII
i
PIK3R1 promoter activity
10
8
6
4
2
0
**
**
*
ChREBP WT - + + +
ChREBP DN - - 1x 2x
j
IgG
ChREBP
PIK3R1 promoter occupancy
10
8
6
4
2
0
*
**
NT T
k
Empty vector
ChREBP
NT T NT T
p85α
HSP90
P85α staining
NT
T
l
ChREBP - + - +
P85αi - - + +
ChREBP
p85α
P-Akt
Akt
P-P70S6K
P70S6K
PCNA
Cyclin D1
HSP90
m
Ctrl
ChREBP
USi
p85αi
n
Cell proliferation (% of BrdU positive cells)
100
80
60
40
20
0
**
**
Ctrl
ChREBP
USi p85αi
o
GFP ChREBP
USi USi P85αi
ChREBP
p85α
P-Akt
Akt
P-P70S6K
P70S6K
PCNA
Cyclin D1
HSP90
p
GFP
ChREBP
USi
p85αi
Hepatocyte proliferation (% of BrdU positive cells)
50
40
30
20
10
0
**
**
GFP
ChREBP
USi p85αi

Figure 4.

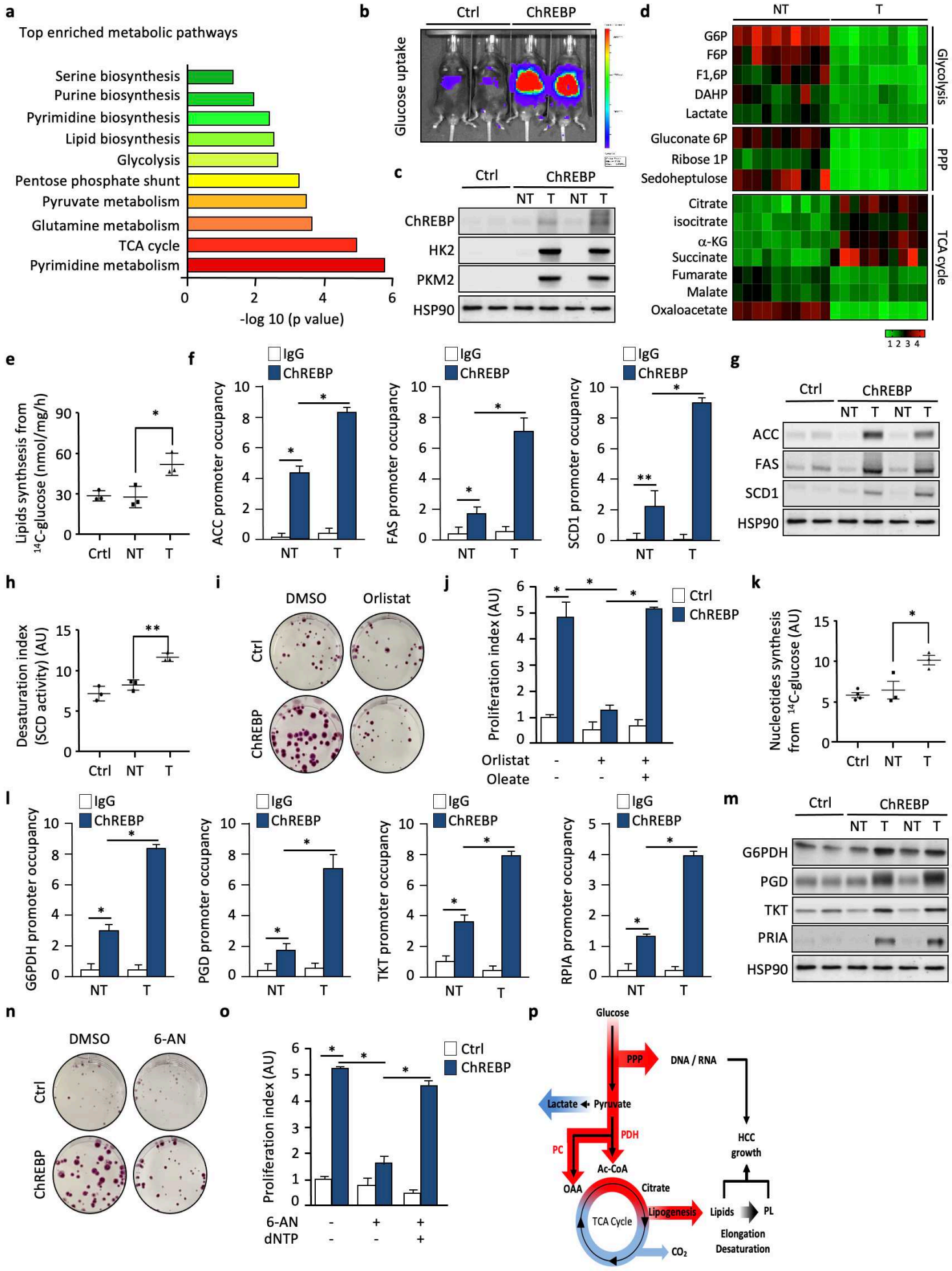

a
Top enriched metabolic pathways
Serine biosynthesis
Purine biosynthesis
Pyrimidine biosynthesis
Lipid biosynthesis
Glycolysis
Pentose phosphate shunt
Pyruvate metabolism
Glutamine metabolism
TCA cycle
Pyrimidine metabolism
0
2
4
6
-log 10 (p value)
b
Ctrl
ChREBP
Glucose uptake
c
Ctrl
ChREBP
NT T NT T
ChREBP
HK2
PKM2
HSP90
d
NT
T
G6P
F6P
F1,6P
DAHP
Lactate
Gluconate 6P
Ribose 1P
Sedoheptulose
Citrate
isocitrate
α-KG
Succinate
Fumarate
Malate
Oxaloacetate
Glycolysis
PPP
TCA cycle
1 2 3 4
e
Lipids synthesis from ¹⁴C-glucose (nmol/mg/h)
Crtl
NT
T
f
IgG
ChREBP
ACC promoter occupancy
FAS promoter occupancy
SCD1 promoter occupancy
NT
T
g
Ctrl
ChREBP
NT T NT T
ACC
FAS
SCD1
HSP90
h
Desaturation index (SCD activity) (AU)
Ctrl
NT
T
i
DMSO
Orlistat
Ctrl
ChREBP
j
Proliferation index (AU)
Ctrl
ChREBP
Orlistat - + +
Oleate - - +
k
Nucleotides synthesis from ¹⁴C-glucose (AU)
Ctrl
NT
T
l
IgG
ChREBP
G6PDH promoter occupancy
PGD promoter occupancy
TKT promoter occupancy
RPIA promoter occupancy
NT
T
m
Ctrl
ChREBP
NT T NT T
G6PDH
PGD
TKT
PRIA
HSP90
n
DMSO
6-AN
Ctrl
ChREBP
o
Proliferation index (AU)
Ctrl
ChREBP
6-AN - + +
dNTP - - +
p
Glucose
PPP
DNA / RNA
Lactate
Pyruvate
PDH
PC
Ac-CoA
OAA
Citrate
TCA Cycle
Lipogenesis
Lipids
PL
Elongation
Desaturation
CO₂
HCC growth

Figure 5.

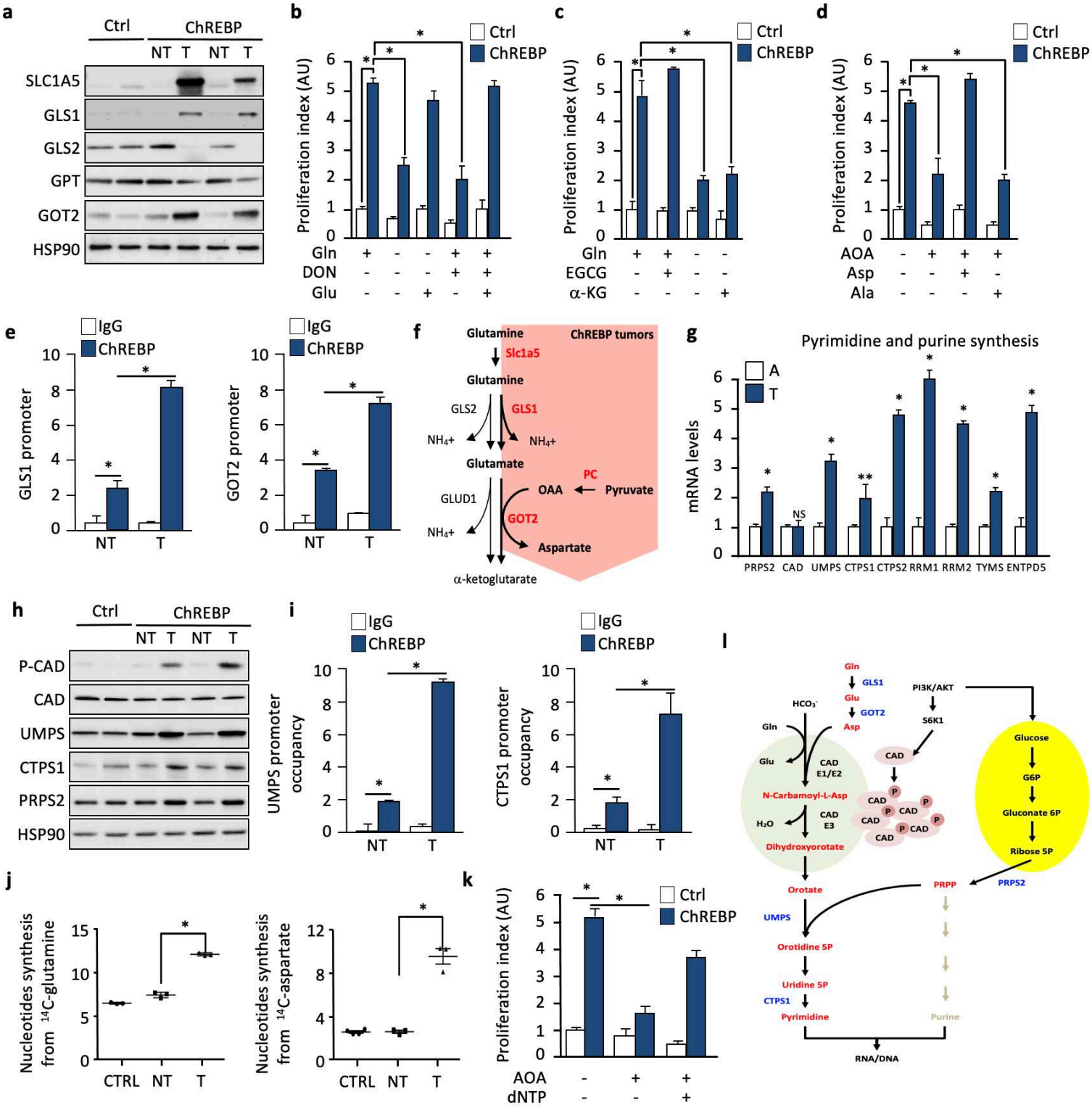

a
Ctrl
ChREBP
NT T NT T
SLC1A5
GLS1
GLS2
GPT
GOT2
HSP90
b
Ctrl
ChREBP
Proliferation index (AU)
Gln + - - + +
DON - - - + +
Glu - - + - +
c
Ctrl
ChREBP
Proliferation index (AU)
Gln + + - -
EGCG - + - -
α-KG - - - +
d
Ctrl
ChREBP
Proliferation index (AU)
AOA - + + +
Asp - - + -
Ala - - - +
e
IgG
ChREBP
GLS1 promoter
GOT2 promoter
NT T
f
Glutamine
ChREBP tumors
Slc1a5
Glutamine
GLS2
GLS1
NH4+
NH4+
Glutamate
PC
OAA
Pyruvate
GLUD1
GOT2
NH4+
Aspartate
α-ketoglutarate
g
Pyrimidine and purine synthesis
A
T
mRNA levels
NS
PRPS2 CAD UMPS CTPS1 CTPS2 RRM1 RRM2 TYMS ENTPD5
h
Ctrl
ChREBP
NT T NT T
P-CAD
CAD
UMPS
CTPS1
PRPS2
HSP90
i
IgG
ChREBP
UMPS promoter occupancy
CTPS1 promoter occupancy
NT T
j
Nucleotides synthesis from 14C-glutamine
Nucleotides synthesis from 14C-aspartate
CTRL NT T
k
Ctrl
ChREBP
Proliferation index (AU)
AOA - + +
dNTP - - +
l
Gln
GLS1
Glu
GOT2
Asp
HCO3-
Gln
Glu
CAD E1/E2
N-Carbamoyl-L-Asp
H2O
CAD E3
Dihydroxyorotate
Orotate
UMPS
Orotidine 5P
Uridine 5P
CTPS1
Pyrimidine
RNA/DNA
PI3K/AKT
S6K1
CAD
P
Glucose
G6P
Gluconate 6P
Ribose 5P
PRPP
PRPS2
Purine

Figure 6.

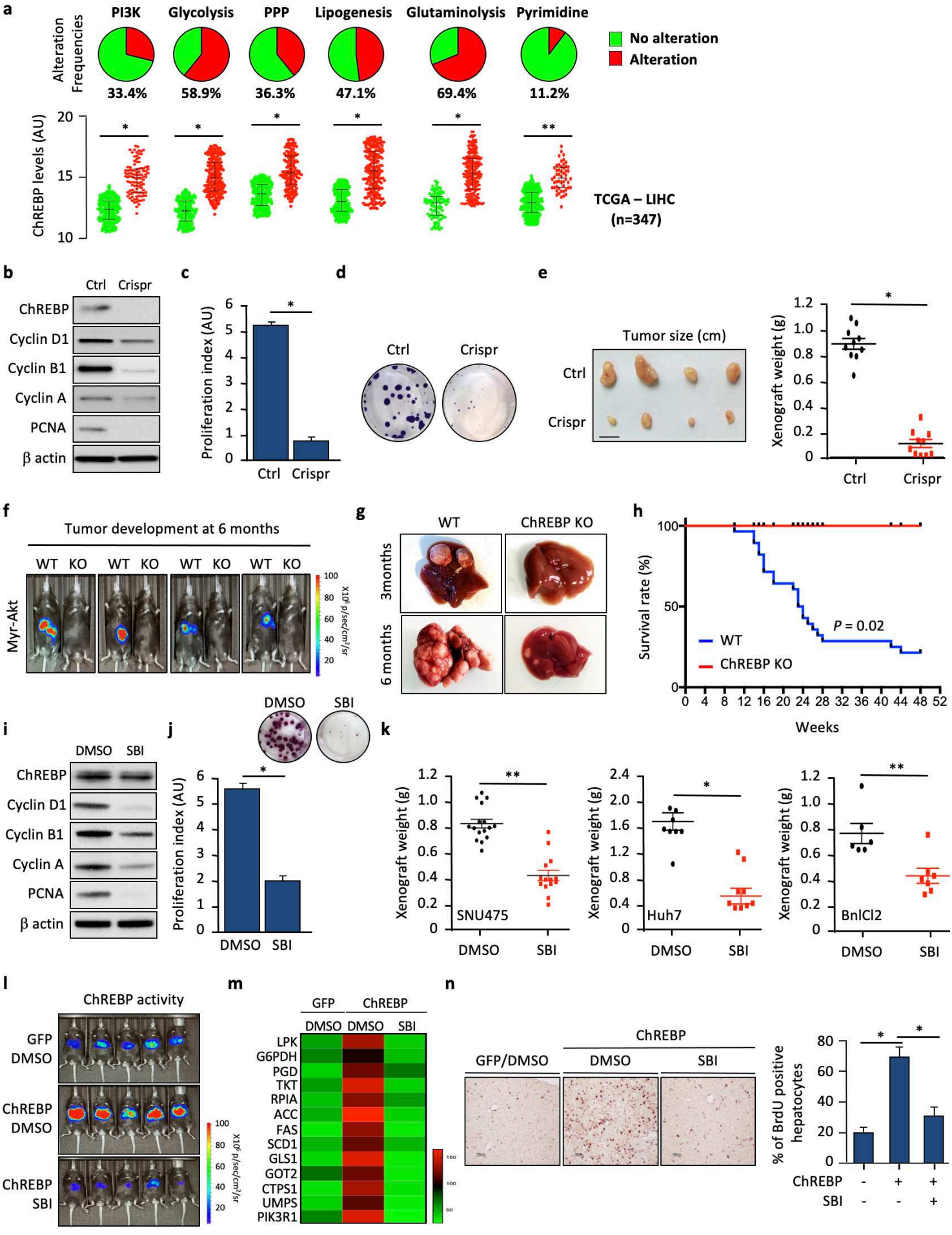
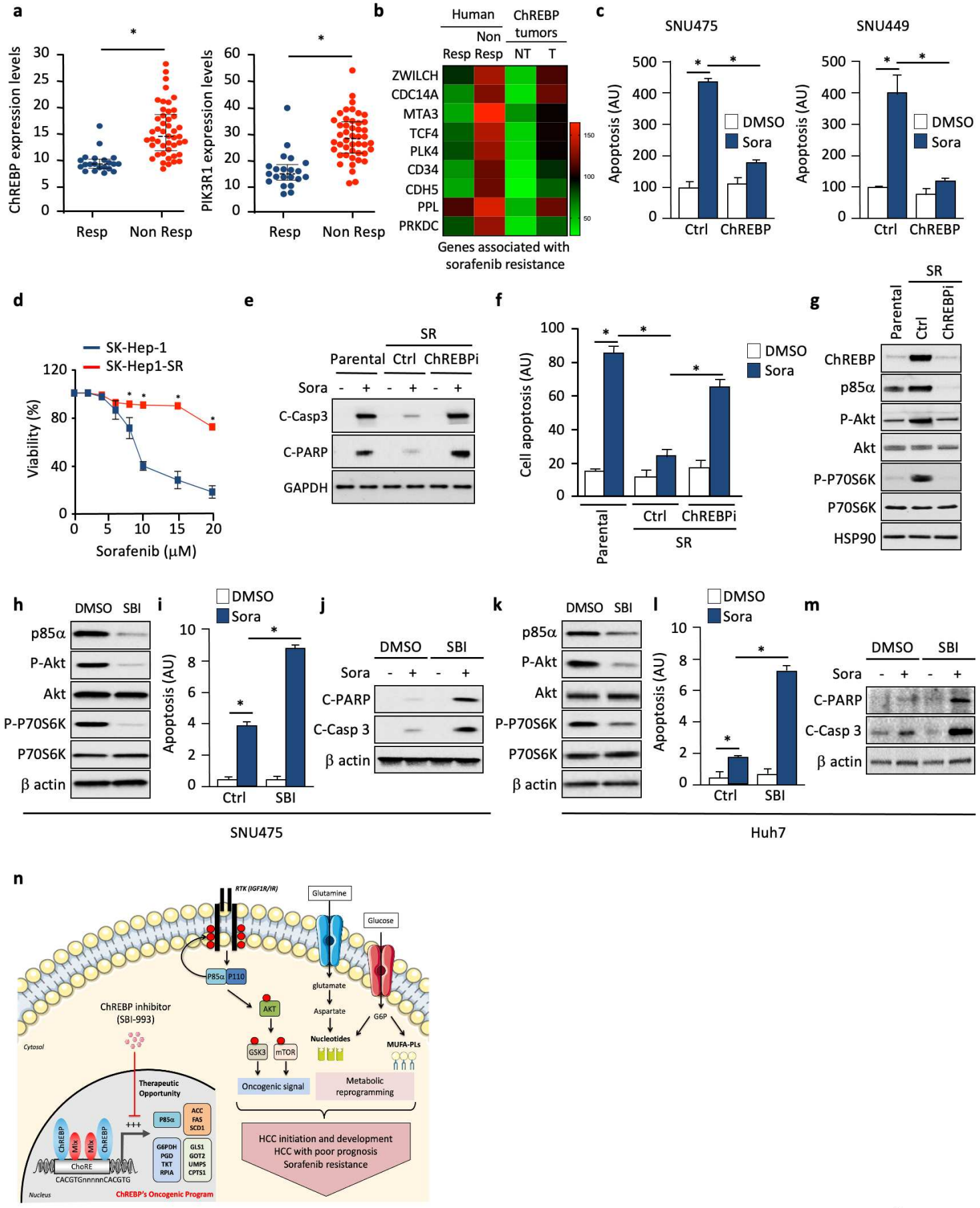
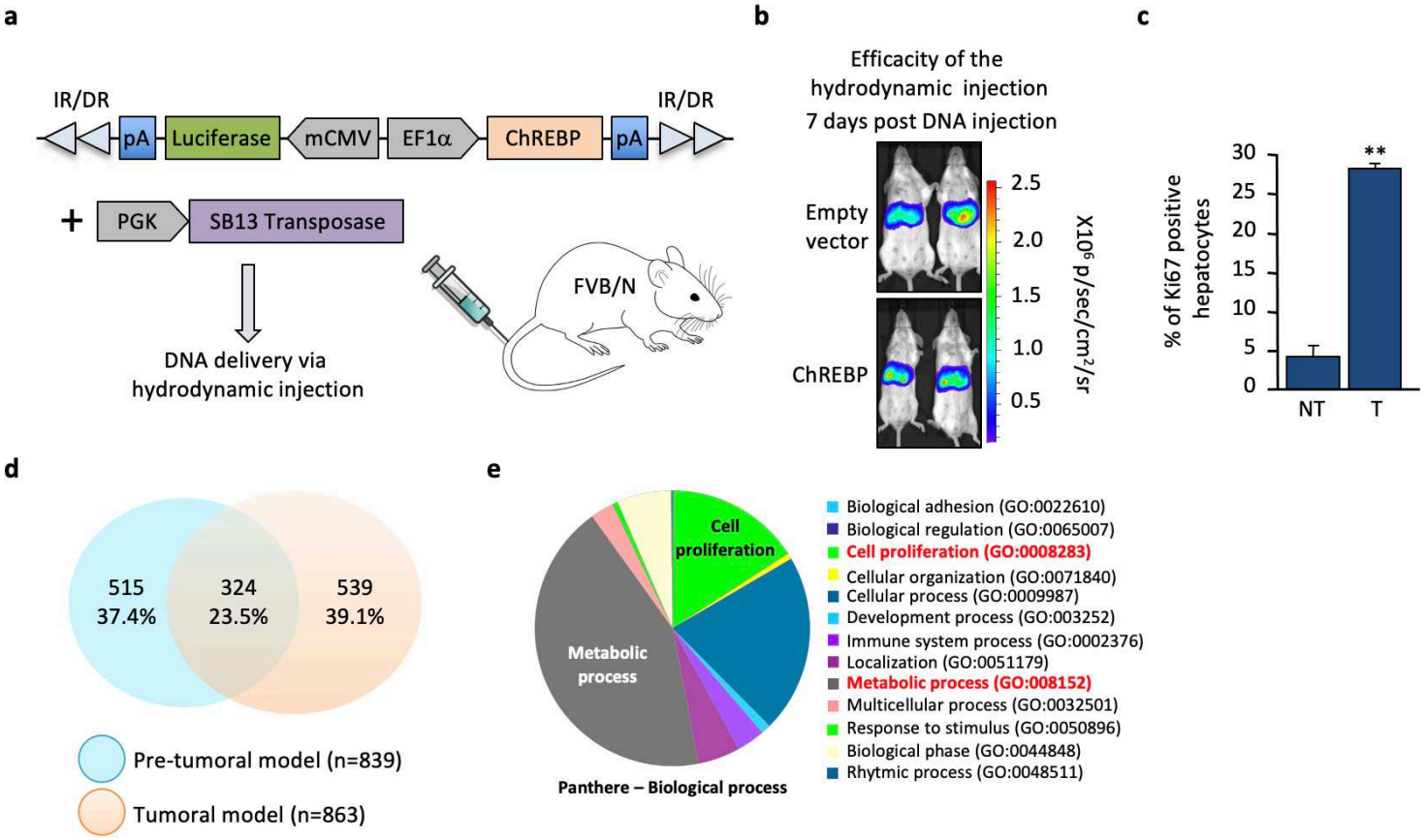

