

Université de Montréal

**Rôle du métabolisme du glucose dans le phénotype tumoral
hépatocytaire**

par

Shamir Cassim

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de docteur

en Sciences biomédicales

Option générale

Juillet 2018

© Shamir Cassim, 2018

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

**Rôle du métabolisme du glucose dans le phénotype tumoral
hépatocytaire**

Présentée par:
Shamir Cassim

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Chantal Bémeur, président-rapporteur

Dr Marc Bilodeau, directeur de recherche

Dr Simon Turcotte, membre du jury

Dr Jessica Zucman-Rossi, examinateur externe

Dr Nathalie Grandvaux, représentante de la doyenne de la FES

Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une forme de cancer hétérogène tant d'un point de vue morphologique que d'un point de vue fonctionnel. Depuis maintenant plusieurs décennies, l'implication du métabolisme du glucose au sein des cellules tumorales a été abondamment étudiée et plusieurs constats importants à ce sujet ont été notés comme la présence d'une consommation exacerbée en glucose, d'une production accrue en lactate, ou encore d'un « switch » métabolique plus connu sous le nom d'*effet Warburg*. La notion d'adaptabilité des cellules cancéreuses face à la stringence du microenvironnement devient équivoque dès lors que leur aptitude à pouvoir modifier aisément leur métabolisme s'opère sous l'effet de ces variations. D'autre part, l'intense activité métabolique retrouvée dans le foie rend difficilement détectable la présence de foyers tumoraux primitifs par tomographie par émission de positron (TEP). Cette technique d'imagerie médicale, reposant principalement sur la capacité substantielle des cellules néoplasiques à consommer d'importantes quantités de glucose, ne permet pas ou très laborieusement la discrimination d'une cellule d'hépatocarcinome d'une cellule saine. Les recherches touchant de près au métabolisme de ces cellules comportent alors un grand intérêt non seulement pour étudier leur dépendance au glucose mais également apprécier leur adaptabilité face à un microenvironnement hostile. L'objectif principal de ce projet a donc été de caractériser fonctionnellement les cellules provenant de CHC en comparant leur métabolisme à celui de cellules non tumorales. Dans cette optique, nous avons premièrement étudié les hépatocytes en culture primaire de façon à pouvoir les utiliser en tant que cellules contrôles. Cependant, nous avons constaté que des altérations métaboliques majeures s'opéraient au sein de ces cellules non seulement au fil des différentes étapes de l'isolation mais également après 48 heures *in vitro* lorsque comparé aux hépatocytes du foie *in situ*. En effet, une diminution significative des métabolites impliqués dans la réponse face au stress oxydant, à l'activité du cycle de Krebs (TCA) et à la production d'énergie a alors été notée, accompagnée également d'une capacité respiratoire fortement réduite. Parallèlement, l'étude d'une lignée cellulaire isolée au laboratoire, la Dt81Hepa1-6, a clairement montré une plus grande tumorigénicité *in vivo* par rapport à la lignée mère Hepa1-6

dont elles sont issues. Nous avons ainsi pu, par comparaison avec les Hepa1-6, démontrer que le potentiel tumorigénique des Dt81Hepa1-6 reposait en partie sur leur forte dépendance au glucose environnant mais également sur leur capacité à pouvoir utiliser leur réserve en acides gras en l'absence de glucose. En ciblant cette reprogrammation métabolique par ajout d'oxamate de sodium, un inhibiteur du lactate déshydrogénase (LDH), nous avons non seulement pu mettre en évidence une diminution significative de leur tumorigénicité mais aussi observer une mortalité accrue lorsque couplé au cisplatine (CP). De plus, nous avons mis en évidence une association entre la surexpression de gènes glycolytiques et le pronostic clinique de patients atteints de CHC : ceci nous a amené à envisager la possibilité de pouvoir combiner des agents ciblant le métabolisme de ces cellules à des agents de chimiothérapie conventionnels dans le traitement du CHC. L'analyse métabolomique nous a également permis de constater qu'outre cette aptitude à pouvoir efficacement s'adapter à leur microenvironnement, les cellules issues d'hépatocarcinome mettaient en place une réelle stratégie métabolique en sollicitant préférentiellement certaines voies métaboliques par rapport à d'autres. Nous avons ainsi pu établir une signature métabolique visant à démontrer que, de *in vitro* vers *in vivo* en passant par l'humain, les voies de la glycolyse et de la réponse liée à l'hypoxie étaient essentielles au maintien de la tumorigénicité des cellules d'hépatocarcinome.

Mots-clés : Carcinome hépatocellulaire, glucose, métabolisme, adaptabilité, tumorigénicité

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a morphologically and functionally heterogeneous cancer. For several decades, the involvement of glucose metabolism in tumor cells has been widely studied and several key features have been observed including increased glucose consumption, increased lactate production, or a "metabolic switch" more commonly known as the *Warburg effect*. The adaptability of cancer cells in a nutrient-restricted microenvironment becomes evident since they can easily modify their metabolic phenotype under different conditions. On the other hand, the intense metabolic activity displayed by the liver complicates the detection of primary tumor foci by clinical imaging especially by positron emission tomography (PET). This medical imaging technique, based on the substantial ability of neoplastic cells to consume large amounts of glucose, does not efficiently allow to differentiate between healthy and HCC tumor cells. Therefore, studies closely related to the metabolism of HCC cells are of great interest not only to understand their glucose dependence but also their capacity to adapt to a harsh microenvironment. The main objective of this project was to functionally characterize HCC cells by comparing their metabolism to that of non-tumor cells. In this context, we first studied primary cultures of normal hepatocytes as control cells: we demonstrated that major metabolic alterations occurred immediately after hepatocytes are removed from the liver and that these changes could persist or increase during culture. Indeed, a drastic decrease in metabolites related to antioxidative stress, Krebs cycle activity (TCA) and energy production was noted, accompanied by a significant reduced respiratory capacity when compared to liver cells *in situ*. The study of HCC Dt81Hepa1-6 cells, a derivative of Hepa1-6 cells, demonstrated enhanced tumorigenicity *in vivo* when compared to their parental cell line. Furthermore, we showed that the tumorigenic potential of these Dt81Hepa1-6 cells was partly based on their capacity to uptake surrounding glucose but also on their ability to use their stored fatty acids under glucose-restricted conditions. Targeting HCC Dt81Hepa1-6 cell metabolic reprogramming by sodium oxamate, a known inhibitor of lactate dehydrogenase (LDH), not only confirmed their greater metabolic plasticity with decreased tumorigenicity but also increased mortality when combined with cisplatinium

(CP). Moreover, the association of glycolytic gene overexpression with increased tumorigenicity and mortality in patients with HCC led us to consider the possibility of targeting the metabolic processes used by highly tumorigenic HCC cells to potentiate the effectiveness of current chemotherapeutic drugs. Metabolomic analysis also allowed us to note that besides the intrinsic ability of Dt81Hepa1-6 cells to efficiently adapt to their microenvironment, HCC cells rapidly display a metabolic strategy by preferentially activating some specific metabolic pathways that favors their tumorigenicity both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, we have been able to identify a metabolic signature associated with increased tumorigenicity in HCC that heralds glycolytic and hypoxia pathways as being critical.

Keywords : Hepatocellular carcinoma, glucose, metabolism, adaptability, tumorigenicity

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des Figures.....	viii
Liste des Abréviations.....	x
<i>François Rabelais; Pantagruel, 1532.</i>	xiv
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	xvi
I) Introduction.....	1
1. Le foie.....	2
1.1 Perspectives historiques.....	2
1.2 Anatomie et organisation structurelle du foie.....	4
1.3 Vascularisation et zonation métabolique.....	5
1.3.1 Zonation glucidique.....	7
1.3.2 Zonation lipidique et cholestérolique.....	7
1.3.3 Zonation du métabolisme des xénobiotiques.....	8
1.4 Propriétés fonctionnelles hépatiques.....	9
1.4.1 Rôle de synthèse protéique.....	9
1.4.2 Rôle d'épuration.....	10
1.4.2.1 Clairance hépatique.....	10
1.4.2.2 Élimination de l'ammoniac.....	10
1.4.2.3 Métabolisme de la bilirubine.....	12
1.4.3 Métabolisme hépatique selon l'état nutritionnel.....	13
1.4.3.1 État de jeûne.....	14

1.4.3.1.1	Glycogénolyse hépatique	14
1.4.3.1.2	Gluconéogenèse hépatique.....	15
1.4.3.1.3	Captage, activation et oxydation des acides gras.....	17
1.4.3.1.4	Cétogenèse	20
1.4.3.1.5	Synthèse et sécrétion des VLDL.....	20
1.4.3.2	État postprandial	21
1.4.3.2.1	Glycolyse hépatique.....	21
1.4.3.2.2	Glycogénogenèse hépatique.....	24
1.4.3.2.3	Voie des pentoses phosphates.....	25
1.4.3.2.4	Biosynthèse des acides gras	25
1.4.3.2.4.1	<i>Les mécanismes de régulation</i>	26
1.4.3.2.4.2	<i>Élongation, désaturation et estérification des acides gras</i>	27
1.5	Régénération hépatique.....	30
2.	Le carcinome hépatocellulaire	32
2.1	Épidémiologie et étiologie	32
2.2	Facteurs de risque	34
2.3	Hépatocarcinogenèse	35
2.3.1	Origines.....	35
2.3.2	Altérations chromosomiques	36
2.3.3	Modifications épigénétiques.....	37
2.3.4	Voies de signalisation cellulaires.....	38
2.3.4.1	P53	38
2.3.4.2	Wnt/ β -caténine.....	38
2.3.4.3	mTOR	39
2.3.5	miARNs	40
2.3.6	Classification moléculaire.....	41
2.4	Caractéristiques pathologiques	43
2.4.1	Physiopathologie.....	43
2.4.2	Anatomopathologie.....	45
2.4.3	Classifications anatomopathologiques.....	46

2.4.4 Présentations cliniques et biologiques	48
2.5 Modèles d'étude du CHC	49
3. Métabolisme des cellules cancéreuses	51
3.1 Perspectives historiques	51
3.2 Reprogrammation métabolique.....	53
3.2.1 Concepts émergents en bioénergétique.....	53
3.2.2 Reprogrammation métabolique tumorale	55
3.2.2.1 Glycolyse aérobie ou <i>effet Warburg</i>	55
3.2.2.2 Cancers oxydatifs.....	56
3.2.2.3 Cancers glycolytiques, oxydatifs ou mixtes?.....	59
3.3 Microenvironnement tumoral	60
3.4 Tomographie par émission de positrons (TEP)	63
3.5 Enjeux de la TEP avec l'hépatocarcinome	66
II) Objectifs de la thèse	70
III) Résultats.....	72
Article 1	72
Article 2	100
Article 3	143
IV) Discussion générale.....	192
Première partie: Rappels.....	192
Deuxième partie: Rédecouverte du métabolisme	198
Troisième partie: Ouvertures thérapeutiques	212
Quatrième partie: Perspectives	217
V) Conclusion	220
Bibliographie.....	221

Liste des Figures

Figure 1. Fresque égyptienne montrant le gavage des oies. Tirée de la New York Public Library, from the Oriental Division.....	2
Figure 2. Représentation schématique du lobule hépatique. Adaptée de la figure Structure of the liver's lobules générée par le National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.....	5
Figure 3. Représentation schématisée de la zonation des différentes voies métaboliques selon la localisation des hépatocytes le long de l'axe porto-central. Adaptée de Braeuning A. et al. FEBS Journal, 2006 (4).....	6
Figure 4. Représentation schématisée du métabolisme de l'ammoniac. Tirée de Funakoshi N. et al. John Libbey Eurotext, 2014.....	11
Figure 5. Représentation simplifiée de la voie de la gluconéogenèse hépatique. Adaptée à partir du Précis de biochimie de Harper, Murray et al. 1993.....	16
Figure 6. Représentation simplifiée montrant les différentes étapes de la voie d'oxydation des acides gras et de la production des corps cétoniques. Adaptée à partir de JD McGarry et al. 1980 (38).	19
Figure 7. Représentation schématique des différentes étapes de la voie de la glycolyse. Adaptée à partir du Précis de biochimie de Harper, Murray et al. 1993.....	22
Figure 8. Représentation de la voie de synthèse, d'élongation et d'estérification des acides gras. Adaptée à partir du Précis de biochimie de Harper, Murray et al. 1993.....	29
Figure 9. Vase antique représentant l'illustration du mythe de Prométhée. Provenant du Gregorian Etruscan Museum.....	30
Figure 10. Taux de mortalité lié au CHC dans le monde. Les fréquences sont indiquées chez les deux sexes pour 100 000 personnes. Tirée de GLOBOCAN 2012.....	33
Figure 11. Progression histopathologique du CHC. Tirée de Farazi P. et al. Nature Reviews Cancer, 2006 (104).	44
Figure 12. Caractéristiques histologiques du CHC. Adaptée de Paradis V. et al. Recent Results in Cancer Research, 2013 (141).....	46

Figure 13. Image TEP montrant la répartition du ¹⁸F-FDG dans l'organisme avec présence entre autres d'une tumeur mammaire droite. Extrait de Imagerie TEP au ¹⁸F-FDG du cancer du sein. 65

Liste des Abréviations

¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-fluoro-D-glucose
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACLY	ATP citrate lyase
ACS	Acyl-CoA synthases
AFP	Alpha-fœtoprotéine
AGPAT	Acylglycérol phosphate acyltransférase
AKT	Protéine kinase B
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ASS1	Arginosuccinate synthétase 1
ATP	Adénosine triphosphate
Bax	Protéine Bcl-2-associated X
CD4	Cluster de différenciation 4
CD8	Cluster de différenciation 8
CHC	Carcinome hépatocellulaire
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
cMOAT	Canaliculaire multiple organic anion transporter
CP	Cisplatinium
CpG	Dinucléotides C-G sur le même brin
CPT1	Carnitine palmitoyltransferase 1
CPT2	Carnitine palmitoyltransférase 2
DAG	Diacylglycéride
DCP	Des-gamma carboxyprothrombine
DGAT	Diacylglycerol acyltransférase
DHAP	Dihydroacétone phosphate
ELOVL	Elongase Very Long chain
F1,6 biP	Fructose 1,6 biphosphate

F1,6 biPase	Fructose 1,6 biphosphatase
F2,6 biP	Fructose 2,6 biphosphate
F6P	Fructose 6 phosphate
FADS	Fatty Acid Désaturases
FASN	Acides gras synthase
FGF19	Fibroblast growth factor 19
G1P	Glucose 1 phosphate
G6P	Glucose 6 phosphate
G6Pase	Glucose 6 phosphatase
G6PDH	Glucose 6 phosphate déhydrogénase
GK	Glucokinase
GKRP	Glucokinase regulatory protein
GLUT-1	Glucose transporter 1
GLUT-2	Glucose transporter 2
GP	Glycogène phosphorylase
GPAT	Glycérol 3 phosphate acyltransférase
GS	Glycogène synthase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HBx	Protéine X du virus de l'hépatite B
HFA	Hollow Fibre Assay
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 α
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-CoA
HNF	Hyperplasie nodulaire focale
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IDO	Indoléamine 2,3 dioxygénase
K _m	Constante de Michaelis
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LRP	LDL-Related Protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinases

MCT	Monocarboxylate transporter
MEC	Matrice extracellulaire
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NAD/NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PDC	Pyruvate décarboxylase
PDH	Pyruvate déhydrogénase
PDK1	Pyruvate déhydrogénase kinase 1
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK	Phosphofructokinase
PHGDH	Phosphoglycérate déhydrogénase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA	Phosphoinositide 3-kinase catalytic alpha polypeptide
PK	Pyruvate kinase
PKA	Protéine kinase A
pO ₂	Pression partielle en oxygène
PP	Périportal(e)
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PV	Périveineu(x)se
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase A3
SCD1	Stéaroyl-CoA Désaturase 1
SLC1A5	Solute Carrier Family 1 Member 5
SREBP-1c	Stérol regulatory element-binding protein-1c
TALDO	Transaldolase

TCA	Cycle de Krebs
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TEP	Tomographie par émission de positons
TG	Triglycérides
TGF- β	Transforming growth factor- β
TKT	Transcétolase
UDP	Uridine diphosphate
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité
Wnt	Wingless-related integration site

"Science sans conscience n'est que ruine de l'âme"

François Rabelais; Pantagruel, 1532.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Marc Bilodeau pour m'avoir premièrement accepté au sein de son laboratoire en tant qu'étudiant au PhD. À mon arrivée au laboratoire, je me suis vu confié un tout nouveau projet traitant du métabolisme des cellules d'hépatocarcinome qu'il a fallu mettre en place et développer. Au fil des premiers résultats, j'ai ainsi pu bénéficier de son aide mais surtout de son encouragement inconditionnel notamment sur la façon d'interpréter et d'intégrer mes résultats à la littérature actuelle, tout en essayant de revisiter certains des dogmes du métabolisme des cellules cancéreuses. Dr Bilodeau m'a ainsi énormément appris sur la science et la recherche, mais a surtout développé en moi un niveau d'exigence et un sens critique que je ne possédais pas avant notre rencontre. Si j'ai pu accomplir ce que j'ai entrepris durant ces 3 dernières années dans votre laboratoire, c'est sans aucun doute grâce à vous et je vous en suis d'une grande reconnaissance. Merci pour votre confiance.