a
PI3K
Glycolysis
PPP
Lipogenesis
Glutaminolysis
Pyrimidine
Alteration Frequencies
33.4%
58.9%
36.3%
47.1%
69.4%
11.2%
No alteration
Alteration
ChREBP levels (AU)
TCGA – LIHC
(n=347)
b
Ctrl
Crispr
ChREBP
Cyclin D1
Cyclin B1
Cyclin A
PCNA
β actin
c
Proliferation index (AU)
d
e
Tumor size (cm)
Xenograft weight (g)
f
Tumor development at 6 months
WT KO
Myr-Akt
g
WT
ChREBP KO
3months
6 months
h
Survival rate (%)
P = 0.02
Weeks
i
DMSO
SBI
j
k
SNU475
Huh7
BnlCl2
l
ChREBP activity
GFP DMSO
ChREBP DMSO
ChREBP SBI
m
GFP
ChREBP
LPK
G6PDH
PGD
TKT
RPIA
ACC
FAS
SCD1
GLS1
GOT2
CTPS1
UMPS
PIK3R1
n
GFP/DMSO
% of BrdU positive hepatocytes

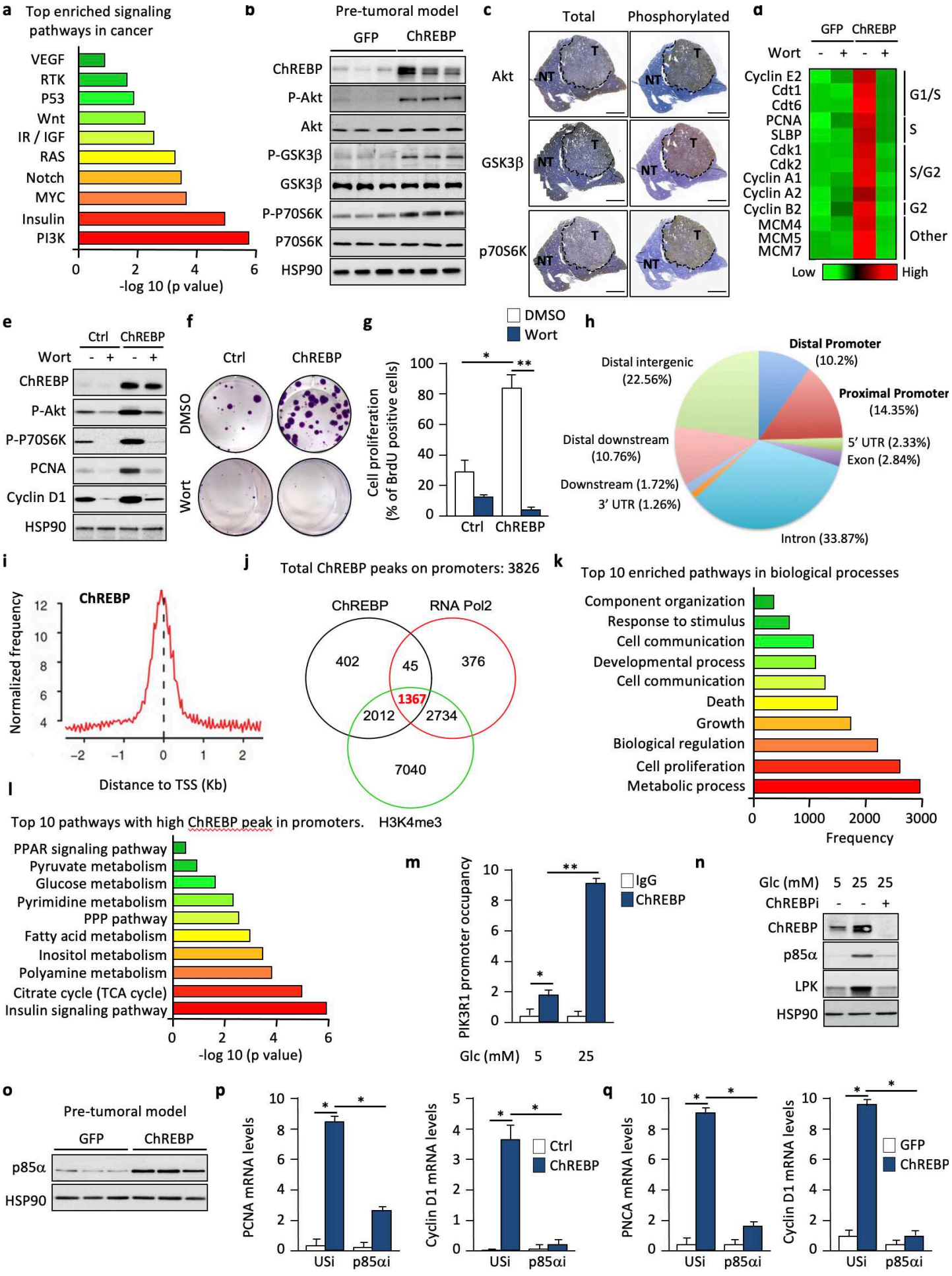
Figure 7.


a
ChREBP expression levels
PIK3R1 expression levels
Resp
Non Resp
b
Human
ChREBP tumors
Non Resp
Resp
NT
T
ZWILCH
CDC14A
MTA3
TCF4
PLK4
CD34
CDH5
PPL
PRKDC
Genes associated with sorafenib resistance
c
SNU475
SNU449
Apoptosis (AU)
DMSO
Sora
Ctrl
ChREBP
d
SK-Hep-1
SK-Hep1-SR
Viability (%)
Sorafenib (μM)
e
SR
Parental
Ctrl
ChREBPi
Sora
C-Casp3
C-PARP
GAPDH
f
Cell apoptosis (AU)
DMSO
Sora
Parental
Ctrl
ChREBPi
SR
g
SR
Parental
Ctrl
ChREBPi
ChREBP
p85α
P-Akt
Akt
P-P70S6K
P70S6K
HSP90
h
DMSO
SBI
p85α
P-Akt
Akt
P-P70S6K
P70S6K
β actin
i
DMSO
Sora
Apoptosis (AU)
Ctrl
SBI
j
DMSO
SBI
Sora
C-PARP
C-Casp 3
β actin
k
DMSO
SBI
p85α
P-Akt
Akt
P-P70S6K
P70S6K
β actin
l
DMSO
Sora
Apoptosis (AU)
Ctrl
SBI
m
DMSO
SBI
Sora
C-PARP
C-Casp 3
β actin
SNU475
Huh7
n
RTK (IGF1R/IR)
Glutamine
Glucose
P85α
P110
AKT
glutamate
Aspartate
G6P
Nucleotides
MUFA-PLs
GSK3
mTOR
Oncogenic signal
Metabolic reprogramming
HCC initiation and development
HCC with poor prognosis
Sorafenib resistance
ChREBP inhibitor (SBI-993)
Cytosol
Therapeutic Opportunity
ChREBP
Mlx
ChoRE
CACGTGnnnnnCACGTG
Nucleus
ChREBP's Oncogenic Program
ACC
FAS
SCD1
GLS1
GOT2
UMPS
CPTS1
G6PDH
PGD
TKT
RPIA

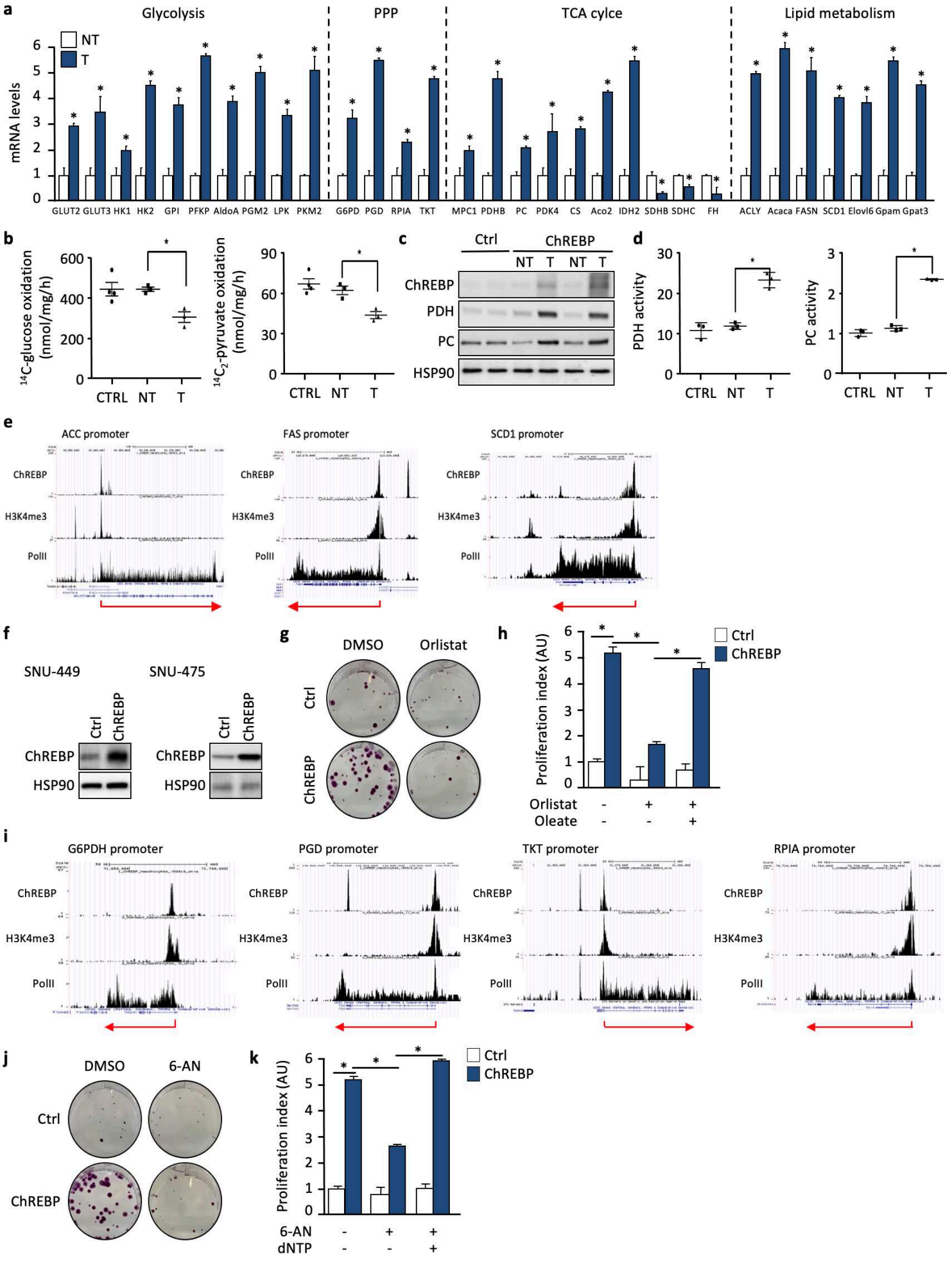
Supplementary Figure 1.



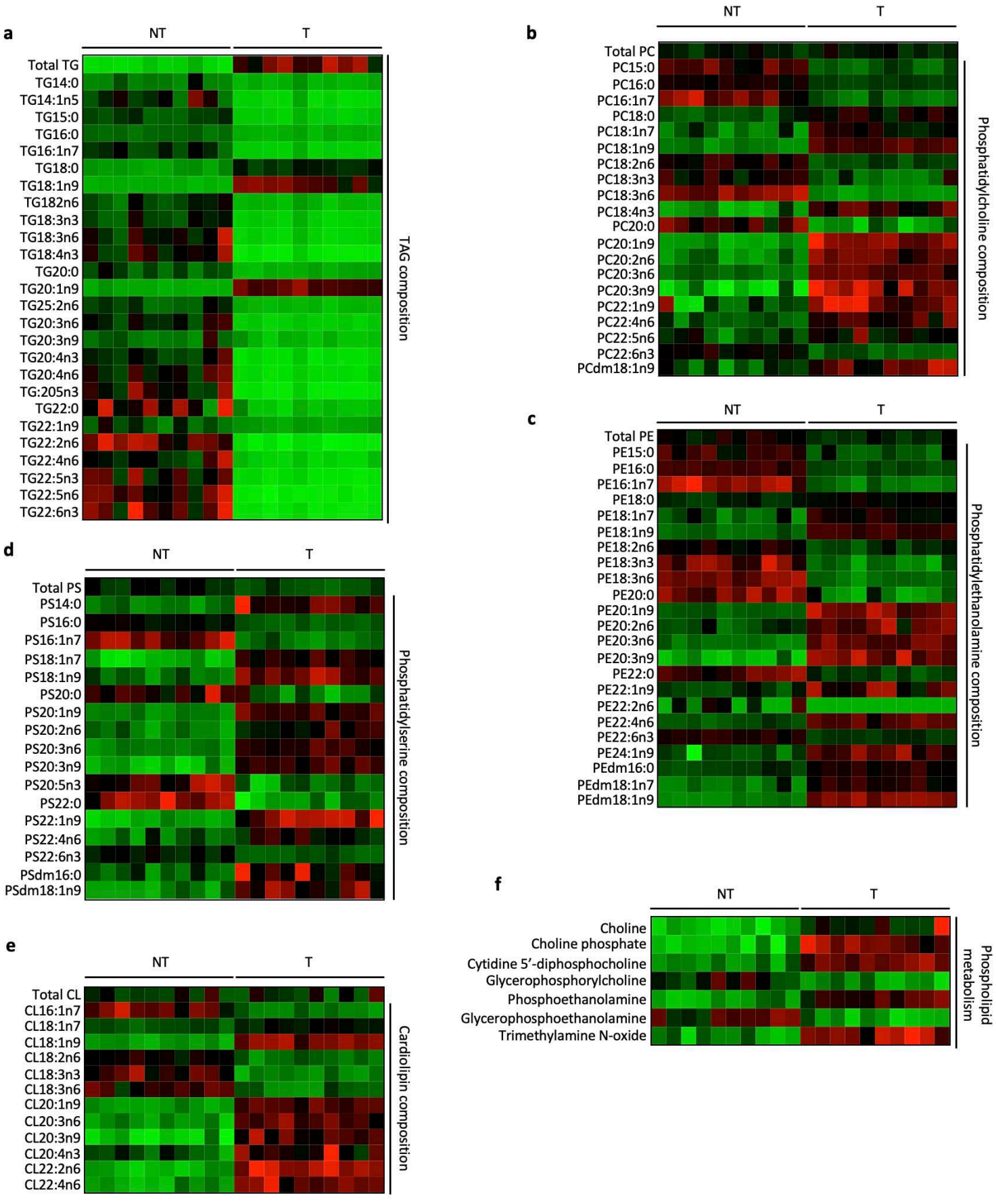
Supplementary Figure 2.