Je tiens à également remercier Valérie-Ann Raymond pour m'avoir quotidiennement encouragé. En effet, Valérie-Ann m'a été d'une grande aide tout au long de ce PhD de mes débuts lors de la mise en place du projet, jusqu'à la fin dans la rédaction des articles. J'ai ainsi pu beaucoup apprendre à ses côtés, ce qui m'a rapidement permis de développer un sens de l'organisation et de pouvoir mener un grand nombre d'expériences simultanément. L'accomplissement de ce PhD dans de telles conditions a en grande partie été rendue possible grâce à toi et je t'en remercie.

Je tiens également à remercier Pascal Lapierre pour m'avoir guidé, encouragé mais surtout appris à développer un sens critique, notamment dans l'écriture, où il a pu à plusieurs reprises me démontrer la pertinence cruciale et le poids de chacun des mots utilisés dans une introduction ou discussion pour une meilleure compréhension globale. Merci à toi.

Je remercie enfin ma mère et mon père pour leur soutien indéfectible.

Avant-propos

Décrit comme un organe fascinant tant pour son rôle dans le métabolisme du glucose avec le maintien des fonctions homéostatiques du corps humain que pour ses propriétés régénératives, le foie possède de base une intense activité métabolique rendant alors difficile la détection de foyers tumoraux primitifs par TEP. Les recherches portant sur la fonctionnalité de ces cellules vont donc être d'un grand intérêt pour non seulement comprendre les mécanismes leur permettant de croître et de proliférer, mais également pour pouvoir discriminer une cellule cancéreuse d'une cellule saine en imagerie médicale.

Les cellules cancéreuses ont pendant longtemps été l'attrait de plusieurs types de recherche, toujours dans le but de mieux pouvoir les caractériser tant d'un point de vue morphologique que fonctionnel. Il a ainsi été constaté en 1956 par le célèbre physiologiste allemand Otto Warburg que les cellules cancéreuses vont privilégier la glycolyse plutôt que la chaîne respiratoire mitochondriale dans la production d'ATP, et ce même en présence d'oxygène et de mitochondries parfaitement fonctionnelles. Ainsi, par le biais de leur aptitude à pouvoir capter le glucose environnant, ces cellules pourront démontrer un phénotype tumoral extrêmement agressif.

Mais qu'en est-il des cellules tumorales issues de cancers primitifs du foie comme le CHC qui, se développant majoritairement sur un fond cirrhotique avec une altération profonde des structures hépatiques, démontrent néanmoins une réelle capacité à proliférer malgré la faible oxygénation, ou encore l'appauvrissement en glucose? Ont-elles recours à des voies métaboliques alternatives dans le maintien de leur tumorigénicité? Et quelles sont ces alternatives? Pour tenter de répondre au mieux à ces questions, plusieurs volets ont été abordés pendant ce travail de doctorat telles les caractérisations morphologiques et fonctionnelles *in vitro* des cellules d'hépatocarcinome, ou encore par expérimentation *in vivo* sur des modèles de souris, l'adaptabilité métabolique mise en place par ces dernières dans leur croissance et prolifération.

I) Introduction

Le carcinome hépatocellulaire (CHC), principal cancer primitif du foie, se décrit comme un cancer hétérogène tant d'un point de vue morphologique que fonctionnel. Il est classé comme étant le 5^{ème} cancer le plus fréquent dans le monde avec une incidence qui ne cesse d'augmenter années après années notamment dans les pays occidentaux. La pathogénèse du CHC est complexe et résulterait de la convergence de plusieurs facteurs intrinsèquement liés au foie comme par exemple la présence de cirrhose, mais aussi à d'autres prédispositions comme celles liées aux mécanismes de tolérance immunitaire ou encore au microenvironnement. La fonctionnalité des cellules d'hépatocarcinome va ainsi être d'une importance capitale dans le maintien de leur phénotype tumoral. L'étude de leur métabolisme et particulièrement leur dépendance au glucose devraient nous permettre de mettre en évidence les différentes voies métaboliques sollicitées dans le maintien de leur tumorigénicité en cas de variations du microenvironnement. Pour avoir une vue d'ensemble des différents acteurs auxquels nous allons par la suite faire référence, nous allons dans cette introduction:

- premièrement aborder les principales caractéristiques du foie en conditions basales en rappelant par exemple son organisation structurelle et ses propriétés biologiques et fonctionnelles. Cette première partie devrait alors nous permettre de mieux assimiler les fonctions cruciales occupées par le foie en condition physiologique et en quoi ce dernier se trouve être un organe si métaboliquement atypique.
- deuxièmement décrire morphologiquement et fonctionnellement le CHC en détaillant plusieurs aspects de cette maladie comme sa pathogénèse ou encore sa physiopathologie, ce qui devrait nous permettre de souligner davantage l'aspect dysfonctionnel d'un foie tumoral par rapport à un foie sain.
- finalement aborder la notion du métabolisme des cellules cancéreuses en général dans un premier temps et celui des cellules d'hépatocarcinome par la suite, avec son implication dans l'imagerie médicale, pour *in fine* mieux pouvoir cerner les composantes métaboliques déterminantes dans la croissance et la prolifération de ces cellules en conditions extrêmes.

1. Le foie

1.1 Perspectives historiques

Longtemps perçu comme étant un organe mystérieux au pouvoir divinatoire de prédiction, les termes de "foie" en français ou "liver" en anglais ou même encore "leben" en allemand auraient étymologiquement un lien avec la notion de "vie". Plus spécifiquement, le mot foie proviendrait du latin *Jecur ficatum*, signifiant alors foie d'oie engraisé de figes. Cette pratique ancestrale remonte au moins à l'ère de l'Égypte ancienne puisque des fresques vieilles de 4 500 ans représentant le gavage des oies ont été retrouvées (**Figure 1**). En effet, les égyptiens avaient pris pour habitude de gaver plusieurs espèces d'oiseaux palmipèdes, dont des oies, à l'aide de granules de grains rôtis et humidifiés.

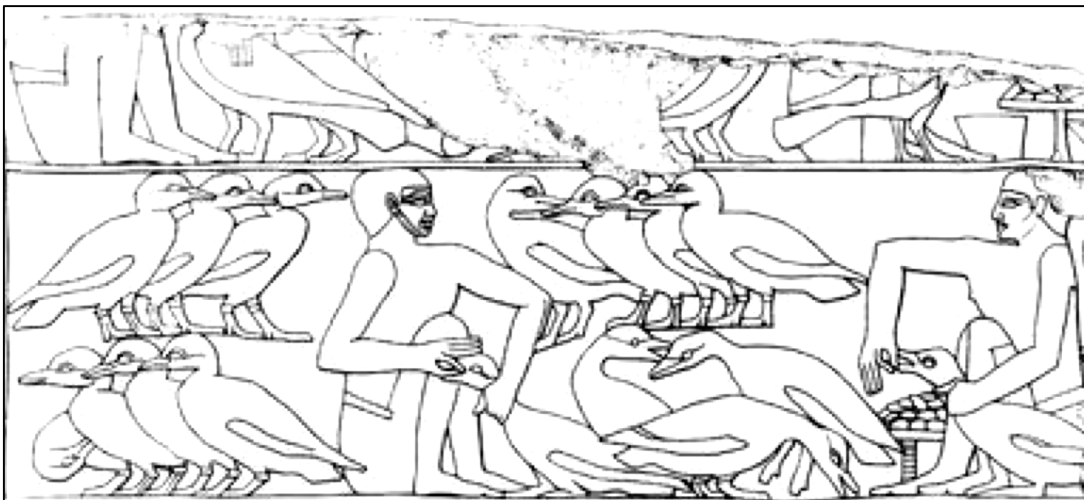


Figure 1. Fresque égyptienne montrant le gavage des oies. Tirée de la New York Public Library, from the Oriental Division.

Cette pratique s'est par la suite poursuivie dans la Grèce antique en prenant comme souvent à cette époque une connotation symbolique religieuse, qui sera par la suite conservée sous l'Empire romain. Pline l'Ancien évoquera alors le gavage des oies à l'aide de figes

séchées alors que Caton l'Ancien décrira quant à lui le gavage des poules et des oies avec des pâtons de fleurs de farine humidifiés. C'est ainsi que les anciens latinisés ne conservèrent que le terme *ficatum* ou figue pour sa dénomination, ce qui donna au fil du temps la forme *figido* au VIII^{ème} siècle, puis *fedie*, *feie* au XII^{ème} et finalement "foie", expliquant alors que la racine étymologique de ce mot soit retrouvée dans plusieurs langues romanes telles que le français, l'italien, l'espagnol ou même le portugais. La déchéance romaine entraîna cependant la quasi-disparition du foie gras pendant près d'un millénaire en Occident, marquée par une absence totale d'oies et de canards dans les basses cours. Ce n'est qu'au cours du XV^{ème} siècle avec l'avènement du maïs rapporté par Christophe Colomb lors de ses expéditions que le renouement à l'élevage et l'engraissement des oies et des canards recommencèrent et s'étendirent par la suite sur plusieurs siècles sur le continent européen. Héritiers des vieilles coutumes et recettes égyptiennes de l'époque, les juifs d'Europe centrale eurent par la suite la réputation de bien connaître et maîtriser la production de cette denrée délicate au cours du XVI^{ème} siècle, la consommation en viande de porc leur étant interdite. La notoriété du foie gras atteignit finalement son heure de gloire sous le règne de Louis XVI et inspira par la suite de multiples grand écrivains tels que George Sand ou même encore Alexandre Dumas.