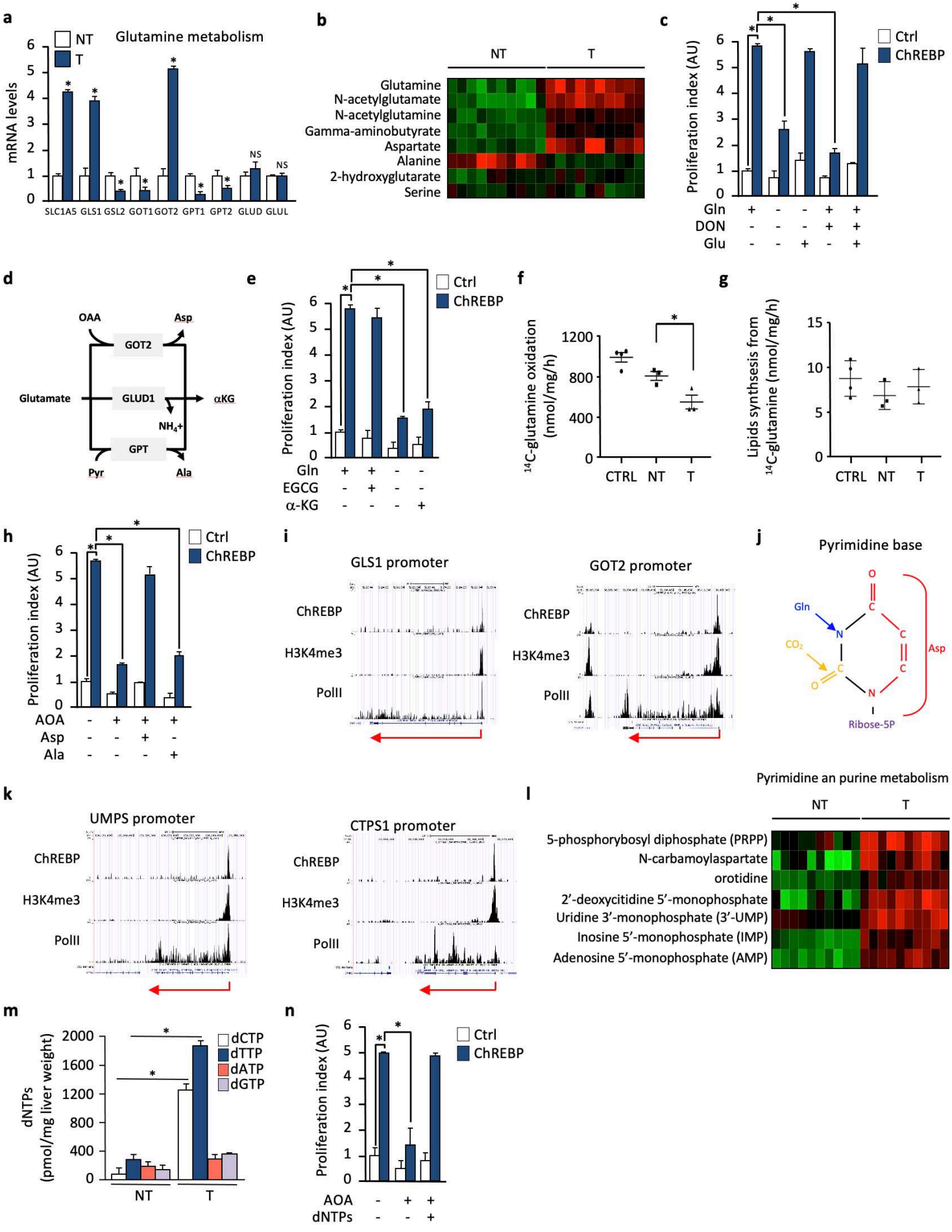
Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 4.



Supplementary Figure 5.



Supplementary Figure 6.

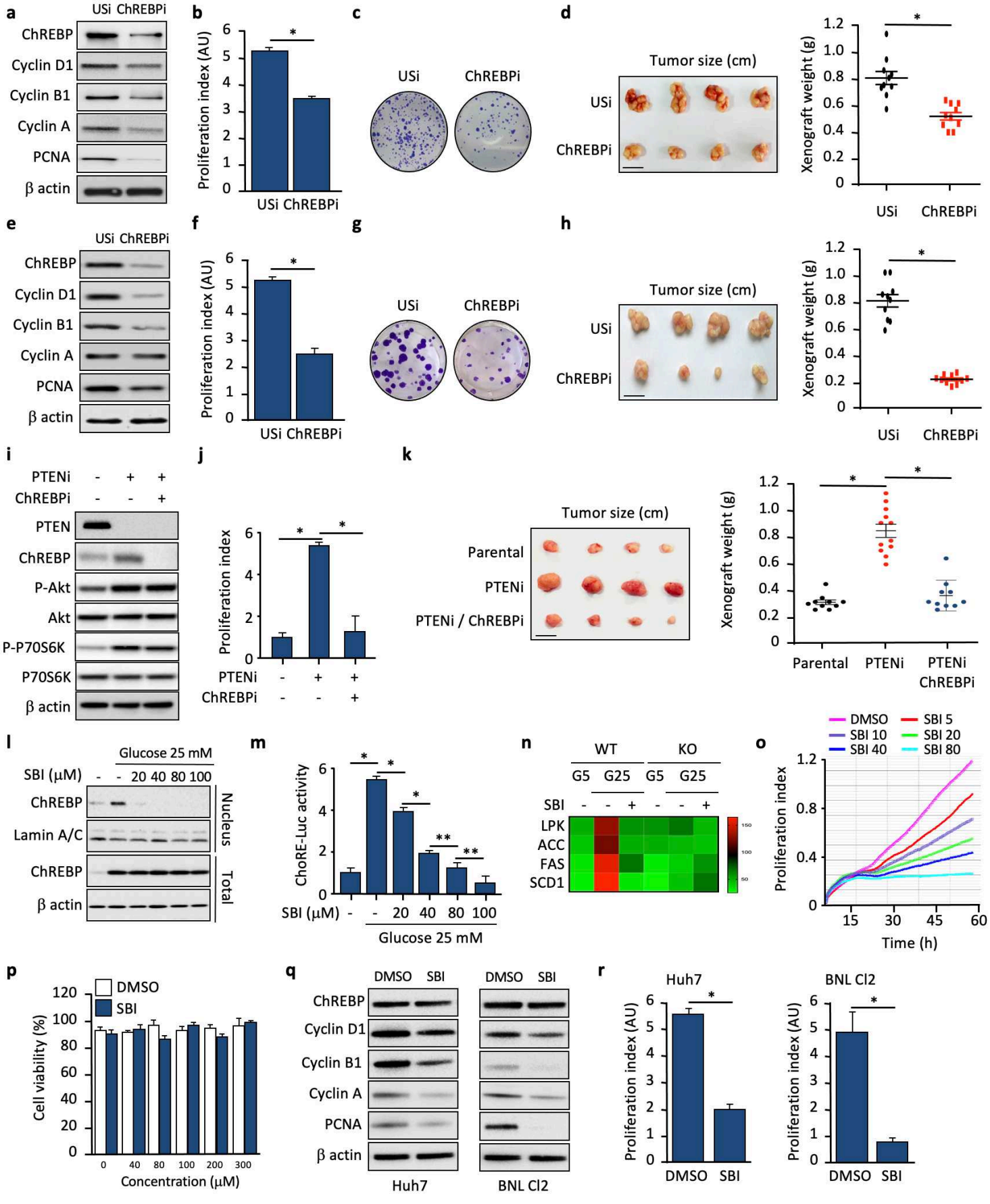


Table S1. Publicly available microarray Datasets analyzed for ChREBP expression and altered target genes in HCC patients

Number	Accession Number	Data compared *	Numbers of samples		Main etiology reported	reference
			Control	HCC		
1	GSE14520	Paired NT vs HCC	220	225	NAFLD/NASH, HBV	Roessler, 2010 #1099
2	GSE39791	Matched NT vs HCC	72	72	NAFLD/NASH, HBV	Kim, 2014 #1100
3	GSE57957	Adjacent NT vs HCC	39	39	NAFLD/NASH, HBV	Mah, 2014 #1101
4	GSE36376	Adjacent NT vs HCC	32	38	NAFLD/NASH, HBV	Lim, 2013 #1102
5	GSE60502	Adjacent NT vs HCC	18	18	NA	Mas, 2009 #1104
6	GSE14323	Normal liver vs HCC	19	38	HCV	Wang, 2014 #1103
7	GSE6764	Normal liver vs advanced HCC	10	10	HCV	Wurmbach, 2007 #1105
8	GSE62232	Normal liver vs HCC	10	81	Mixed: Alcohol, NAFLD/NASH, HCV	Schulze, 2015 #1106
	LIHC dataset	Normal liver vs HCC	50	334	Mixed: Alcohol, NAFLD/NASH, HCV	
	LICA-FR dataset	Adjacent NT vs HCC	160	160	Mixed: Alcohol, NAFLD/NASH, HCV, HBV	
Total arrays			630	1015		

HBV/HCV, hepatatis B/C virus; HCC, hepatocellular carcinoma; NA, detail could not be accesed; NT, non tumoral tissue.

* Description of the data compared as documented in the National Center for Biotechnology Information Gene Expression omnibus. Differential expression was analyzed with GEO2R tool. The overall design for each data set can be found at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/.

Table S2: Main clinical characteristics of the LIHC and LICA-FR cohorts

For each clinical characteristic, % are given as proportion of samples with available data.

LICA-FR COHORT (n=160)

Age	Median [range]	66 [21-94]
Gender	M	126 (79%)
	F	34 (21%)
Etiology	Alcohol	63 (39%)
	Metabolic disease	37 (23%)
	HCV	30 (19%)
	HBV	30 (19%)
Largest nodule diameter (mm)	Median [range]	67 [12-210]
Fibrosis (METAVIR score)	F0-F1	75 (47%)
	F2-F3	32 (20%)
	F4	53 (33%)
Edmonson grade	I-II	48 (30%)
	III-IV	110 (70%)
	Not determined	2
Vascular invasion	yes	93 (58%)
	no	67 (42%)

LIHC COHORT (n=334)

Age	Median [range]	61 [16-90]
Gender	M	224 (67%)
	F	110 (33%)
Etiology	Alcohol	106 (32%)
	NAFLD*	19 (6%)
	HCV	52 (16%)
	HBV	86 (26%)
Fibrosis (Ishak score)	0 - No Fibrosis	85 (36%)
	1,2 - Portal Fibrosis	35 (15%)
	3,4 - Fibrous Speta	28 (12%)
	5 - Nodular Formation and Incomplete Cirrhosis	9 (4%)
	6 - Established Cirrhosis	78 (33%)
	Not determined	99
Histological grade	G1	50 (15%)
	G2	160 (48%)
	G3	113 (34%)
	G4	7 (2%)
	Not determined	4
Vascular invasion	Macro	14 (5%)
	Micro	80 (29%)
	None	186 (66%)
	Not determined	54

*NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Table S7: gene expression in the GO: PI3K_signaling in the pre-tumoral and tumoral models

Fold change > 1.20
p-value < 0.05

	Pre-tumoral model		Tumoral model	
	Fold-Change (chREBP1 vs. GFP)	p-value (ChREBP vs. GFP)	Fold-Change (Tumoral vs, Adjacent)	p-value (Tumoral vs, Adjacent)
CCL5	3,75	5,63885E-04	13,75	7,74917E-08
PDGFRA	1,34	1,04057E-02	1,85	1,04058E-04
CD28	1,29	5,69639E-02	1,88	1,46796E-03
PDGFRB	1,28	2,04913E-02	1,82	8,10075E-04
DCN	1,30	1,31892E-02	1,88	7,59673E-07
HGF	1,35	4,66371E-04	2,01	5,83310E-10
PIP4K2A	1,41	3,26532E-04	2,01	7,28845E-07
RASGRP1	1,27	6,90095E-03	1,82	5,38581E-06
HCLS1	1,77	1,09837E-05	1,82	3,05549E-03
PIK3CD	1,32	7,38128E-03	1,75	5,63885E-04
RELN	1,30	3,57752E-03	1,60	3,92592E-05
PDGFC	1,24	8,32304E-03	1,62	4,09024E-05
FYN	1,33	4,16078E-03	1,66	1,25076E-03
NTRK2	1,55	1,15916E-05	1,67	3,98275E-06
PIK3CG	1,38	3,19583E-03	1,73	2,57759E-05
NCF1	1,46	1,55332E-03	1,51	9,05470E-06
CBL	1,35	5,90326E-05	1,53	2,35257E-03
PLEKHA1	2,58	2,47043E-08	1,62	9,03516E-06
PIK3R5	1,41	7,80300E-04	1,40	6,51330E-04
PDGFD	1,25	5,48394E-02	1,34	1,14508E-02
ANGPT1	1,55	2,92410E-02	1,23	3,71534E-02
IGF1R	1,22	1,30640E-02	1,25	1,61775E-03
CEP55	1,96	1,47321E-04	1,48	4,09805E-05
FLT4	1,43	9,56546E-03	1,34	8,10315E-03
SRC	1,55	2,07560E-03	1,28	2,41691E-03
PTPN6	1,27	3,00222E-04	1,37	6,14254E-06
SOX9	1,43	6,10455E-03	1,38	3,72973E-03
F2R	1,23	6,02809E-03	1,33	7,57429E-05
TNF	1,12	1,63518E-03	1,37	5,37694E-06
PIK3R1	1,28	5,86061E-04	1,77	1,96900E-02
PREX2	1,49	6,47077E-03	1,27	3,00023E-02
PDGFB	1,36	1,82434E-03	1,39	7,01274E-05
PPP1R16B	1,24	6,49246E-01	1,28	2,51326E-02
LYN	1,32	9,00993E-03	1,33	1,16763E-05
FGR	1,40	2,74492E-03	1,25	2,10301E-02
CD160	1,43	3,28595E-03	1,20	2,02094E-02
KDR	1,57	1,02831E-03	1,54	3,34295E-03
ZFP36L1	1,77	9,29565E-03	1,31	1,14645E-02
PIK3AP1	1,28	4,74623E-04	1,28	3,55374E-03
MAPK3	1,54	4,29953E-05	1,25	1,61763E-02
ENTPD5	1,31	3,01049E-05	1,24	2,60319E-03
PTPN13	1,38	5,04357E-01	1,25	1,13546E-02
GNAI2	1,48	9,60806E-06	1,34	1,25718E-05
CCDC88A	1,94	7,25409E-06	1,31	1,75039E-02
MDM4	1,28	7,47877E-02	1,22	2,42434E-02
MDM2	1,92	5,73385E-07	1,43	5,95010E-03
RPS6KA1	1,53	7,53585E-07	1,21	3,06601E-02
RPS6KA3	1,41	1,14979E-04	1,32	3,37569E-03
CCND1	2,23	6,03731E-08	2,86	2,00304E-08
CCND2	1,67	8,90658E-02	1,21	9,57019E-02
AKT3	1,56	1,62969E-02	1,53	3,55604E-05
GSK3B	1,60	4,09382E-04	1,22	6,72516E-03
PIK3R3	1,43	2,21906E-03	1,25	4,89334E-03

Table S9. Genes in Enriched Pathways Identified by KEGG for Top 1000 Genes in ChREBP overexpressing tumors

Term	genes	*P* Value
map04910: Insulin signaling pathway	PRKAG2, PPP1R3C, PPP1R3B, SORBS1, SOS1, FASN, GYS1, GYS2, PRKACA, PRKAA2, INSR, RAPGEF1, PIK3R1, SHC4, SREBF1, IRS2, IRS3, SOCS2, SOCS3, ACACA, FBP1, RAF1, PDE3A, ACACB, PCK1, CBLB, G6PC, CRKL, PYGL, GSK3B, PKLR, PTPN1	2.3E–06
map00030: Pentose phosphate pathway	PGM2, G6PD, TALDO1, PFKL, H6PD, PGD, PFKP, DERA, TKT, RPIA, GPI1	4.4E–03
map00020: Citrate cycle (TCA cycle)	SDHB, ACO1, SUCLG2, IDH1, PDHA1, DLAT, IDH3A, PCK1	5.7E–04
map00620: pyruvate metabolism	PCX, AKR1B3, PKLR, PKM2, ACYP2, ALDH2, ACACA, PDHA1, ACACB, GRHPR, DLAT, PCK2, PCK1	1.8E–06
map01212: Fatty acid metabolism	ACADM, ACADL, SCD1, FASN, ACSL, ACACA, ACACB, CBR4, FABP2, ELOVL6, ELOVL2	8.1E–04
map00240: Pyrimidine metabolism	RRM1, RRM2, CAD, UMPS, CTPS1, CTPS2, UMPS	5.2E–03
map00471: Glutamine and glutamate metabolism	GLUD1, GLS, Asns, CAD, CTPS, CTPS2, GLS, GLUL, ASNS, GCLC, GOT2, PPAT	7.8E–04
map00561: Glycerolipid metabolism	AGPAT1, CCNC, DGAT1, FABP5, FGF21, G6PC, GPAM, PIK3R1, PLIN2, PNPLA3, SCD1	3.4E–03

Supplementary Table 10. Systematic toxicity evaluation during *in vivo* treatment of mice with SBI-993.

Mice Body weight (g)		
Days of treatment	Vehicule (n= 12 mice)	SBI-993 (n=12 mice)
0	27.7 ± 1.4	27.6 ± 1.1
3	27.2 ± 1.7	27.3 ± 1.6
6	27.6 ± 1.4	27.9 ± 1.2
10	26.8 ± 1.1	27.8 ± 1.2
13	28.1 ± 0.9	29.1 ± 1.2
16	28.4 ± 1.1	29.2 ± 0.5
23	28.8 ± 0.5	29.8 ± 0.8

Blood chemistry at day 23	Vehicule (n= 12 mice)	SBI-993 (n=12 mice)	Normal range
ALT (U/L)	58.80 ± 24.16	53.00 ± 19.81	17 - 77
AST (U/L)	130.40 ± 92.57	147.00 ± 64.93	54 - 298
ALP (U/L)	68.80 ± 4.27	76.80 ± 9.76	35 - 96
ALB (g/dl)	2.80 ± 0.12	3.20 ± 0.26	2.5 - 3
Creat (mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.13 ± 0.06	0.2 - 0.9
BIL (mg/dl)	0.35 ± 0.08	0.42 ± 0.09	0 - 0.9

Hematology at day 23	Vehicule (n= 12 mice)	SBI-993 (n=12 mice)	Normal range
Leukocytes			
WBC (k/μL)	3.81 ± 1.14	6.02 ± 2.21	1.8 - 10.7
NE (K/μL)	0.40 ± 0.07	0.60 ± 0.13	0.1 - 2.4
LY (K/μL)	3.36 ± 1.25	5.89 ± 1.34	0.9 - 9.3
MO (k/μL)	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.16	0.0 - 0.4
EO (K/μL)	0.01 ± 0.02	0.12 ± 0.04	0.0 - 0.2
BA (K/μL)	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.03	0.0 - 0.2
%			
NE	11.35 ± 3.1	9.40 ± 2.5	6.6 - 38.9
LY	85.78 ± 4.3	88.12 ± 4.98	55.9 - 91.6
MO	1.31 ± 0.72	0.55 ± 0.86	0.0 - 7.5
EO	0.28 ± 0.51	1.32 ± 1.74	0.0 - 3.9
BA	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.0 - 2.0
Erythrocytes			
RBC (M/μL)	9.81 ± 0.24	10.01 ± 0.72	6.36 - 9.42
HGB (g/dl)	14.12 ± 0.77	15.76 ± 0.28	11.0 - 15.1
HCT (%)	49.31 ± 2.03	46.91 ± 3.77	35.1 - 45.4
MCV (fL)	50.68 ± 1.39	48.41 ± 0.99	45.4 - 60.3
MCH (pg)	14.80 ± 0.43	15.62 ± 0.51	14.1 - 19.3
MCHC (g/dl)	29.51 ± 0.74	31.56 ± 1.30	30.2 - 34.2
RDW (%)	13.18 ± 0.12	13.84 ± 1.45	12.4 - 27.0

Références bibliographiques

Abdel-Misih, Sherif R. Z., et Mark Bloomston. 2010. « Liver Anatomy ». *The Surgical Clinics of North America* 90(4): 643-53.

Abdul-Wahed, Aya, Sandra Guilmeau, et Catherine Postic. 2017. « Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals ». *Cell Metabolism* 26(2): 324-41.

Abla, Houda et al. 2020. « The Multifaceted Contribution of α-Ketoglutarate to Tumor Progression: An Opportunity to Exploit? » *Seminars in Cell & Developmental Biology* 98: 26-33.

Adamson, Aaron W. et al. 2006. « Hepatocyte Nuclear Factor-4alpha Contributes to Carbohydrate-Induced Transcriptional Activation of Hepatic Fatty Acid Synthase ». *The Biochemical Journal* 399(2): 285-95.

Aft, R. L., F. W. Zhang, et D. Gius. 2002. « Evaluation of 2-Deoxy-D-Glucose as a Chemotherapeutic Agent: Mechanism of Cell Death ». *British Journal of Cancer* 87(7): 805-12.

Ahn, Byungyong et al. 2016. « MondoA Coordinately Regulates Skeletal Myocyte Lipid Homeostasis and Insulin Signaling ». *The Journal of Clinical Investigation* 126(9): 3567-79.

Ai, Xuejun et al. 2018. « Overexpression of PIK3R1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression ». *Biological Research* 51(1): 52.

Airley, R. E. et al. 2014. « Role of Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP) in Generating an Aerobic Metabolic Phenotype and in Breast Cancer Progression ». *British Journal of Cancer* 110(3): 715-23.

Akins, Nicholas S., Tanner C. Nielson, et Hoang V. Le. 2018. « Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18(6): 494-504.

Akins, Nicholas S., Tanner C. Nielson, et Hoang V. Le. 2018. « Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18(6): 494-504.

Alayev, Anya et al. 2015. « The Combination of Rapamycin and Resveratrol Blocks Autophagy and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 116(3): 450-57.

Alessi, D. R. et al. 1996. « Mechanism of Activation of Protein Kinase B by Insulin and IGF-1 ». *The EMBO journal* 15(23): 6541-51.

Alessi, Dario R., Laura R. Pearce, et Juan M. García-Martínez. 2009. « New Insights into MTOR Signaling: MTORC2 and Beyond ». *Science Signaling* 2(67): pe27.

Altman, Brian J., Zachary E. Stine, et Chi V. Dang. 2016. « From Krebs to Clinic: Glutamine Metabolism to Cancer Therapy ». *Nature Reviews. Cancer* 16(10): 619-34.

Andjelković, M. et al. 1997. « Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B ». *The Journal of Biological Chemistry* 272(50): 31515-24.

Arden, Catherine et al. 2012. « Fructose 2,6-Bisphosphate Is Essential for Glucose-Regulated Gene Transcription of Glucose-6-Phosphatase and Other ChREBP Target Genes in Hepatocytes ». *The Biochemical Journal* 443(1): 111-23.

Assimacopoulos-Jeannet, F., et B. Jeanrenaud. 1990. « Insulin Activates 6-Phosphofructo-2-Kinase and Pyruvate Kinase in the Liver. Indirect Evidence for an Action via a Phosphatase ». *The Journal of Biological Chemistry* 265(13): 7202-6.

Avissar, Nelly E., Harry C. Sax, et Liana Toia. 2008. « In Human Entrocytes, GLN Transport and ASCT2 Surface Expression Induced by Short-Term EGF Are MAPK, PI3K, and Rho-Dependent ». *Digestive Diseases and Sciences* 53(8): 2113-25.

Backer, Jonathan M. 2008. « The Regulation and Function of Class III PI3Ks: Novel Roles for Vps34 ». *The Biochemical Journal* 410(1): 1-17.

Bang, Yung-Jue et al. 2020. « Ramucirumab and Durvalumab for Previously Treated, Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, Gastric/Gastro-Oesophageal Junction Adenocarcinoma, or Hepatocellular Carcinoma: An Open-Label, Phase Ia/b Study (JVDJ) ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 137: 272-84.

Baraille, Floriane et al. 2015. « Integration of ChREBP-Mediated Glucose Sensing into Whole Body Metabolism ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 30(6): 428-37.

Barber, Michael C., Nigel T. Price, et Maureen T. Travers. 2005. « Structure and Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase Genes of Metazoa ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1733(1): 1-28.

Barron, Carly C., Philip J. Bilan, Theodoros Tsakiridis, et Evangelia Tsiani. 2016. « Facilitative Glucose Transporters: Implications for Cancer Detection, Prognosis and Treatment ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 65(2): 124-39.

Bauer, Todd M., Manish R. Patel, et Jeffrey R. Infante. 2015. « Targeting PI3 Kinase in Cancer ». *Pharmacology & Therapeutics* 146: 53-60.

Bayascas, Jose R. et al. 2005. « Hypomorphic Mutation of PDK1 Suppresses Tumorigenesis in PTEN(+/-) Mice ». *Current biology: CB* 15(20): 1839-46.

Bayés, Mònica et al. 2003. « Mutational Mechanisms of Williams-Beuren Syndrome

Deletions ». *American Journal of Human Genetics* 73(1): 131-51.

Bécard, D. et al. 2001. « Adenovirus-Mediated Overexpression of Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Mimics Insulin Effects on Hepatic Gene Expression and Glucose Homeostasis in Diabetic Mice ». *Diabetes* 50(11): 2425-30.

Ben-Sahra, Issam, Jessica J. Howell, John M. Asara, et Brendan D. Manning. 2013. « Stimulation of de Novo Pyrimidine Synthesis by Growth Signaling through MTOR and S6K1 ». *Science (New York, N.Y.)* 339(6125): 1323-28.

Benhamed, Fadila et al. 2012. « The Lipogenic Transcription Factor ChREBP Dissociates Hepatic Steatosis from Insulin Resistance in Mice and Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 122(6): 2176-94.

Bhutia, Yangzom D., Ellappan Babu, Sabarish Ramachandran, et Vadivel Ganapathy. 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 Research* 75(9): 1782-88.

Bilzer, Manfred, Frigga Roggel, et Alexander L. Gerbes. 2006. « Role of Kupffer Cells in Host Defense and Liver Disease ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 26(10): 1175-86.

Birkenfeld, Andreas L., et Gerald I. Shulman. 2014. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59(2): 713-23.

Blackwell, T. K. et al. 1993. « Binding of Myc Proteins to Canonical and Noncanonical DNA Sequences ». *Molecular and Cellular Biology* 13(9): 5216-24.

Boroughs, Lindsey K., et Ralph J. DeBerardinis. 2015. « Metabolic Pathways Promoting Cancer Cell Survival and Growth ». *Nature Cell Biology* 17(4): 351-59.

Boyault, Sandrine et al. 2007. « Transcriptome Classification of HCC Is Related to Gene Alterations and to New Therapeutic Targets ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45(1): 42-52.

Brancatelli, Giuseppe, Michael P. Federle, Luigi Grazioli, et Brian I. Carr. 2002. « Hepatocellular Carcinoma in Noncirrhotic Liver: CT, Clinical, and Pathologic Findings in 39 U.S. Residents ». *Radiology* 222(1): 89-94.

Bray, Freddie et al. 2018. « Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries ». *CA: a cancer journal for clinicians* 68(6): 394-424.

Bricambert, Julien et al. 2010. « Salt-Inducible Kinase 2 Links Transcriptional Coactivator P300 Phosphorylation to the Prevention of ChREBP-Dependent Hepatic Steatosis in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 120(12): 4316-31.

Bricambert, Julien et al. 2018. « The Histone Demethylase Phf2 Acts as a Molecular

Checkpoint to Prevent NAFLD Progression during Obesity ». *Nature Communications* 9(1): 2092.

Brown, J. L., et J. M. Johnston. 1964. « THE UTILIZATION OF I- AND 2-MONOGLYCERIDES FOR INTESTINAL TRIGLYCERIDE BIOSYNTHESIS ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 84: 448-57.

Brown, K. S. et al. 1997. « Glucokinase Regulatory Protein May Interact with Glucokinase in the Hepatocyte Nucleus ». *Diabetes* 46(2): 179-86.

Budhu, Anuradha et al. 2013. « Integrated Metabolite and Gene Expression Profiles Identify Lipid Biomarkers Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma and Patient Outcomes ». *Gastroenterology* 144(5): 1066-1075.e1.

Bungard, Claire I., et John D. McGivan. 2005. « Identification of the Promoter Elements Involved in the Stimulation of ASCT2 Expression by Glutamine Availability in HepG2 Cells and the Probable Involvement of FXR/RXR Dimers ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 443(1-2): 53-59.

Burke, Susan J., J. Jason Collier, et Donald K. Scott. 2009. « CAMP Opposes the Glucose-Mediated Induction of the L-PK Gene by Preventing the Recruitment of a Complex Containing ChREBP, HNF4alpha, and CBP ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(9): 2855-65.

Capurro, Mariana et al. 2003. « Glypican-3: A Novel Serum and Histochemical Marker for Hepatocellular Carcinoma ». *Gastroenterology* 125(1): 89-97.

Cariani, E. et al. 1988. « Differential Expression of Insulin-like Growth Factor II MRNA in Human Primary Liver Cancers, Benign Liver Tumors, and Liver Cirrhosis ». *Cancer Research* 48(23): 6844-49.

Caron, Sandrine et al. 2013. « Farnesoid X Receptor Inhibits the Transcriptional Activity of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Human Hepatocytes ». *Molecular and Cellular Biology* 33(11): 2202-11.

Cascone, Tina et al. 2018. « Increased Tumor Glycolysis Characterizes Immune Resistance to Adoptive T Cell Therapy ». *Cell Metabolism* 27(5): 977-987.e4.

Cha, Ji-Young, et Joyce J. Repa. 2007. « The Liver X Receptor (LXR) and Hepatic Lipogenesis. The Carbohydrate-Response Element-Binding Protein Is a Target Gene of LXR ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(1): 743-51.

Cha, Jong-Ho et al. 2018. « Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1 ». *Molecular Cell* 71(4): 606-620.e7.

Chambers, Kari T. et al. 2013. « PGC-1β and ChREBP Partner to Cooperatively Regulate Hepatic Lipogenesis in a Glucose Concentration-Dependent Manner ». *Molecular Metabolism* 2(3): 194-204.

Chan, T. O., S. E. Rittenhouse, et P. N. Tsichlis. 1999. « AKT/PKB and Other D3

Phosphoinositide-Regulated Kinases: Kinase Activation by Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation ». *Annual Review of Biochemistry* 68: 965-1014.

Chang, Chih-Hao et al. 2015. « Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression ». *Cell* 162(6): 1229-41.

Chattergoon, Michael A. et al. 2014. « HIV and HCV Activate the Inflammasome in Monocytes and Macrophages via Endosomal Toll-like Receptors without Induction of Type 1 Interferon ». *PLoS pathogens* 10(5): e1004082.

Chen, Chu, et Tao Lou. 2017. « Hypoxia Inducible Factors in Hepatocellular Carcinoma ». *Oncotarget* 8(28): 46691-703.

Chen, Chuan, et Ge Wang. 2015. « Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma and Challenges and Opportunities for Molecular Targeted Therapy ». *World Journal of Hepatology* 7(15): 1964-70.

Chen, Hanbei et al. 2014. « Advanced Glycation End Products Increase Carbohydrate Responsive Element Binding Protein Expression and Promote Cancer Cell Proliferation ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 395(1-2): 69-78.

Chen, Hu et al. 2019. « 6PGD Inhibition Sensitizes Hepatocellular Carcinoma to Chemotherapy via AMPK Activation and Metabolic Reprogramming ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 111: 1353-58.

Chen, Junqin et al. 2008. « Thioredoxin-Interacting Protein: A Critical Link between Glucose Toxicity and Beta-Cell Apoptosis ». *Diabetes* 57(4): 938-44.

Chen, Lian, et Hengmin Cui. 2015. « Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach ». *International Journal of Molecular Sciences* 16(9): 22830-55.

Chen, Xiu, Di Xu, Jian Zhang, et Jinhai Tang. 2019a. « Future Perspectives of Sleeping Beauty Transposon System in Cancer Research ». *EBioMedicine* 46: 2-3.

Chen, Xun, Shangwu Chen, et Dongsheng Yu. 2020. « Metabolic Reprogramming of Chemoresistant Cancer Cells and the Potential Significance of Metabolic Regulation in the Reversal of Cancer Chemoresistance ». *Metabolites* 10(7).

Chen, Yue-Lei et al. 2011. « Sorafenib Inhibits Transforming Growth Factor B1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Apoptosis in Mouse Hepatocytes ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53(5): 1708-18.

Cheng, Tzuling et al. 2011. « Pyruvate Carboxylase Is Required for Glutamine-Independent Growth of Tumor Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(21): 8674-79.

Cherniske, Elizabeth M. et al. 2004. « Multisystem Study of 20 Older Adults with Williams Syndrome ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 131(3): 255-64.

Choi, Y. et al. 2000. « The Trans-10,Cis-12 Isomer of Conjugated Linoleic Acid

Downregulates Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes ». *The Journal of Nutrition* 130(8): 1920-24.

Christen, Stefan et al. 2016. « Breast Cancer-Derived Lung Metastases Show Increased Pyruvate Carboxylase-Dependent Anaplerosis ». *Cell Reports* 17(3): 837-48.

Cinti, D. L., L. Cook, M. N. Nagi, et S. K. Suneja. 1992. « The Fatty Acid Chain Elongation System of Mammalian Endoplasmic Reticulum ». *Progress in Lipid Research* 31(1): 1-51.

Colegio, Oscar R. et al. 2014. « Functional Polarization of Tumour-Associated Macrophages by Tumour-Derived Lactic Acid ». *Nature* 513(7519): 559-63.

Colnot, S. et al. 2004. « Liver-Targeted Disruption of Apc in Mice Activates Beta-Catenin Signaling and Leads to Hepatocellular Carcinomas ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(49): 17216-21.

Contreras, Osvaldo et al. 2019. « Cross-Talk between TGF-β and PDGFRα Signaling Pathways Regulates the Fate of Stromal Fibro-Adipogenic Progenitors ». *Journal of Cell Science* 132(19).

Courtney, Kevin D., Ryan B. Corcoran, et Jeffrey A. Engelman. 2010. « The PI3K Pathway as Drug Target in Human Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(6): 1075-83.

Cowling, Victoria H., et Michael D. Cole. 2006. « Mechanism of Transcriptional Activation by the Myc Oncoproteins ». *Seminars in Cancer Biology* 16(4): 242-52.

Cummins, Eoin P. et al. 2006. « Prolyl Hydroxylase-1 Negatively Regulates IkappaB Kinase-Beta, Giving Insight into Hypoxia-Induced NFkappaB Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48): 18154-59.

Curthoys, N. P., et M. Watford. 1995. « Regulation of Glutaminase Activity and Glutamine Metabolism ». *Annual Review of Nutrition* 15: 133-59.

D'Aniello, Cristina, Eduardo J. Patriarca, James M. Phang, et Gabriella Minchiotti. 2020. « Proline Metabolism in Tumor Growth and Metastatic Progression ». *Frontiers in Oncology* 10: 776.

Da Silva Xavier, Gabriela et al. 2006. « ChREBP Binding to Fatty Acid Synthase and L-Type Pyruvate Kinase Genes Is Stimulated by Glucose in Pancreatic Beta-Cells ». *Journal of Lipid Research* 47(11): 2482-91.

Dai, Weiqi et al. 2015. « By Reducing Hexokinase 2, Resveratrol Induces Apoptosis in HCC Cells Addicted to Aerobic Glycolysis and Inhibits Tumor Growth in Mice ». *Oncotarget* 6(15): 13703-17.

Dang, Chi V. 2013. « MYC, Metabolism, Cell Growth, and Tumorigenesis ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(8).

Dang, Chi V., Anne Le, et Ping Gao. 2009. « MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15(21): 6479-83.

Dang, Chi V., Jung-whan Kim, Ping Gao, et Jason Yustein. 2008. « The Interplay between MYC and HIF in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 8(1): 51-56.

Dasgupta, Paramita et al. 2020. « Global Trends in Incidence Rates of Primary Adult Liver Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Frontiers in Oncology* 10: 171.

Davies, Michael N., Brennon L. O'Callaghan, et Howard C. Towle. 2008. « Glucose Activates ChREBP by Increasing Its Rate of Nuclear Entry and Relieving Repression of Its Transcriptional Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 283(35): 24029-38.

Davies, Michael N., Brennon L. O'Callaghan, et Howard C. Towle. 2010. « Activation and Repression of Glucose-Stimulated ChREBP Requires the Concerted Action of Multiple Domains within the MondoA Conserved Region ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 299(4): E665-674.

DeBerardinis, R. J., et T. Cheng. 2010. « Q's next: The Diverse Functions of Glutamine in Metabolism, Cell Biology and Cancer ». *Oncogene* 29(3): 313-24.

DeBerardinis, Ralph J. et al. 2007. « Beyond Aerobic Glycolysis: Transformed Cells Can Engage in Glutamine Metabolism That Exceeds the Requirement for Protein and Nucleotide Synthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(49): 19345-50.

DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, et Craig B. Thompson. 2008. « The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation ». *Cell Metabolism* 7(1): 11-20.

Denechaud, Pierre-Damien et al. 2008. « ChREBP, but Not LXRs, Is Required for the Induction of Glucose-Regulated Genes in Mouse Liver ». *The Journal of Clinical Investigation* 118(3): 956-64.