Côtés religieux et ordres divinatoires, le foie a pendant longtemps été perçu comme un organe sacré. Plusieurs rattachements symboliques ont ainsi pu être retrouvés comme à celui de la bible, où de par son étymologie, le foie serait considéré "*comme le siège de la puissance divine et de la gloire*". Nous trouvons également dans le livre de Jean XIX que le foie est le lieu du corps où "*s'enrange la lumière de l'accompli*" et que "*lorsque tout est accompli le foie devient lourd de richesse et c'est la résurrection, le passage de la porte de Dieu*." Toute une symbolique dédiée au foie est également retrouvée dans la croyance des peuples venus d'Orient, notamment avec les chinois affirmant que le foie servirait "*de bouclier servant à protéger*" en transmettant son "*pouvoir lumière*" à la vésicule biliaire, organe atelier traditionnellement décrit comme étant le siège du discernement. Le *Souwen*, traité de base de la médecine chinoise traditionnelle, définit aussi le foie comme le générateur des forces étant "*le général qui élabore les plans*" et la vésicule biliaire "*le juge qui décide et condamne*". Le foie a pour ainsi dire, et ce, depuis la nuit des temps, bénéficié d'une forte attache symbolique comme nous avons pu brièvement le constater dans ce paragraphe.

Forts de cet aspect historique suscitant à la fois intérêt et curiosité, nous allons à présent provisoirement laisser ces mythes de côté pour particulièrement nous intéresser au réel rôle physiologique du foie dans le corps humain en commençant notamment par rappeler son organisation structurelle.

1.2 Anatomie et organisation structurelle du foie

Sur le plan morphologique, la connaissance anatomique du foie semble incontestablement remonter à des temps anciens. Des représentations datant de 2000 ans avant Jésus-Christ ont ainsi pu être retrouvées, comme notamment certains modèles de foie en argile où les Babyloniens associaient déjà des noms distincts à différentes portions du foie. À la différence du foie murin, le foie humain est anatomiquement constitué de 2 lobes: gauche et droit, marqués par l'insertion du ligament falciforme.

D'un point de vue histologique, le foie est constitué de cellules hépatiques appelées hépatocytes, qui sont organisés en travées autour des sinusoides. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique pouvant se définir comme étant la plus petite structure distincte se suffisant à elle-même et qui peut de façon indépendante réaliser toutes les fonctions connues de cet organe (**Figure 2**). La double irrigation sanguine, 2/3 de la veine porte et 1/3 de l'artère hépatique, permet les échanges entre le foie et le reste de l'organisme par un réseau de capillaires irriguant le parenchyme hépatique. Constitué à 80% d'hépatocytes, le foie contient également plusieurs autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules des canaux biliaires, les macrophages également appelés cellules de Kupffer, les cellules de Ito ou étoilées ou encore de cellules ovales impliquées dans la régénération et la réparation tissulaire hépatique. Les lobules hépatiques se définissent comme étant des groupements de cellules hépatiques ayant une forme polyédrique, dont l'agencement est déterminé par la disposition des vaisseaux et des voies biliaires intrahépatiques (**Figure 2**). Des travées de tissu conjonctif marquent une distincte séparation des lobules les uns des autres et ont pour appellation le nom d'espace porte, endroit même où cheminent les vaisseaux et canaux biliaires intrahépatiques.

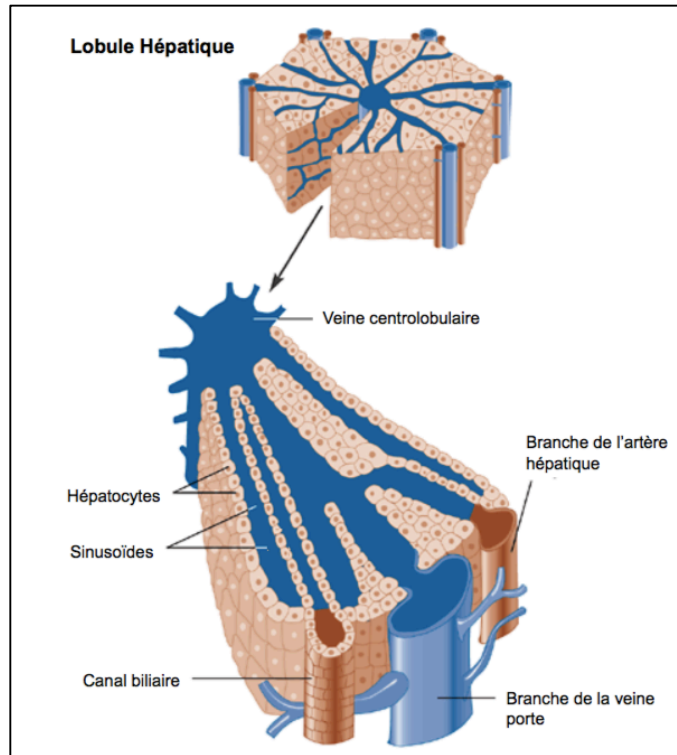


Figure 2. Représentation schématique du lobule hépatique. *Adaptée de la figure Structure of the liver's lobules générée par le National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism.*

1.3 Vascularisation et zonation métabolique

Le foie bénéficie d'une vascularisation particulière et différente de celle des autres organes avec, comme mentionné au préalable, un double apport sanguin: un sang riche en oxygène acheminé par l'artère hépatique sous haute pression et un sang tout aussi riche en oxygène mais également riche en nutriments et hormones provenant de l'intestin et du pancréas, en provenance de la veine porte hépatique sous basse pression. Le retour veineux du foie se fait grâce à la veine hépatique qui se jette ensuite dans la veine cave inférieure. Cette vascularisation si particulière et propre au foie lui permet d'être le premier organe à recevoir les nutriments issus de l'alimentation et les hormones sécrétées par le pancréas. Ainsi, le sang

arrivant de l'artère hépatique et de la veine porte sera acheminé vers le lobule hépatique en partant de la périphérie vers le centre en se mélangeant dans les sinusoides qui passent entre les travées d'hépatocytes. On parle alors d'irrigation centripète, de la triade portale (canalicule biliaire, veine porte et artère hépatique) vers la veine centrolobulaire, qui se jette ensuite dans la veine hépatique.

Cette vascularisation spécifique aura pour effet de créer un gradient des concentrations sanguines en oxygène, nutriments et hormones le long des sinusoides entre la zone périportale (PP) et la zone périveineuse (PV), influençant alors grandement le phénotype des hépatocytes selon leur localisation au sein du lobule hépatique : il s'agit du phénomène de zonation métabolique (**Figure 3**). Les hépatocytes périportaux situés proches de l'artère hépatique auront ainsi une forte prédisposition à arborer un métabolisme oxydatif étant donné l'importante pression en oxygène (pO_2). Les hépatocytes localisés à proximité de la veine centrolobulaire auront quant à eux un métabolisme plutôt orienté vers la glycolyse étant donné la faible pO_2 (**Figure 3**) (1-3).