Dentin, Renaud et al. 2004. « Hepatic Glucokinase Is Required for the Synergistic Action of ChREBP and SREBP-1c on Glycolytic and Lipogenic Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(19): 20314-26.

Dentin, Renaud et al. 2012. « Glucose 6-Phosphate, Rather than Xylulose 5-Phosphate, Is Required for the Activation of ChREBP in Response to Glucose in the Liver ». *Journal of Hepatology* 56(1): 199-209.

Dentin, Renaud, Dominique Langin, et Catherine Postic. 2012. « Hidden Variant of ChREBP in Fat Links Lipogenesis to Insulin Sensitivity ». *Cell Metabolism* 15(6): 795-97.

Desbois-Mouthon, C. et al. 2001. « Insulin and IGF-1 Stimulate the Beta-Catenin Pathway through Two Signalling Cascades Involving GSK-3beta Inhibition and Ras Activation ». *Oncogene* 20(2): 252-59.

DeWaal, Dannielle et al. 2018. « Hexokinase-2 Depletion Inhibits Glycolysis and Induces Oxidative Phosphorylation in Hepatocellular Carcinoma and Sensitizes to Metformin ». *Nature Communications* 9(1): 446.

Diaz-Moralli, Santiago et al. 2012. « Target Metabolomics Revealed Complementary Roles of Hexose- and Pentose-Phosphates in the Regulation of Carbohydrate-Dependent Gene Expression ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 303(2): E234-242.

Dijkgraaf, Eveline M. et al. 2013. « Chemotherapy Alters Monocyte Differentiation to Favor Generation of Cancer-Supporting M2 Macrophages in the Tumor Microenvironment ». *Cancer Research* 73(8): 2480-92.

Dose Schwarz, Joerg et al. 2005. « Early Prediction of Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer Using Sequential 18F-FDG PET ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 46(7): 1144-50.

Dragani, Tommaso A. 2010. « Risk of HCC: Genetic Heterogeneity and Complex Genetics ». *Journal of Hepatology* 52(2): 252-57.

Dunn, Katherine L., et James R. Davie. 2005. « Stimulation of the Ras-MAPK Pathway Leads to Independent Phosphorylation of Histone H3 on Serine 10 and 28 ». *Oncogene* 24(21): 3492-3502.

Durán, Raúl V. et al. 2012. « Glutaminolysis Activates Rag-MTORC1 Signaling ». *Molecular Cell* 47(3): 349-58.

Edmondson, H. A., et P. E. Steiner. 1954. « Primary Carcinoma of the Liver: A Study of 100 Cases among 48,900 Necropsies ». *Cancer* 7(3): 462-503.

Eissing, Leah et al. 2013. « De Novo Lipogenesis in Human Fat and Liver Is Linked to ChREBP-β and Metabolic Health ». *Nature Communications* 4: 1528.

El-Khoueiry, Anthony B. et al. 2017. « Nivolumab in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (CheckMate 040): An Open-Label, Non-Comparative, Phase 1/2 Dose Escalation and Expansion Trial ». *Lancet (London, England)* 389(10088): 2492-2502.

European Association for the Study of Liver. 2012. « EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease ». *Journal of Hepatology* 57(2): 399-420.

Faes, Seraina, et Olivier Dormond. 2015. « PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 16(9): 21138-52.

Faivre, Sandrine, Lorenza Rimassa, et Richard S. Finn. 2020. « Molecular Therapies for HCC: Looking Outside the Box ». *Journal of Hepatology* 72(2): 342-52.

Farazi, Paraskevi A. et al. 2003. « Differential Impact of Telomere Dysfunction on Initiation and Progression of Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer Research* 63(16): 5021-27.

Farazi, Paraskevi A., et Ronald A. DePinho. 2006. « Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis:

From Genes to Environment ». *Nature Reviews. Cancer* 6(9): 674-87.

Farese, R. V., S. Cases, et S. J. Smith. 2000. « Triglyceride Synthesis: Insights from the Cloning of Diacylglycerol Acyltransferase ». *Current Opinion in Lipidology* 11(3): 229-34.

Fattovich, Giovanna, Tommaso Stroffolini, Irene Zagni, et Francesco Donato. 2004. « Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors ». *Gastroenterology* 127(5 Suppl 1): S35-50.

Febbraio, Mark A. et al. 2019. « Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They? » *Cell Metabolism* 29(1): 18-26.

Fendt, Sarah-Maria, Christian Frezza, et Ayelet Erez. 2020. « Targeting Metabolic Plasticity and Flexibility Dynamics for Cancer Therapy ». *Cancer Discovery* 10(12): 1797-1807.

Feng, D. Y., H. Zheng, Y. Tan, et R. X. Cheng. 2001. « Effect of Phosphorylation of MAPK and Stat3 and Expression of C-Fos and c-Jun Proteins on Hepatocarcinogenesis and Their Clinical Significance ». *World Journal of Gastroenterology* 7(1): 33-36.

Fingar, Diane C. et al. 2002. « Mammalian Cell Size Is Controlled by MTOR and Its Downstream Targets S6K1 and 4EBP1/EIF4E ». *Genes & Development* 16(12): 1472-87.

Finn, Richard S. et al. 2020. « Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma ». *The New England Journal of Medicine* 382(20): 1894-1905.

Finn, Richard S., Masafumi Ikeda, et al. 2020. « Phase Ib Study of Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 38(26): 2960-70.

Finn, Richard S., Shukui Qin, et al. 2020. « Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma ». *The New England Journal of Medicine* 382(20): 1894-1905.

Flavin, Richard, Stephane Peluso, Paul L. Nguyen, et Massimo Loda. 2010. « Fatty Acid Synthase as a Potential Therapeutic Target in Cancer ». *Future Oncology (London, England)* 6(4): 551-62.

Flowers, Matthew T., et James M. Ntambi. 2008. « Role of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase in Regulating Lipid Metabolism ». *Current Opinion in Lipidology* 19(3): 248-56.

Foretz, M., C. Guichard, P. Ferré, et F. Foufelle. 1999. « Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Is a Major Mediator of Insulin Action on the Hepatic Expression of Glucokinase and Lipogenesis-Related Genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(22): 12737-42.

Fujiyama, Shigetoshi et al. 2002. « Tumor Markers in Early Diagnosis, Follow-up and

Management of Patients with Hepatocellular Carcinoma ». *Oncology* 62 Suppl 1: 57-63.

Gameiro, Paulo A. et al. 2013. « In Vivo HIF-Mediated Reductive Carboxylation Is Regulated by Citrate Levels and Sensitizes VHL-Deficient Cells to Glutamine Deprivation ». *Cell Metabolism* 17(3): 372-85.

Gao, Ping et al. 2009. « C-Myc Suppression of MiR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism ». *Nature* 458(7239): 762-65.

Gauthier, Karine et al. 2010. « Thyroid Hormone Receptor Beta (TRbeta) and Liver X Receptor (LXR) Regulate Carbohydrate-Response Element-Binding Protein (ChREBP) Expression in a Tissue-Selective Manner ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(36): 28156-63.

Ge, Xiaodong et al. 2014. « High Mobility Group Box-1 (HMGB1) Participates in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease (ALD) ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(33): 22672-91.

Gentric, Géraldine, Virginie Mieulet, et Fatima Mechta-Grigoriou. 2017. « Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field ». *Antioxidants & Redox Signaling* 26(9): 462-85.

Georgescu, Maria-Magdalena. 2010. « PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control ». *Genes & Cancer* 1(12): 1170-77.

Giannelli, Gianluigi, et Salvatore Antonaci. 2006. « Novel Concepts in Hepatocellular Carcinoma: From Molecular Research to Clinical Practice ». *Journal of Clinical Gastroenterology* 40(9): 842-46.

Girard, J., P. Ferré, et F. Foufelle. 1997. « Mechanisms by Which Carbohydrates Regulate Expression of Genes for Glycolytic and Lipogenic Enzymes ». *Annual Review of Nutrition* 17: 325-52.

Goetzman, Eric S., et Edward V. Prochownik. 2018. « The Role for Myc in Coordinating Glycolysis, Oxidative Phosphorylation, Glutaminolysis, and Fatty Acid Metabolism in Normal and Neoplastic Tissues ». *Frontiers in Endocrinology* 9: 129.

Goldberg, Ira J., Robert H. Eckel, et Nada A. Abumrad. 2009. « Regulation of Fatty Acid Uptake into Tissues: Lipoprotein Lipase- and CD36-Mediated Pathways ». *Journal of Lipid Research* 50 Suppl: S86-90.

Gollob, Jared A., Scott Wilhelm, Chris Carter, et Susan L. Kelley. 2006. « Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway ». *Seminars in Oncology* 33(4): 392-406.

Grabitzki, Julia, et Günter Lochnit. 2009. « Immunomodulation by Phosphocholine--Biosynthesis, Structures and Immunological Implications of Parasitic PC-Epitopes ». *Molecular Immunology* 47(2-3): 149-63.

Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James, et R. N. Eisenman. 2000. « The Myc/Max/Mad Network and the Transcriptional Control of Cell Behavior ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 653-99.

Grant, D. M. 1991. « Detoxification Pathways in the Liver ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 14(4): 421-30.

Greco, Dario et al. 2008. « Gene Expression in Human NAFLD ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 294(5): G1281-1287.

Gross, Matt I. et al. 2014. « Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer ». *Molecular Cancer Therapeutics* 13(4): 890-901.

Guinez, Céline et al. 2011. « O-GlcNAcylation Increases ChREBP Protein Content and Transcriptional Activity in the Liver ». *Diabetes* 60(5): 1399-1413.

Hadad, Sirwan M. et al. 2015. « Evidence for Biological Effects of Metformin in Operable Breast Cancer: Biomarker Analysis in a Pre-Operative Window of Opportunity Randomized Trial ». *Breast Cancer Research and Treatment* 150(1): 149-55.

Hall, Zoe et al. 2021. « Lipid Remodeling in Hepatocyte Proliferation and Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 73(3): 1028-44.

Hamaguchi, Takashi et al. 2008. « Glycolysis Module Activated by Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Is Related to the Aggressive Phenotype of Hepatocellular Carcinoma ». *International Journal of Oncology* 33(4): 725-31.

Hamid, Abdu Selim, Isaias Goitom Tesfamariam, Yucheng Zhang, et Zhen Gui Zhang. 2013. « Aflatoxin B1-Induced Hepatocellular Carcinoma in Developing Countries: Geographical Distribution, Mechanism of Action and Prevention ». *Oncology Letters* 5(4): 1087-92.

Hanada, Masahito, Jianhua Feng, et Brian A. Hemmings. 2004. « Structure, Regulation and Function of PKB/AKT--a Major Therapeutic Target ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1697(1-2): 3-16.

Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100(1): 57-70.

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144(5): 646-74.

Hao, Yujun et al. 2016. « Oncogenic PIK3CA Mutations Reprogram Glutamine Metabolism in Colorectal Cancer ». *Nature Communications* 7: 11971.

Hart, Gerald W., et Yoshihiro Akimoto. 2009. « The O-GlcNAc Modification ». In *Essentials of Glycobiology*, éd. Ajit Varki et al. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1954/ (24 avril 2021).

Hart, M. J. et al. 1998. « Downregulation of Beta-Catenin by Human Axin and Its Association with the APC Tumor Suppressor, Beta-Catenin and GSK3 Beta ». *Current biology:*

CB 8(10): 573-81.

Hatzivassiliou, Georgia et al. 2005a. « ATP Citrate Lyase Inhibition Can Suppress Tumor Cell Growth ». *Cancer Cell* 8(4): 311-21.

He, Shujiao et al. 2017. « FOXA1 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Progression by Suppressing PIK3R1 Expression in Male Patients ». *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 36(1): 175.

He, Zhibin et al. 2004. « Modulation of Carbohydrate Response Element-Binding Protein Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes and Rat Adipose Tissue ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 287(3): E424-430.

Heidenreich, Steffi et al. 2020. « The Glucose-Sensing Transcription Factor ChREBP Is Targeted by Proline Hydroxylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 295(50): 17158-68.

Herman, Mark A. et al. 2012. « A Novel ChREBP Isoform in Adipose Tissue Regulates Systemic Glucose Metabolism ». *Nature* 484(7394): 333-38.

Hiyama, Eiso. 2014. « Pediatric Hepatoblastoma: Diagnosis and Treatment ». *Translational Pediatrics* 3(4): 293-99.

Hoshida, Yujin et al. 2008. « Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma ». *The New England Journal of Medicine* 359(19): 1995-2004.

Hoshida, Yujin et al. 2009. « Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer Research* 69(18): 7385-92.

Hosios, Aaron M. et al. 2016. « Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells ». *Developmental Cell* 36(5): 540-49.

Hoxhaj, Gerta, et Brendan D. Manning. 2020. « The PI3K-AKT Network at the Interface of Oncogenic Signalling and Cancer Metabolism ». *Nature Reviews. Cancer* 20(2): 74-88.

Hu, Tsung-Hui et al. 2003a. « Expression and Prognostic Role of Tumor Suppressor Gene PTEN/MMAC1/TEP1 in Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer* 97(8): 1929-40.

Hu, Wenwei et al. 2010. « Glutaminase 2, a Novel P53 Target Gene Regulating Energy Metabolism and Antioxidant Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16): 7455-60.

Hua, Hui et al. 2019. « Targeting MTOR for Cancer Therapy ». *Journal of Hematology & Oncology* 12(1): 71.

Hubbard, Stevan R., et W. Todd Miller. 2007. « Receptor Tyrosine Kinases: Mechanisms of Activation and Signaling ». *Current Opinion in Cell Biology* 19(2): 117-23.

Huether, Alexander et al. 2006. « Signaling Pathways Involved in the Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor by Erlotinib in Hepatocellular Cancer ». *World Journal of Gastroenterology* 12(32): 5160-67.

Hurtado del Pozo, Carmen et al. 2011. « ChREBP Expression in the Liver, Adipose Tissue and Differentiated Preadipocytes in Human Obesity ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1811(12): 1194-1200.

Hussain, S. P. et al. 2007. « TP53 Mutations and Hepatocellular Carcinoma: Insights into the Etiology and Pathogenesis of Liver Cancer ». *Oncogene* 26(15): 2166-76.

Huynh, Hung et al. 2003. « Over-Expression of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Kinase (MEK)-MAPK in Hepatocellular Carcinoma: Its Role in Tumor Progression and Apoptosis ». *BMC gastroenterology* 3: 19.

Iizuka, Katsumi et al. 2004. « Deficiency of Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP) Reduces Lipogenesis as Well as Glycolysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(19): 7281-86.

Iizuka, Katsumi, Bonnie Miller, et Kosaku Uyeda. 2006. « Deficiency of Carbohydrate-Activated Transcription Factor ChREBP Prevents Obesity and Improves Plasma Glucose Control in Leptin-Deficient (Ob/Ob) Mice ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 291(2): E358-364.

Iizuka, Katsumi, et Yukio Horikawa. 2008. « ChREBP: A Glucose-Activated Transcription Factor Involved in the Development of Metabolic Syndrome ». *Endocrine Journal* 55(4): 617-24.

Iizuka, Katsumi, Jun Takeda, et Yukio Horikawa. 2009. « Glucose Induces FGF21 MRNA Expression through ChREBP Activation in Rat Hepatocytes ». *FEBS letters* 583(17): 2882-86.

Iracheta-Vellve, Arvin et al. 2015. « Inhibition of Sterile Danger Signals, Uric Acid and ATP, Prevents Inflammasome Activation and Protects from Alcoholic Steatohepatitis in Mice ». *Journal of Hepatology* 63(5): 1147-55.

Iroz, Alison et al. 2017. « A Specific ChREBP and PPARα Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21 Response ». *Cell Reports* 21(2): 403-16.

Ishii, Seiji, Katsumi Iizuka, Bonnie C. Miller, et Kosaku Uyeda. 2004. « Carbohydrate Response Element Binding Protein Directly Promotes Lipogenic Enzyme Gene Transcription ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15597-602.

Ito, Y. et al. 1998. « Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular Signal-Regulated Kinases in Human Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 27(4): 951-58.

Ito, Y. et al. 2001. « Expression and Clinical Significance of Erb-B Receptor Family in Hepatocellular Carcinoma ». *British Journal of Cancer* 84(10): 1377-83.

Iynedjian, P. B., A. Gjinovci, et A. E. Renold. 1988. « Stimulation by Insulin of Glucokinase Gene Transcription in Liver of Diabetic Rats ». *The Journal of Biological Chemistry* 263(2): 740-44.

Jacinto, Estela et al. 2004. « Mammalian TOR Complex 2 Controls the Actin Cytoskeleton and Is Rapamycin Insensitive ». *Nature Cell Biology* 6(11): 1122-28.

Jaiswal, Bijay S. et al. 2009. « Somatic Mutations in P85alpha Promote Tumorigenesis through Class IA PI3K Activation ». *Cancer Cell* 16(6): 463-74.

Janic, Ana et al. 2018. « DNA Repair Processes Are Critical Mediators of P53-Dependent Tumor Suppression ». *Nature Medicine* 24(7): 947-53.

Jensen-Urstad, Anne P. L., et Clay F. Semenkovich. 2012. « Fatty Acid Synthase and Liver Triglyceride Metabolism: Housekeeper or Messenger? » *Biochimica Et Biophysica Acta* 1821(5): 747-53.

Jeong, Yun-Seung et al. 2011. « Integrated Expression Profiling and Genome-Wide Analysis of ChREBP Targets Reveals the Dual Role for ChREBP in Glucose-Regulated Gene Expression ». *PloS One* 6(7): e22544.

Jewell, Jenna L. et al. 2015. « Metabolism. Differential Regulation of MTORC1 by Leucine and Glutamine ». *Science (New York, N.Y.)* 347(6218): 194-98.

Jiang, Peng et al. 2013. « Reciprocal Regulation of P53 and Malic Enzymes Modulates Metabolism and Senescence ». *Nature* 493(7434): 689-93.

Jin, Quanri et al. 2010. « Fatty Acid Synthase Phosphorylation: A Novel Therapeutic Target in HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells ». *Breast cancer research: BCR* 12(6): R96.

Jung, Hunmin et al. 2020. « The Structure of Importin α and the Nuclear Localization Peptide of ChREBP, and Small Compound Inhibitors of ChREBP-Importin α Interactions ». *The Biochemical Journal* 477(17): 3253-69.

Jurica, M. S. et al. 1998. « The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase by Fructose-1,6-Bisphosphate ». *Structure (London, England: 1993)* 6(2): 195-210.

Kabashima, Tsutomu, Takumi Kawaguchi, Brian E. Wadzinski, et Kosaku Uyeda. 2003. « Xylulose 5-Phosphate Mediates Glucose-Induced Lipogenesis by Xylulose 5-Phosphate-Activated Protein Phosphatase in Rat Liver ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9): 5107-12.

Kaimori, Aki et al. 2007. « Transforming Growth Factor-Beta1 Induces an Epithelial-to-Mesenchymal Transition State in Mouse Hepatocytes in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(30): 22089-101.

Kallinowski, F. et al. 1989. « Blood Flow, Metabolism, Cellular Microenvironment, and Growth Rate of Human Tumor Xenografts ». *Cancer Research* 49(14): 3759-64.

Kato, Yasumasa, Toyonobu Maeda, Atsuko Suzuki, et Yuh Baba. 2018. « Cancer Metabolism: New Insights into Classic Characteristics ». *The Japanese Dental Science Review* 54(1): 8-21.

Kaushik, Akash K. et al. 2016. « Inhibition of the Hexosamine Biosynthetic Pathway Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer ». *Nature Communications* 7: 11612.

Kaushik, Akash K., et Ralph J. DeBerardinis. 2018. « Applications of Metabolomics to Study Cancer Metabolism ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* 1870(1): 2-14.

Kawate, S. et al. 1999. « Amplification of C-Myc in Hepatocellular Carcinoma: Correlation with Clinicopathologic Features, Proliferative Activity and P53 Overexpression ». *Oncology* 57(2): 157-63.

Kebriaei, Partow et al. 2017. « Gene Therapy with the Sleeping Beauty Transposon System ». *Trends in genetics: TIG* 33(11): 852-70.

Keinicke, Helle et al. 2020. « FGF21 Regulates Hepatic Metabolic Pathways to Improve Steatosis and Inflammation ». *Endocrine Connections* 9(8): 755-68.

Khomich, Olga, Alexander V. Ivanov, et Birke Bartosch. 2019. « Metabolic Hallmarks of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis ». *Cells* 9(1).

Khotskaya, Yekaterina B. et al. 2017. « Targeting TRK Family Proteins in Cancer ». *Pharmacology & Therapeutics* 173: 58-66.

Kiesel, Violet A. et al. 2021. « Pyruvate Carboxylase and Cancer Progression ». *Cancer & Metabolism* 9(1): 20.

Kim, Hyoun-Ju, Makoto Miyazaki, et James M. Ntambi. 2002. « Dietary Cholesterol Opposes PUFA-Mediated Repression of the Stearoyl-CoA Desaturase-1 Gene by SREBP-1 Independent Mechanism ». *Journal of Lipid Research* 43(10): 1750-57.

Kim, Jiyeon, et Ralph J. DeBerardinis. 2019. « Mechanisms and Implications of Metabolic Heterogeneity in Cancer ». *Cell Metabolism* 30(3): 434-46.

Kim, Jung-whan et al. 2004. « Evaluation of Myc E-Box Phylogenetic Footprints in Glycolytic Genes by Chromatin Immunoprecipitation Assays ». *Molecular and Cellular Biology* 24(13): 5923-36.

Kim, Jung-whan et al. 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(21): 7381-93.

Kim, Jung-whan, Irina Tchernyshyov, Gregg L. Semenza, et Chi V. Dang. 2006. « HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia ». *Cell Metabolism* 3(3): 177-85.

Kim, Mi-Sung et al. 2016. « ChREBP Regulates Fructose-Induced Glucose Production Independently of Insulin Signaling ». *The Journal of Clinical Investigation* 126(11): 4372-86.

Kim, Yun Hak et al. 2017. « SLC2A2 (GLUT2) as a Novel Prognostic Factor for Hepatocellular Carcinoma ». *Oncotarget* 8(40): 68381-92.

Kinney, A. J., et T. S. Moore. 1987. « Phosphatidylcholine Synthesis in Castor Bean Endosperm : I. Metabolism of l-Serine ». *Plant Physiology* 84(1): 78-81.

Klein Geltink, Ramon I. et al. 2020. « Metabolic Conditioning of CD8+ Effector T Cells for Adoptive Cell Therapy ». *Nature Metabolism* 2(8): 703-16.

Ko, Y. H. et al. 2012. « A Translational Study "Case Report" on the Small Molecule "Energy Blocker" 3-Bromopyruvate (3BP) as a Potent Anticancer Agent: From Bench Side to Bedside ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 44(1): 163-70.

Kojiro, Masamichi. 2005. « Histopathology of Liver Cancers ». *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 19(1): 39-62.

Kollareddy, Madhusudhan et al. 2015. « Regulation of Nucleotide Metabolism by Mutant P53 Contributes to Its Gain-of-Function Activities ». *Nature Communications* 6: 7389.

Koo, S. H., A. K. Dutcher, et H. C. Towle. 2001. « Glucose and Insulin Function through Two Distinct Transcription Factors to Stimulate Expression of Lipogenic Enzyme Genes in Liver ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(12): 9437-45.

Koppenol, Willem H., Patricia L. Bounds, et Chi V. Dang. 2011. « Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism ». *Nature Reviews. Cancer* 11(5): 325-37.

Kornberg, H. 2000. « Krebs and His Trinity of Cycles ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1(3): 225-28.

Kowalik, Marta Anna et al. 2016. « Metabolic Reprogramming Identifies the Most Aggressive Lesions at Early Phases of Hepatic Carcinogenesis ». *Oncotarget* 7(22): 32375-93.

Kowalik, Marta Anna, Amedeo Columbano, et Andrea Perra. 2017. « Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma ». *Frontiers in Oncology* 7: 87.

Kridel, Steven J., Fumiko Axelrod, Natasha Rozenkrantz, et Jeffrey W. Smith. 2004. « Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity ». *Cancer Research* 64(6): 2070-75.

Kudo, Masatoshi et al. 2018. « Lenvatinib versus Sorafenib in First-Line Treatment of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial ». *Lancet (London, England)* 391(10126): 1163-73.

Kuehl, W. Michael, et P. Leif Bergsagel. 2012. « MYC Addiction: A Potential Therapeutic Target in MM ». *Blood* 120(12): 2351-52.

Kuhajda, Francis P. 2006. « Fatty Acid Synthase and Cancer: New Application of an Old Pathway ». *Cancer Research* 66(12): 5977-80.

Lacroix, Matthieu, Laetitia Karine Linares, et Laurent Le Cam. 2013. « [Role of the p53 tumor suppressor in metabolism] ». *Medecine Sciences: M/S* 29(12): 1125-30.

Lally, James S. V. et al. 2019. « Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase by Phosphorylation or the Inhibitor ND-654 Suppresses Lipogenesis and Hepatocellular Carcinoma ». *Cell Metabolism* 29(1): 174-182.e5.

Lam, Tony K. T. et al. 2003. « Mechanisms of the Free Fatty Acid-Induced Increase in Hepatic Glucose Production ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 284(5): E863-873.

Laplante, Mathieu, et David M. Sabatini. 2012. « MTOR Signaling in Growth Control and Disease ». *Cell* 149(2): 274-93.

Leach, R. M., et D. F. Treacher. 1998. « Oxygen Transport-2. Tissue Hypoxia ». *BMJ (Clinical research ed.)* 317(7169): 1370-73.

Lee, Jong Woo et al. 2005. « PIK3CA Gene Is Frequently Mutated in Breast Carcinomas and Hepatocellular Carcinomas ». *Oncogene* 24(8): 1477-80.

Lee, Ju-Seog et al. 2004. « Classification and Prediction of Survival in Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 40(3): 667-76.

Lee, Sunjae et al. 2017. « Network Analyses Identify Liver-Specific Targets for Treating Liver Diseases ». *Molecular Systems Biology* 13(8): 938.

Lei, Yu et al. 2020. « Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) Correlates with Colon Cancer Progression and Contributes to Cell Proliferation ». *Scientific Reports* 10(1): 4233.

Leight, Jennifer L. et al. 2012. « Matrix Rigidity Regulates a Switch between TGF-B1-Induced Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition ». *Molecular Biology of the Cell* 23(5): 781-91.

Lemmon, Mark A., et Joseph Schlessinger. 2010. « Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases ». *Cell* 141(7): 1117-34.

Leone, Robert D. et al. 2019. « Glutamine Blockade Induces Divergent Metabolic Programs to Overcome Tumor Immune Evasion ». *Science (New York, N.Y.)* 366(6468): 1013-21.

Levine, Arnold J., et Anna M. Puzio-Kuter. 2010. « The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes ». *Science (New York, N.Y.)*

330(6009): 1340-44.

Lewis, B. C. et al. 1997. « Identification of Putative C-Myc-Responsive Genes: Characterization of Rcl, a Novel Growth-Related Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 17(9): 4967-78.

Li, Feng et al. 2005. « Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis ». *Molecular and Cellular Biology* 25(14): 6225-34.

Li, Ming V. et al. 2006. « Glucose-Dependent Transcriptional Regulation by an Evolutionarily Conserved Glucose-Sensing Module ». *Diabetes* 55(5): 1179-89.

Li, Ming V. et al. 2010. « Glucose-6-Phosphate Mediates Activation of the Carbohydrate Responsive Binding Protein (ChREBP) ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395(3): 395-400.

Libbrecht, Louis, Valeer Desmet, et Tania Roskams. 2005. « Preneoplastic Lesions in Human Hepatocarcinogenesis ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 25(1): 16-27.

Lin, Ling et al. 2017. « Functional Lipidomics: Palmitic Acid Impairs Hepatocellular Carcinoma Development by Modulating Membrane Fluidity and Glucose Metabolism ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66(2): 432-48.

Linares, Juan F. et al. 2017. « ATF4-Induced Metabolic Reprograming Is a Synthetic Vulnerability of the P62-Deficient Tumor Stroma ». *Cell Metabolism* 26(6): 817-829.e6.

Liu, Hongyan, Huijia Dong, Keith Robertson, et Chen Liu. 2011. « DNA Methylation Suppresses Expression of the Urea Cycle Enzyme Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 (CPS1) in Human Hepatocellular Carcinoma ». *The American Journal of Pathology* 178(2): 652-61.

Liu, Yi et al. 2012. « A Small-Molecule Inhibitor of Glucose Transporter 1 Downregulates Glycolysis, Induces Cell-Cycle Arrest, and Inhibits Cancer Cell Growth in Vitro and in Vivo ». *Molecular Cancer Therapeutics* 11(8): 1672-82.

Llovet, Josep M. et al. 2008. « Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma ». *The New England Journal of Medicine* 359(4): 378-90.

Loizides-Mangold, Ursula. 2013. « On the Future of Mass-Spectrometry-Based Lipidomics ». *The FEBS journal* 280(12): 2817-29.

Long, Xiaomeng et al. 2005. « Rheb Binds and Regulates the MTOR Kinase ». *Current biology: CB* 15(8): 702-13.

Lu, Ming et al. 2018. « Elevated G6PD Expression Contributes to Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 50(4): 370-80.

Luo, X. C., K. Park, F. Lopez-Casillas, et K. H. Kim. 1989. « Structural Features of the Acetyl-CoA Carboxylase Gene: Mechanisms for the Generation of MRNAs with 5' End Heterogeneity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(11): 4042-46.

Ma, Mark Kin Fai et al. 2017. « Stearoyl-CoA Desaturase Regulates Sorafenib Resistance via Modulation of ER Stress-Induced Differentiation ». *Journal of Hepatology* 67(5): 979-90.

Maehama, T., et J. E. Dixon. 1998. « The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate ». *The Journal of Biological Chemistry* 273(22): 13375-78.

Maeno, Yasuhiro et al. 2012. « Inhibition of Insulin Signaling in Endothelial Cells by Protein Kinase C-Induced Phosphorylation of P85 Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(7): 4518-30.

Maier, U., A. Babich, et B. Nürnberg. 1999. « Roles of Non-Catalytic Subunits in Gbetagamma-Induced Activation of Class I Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms Beta and Gamma ». *The Journal of Biological Chemistry* 274(41): 29311-17.

Maric, Tamara et al. 2019. « Bioluminescent-Based Imaging and Quantification of Glucose Uptake in Vivo ». *Nature Methods* 16(6): 526-32.

Markan, Kathleen R. et al. 2014. « Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake during Refeeding and Overfeeding ». *Diabetes* 63(12): 4057-63.

Marone, Romina, Vladimir Cmiljanovic, Bernd Giese, et Matthias P. Wymann. 2008. « Targeting Phosphoinositide 3-Kinase: Moving towards Therapy ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1784(1): 159-85.

Marrero, Jorge A. et al. 2003. « Des-Gamma Carboxyprothrombin Can Differentiate Hepatocellular Carcinoma from Nonmalignant Chronic Liver Disease in American Patients ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37(5): 1114-21.

Mashek, Douglas G., Michelle A. McKenzie, Cynthia G. Van Horn, et Rosalind A. Coleman. 2006. « Rat Long Chain Acyl-CoA Synthetase 5 Increases Fatty Acid Uptake and Partitioning to Cellular Triacylglycerol in McArdle-RH7777 Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 281(2): 945-50.

Matés, J. M. et al. 2013. « Glutaminase Isoenzymes as Key Regulators in Metabolic and Oxidative Stress against Cancer ». *Current Molecular Medicine* 13(4): 514-34.

Matsuda, T. et al. 1990. « Regulation of the Gene Expression of Glucokinase and L-Type Pyruvate Kinase in Primary Cultures of Rat Hepatocytes by Hormones and Carbohydrates ». *Journal of Biochemistry* 108(5): 778-84.

Matsuzaka, Takashi et al. 2002. « Cloning and Characterization of a Mammalian Fatty Acyl-CoA Elongase as a Lipogenic Enzyme Regulated by SREBPs ». *Journal of Lipid Research* 43(6): 911-20.

Matter, Matthias S., Thomas Decaens, Jesper B. Andersen, et Snorri S. Thorgeirsson. 2014. « Targeting the MTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma: Current State and Future Trends ». *Journal of Hepatology* 60(4): 855-65.

Mauvoisin, Daniel, et Catherine Mounier. 2011. « Hormonal and Nutritional Regulation of SCD1 Gene Expression ». *Biochimie* 93(1): 78-86.

McGlynn, Katherine A., et W. Thomas London. 2011. « The Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: Present and Future ». *Clinics in Liver Disease* 15(2): 223-43, vii-x.

Menendez, Javier A., et Ruth Lupu. 2007. « Fatty Acid Synthase and the Lipogenic Phenotype in Cancer Pathogenesis ». *Nature Reviews. Cancer* 7(10): 763-77.

Metallo, Christian M. et al. 2011. « Reductive Glutamine Metabolism by IDH1 Mediates Lipogenesis under Hypoxia ». *Nature* 481(7381): 380-84.

Metukuri, Mallikarjuna R. et al. 2012. « ChREBP Mediates Glucose-Stimulated Pancreatic β-Cell Proliferation ». *Diabetes* 61(8): 2004-15.

Michalak, Krzysztof Piotr, Agnieszka Maćkowska-Kędziora, Bogusław Sobolewski, et Piotr Woźniak. 2015. « Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015: 964321.

Miller, Donald M. et al. 2012. « C-Myc and Cancer Metabolism ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18(20): 5546-53.

Moeini, Agrin, Helena Cornellà, et Augusto Villanueva. 2012. « Emerging Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma ». *Liver Cancer* 1(2): 83-93.

Moon, Young-Ah, Robert E. Hammer, et Jay D. Horton. 2009. « Deletion of ELOVL5 Leads to Fatty Liver through Activation of SREBP-1c in Mice ». *Journal of Lipid Research* 50(3): 412-23.

Moreau, H. et al. 1988. « Human Gastric Lipase: Variations Induced by Gastrointestinal Hormones and by Pathology ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 23(9): 1044-48.

Morin, P. J. et al. 1997. « Activation of Beta-Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in Beta-Catenin or APC ». *Science (New York, N.Y.)* 275(5307): 1787-90.

Morin, P. J. et al. 1999. « Beta-Catenin Signaling and Cancer ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 21(12): 1021-30.

Motohashi, Hozumi, et Masayuki Yamamoto. 2004. « Nrf2-Keap1 Defines a Physiologically Important Stress Response Mechanism ». *Trends in Molecular Medicine* 10(11): 549-57.

Mu, Huiling, et Trine Porsgaard. 2005. « The Metabolism of Structured Triacylglycerols ».

Progress in Lipid Research 44(6): 430-48.

Muir, Kyle et al. 2013. « Proteomic and Lipidomic Signatures of Lipid Metabolism in NASH-Associated Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer Research* 73(15): 4722-31.

Muntz, J. A., et J. R. Murphy. 1957. « The Metabolism of Variously Labeled Glucose in Rat Liver in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 224(2): 971-85.

Murakami, H. et al. 1993. « Transgenic Mouse Model for Synergistic Effects of Nuclear Oncogenes and Growth Factors in Tumorigenesis: Interaction of c-Myc and Transforming Growth Factor Alpha in Hepatic Oncogenesis ». *Cancer Research* 53(8): 1719-23.

Murthy, M. S., et S. V. Pande. 1987. « Some Differences in the Properties of Carnitine Palmitoyltransferase Activities of the Mitochondrial Outer and Inner Membranes ». *The Biochemical Journal* 248(3): 727-33.

Najafi, Masoud et al. 2019. « Macrophage Polarity in Cancer: A Review ». *Journal of Cellular Biochemistry* 120(3): 2756-65.

Nakajima, Erica C., et Bennett Van Houten. 2013. « Metabolic Symbiosis in Cancer: Refocusing the Warburg Lens ». *Molecular Carcinogenesis* 52(5): 329-37.

Nakanishi, Kazuaki et al. 2005. « Akt Phosphorylation Is a Risk Factor for Early Disease Recurrence and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma ». *Cancer* 103(2): 307-12.

Nault, Jean-Charles, et Eric Letouzé. 2019. « Mutational Processes in Hepatocellular Carcinoma: The Story of Aristolochic Acid ». *Seminars in Liver Disease* 39(3): 334-40.

Negri, Francesca V. et al. 2015. « Expression of PERK and VEGFR-2 in Advanced Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib Treatment ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 35(8): 2001-8.

Nelson, Marin E. et al. 2017. « Inhibition of Hepatic Lipogenesis Enhances Liver Tumorigenesis by Increasing Antioxidant Defence and Promoting Cell Survival ». *Nature Communications* 8: 14689.

Neuveut, Christine, Yu Wei, et Marie Annick Buendia. 2010. « Mechanisms of HBV-Related Hepatocarcinogenesis ». *Journal of Hepatology* 52(4): 594-604.

Ngo, Hoang Kieu Chi et al. 2017. « Nrf2 Mutagenic Activation Drives Hepatocarcinogenesis ». *Cancer Research* 77(18): 4797-4808.

Nikawa, J. et al. 1979. « Inhibitory Effects of Long-Chain Acyl Coenzyme A Analogues on Rat Liver Acetyl Coenzyme A Carboxylase ». *FEBS letters* 102(2): 223-26.

Niu, Zhao-Shan, Xiao-Jun Niu, et Wen-Hong Wang. 2016. « Genetic Alterations in

Hepatocellular Carcinoma: An Update ». *World Journal of Gastroenterology* 22(41): 9069-95.

Noguchi, T. et al. 1983. « Molecular Cloning of DNA Complementary to Rat L-Type Pyruvate Kinase MRNA. Nutritional and Hormonal Regulation of L-Type Pyruvate Kinase MRNA Concentration ». *The Journal of Biological Chemistry* 258(24): 15220-23.

Noordeen, Nafeesa A. et al. 2010. « Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein (ChREBP) Is a Negative Regulator of ARNT/HIF-1beta Gene Expression in Pancreatic Islet Beta-Cells ». *Diabetes* 59(1): 153-60.