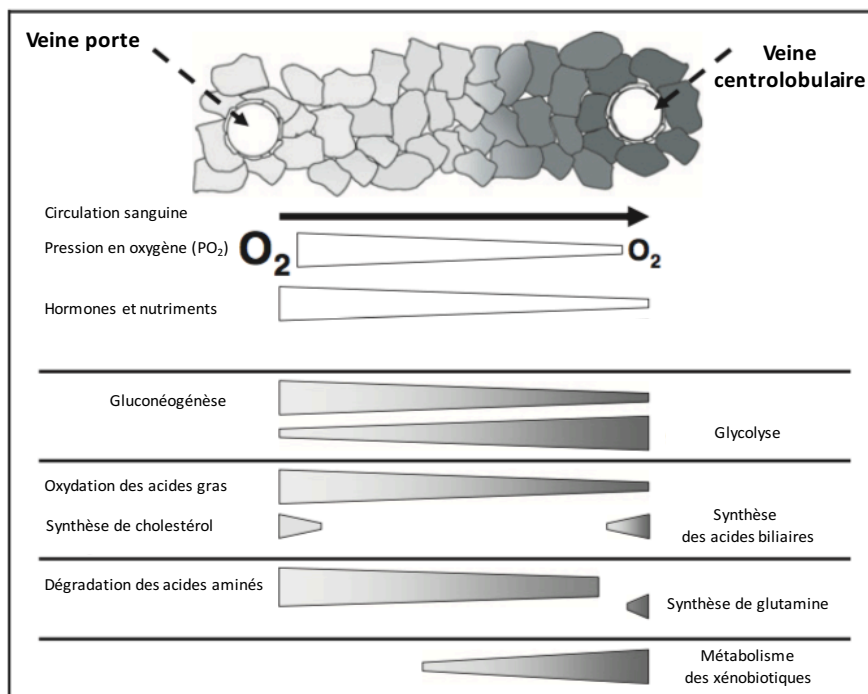


Figure 3. Représentation schématisée de la zonation des différentes voies métaboliques selon la localisation des hépatocytes le long de l'axe porto-central.
Adaptée de Braeuning A. et al. *FEBS Journal*, 2006 (4).

Cette hiérarchisation structurelle des hépatocytes tout au long de l'axe porto-central va alors grandement modifier le phénotype fonctionnel de ces derniers compte tenu des variations en pO_2 et en nutriments décrits précédemment. Ce principe même de zonation métabolique va ainsi intrinsèquement influencer les fonctions métaboliques du foie.

1.3.1 Zonation glucidique

La caractérisation du principe de zonation hépatique du métabolisme glucidique a démontré que la gluconéogenèse s'opérait de façon principale au sein d'hépatocytes localisés en zone PP et la glycolyse pour les hépatocytes situés en zone PV (5, 6). Étant une voie métabolique fortement consommatrice d'énergie oxydative, la gluconéogenèse est une voie métabolique s'opérant majoritairement en zone PP car bien oxygénée. Cependant, la voie de la glycolyse étant moins consommatrice d'énergie oxydative mais plus dépendante de la quantité de glucose disponible pourra s'effectuer en zone PV. Ainsi, en période postprandiale, le glucose sera capté par les hépatocytes périverneux pour ensuite être stocké sous la forme de glycogène. Une fois les réserves de glycogène remplies, le glucose sera transformé en lactate et libéré dans la circulation sanguine pour, *in fine*, être capté de nouveau par les hépatocytes mais cette fois-ci en zone PP. En période de jeûne, le glycogène sera dégradé en glucose au niveau périportal et en lactate au niveau périverneux pour ensuite aller rejoindre la circulation sanguine. De cette façon, le lactate pourra ensuite être recapté par des hépatocytes périportaux pour servir de substrat à la gluconéogenèse permettant alors la synthèse de glucose (7).

1.3.2 Zonation lipidique et cholestérolique

La synthèse des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) a été décrite comme étant préférentiellement localisée en zone PV tandis que l'oxydation des acides gras et la synthèse des corps cétoniques se produisent majoritairement en zone PP en réponse notamment à une

activité PP accrue de l'enzyme carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) (2, 5, 6). Par ailleurs, la synthèse des acides gras est plus importante au sein des hépatocytes situés en zone PV avec une meilleure capacité d'estérification de ces derniers, phénomène en partie expliqué par une plus grande activité des enzymes impliqués dans la synthèse des acides gras comme l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'acides gras synthase (FASN) ou encore l'ATP citrate lyase (ACLY) en zone PV (8-10).

À propos du cholestérol, des études antérieures ont établi à l'aide d'expériences d'immunohistochimie que la synthèse de ce dernier s'opérait préférentiellement en zone PP alors que son catabolisme ainsi que la synthèse des acides biliaires étaient plutôt localisés en zone PV. En effet, les activités de la 3-Hydroxy-3-methylglutarate-CoA synthase (HMG-CoA) et de l'HMG-CoA réductase, enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol, ont une activité plus importante en zone PP (11, 12). À l'inverse, les hépatocytes situés en zone PV révèlent une importante activité des enzymes responsables de la synthèse des acides biliaires (13, 14).

1.3.3 Zonation du métabolisme des xénobiotiques

Une zonation hépatique bien caractérisée a également été observée autour du métabolisme des xénobiotiques. En effet, la transformation biochimique des xénobiotiques en composés excrétables s'effectue par le biais des cytochromes P450. Cette étape de transformation nécessite premièrement une mono-oxygénation effectuée par les P450, suivie d'une étape de conjugaison avec, par exemple, l'acide glucuronique ou sulfuronique. Des études d'immunomarquage des cytochromes P450 ont montré une distribution hétérogène de ces derniers dans le foie avec notamment une plus forte concentration au niveau de la région PV (15). L'étude du métabolisme de l'énalapril, un traitement utilisé en cas d'hypertension artérielle, a également démontré une activité plus importante de l'élimination de ce composé en zone PV par rapport à la région PP (16). Enfin, l'analyse transcriptomique des hépatocytes a aussi révélé, selon la localisation de ces derniers le long de l'axe porto-central, que la majorité

des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques se trouvaient bel et bien en région PV (4, 5).

1.4 Propriétés fonctionnelles hépatiques

1.4.1 Rôle de synthèse protéique

Les protéines absorbées par l'alimentation vont essentiellement être dégradées dans l'intestin en oligopeptides ou acides aminés, ces derniers étant acheminés au foie par l'intermédiaire de la veine porte. Le foie va alors utiliser ces acides aminés principalement pour la synthèse protéique qui est une des caractéristiques majeures de la fonction des hépatocytes. Les protéines synthétisées seront ensuite sécrétées dans la circulation générale et ainsi former les protéines plasmatiques. Parmi elles, on note l'albumine, qui en plus de pouvoir permettre le transport de substances liposolubles dans le sang, va également permettre le maintien de la pression oncotique (17). C'est ainsi qu'une pression oncotique souvent altérée et diminuée sera fréquemment observée dans les cas d'insuffisance hépatique ou d'hypoalbuminémie (18). Outre l'albumine, on trouve aussi d'autres protéines de transport comme par exemple la transferrine qui transporte le fer dans le sang ou la céruloplasmine servant de transport au cuivre (19, 20). Le foie va également être l'organe majeur responsable de la production des facteurs de coagulation, ayant tous une synthèse exclusivement hépatique excepté pour le facteur VIII. Un certain nombre de médiateurs impliqués dans l'activation de la réponse inflammatoire vont aussi être sécrétés par le foie comme la protéine C réactive servant de marqueur biologique aux réactions inflammatoires lors d'infections (21). Le foie va également sécréter un nombre important de facteurs de croissance favorisant la croissance tissulaire, le renouvellement et la différenciation cellulaire (22).

1.4.2 Rôle d'épuration

1.4.2.1 Clairance hépatique

À l'inverse des molécules toxiques et xénobiotiques hydrosolubles se voyant être bloqués par la membrane cellulaire et particulièrement par la bicouche lipidique, les molécules hydrophobes peuvent quant à elles traverser sans difficulté la membrane cellulaire et ainsi s'accumuler dans la cellule dépassant potentiellement leur seuil toxique. Les organismes ont mis en place des systèmes permettant de limiter l'accumulation toxique de ces composés, et ce par le biais 1) de transporteurs membranaires permettant une sortie rapide de ces molécules indésirables, et 2) des systèmes de conversions chimiques rendant ces dites molécules plus hydrophiles, facilitant alors leur élimination par les fluides corporels. Les enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques, caractérisée par la famille des cytochromes P450, vont ainsi jouer un rôle capital dans la biotransformation et l'élimination de ces composés (23, 24).

Le métabolisme des xénobiotiques va se décomposer en 3 phases aboutissant au final à l'élimination de ces substances étrangères dans la bile et/ou l'urine. Les enzymes de la phase I (majoritairement des cytochromes P450), dites de fonctionnalisation, vont catalyser principalement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse; les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases et glucuronosyltransférases), dites de conjugaison cette fois, vont catalyser les réactions de transfert ; les transporteurs de la phase III (glycoprotéine P et protéines impliquées dans la résistance multi-médicamenteuse) vont finalement transporter au travers des membranes les xénobiotiques présents essentiellement sous la forme de dérivés conjugués.

1.4.2.2 Élimination de l'ammoniac

L'origine de l'ammoniac est double: exogène à partir du côlon notamment par la dégradation des acides aminés par les bactéries intestinales, et endogène à partir des acides aminés provenant de la dégradation des protéines des muscles, du cerveau et des reins (**Figure**

4). Chez un sujet sain, l'ammoniac est transformé au niveau du foie en urée selon le cycle de Krebs-Henseleit, pour finalement être éliminé au niveau des reins (25, 26).

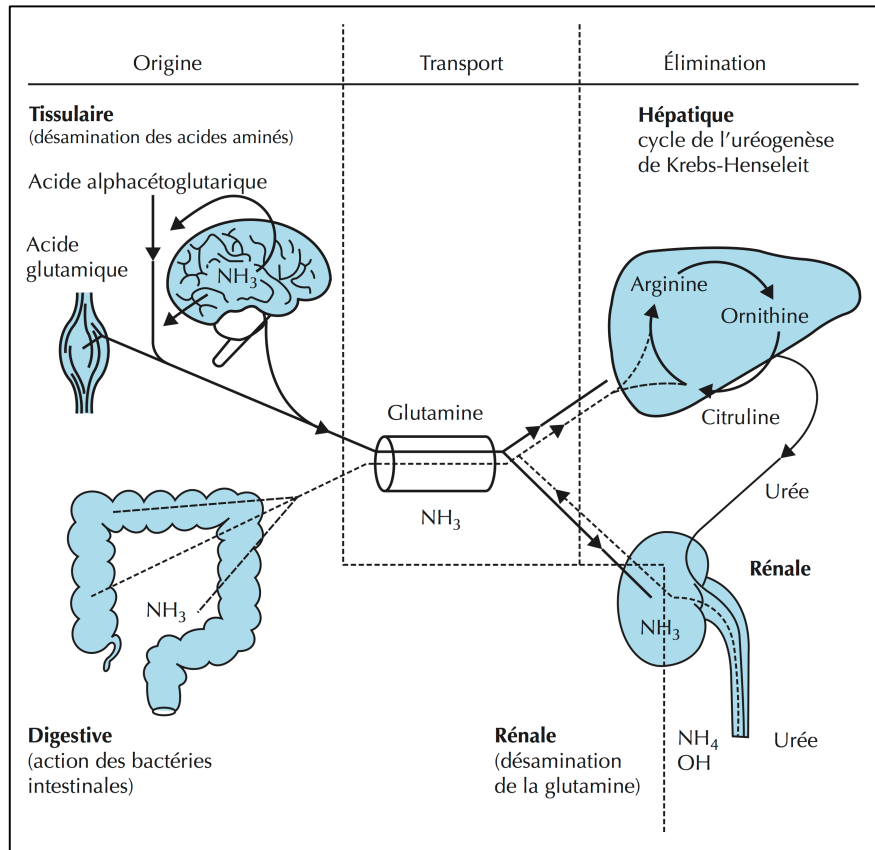


Figure 4. Représentation schématisée du métabolisme de l'ammoniac. Tirée de Funakoshi N. et al. John Libbey Eurotext, 2014.

En effet, lorsque se trouvant dans un milieu aqueux, l'ammoniac se dissocie en ion ammonium et devient ainsi un composé potentiellement toxique pour le système nerveux central, nécessitant alors son élimination qui s'effectue principalement par deux systèmes (**Figure 4**) :

- la synthèse de glutamine avec addition de l'ammonium au glutamate, grâce à la glutamine synthétase retrouvée dans les tissus. Ayant une très forte affinité pour

l'ammonium mais une très faible activité de synthèse en glutamine, ce système va ainsi prédominer lors de l'élimination de faibles quantités d'ammonium.

- pour des concentrations plus importantes et donc un risque accru de toxicité, un mécanisme de détoxification plus efficace devient alors nécessaire : c'est le cycle de l'urée qui s'effectue dans la mitochondrie des hépatocytes. Chaque cycle va alors produire une molécule d'urée. L'urée va par la suite quitter le cytoplasme hépatocytaire au niveau de la membrane sinusoïdale pour rejoindre la circulation sinusoïdale puis la circulation générale, pour finalement être éliminée par filtration rénale.

Chez le patient cirrhotique, des quantités importantes d'ammoniac arrivent par le sang artériel dans le système nerveux central en raison de l'insuffisance hépatocellulaire. Cela aboutit alors à l'encéphalopathie hépatique.

1.4.2.3 Métabolisme de la bilirubine

La bilirubine est le principal produit issu de la dégradation de l'hème. Ce cofacteur est surtout retrouvé dans l'hémoglobine, dans la myoglobine et également dans d'autres protéines tels que les cytochromes P450. L'hème possède au centre un large anneau organique appelé protoporphyrine, dans lequel se trouve un atome de fer. La première réaction enzymatique de dégradation de l'hème consiste en l'ouverture de ce noyau par une enzyme : l'hème oxygénase, réaction qui va avoir pour effet de libérer le fer, du monoxyde de carbone et de la biliverdine (pigment vert). Le fer sera ensuite soit emmagasiné dans le foie, soit réutilisé par les cellules de la moelle osseuse dans la fabrication de nouveaux globules rouges. La biliverdine est une molécule ouverte qui va être transformée en bilirubine dite "libre" par l'action d'une réductase et sera ensuite éjectée dans le plasma. Étant insoluble en phase aqueuse, la bilirubine va alors se lier à l'albumine qui l'acheminera jusqu'au foie, pour ensuite être captée par l'hépatocyte après dissociation avec l'albumine. Dans l'hépatocyte, la bilirubine va alors se lier à des protéines cytosoliques dont principalement la ligandine. Étant très peu soluble dans l'eau sous sa forme non conjuguée, l'étape de conjugaison va donc être obligatoire pour que la bilirubine puisse être excrétée dans la bile. La conjugaison va se faire

principalement avec l'acide glucuronique grâce à une enzyme du reticulum endoplasmique: la glucuronosyltransférase. La plus grande partie de la bilirubine sera excrétée dans la bile sous forme conjuguée et son transport de l'hépatocyte vers la bile à travers la membrane canaliculaire va se faire grâce à un transporteur: le cMOAT (canaliculaire multiple organic anion transporter). Il s'agit d'un transporteur actif, utilisant l'ATP, qui sera différent du transporteur responsable de l'excrétion des acides biliaires dans la bile. La bilirubine sera finalement dégradée par des enzymes bactériennes présents dans la flore intestinale (27-29).

La sécrétion biliaire est un phénomène constant dans le temps. Durant les périodes interprandiales, la bile va alors s'écouler le long de la voie biliaire principale pour finalement s'accumuler au niveau de la vésicule biliaire. Étant pourvue d'une paroi capable de se relâcher, la vésicule biliaire sera alors capable d'accueillir un volume important de bile sans pour autant que la pression intérieure n'augmente. L'élément déclenchant permettant l'excrétion biliaire et le passage du sphincter d'Oddi jusqu'ici fermé est la prise du repas avec l'arrivée des aliments dans le duodénum. Les lipides provenant du bol alimentaire vont alors permettre la sécrétion de la cholécystokinine qui, par voie endocrine, pourra agir sur les cellules musculaires lisses constituant la paroi de la vésicule biliaire, et ainsi provoquer la contraction et le déversement de la bile dans l'intestin.

1.4.3 Métabolisme hépatique selon l'état nutritionnel

Le foie a pour principale fonction de maintenir la 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 de l'énergie sous forme de glucose en excès lorsque le rapport insuline/glucagon augmente et, inversement, une libération des réserves énergétiques du glucose stocké dans la circulation sanguine 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 va alors produire 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 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 utiliser le glucose telles que la voie de la glycolyse, pour ensuite favoriser une mise en réserve du glucose sous la forme de glycogène ou d'acides gras respectivement grâce à la glycogénogenèse et la lipogenèse. Les acides gras issus de l'alimentation vont également être transportés et mis en réserve dans le foie sous forme de triglycérides (TG).

1.4.3.1 État de jeûne

1.4.3.1.1 Glycogénolyse hépatique

La voie de glycogénolyse permet, en période de jeûne, la dégradation du glycogène hépatique présent sous la forme de polysaccharide grâce à la glycogène phosphorylase (GP) qui est active sous forme phosphorylée et inactive lorsque déphosphorylée. En période de jeûne, la GP sera donc phosphorylée et donc active notamment par l'action de la Protéine kinase A (PKA), alors qu'à l'état postprandial, elle sera inactive grâce à la protéine phosphatase 1 et 2A. Les réserves de glycogène hépatique étant restreintes, la production hépatique de glucose sera par la suite prise en charge par la gluconéogenèse.