Noriega, Lilia G. et al. 2011. « CREB and ChREBP Oppositely Regulate SIRT1 Expression in Response to Energy Availability ». *EMBO reports* 12(10): 1069-76.

Nouspikel, T., et P. B. Iynedjian. 1992. « Insulin Signalling and Regulation of Glucokinase Gene Expression in Cultured Hepatocytes ». *European Journal of Biochemistry* 210(1): 365-73.

Ntambi, J. M. 1992. « Dietary Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression in Mouse Liver ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(15): 10925-30.

Nwosu, Zeribe Chike et al. 2017a. « Identification of the Consistently Altered Metabolic Targets in Human Hepatocellular Carcinoma ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 4(2): 303-323.e1.

Olson, A. L., et J. E. Pessin. 1996. « Structure, Function, and Regulation of the Mammalian Facilitative Glucose Transporter Gene Family ». *Annual Review of Nutrition* 16: 235-56.

Onishi-Haraikawa, Y. et al. 2001. « Unique Phosphorylation Mechanism of Gab1 Using PI 3-Kinase as an Adaptor Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288(2): 476-82.

Orrù, Claudia et al. 2020. « Distinct Mechanisms Are Responsible for Nrf2-Keap1 Pathway Activation at Different Stages of Rat Hepatocarcinogenesis ». *Cancers* 12(8).

Oslowski, Christine M. et al. 2012. « Thioredoxin-Interacting Protein Mediates ER Stress-Induced β Cell Death through Initiation of the Inflammasome ». *Cell Metabolism* 16(2): 265-73.

Osthus, R. C. et al. 2000. « Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by C-Myc ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(29): 21797-800.

Pal, Sumanta Kumar, et Robert A. Figlin. 2011. « Future Directions of Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Inhibitor Therapy in Renal Cell Carcinoma ». *Targeted Oncology* 6(1): 5-16.

Papandreou, Ioanna et al. 2006. « HIF-1 Mediates Adaptation to Hypoxia by Actively Downregulating Mitochondrial Oxygen Consumption ». *Cell Metabolism* 3(3):

187-97.

Park, E. A., R. L. Mynatt, G. A. Cook, et K. Kashfi. 1995. « Insulin Regulates Enzyme Activity, Malonyl-CoA Sensitivity and MRNA Abundance of Hepatic Carnitine Palmitoyltransferase-I ». *The Biochemical Journal* 310 (Pt 3): 853-58.

Patel, Deven et al. 2016. « Aspartate Rescues S-Phase Arrest Caused by Suppression of Glutamine Utilization in KRas-Driven Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 291(17): 9322-29.

Pavlova, Natalya N., et Craig B. Thompson. 2016. « The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism ». *Cell Metabolism* 23(1): 27-47.

Peck, Barrie, et Almut Schulze. 2016. « Lipid Desaturation - the next Step in Targeting Lipogenesis in Cancer? » *The FEBS journal* 283(15): 2767-78.

Pei, Xiaolei et al. 2020. « Development of AAV Variants with Human Hepatocyte Tropism and Neutralizing Antibody Escape Capacity ». *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 18: 259-68.

Perry, Rachel J., Varman T. Samuel, Kitt F. Petersen, et Gerald I. Shulman. 2014. « The Role of Hepatic Lipids in Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes ». *Nature* 510(7503): 84-91.

Personeni, Nicola et al. 2013. « Molecular Determinants of Outcome in Sorafenib-Treated Patients with Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139(7): 1179-87.

Petersen, Max C., Daniel F. Vatner, et Gerald I. Shulman. 2017. « Regulation of Hepatic Glucose Metabolism in Health and Disease ». *Nature Reviews. Endocrinology* 13(10): 572-87.

Phan, Liem Minh, Sai-Ching Jim Yeung, et Mong-Hong Lee. 2014. « Cancer Metabolic Reprogramming: Importance, Main Features, and Potentials for Precise Targeted Anti-Cancer Therapies ». *Cancer Biology & Medicine* 11(1): 1-19.

Philip A. et al. 2005. « Phase II Study of Erlotinib (OSI-774) in Patients with Advanced Hepatocellular Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(27): 6657-63.

Pilkis, S. J., et T. H. Claus. 1991. « Hepatic Gluconeogenesis/Glycolysis: Regulation and Structure/Function Relationships of Substrate Cycle Enzymes ». *Annual Review of Nutrition* 11: 465-515.

Pilkis, S. J., M. R. el-Maghrabi, et T. H. Claus. 1988. « Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis ». *Annual Review of Biochemistry* 57: 755-83.

Pochini, Lorena, Mariafrancesca Scalise, Michele Galluccio, et Cesare Indiveri. 2014. « Membrane Transporters for the Special Amino Acid Glutamine: Structure/Function Relationships and Relevance to Human Health ». *Frontiers in Chemistry* 2: 61.

Poon, R. T. P. et al. 2004. « Prognostic Significance of Serum Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin in Patients with Hepatocellular Carcinoma ». *The British Journal of Surgery* 91(10): 1354-60.

Pope, Evans D. et al. 2019. « Aberrant Lipid Metabolism as a Therapeutic Target in Liver Cancer ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 23(6): 473-83.

Poungvarin, N. et al. 2012. « Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP) Plays a Pivotal Role in Beta Cell Glucotoxicity ». *Diabetologia* 55(6): 1783-96.

Poungvarin, Naravat et al. 2015. « Genome-Wide Analysis of ChREBP Binding Sites on Male Mouse Liver and White Adipose Chromatin ». *Endocrinology* 156(6): 1982-94.

Qin, Lun-Xiu, et Zhao-You Tang. 2002. « The Prognostic Significance of Clinical and Pathological Features in Hepatocellular Carcinoma ». *World Journal of Gastroenterology* 8(2): 193-99.

Raghunath, Azhwar et al. 2018. « Dysregulation of Nrf2 in Hepatocellular Carcinoma: Role in Cancer Progression and Chemoresistance ». *Cancers* 10(12).

Rajas, Fabienne, Amandine Gautier-Stein, et Gilles Mithieux. 2019. « Glucose-6 Phosphate, A Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism ». *Metabolites* 9(12).

Rebouissou, Sandra, et Jean-Charles Nault. 2020. « Advances in Molecular Classification and Precision Oncology in Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Hepatology* 72(2): 215-29.

Reitzer, L. J., B. M. Wice, et D. Kennell. 1979. « Evidence That Glutamine, Not Sugar, Is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 254(8): 2669-76.

Ribback, Silvia et al. 2018. « Oncogene-Dependent Addiction to Carbohydrate-Responsive Element Binding Protein in Hepatocellular Carcinoma ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 17(12): 1496-1512.

Rinella, Mary E. 2015. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review ». *JAMA* 313(22): 2263-73.

Ringelhan, Marc et al. 2018. « The Immunology of Hepatocellular Carcinoma ». *Nature Immunology* 19(3): 222-32.

Ringelhan, Marc, Jane A. McKeating, et Ulrike Protzer. 2017. « Viral Hepatitis and Liver Cancer ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 372(1732).

Rizvi, Sumera et al. 2018. « Cholangiocarcinoma - Evolving Concepts and Therapeutic Strategies ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 15(2): 95-111.

Roayaie, Sasan et al. 2015. « The Role of Hepatic Resection in the Treatment of Hepatocellular Cancer ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 62(2): 440-51.

Robinson, D. R., Y. M. Wu, et S. F. Lin. 2000. « The Protein Tyrosine Kinase Family of the Human Genome ». *Oncogene* 19(49): 5548-57.

Robitaille, Aaron M. et al. 2013. « Quantitative Phosphoproteomics Reveal MTORC1 Activates de Novo Pyrimidine Synthesis ». *Science (New York, N.Y.)* 339(6125): 1320-23.

Roesler, W. J., et R. L. Khandelwal. 1986. « Kinetic Properties of Glycogen Synthase and Phosphorylase and Structural Aspects of Glycogen in the Db/Db Mouse Liver ». *Diabetes* 35(2): 210-16.

Rueda-Rincon, Natalia et al. 2015. « P53 Attenuates AKT Signaling by Modulating Membrane Phospholipid Composition ». *Oncotarget* 6(25): 21240-54.

Rujeerapaiboon, Natthapat, et Panu Wetwittayakhlang. 2020. « Primary Hepatic Angiosarcoma: A Rare Liver Malignancy - Varying Manifestations but Grave Prognosis ». *Case Reports in Gastroenterology* 14(1): 137-49.

Ryan, K. M., et G. D. Birnie. 1996. « Myc Oncogenes: The Enigmatic Family ». *The Biochemical Journal* 314 (Pt 3): 713-21.

Sakiyama, Haruhiko et al. 2008. « Regulation of Nuclear Import/Export of Carbohydrate Response Element-Binding Protein (ChREBP): Interaction of an Alpha-Helix of ChREBP with the 14-3-3 Proteins and Regulation by Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 283(36): 24899-908.

Sancak, Yasemin et al. 2008. « The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to MTORC1 ». *Science (New York, N.Y.)* 320(5882): 1496-1501.

Sanchez-Macedo, N. et al. 2013. « Depletion of the Novel P53-Target Gene Carnitine Palmitoyltransferase 1C Delays Tumor Growth in the Neurofibromatosis Type I Tumor Model ». *Cell Death and Differentiation* 20(4): 659-68.

Sans, Christopher L. et al. 2006. « MondoA-Mlx Heterodimers Are Candidate Sensors of Cellular Energy Status: Mitochondrial Localization and Direct Regulation of Glycolysis ». *Molecular and Cellular Biology* 26(13): 4863-71.

Sarbassov, D. D. et al. 2004. « Rictor, a Novel Binding Partner of MTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway That Regulates the Cytoskeleton ». *Current biology: CB* 14(14): 1296-1302.

Sarbassov, D. D., David A. Guertin, Siraj M. Ali, et David M. Sabatini. 2005. « Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-MTOR Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 307(5712): 1098-1101.

Sato, Shogo et al. 2016. « Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-Response Element-Binding Protein (ChREBP): ROLE OF AMP AS AN ALLOSTERIC INHIBITOR ». *The Journal of Biological Chemistry* 291(20): 10515-27.

Satriano, Letizia et al. 2019. « Metabolic Rearrangements in Primary Liver Cancers: Cause and Consequences ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16(12): 748-66.

Saxton, Robert A., et David M. Sabatini. 2017. « MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease ». *Cell* 168(6): 960-76.

Schaer, David A. et al. 2019. « The Folate Pathway Inhibitor Pemetrexed Pleiotropically Enhances Effects of Cancer Immunotherapy ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25(23): 7175-88.

Semenza, G. L., P. H. Roth, H. M. Fang, et G. L. Wang. 1994. « Transcriptional Regulation of Genes Encoding Glycolytic Enzymes by Hypoxia-Inducible Factor 1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 269(38): 23757-63.

Senni, Nadia et al. 2019. « β-Catenin-Activated Hepatocellular Carcinomas Are Addicted to Fatty Acids ». *Gut* 68(2): 322-34.

Shachaf, Catherine M. et al. 2004. « MYC Inactivation Uncovers Pluripotent Differentiation and Tumour Dormancy in Hepatocellular Cancer ». *Nature* 431(7012): 1112-17.

Shen, Lan et al. 2012. « The Fundamental Role of the P53 Pathway in Tumor Metabolism and Its Implication in Tumor Therapy ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18(6): 1561-67.

Shi, Yuji, Benjamin E. Paluch, Xinjiang Wang, et Xuejun Jiang. 2012. « PTEN at a Glance ». *Journal of Cell Science* 125(Pt 20): 4687-92.

Shim, Eun Kyung, Seung Hee Jung, et Jong Ran Lee. 2011. « Role of Two Adaptor Molecules SLP-76 and LAT in the PI3K Signaling Pathway in Activated T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186(5): 2926-35.

Shim, H. et al. 1997. « C-Myc Transactivation of LDH-A: Implications for Tumor Metabolism and Growth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13): 6658-63.

Shimamura, T. et al. 2000. « Detection of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Expression in Human Hepatocellular Carcinoma Biopsy Specimens ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15(6): 640-46.

Shiota, C. et al. 1999. « Nuclear Import of Hepatic Glucokinase Depends upon Glucokinase Regulatory Protein, Whereas Export Is Due to a Nuclear Export Signal Sequence in Glucokinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 274(52): 37125-30.

Shtutman, M. et al. 1999. « The Cyclin D1 Gene Is a Target of the Beta-Catenin/LEF-1 Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10): 5522-27.

Sigoillot, Frederic D. et al. 2003. « Cell Cycle-Dependent Regulation of Pyrimidine Biosynthesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(5): 3403-9.

Sijbesma, Eline et al. 2020. « Structure-Based Evolution of a Promiscuous Inhibitor to a Selective Stabilizer of Protein-Protein Interactions ». *Nature Communications* 11(1): 3954.

Singal, Amit G., Pietro Lampertico, et Pierre Nahon. 2020. « Epidemiology and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: New Trends ». *Journal of Hepatology* 72(2): 250-61.

Singh, Parmveer, et David M. Irwin. 2016. « Contrasting Patterns in the Evolution of Vertebrate MLX Interacting Protein (MLXIP) and MLX Interacting Protein-Like (MLXIPL) Genes ». *PloS One* 11(2): e0149682.

Snaebjornsson, Marteinn Thor, Sudha Janaki-Raman, et Almut Schulze. 2020. « Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer ». *Cell Metabolism* 31(1): 62-76.

Soggia, A. et al. 2012. « Activation of the Transcription Factor Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein by Glucose Leads to Increased Pancreatic Beta Cell Differentiation in Rats ». *Diabetologia* 55(10): 2713-22.

Stamatikos, Alexis D. et al. 2016. « Tissue Specific Effects of Dietary Carbohydrates and Obesity on ChREBPα and ChREBPβ Expression ». *Lipids* 51(1): 95-104.

Stange, E. F., et J. M. Dietschy. 1985. « The Origin of Cholesterol in the Mesenteric Lymph of the Rat ». *Journal of Lipid Research* 26(2): 175-84.

Stanley, William C., Fabio A. Recchia, et Gary D. Lopaschuk. 2005. « Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart ». *Physiological Reviews* 85(3): 1093-1129.

Steggerda, Susanne M. et al. 2017. « Inhibition of Arginase by CB-1158 Blocks Myeloid Cell-Mediated Immune Suppression in the Tumor Microenvironment ». *Journal for Immunotherapy of Cancer* 5(1): 101.

Stoeckman, Angela K., Lin Ma, et Howard C. Towle. 2004. « Mlx Is the Functional Heteromeric Partner of the Carbohydrate Response Element-Binding Protein in Glucose Regulation of Lipogenic Enzyme Genes ». *The Journal of Biological Chemistry* 279(15): 15662-69.

Storch, Judith, et Alfred E. Thumser. 2010. « Tissue-Specific Functions in the Fatty Acid-Binding Protein Family ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(43): 32679-83.

Sugimoto, Yoshinori et al. 2007. « A Novel Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor Reduces de Novo Fatty Acid Synthesis in HepG2 Cells and Rat Primary Hepatocytes ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 468(1): 44-48.

Sun, Minghao et al. 2010. « Cancer-Derived Mutations in the Regulatory Subunit P85alpha of Phosphoinositide 3-Kinase Function through the Catalytic Subunit P110alpha ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(35): 15547-52.

Sun, Ramon C., et Nicholas C. Denko. 2014. « Hypoxic Regulation of Glutamine Metabolism through HIF1 and SIAH2 Supports Lipid Synthesis That Is Necessary for Tumor Growth ». *Cell Metabolism* 19(2): 285-92.

Szabo, Gyongyi, et Jan Petrasek. 2015. « Inflammasome Activation and Function in Liver Disease ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 12(7): 387-400.

Takahashi, Yoshihisa et al. 2007. « Amplification of C-Myc and Cyclin D1 Genes in Primary and Metastatic Carcinomas of the Liver ». *Pathology International* 57(7): 437-42.

Takeuchi, Kazuharu, et Karen Reue. 2009. « Biochemistry, Physiology, and Genetics of GPAT, AGPAT, and Lipin Enzymes in Triglyceride Synthesis ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296(6): E1195-1209.

Tanaka, Y. et al. 2006. « Absence of PIK3CA Hotspot Mutations in Hepatocellular Carcinoma in Japanese Patients ». *Oncogene* 25(20): 2950-52.

Tang, Z. Y. et al. 1998. « Progress and Prospects in Hepatocellular Carcinoma Surgery ». *Annales De Chirurgie* 52(6): 558-63.

Taniguchi, Cullen M. et al. 2010. « The Phosphoinositide 3-Kinase Regulatory Subunit P85alpha Can Exert Tumor Suppressor Properties through Negative Regulation of Growth Factor Signaling ». *Cancer Research* 70(13): 5305-15.

Tardito, Saverio et al. 2015. « Glutamine Synthetase Activity Fuels Nucleotide Biosynthesis and Supports Growth of Glutamine-Restricted Glioblastoma ». *Nature Cell Biology* 17(12): 1556-68.

Tenen, Daniel G., Li Chai, et Justin L. Tan. 2021. « Metabolic Alterations and Vulnerabilities in Hepatocellular Carcinoma ». *Gastroenterology Report* 9(1): 1-13.

Teng, Qiu-Xu et al. 2019. « Revisiting MTOR Inhibitors as Anticancer Agents ». *Drug Discovery Today* 24(10): 2086-95.

Tesori, Valentina et al. 2015. « The Multikinase Inhibitor Sorafenib Enhances Glycolysis and Synergizes with Glycolysis Blockade for Cancer Cell Killing ». *Scientific Reports* 5: 9149.

Thumelin, S. et al. 1994. « Expression of Liver Carnitine Palmitoyltransferase I and II Genes during Development in the Rat ». *The Biochemical Journal* 300 (Pt 2): 583-87.

Tian, Yi et al. 2017. « HBx Promotes Cell Proliferation by Disturbing the Cross-Talk between MiR-181a and PTEN ». *Scientific Reports* 7: 40089.

Titchenell, Paul M., Mitchell A. Lazar, et Morris J. Birnbaum. 2017. « Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28(7): 497-505.

Tong, Xuemei et al. 2009. « The Glucose-Responsive Transcription Factor ChREBP Contributes to Glucose-Dependent Anabolic Synthesis and Cell Proliferation ».

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(51): 21660-65.

Torre, Lindsey A. et al. 2015. « Global Cancer Statistics, 2012 ». *CA: a cancer journal for clinicians* 65(2): 87-108.

Trefts, Elijah, Maureen Gannon, et David H. Wasserman. 2017. « The Liver ». *Current biology: CB* 27(21): R1147-51.

Tsatsos, Nikolas G., et Howard C. Towle. 2006. « Glucose Activation of ChREBP in Hepatocytes Occurs via a Two-Step Mechanism ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340(2): 449-56.

Tutino, Valeria et al. 2020. « Stearoyl-CoA Desaturase-1 Enzyme Inhibition by Grape Skin Extracts Affects Membrane Fluidity in Human Colon Cancer Cell Lines ». *Nutrients* 12(3).

Tzartzeva, Kristina et al. 2018. « Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-Analysis ». *Gastroenterology* 154(6): 1706-1718.e1.