1.4.3.1.2 Gluconéogenèse hépatique

La gluconéogenèse permet de synthétiser du glucose à partir de composés non-glucidiques. Elle a lieu principalement au niveau du foie mais peut également être opérationnelle au niveau du rein, du cerveau, du muscle cardiaque et, dans une moindre mesure, au niveau des muscles striés squelettiques. La fonction principale de cette voie sera, tout comme la glycogénolyse, de maintenir la glycémie à un niveau constant. Seuls le foie et le rein vont être capables de relarguer le glucose synthétisé *de novo* dans la circulation sanguine, ce notamment grâce à la glucose 6 phosphatase (G6Pase). Les précurseurs permettant cette synthèse seront les acides aminés contribuant pour 50%, le lactate pour 42% et enfin le glycérol pour 8% (**Figure 5**). Voyons les différentes étapes permettant la synthèse de glucose à partir :

- des acides aminés : une fois transférés dans la mitochondrie, ils sont convertis en pyruvate par des réactions de transamination/désamination. Le pyruvate sera ensuite carboxylé par le pyruvate carboxylase pour former de l'oxaloacétate. Cet oxaloacétate va ensuite sortir de la mitochondrie pour rejoindre le cytosol et devra donc être transformé en malate qui, grâce à un système de transport couplé de type antiport, sera transféré dans le cytosol et à nouveau transformé en oxaloacétate. La phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) catalysera ensuite la transformation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate (PEP). Toutes les étapes suivantes jusqu'au fructose 1,6 biphosphate (F1,6 biP) sont les étapes inverses de la glycolyse. En effet, l'activité de ces enzymes se trouve proche de l'équilibre dans les conditions intracellulaires physiologiques et donc facilement réversibles. Cependant, la catalyse du F1,6 biP en fructose 6 phosphate (F6P) étant irréversible dans la glycolyse, cette étape nécessitera le recours d'une enzyme spécifiquement retrouvée dans les organes capables de gluconéogenèse : la fructose 1,6 biphosphatase (F1,6 biPase). La transformation en glucose 6 phosphate (G6P) pourra ensuite s'effectuer facilement dans la plupart des tissus concernés. Cependant, l'étape finale consistant en la transformation du G6P en glucose libre ne se fera que dans le foie et le rein au niveau du réticulum endoplasmique (RE) granuleux, et ce grâce à la G6Pase (**Figure 5**).

- du lactate : grâce au LDH, il sera transformé du pyruvate. Ce dernier va ensuite emprunter les mêmes voies que celles que l'on vient de détailler (**Figure 5**).
- du glycérol : il pourra être phosphorylé par la glycérol kinase et aboutir à la formation de glycérol 3 phosphate. Ce dernier sera alors oxydé en dihydroacétone phosphate (DHAP) et pourra enfin être intégré dans la glycolyse pour remonter jusqu'à la formation de glucose (**Figure 5**).

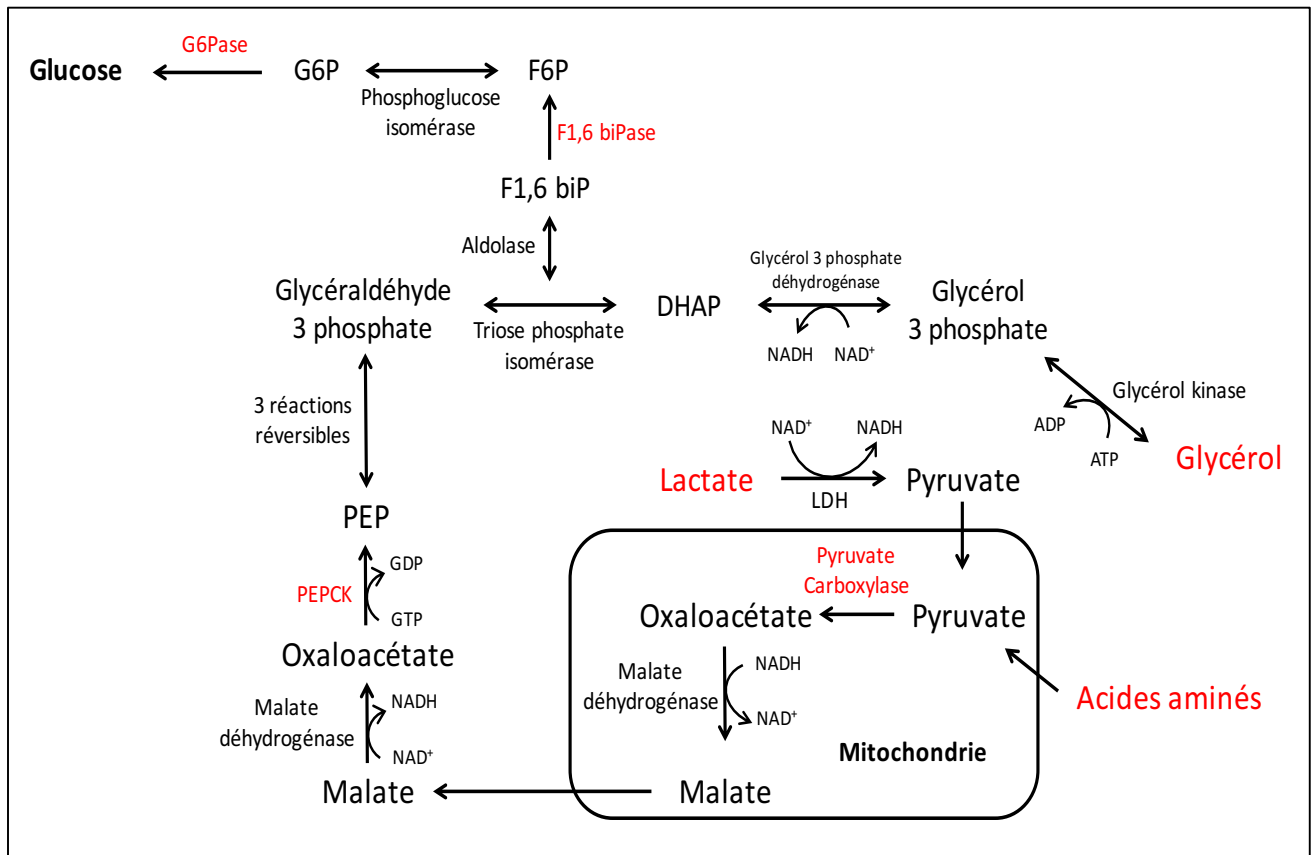


Figure 5. Représentation simplifiée de la voie de la gluconéogenèse hépatique.
Adaptée à partir du Précis de biochimie de Harper, Murray et al. 1993.

1.4.3.1.3 *Captage, activation et oxydation des acides gras*

En période de jeûne, les acides gras non estérifiés provenant de la lipolyse du tissu adipeux circulent dans le sang en formant un complexe avec l'albumine. Ces acides gras vont alors pouvoir être captés par le foie grâce à certains transporteurs (CD36, FATP2 et 5), spécifiques aux acides gras à longue chaîne (30-32). Les acides gras à courte chaîne vont, quant à eux, principalement provenir de l'alimentation et diffuser à travers la membrane plasmique des hépatocytes (31).

Indépendamment de leur provenance, que ce soit du tissu adipeux ou de l'alimentation, les acides gras seront préalablement transformés en molécules d'acyl-CoA et ce grâce aux acyl-CoA synthases (ACS), qui sont spécifiques de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras considéré. Elles sont au nombre de 5 et, 3 d'entre elles sont exprimées dans le foie (ACS1, 4 et 5). Leur différente localisation cellulaire va permettre une orientation spécifique des acides gras vers des voies métaboliques distinctes : en effet, les ACS1 et 4, localisées dans le RE, vont diriger les acides gras vers un processus d'estérification alors que l'ACS5 va acheminer les acides gras vers la voie de la β oxydation, puisque située au niveau de la membrane mitochondriale externe (33, 34).

L'oxydation mitochondriale des acides gras sous forme d'acyl-CoA va alors globalement consister en un raccourcissement progressif de la chaîne d'acyl-CoA jusqu'à l'obtention d'acétyl-CoA. Grâce au CPT1-A, un isoforme spécifique retrouvé dans le foie, l'entrée d'acyl-CoA à chaînes longues au sein de la mitochondrie va pouvoir s'effectuer (**Figure 6**). Cette transférase, localisée dans la membrane mitochondriale externe, permet la catalyse d'acyl-CoA en acylcarnitine et permet alors leur transport au travers de la membrane mitochondriale. L'activité de la CPT1-A fait par ailleurs figure d'étape clef dans la régulation du processus d'oxydation des acides gras. En effet, son activité peut notamment être inhibée par la synthèse de malonyl-CoA, lui-même synthétisé par l'ACC lors de la lipogenèse (35). De plus, son expression se trouve également être régulée par l'état nutritionnel avec une augmentation de l'expression du gène codant pour la CPT1-A au cours du jeûne et une inhibition en période postprandiale. La carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2), située quant à

elle sur la face interne de la membrane mitochondriale, va permettre l'hydrolyse de l'acylcarnitine en acyl-CoA (**Figure 6**) (36). L'oxydation de ces molécules d'acyl-CoA va alors consister en une spirale visant à systématiquement réduire de 2 atomes de carbone l'acyl-CoA, pour générer de l'acétyl-CoA à chaque tour. La première étape sera catalysée par une des 4 acyl-CoA déshydrogénases selon la longueur de la chaîne de l'acyl-CoA. Les deuxième, troisième et quatrième étape seront réalisées par la Protéine Trifonctionnelle Mitochondriale exerçant 3 activités enzymatiques distinctes à savoir une activité hydratase, déshydrogénase et thiolase (37). L'acétyl-CoA alors produit pourra alors entrer dans le TCA et générer de l'énergie par phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou encore servir de substrat pour la production des corps cétoniques.