Ueki, T. et al. 1997. « Expression of Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor, the c-Met Proto-Oncogene, in Hepatocellular Carcinoma ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 25(3): 619-23.

Uhlen, Mathias et al. 2017. « A Pathology Atlas of the Human Cancer Transcriptome ». *Science (New York, N.Y.)* 357(6352).

Urick, Mary E. et al. 2011. « PIK3R1 (P85α) Is Somatically Mutated at High Frequency in Primary Endometrial Cancer ». *Cancer Research* 71(12): 4061-67.

Uyeda, Kosaku, Hiromi Yamashita, et Takumi Kawaguchi. 2002. « Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein (ChREBP): A Key Regulator of Glucose Metabolism and Fat Storage ». *Biochemical Pharmacology* 63(12): 2075-80.

van Geldermalsen, M. et al. 2016. « ASCT2/SLC1A5 Controls Glutamine Uptake and Tumour Growth in Triple-Negative Basal-like Breast Cancer ». *Oncogene* 35(24): 3201-8.

Vander Heiden, M. G. et al. 2011. « Metabolic Pathway Alterations That Support Cell Proliferation ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 76: 325-34.

Vander Heiden, Matthew G. 2011. « Targeting Cancer Metabolism: A Therapeutic Window Opens ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 10(9): 671-84.

Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley, et Craig B. Thompson. 2009. « Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation ». *Science (New York, N.Y.)* 324(5930): 1029-33.

Vanhaesebroeck, Bart, Julie Guillermet-Guibert, Mariona Graupera, et Benoit Bilanges. 2010.

« The Emerging Mechanisms of Isoform-Specific PI3K Signalling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11(5): 329-41.

Vaulont, S., A. Munnich, J. F. Decaux, et A. Kahn. 1986. « Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of L-Type Pyruvate Kinase Gene Expression in Rat Liver ». *The Journal of Biological Chemistry* 261(17): 7621-25.

Vescovo, T. et al. 2016. « Molecular Mechanisms of Hepatitis C Virus-Induced Hepatocellular Carcinoma ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22(10): 853-61.

Vibert, Eric, Myron Schwartz, et Kim M. Olthoff. 2020. « Advances in Resection and Transplantation for Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Hepatology* 72(2): 262-76.

Vié, Nadia et al. 2008. « Overexpression of Phosphoserine Aminotransferase PSAT1 Stimulates Cell Growth and Increases Chemoresistance of Colon Cancer Cells ». *Molecular Cancer* 7: 14.

Vijayakumar, Archana et al. 2017. « Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport ». *Cell Reports* 21(4): 1021-35.

Villanueva, Augusto et al. 2008. « Pivotal Role of MTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma ». *Gastroenterology* 135(6): 1972-83, 1983.e1-11.

Villanueva, Claudio J. et al. 2009. « Specific Role for Acyl CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (Dgat1) in Hepatic Steatosis Due to Exogenous Fatty Acids ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50(2): 434-42.

Visentin, Michele, Rongbao Zhao, et I. David Goldman. 2012. « The Antifolates ». *Hematology/Oncology Clinics of North America* 26(3): 629-48, ix.

Wagle, A., S. Jivraj, G. L. Garlock, et S. R. Stapleton. 1998. « Insulin Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene Expression Is Rapamycin-Sensitive and Requires Phosphatidylinositol 3-Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 273(24): 14968-74.

Waldman, Alex D., Jill M. Fritz, et Michael J. Lenardo. 2020. « A Guide to Cancer Immunotherapy: From T Cell Basic Science to Clinical Practice ». *Nature Reviews. Immunology* 20(11): 651-68.

Wang, Haiyan, Georgia Kouri, et Claes B. Wollheim. 2005. « ER Stress and SREBP-1 Activation Are Implicated in Beta-Cell Glucolipotoxicity ». *Journal of Cell Science* 118(Pt 17): 3905-15.

Wang, Haiyong et al. 2016. « Bufalin Suppresses Hepatocellular Carcinoma Invasion and Metastasis by Targeting HIF-1α via the PI3K/AKT/MTOR Pathway ». *Oncotarget* 7(15): 20193-208.

Wang, Huabo et al. 2018. « Myc and ChREBP Transcription Factors Cooperatively Regulate Normal and Neoplastic Hepatocyte Proliferation in Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 293(38): 14740-57.

Wang, Yun et al. 2005. « Tissue-Specific, Nutritional, and Developmental Regulation of Rat Fatty Acid Elongases ». *Journal of Lipid Research* 46(4): 706-15.

Wang, Yun et al. 2006. « Regulation of Hepatic Fatty Acid Elongase and Desaturase Expression in Diabetes and Obesity ». *Journal of Lipid Research* 47(9): 2028-41.

Warburg Otto. 1925. « The metabolism of carcinoma cells ». *Journal of Cancer Research*.

Ward, Patrick S. et al. 2010. « The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting Alpha-Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate ». *Cancer Cell* 17(3): 225-34.

Waters, K. M., et J. M. Ntambi. 1994. « Insulin and Dietary Fructose Induce Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression of Diabetic Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 269(44): 27773-77.

Waters, K. M., et J. M. Ntambi. 1996. « Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase-1 Gene in Diabetic Mice ». *Lipids* 31 Suppl: S33-36.

Weber, A. et al. 1984. « Dietary Control of Aldolase B and L-Type Pyruvate Kinase MRNAs in Rat. Study of Translational Activity and Hybridization with Cloned CDNA Probes ». *The Journal of Biological Chemistry* 259(3): 1798-1802.

Wheaton, William W. et al. 2014. « Metformin Inhibits Mitochondrial Complex I of Cancer Cells to Reduce Tumorigenesis ». *eLife* 3: e02242.

Wieman, Heather L., Jessica A. Wofford, et Jeffrey C. Rathmell. 2007. « Cytokine Stimulation Promotes Glucose Uptake via Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Regulation of Glut1 Activity and Trafficking ». *Molecular Biology of the Cell* 18(4): 1437-46.

Wilson, Peter M. et al. 2014. « Standing the Test of Time: Targeting Thymidylate Biosynthesis in Cancer Therapy ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 11(5): 282-98.

Wise, David R. et al. 2008. « Myc Regulates a Transcriptional Program That Stimulates Mitochondrial Glutaminolysis and Leads to Glutamine Addiction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(48): 18782-87.

Wise, David R., et Craig B. Thompson. 2010. « Glutamine Addiction: A New Therapeutic Target in Cancer ». *Trends in Biochemical Sciences* 35(8): 427-33.

Witters, L. A., et B. E. Kemp. 1992. « Insulin Activation of Acetyl-CoA Carboxylase Accompanied by Inhibition of the 5'-AMP-Activated Protein Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(5): 2864-67.

Wolfrum, Christian et al. 2004. « Foxa2 Regulates Lipid Metabolism and Ketogenesis in the

Liver during Fasting and in Diabetes ». *Nature* 432(7020): 1027-32.

Wong, Carmen Chak-Lui et al. 2014. « Switching of Pyruvate Kinase Isoform L to M2 Promotes Metabolic Reprogramming in Hepatocarcinogenesis ». *PloS One* 9(12): e115036.

Wood, Tabitha E. et al. 2008. « A Novel Inhibitor of Glucose Uptake Sensitizes Cells to FAS-Induced Cell Death ». *Molecular Cancer Therapeutics* 7(11): 3546-55.

Wu, Wenrui et al. 2017. « Pattern of Distant Extrahepatic Metastases in Primary Liver Cancer: A SEER Based Study ». *Journal of Cancer* 8(12): 2312-18.

Wulfert, Sabine, et Stephan Krueger. 2018. « Phosphoserine Aminotransferase1 Is Part of the Phosphorylated Pathways for Serine Biosynthesis and Essential for Light and Sugar-Dependent Growth Promotion ». *Frontiers in Plant Science* 9: 1712.

Wurie, Haja R., Linda Buckett, et Victor A. Zammit. 2012. « Diacylglycerol Acyltransferase 2 Acts Upstream of Diacylglycerol Acyltransferase 1 and Utilizes Nascent Diglycerides and de Novo Synthesized Fatty Acids in HepG2 Cells ». *The FEBS journal* 279(17): 3033-47.

Xu, Iris Ming-Jing et al. 2016. « Transketolase Counteracts Oxidative Stress to Drive Cancer Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(6): E725-734.

Xu, Jianming et al. 2019. « Anti-PD-1 Antibody SHR-1210 Combined with Apatinib for Advanced Hepatocellular Carcinoma, Gastric, or Esophagogastric Junction Cancer: An Open-Label, Dose Escalation and Expansion Study ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25(2): 515-23.

Xu, Pan et al. 2016. « LRH-1-Dependent Programming of Mitochondrial Glutamine Processing Drives Liver Cancer ». *Genes & Development* 30(11): 1255-60.

Yamashita, H. et al. 2001. « A Glucose-Responsive Transcription Factor That Regulates Carbohydrate Metabolism in the Liver ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16): 9116-21.

Yang, An-Qi, Daoyuan Li, Lianli Chi, et Xin-Shan Ye. 2017. « Validation, Identification, and Biological Consequences of the Site-Specific O-GlcNAcylation Dynamics of Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein (ChREBP) ». *Molecular & cellular proteomics: MCP* 16(7): 1233-43.

Yang, Lifeng, Sriram Venneti, et Deepak Nagrath. 2017. « Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism ». *Annual Review of Biomedical Engineering* 19: 163-94.

Ye, Jiangbin et al. 2012. « Pyruvate Kinase M2 Promotes de Novo Serine Synthesis to Sustain MTORC1 Activity and Cell Proliferation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(18): 6904-9.

Ye, Liangtao et al. 2019. « The PI3K Inhibitor Copanlisib Synergizes with Sorafenib to

Induce Cell Death in Hepatocellular Carcinoma ». *Cell Death Discovery* 5: 86.

Yeh, Hsi-Wen et al. 2017. « Pyrimidine Metabolic Rate Limiting Enzymes in Poorly-Differentiated Hepatocellular Carcinoma Are Signature Genes of Cancer Stemness and Associated with Poor Prognosis ». *Oncotarget* 8(44): 77734-51.

Yore, Mark M. et al. 2014. « Discovery of a Class of Endogenous Mammalian Lipids with Anti-Diabetic and Anti-Inflammatory Effects ». *Cell* 159(2): 318-32.

Yoshida, Go J. 2015. « Metabolic Reprogramming: The Emerging Concept and Associated Therapeutic Strategies ». *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 34: 111.

Yost, C. et al. 1996. « The Axis-Inducing Activity, Stability, and Subcellular Distribution of Beta-Catenin Is Regulated in Xenopus Embryos by Glycogen Synthase Kinase 3 ». *Genes & Development* 10(12): 1443-54.

Yuneva, Mariia et al. 2007. « Deficiency in Glutamine but Not Glucose Induces MYC-Dependent Apoptosis in Human Cells ». *The Journal of Cell Biology* 178(1): 93-105.

Zahan, Tasnim et al. 2020. « Therapy Resistance in Cancers: Phenotypic, Metabolic, Epigenetic and Tumour Microenvironmental Perspectives ». *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 20(18): 2190-2206.

Zavattari, Patrizia et al. 2015. « Nrf2, but Not β-Catenin, Mutation Represents an Early Event in Rat Hepatocarcinogenesis ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 62(3): 851-62.

Zhang, Hao, Qingqing Wang, Jun Liu, et Haoqiang Cao. 2018. « Inhibition of the PI3K/Akt Signaling Pathway Reverses Sorafenib-Derived Chemo-Resistance in Hepatocellular Carcinoma ». *Oncology Letters* 15(6): 9377-84.

Zhang, Hongbing et al. 2007. « PDGFRs Are Critical for PI3K/Akt Activation and Negatively Regulated by MTOR ». *The Journal of Clinical Investigation* 117(3): 730-38.

Zhang, Mingzhen, Hyunbum Jang, et Ruth Nussinov. 2020. « PI3K Inhibitors: Review and New Strategies ». *Chemical Science* 11(23): 5855-65.

Zhao, Youbo et al. 2019. « Targeted Inhibition of MCT4 Disrupts Intracellular PH Homeostasis and Confers Self-Regulated Apoptosis on Hepatocellular Carcinoma ». *Experimental Cell Research* 384(1): 111591.

Zhong, H. et al. 2000. « Modulation of Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Expression by the Epidermal Growth Factor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/FRAP Pathway in Human Prostate Cancer Cells: Implications for Tumor Angiogenesis and Therapeutics ». *Cancer Research* 60(6): 1541-45.

Zhou, Qian, Vivian W. Y. Lui, et Winnie Yeo. 2011. « Targeting the PI3K/Akt/MTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma ». *Future Oncology (London, England)* 7(10): 1149-67.

Zhou, Weibo et al. 2003. « Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human Cancer Cells ». *Cancer Research* 63(21): 7330-37.

Zhu, Andrew X. et al. 2014. « Effect of Everolimus on Survival in Advanced Hepatocellular Carcinoma after Failure of Sorafenib: The EVOLVE-1 Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 312(1): 57-67.

Zhu, Andrew X. et al. 2018. « Pembrolizumab in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Previously Treated with Sorafenib (KEYNOTE-224): A Non-Randomised, Open-Label Phase 2 Trial ». *The Lancet. Oncology* 19(7): 940-52.

Zhu, Yan-Jing, Bo Zheng, Hong-Yang Wang, et Lei Chen. 2017. « New Knowledge of the Mechanisms of Sorafenib Resistance in Liver Cancer ». *Acta Pharmacologica Sinica* 38(5): 614-22.

Zu, Xin Lin, et Michael Guppy. 2004. « Cancer Metabolism: Facts, Fantasy, and Fiction ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313(3): 459-65.

Zucman-Rossi, J. et al. 2007. « Differential Effects of Inactivated Axin1 and Activated Beta-Catenin Mutations in Human Hepatocellular Carcinomas ». *Oncogene* 26(5): 774-80.

Zucman-Rossi, Jessica, Augusto Villanueva, Jean-Charles Nault, et Josep M. Llovet. 2015. « Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma ». *Gastroenterology* 149(5): 1226-1239.e4.

Zucman-Rossi, Jessica. 2010. « Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma ». *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 42 Suppl 3: S235-241.

Résumé

La prévalence du développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) est en constante augmentation dans les sociétés occidentales. Ainsi, au fil de cette décennie, cette forme de cancer du foie est devenue la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde, en raison notamment d'un diagnostic tardif et d'une résistance aux traitements classique de chimiothérapie. Chez l'homme, l'initiation et le développement d'un CHC est particulièrement corrélée à l'augmentation du nombre de patients atteints du syndrome métabolique (obésité, diabète, stéatose hépatique). Dans ce contexte, il est désormais bien décrit que les tumeurs présentent une reprogrammation de leur activité métabolique qui favorise la progression du cancer. En raison de son rôle central dans le contrôle du métabolisme des glucides et des lipides dans le foie, nous avons émis l'hypothèse que le facteur de transcription sensible au glucose ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein), jouant un rôle clé dans la régulation du métabolisme des lipides dans le foie, pourrait jouer un rôle clé dans les étapes d'initiation et de développement du CHC. Pour répondre à cette question, ChREBP a été surexprimé de manière stable dans le foie de souris C57BL6/J en utilisant la technique non virale de transfert de gêne par transposition appelée «Sleeping beauty». Nos résultats montrent pour la première fois qu'une augmentation de l'activité transactivatrice de ChREBP dans l'hépatocyte est suffisante à elle seule pour initier le développement d'un CHC de mauvais pronostic chez la souris. D'un point de vue moléculaire, ChREBP exerce ses effets pro-prolifératifs et pro-oncogéniques sur l'hépatocyte en stimulant l'activité de la voie de signalisation PI3K/AKT, dans un mécanisme dépendant de la régulation transcriptionnelle de la sous unité régulatrice p85α de la PI3K. De plus, l'augmentation de l'activité de ChREBP favorise la réorientation du métabolisme du glucose et de la glutamine vers des voies anaboliques de synthèse *de novo* de lipide et de nucléotide nécessaires au soutient de la prolifération des cellules tumorales. Dans ce contexte, nous démontrons pour la première fois que l'activité de ChREBP est systématiquement augmentée dans 10 cohortes indépendantes de CHC chez l'homme. Finalement, d'un point de vue thérapeutique, nos travaux ont caractérisé un nouvel inhibiteur pharmacologique de ChREBP permettant de diminuer la prolifération cellulaire, le développement tumoral et de manière plus importante de sensibiliser les cellules cancéreuses hépatiques au sorafenib qui représente de nos le traitement de référence utilisé chez l'homme dans le cadre de la lutte contre le CHC. En conclusion, nos travaux ont identifié un nouveau mécanisme de la carcinogenèse hépatique, impliquant le facteur de transcription ChREBP. Au vu de nos résultats, ChREBP constitue une cible thérapeutique de choix pour le développement de nouvelles stratégies de traitement au CHC.

Mots-clés : ChREBP, CHC, Cancer, Métabolisme, PI3K/AKT, Reprogrammation métabolique, Traitements

Abstract

The number of hepatocellular carcinoma (HCC) is constantly increasing in Western societies. As a matter of fact, liver cancer has become, in the past decade, the fourth leading cause of cancer death worldwide, due to its late diagnosis and resistance to classical chemotherapy treatments. In humans, the prevalence of HCC is particularly correlated with the burden of patients exhibiting metabolic syndrome, such as obesity, type 2 diabetes or hepatic steatosis. At the molecular level, it has been recently described that tumors cells have the capacity to reprogram their metabolic activities which are required to sustain cancer progression. In this context, due to its central role in the control of carbohydrate and lipid metabolism in the liver, we hypothesized that the glucose-regulated transcription factor ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) may play a key role in the initiation and development of HCC. To answer this question, ChREBP was stably overexpressed in the liver of C57BL6/J mice by using the non-viral transposon gene transfer technique called "Sleeping beauty». As a result, we demonstrated for the first time that an increase in ChREBP transcriptional activity in the liver is sufficient, by itself, to initiate the development of poor prognosis HCC in mice. Mechanistically, ChREBP exerts its pro-proliferative effects by stimulating the activity of the pro-oncogenic PI3K/AKT signaling pathway, in part by directly regulating the expression of the regulatory subunit p85α of the class 1A PI3K. In addition, sustained ChREBP activation reroutes both glucose and glutamine metabolic fluxes toward *de novo* lipid and nucleotide biosynthesis, in order to support HCC tumor growth. As a result, ChREBP expression is systematically upregulated in 10 independent and publicly available human HCC datasets. Finally, in a context of therapeutic development, we identified and characterized the first pharmacological inhibitor of ChREBP activity that proved to be efficient in inhibiting hepatocyte proliferation and liver tumor growth. More interestingly, pharmacological inhibition of ChREBP significantly sensitizes human hepatocarcinoma cells to sorafenib induced cell apoptosis. Overall, our work therefore provides a better understanding of the mechanisms by which ChREBP is involved in hepatic carcinogenesis and brings strong evidence that ChREBP could represent a valuable therapeutic target for the development of new therapeutics during liver cancer treatment.

Keywords : ChREBP, HCC, Cancer, Metabolism, PI3K/AKT, Metabolic reprogramming, Treatments