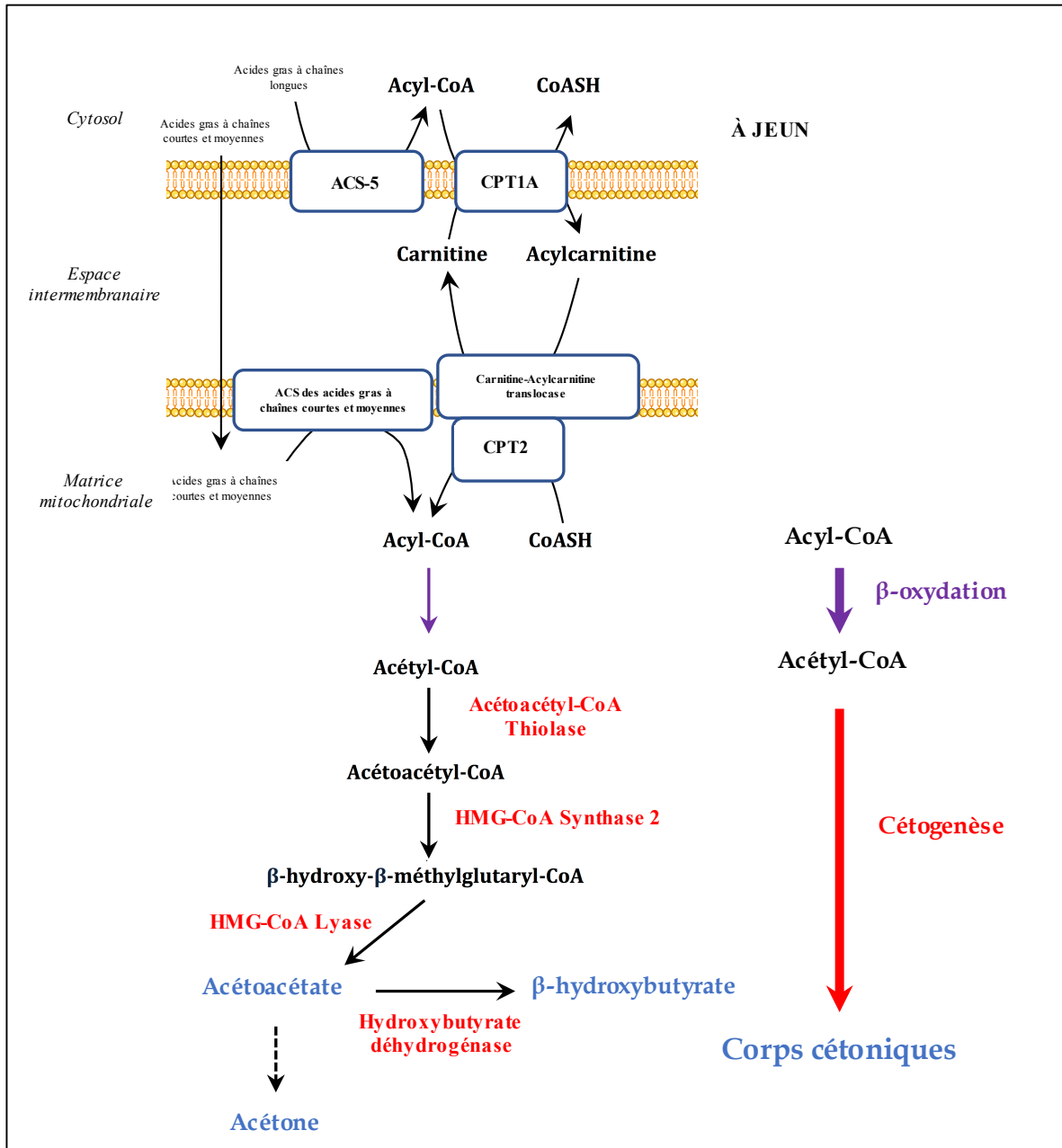


Figure 6. Représentation simplifiée montrant les différentes étapes de la voie d'oxydation des acides gras et de la production des corps cétoniques. Adaptée à partir de JD McGarry et al. 1980 (38).

1.4.3.1.4 Cétogenèse

La cétogenèse, qui a lieu dans la matrice mitochondriale, est réalisée grâce à 4 enzymes: l'acétoacétyl-CoA thiolase, l'HMG-CoA synthase 2, l'HMG-CoA lyase et enfin l'hydroxybutyrate déshydrogénase (**Figure 6**). Ces corps cétoniques seront par la suite transportés à travers l'organisme par le sang et absorbés par les cellules cibles, qui vont alors les reconvertir en molécules d'acétyl-CoA. Ces dernières pourront ainsi être de nouveau oxydées par le TCA pour libérer leur énergie sous la forme d'ATP par la chaîne respiratoire, ou être utilisées par les cellules du cerveau pour synthétiser des acides gras à longue chaîne, ces derniers ne pouvant franchir la barrière hémato-encéphalique. Par ailleurs, l'HMG-CoA synthase 2, enzyme limitante de la cétogenèse, se trouve être régulée positivement par le jeûne et négativement en période postprandiale par l'insuline (39).

1.4.3.1.5 Synthèse et sécrétion des VLDL

En période de jeûne, les VLDL sont synthétisés et libérés par le foie dans la circulation pour fournir des TG et des esters de cholestérol aux tissus périphériques. Parmi les molécules constituant les lipoprotéines, on trouve notamment l'apoB100 spécifique des VLDL, mais également d'autres telles que les apolipoprotéines C3 et E. L'assemblage des VLDL dans le RE va d'abord consister à la "lipidation" de l'apoB100 par une petite quantité de TG pour donner naissance à un petit précurseur très dense du VLDL, le pré-VLDL. Ce dernier va par la suite fusionner avec des vésicules lipidiques riches en TG pour finalement former des VLDL matures, prêts à être sécrétés dans la circulation. Les mécanismes permettant la régulation de cette production sont complexes: même si ces lipoprotéines sont sécrétées de façon continue par le foie, l'insuline semble avoir la capacité d'influencer leur taille et leur quantité, mais également d'inhiber leur sécrétion (40).

1.4.3.2 État postprandial

1.4.3.2.1 Glycolyse hépatique

La glycolyse est une voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie qui a lieu dans le cytosol hépatocytaire. 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'ATP (**Figure 7**). Le pyruvate généré sera par la suite transporté vers la mitochondrie en étant décarboxylé grâce au complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA ainsi généré pourra alors être utilisé par le TCA (**Figure 7**). Par ailleurs, l'excès d'acétyl-CoA pourra également s'engager dans la voie de synthèse des acides gras pour *in fine* être estérifié en TG et être exporté vers le tissu adipeux pour la mise en réserve de cette forme d'énergie.

- la première étape de la glycolyse est irréversible et consiste en la phosphorylation du glucose en G6P par la glucokinase (GK) (**Figure 7**). Avec une constante de Michaelis (Km) élevée et une activité n'étant pas saturée par les concentrations physiologiques en glucose, la GK sera ainsi capable de rapidement répondre aux fluctuations intracellulaires de concentrations en glucose. Dans le foie, le transport du glucose à travers la membrane des hépatocytes se fait par diffusion facilitée grâce à GLUT-2 (Glucose Transporter 2). Ce dernier possède une faible affinité pour le glucose mais un Km plus élevé que celui de la GK : la capacité de transport du glucose au sein de l'hépatocyte sera alors supérieure à la capacité de phosphorylation du glucose par la GK et ne sera donc pas une étape limitante. Nous verrons dans la dernière partie de cette introduction que les cellules tumorales ont mis en place un tout autre dispositif leur permettant de capter le plus efficacement possible le glucose environnant grâce à la reprogrammation métabolique : ceci s'effectue grâce à une augmentation d'expression de l'hexokinase 2 (HK2) et de GLUT-1 (Glucose Transporter 1).

- la deuxième étape irréversible de la glycolyse est la transformation du F6P en F1,6 biP catalysée par la phosphofructokinase (PFK) (**Figure 7**).
- la dernière étape importante de la glycolyse est la transformation du PEP en pyruvate grâce à la pyruvate kinase (PK) (**Figure 7**) (41).

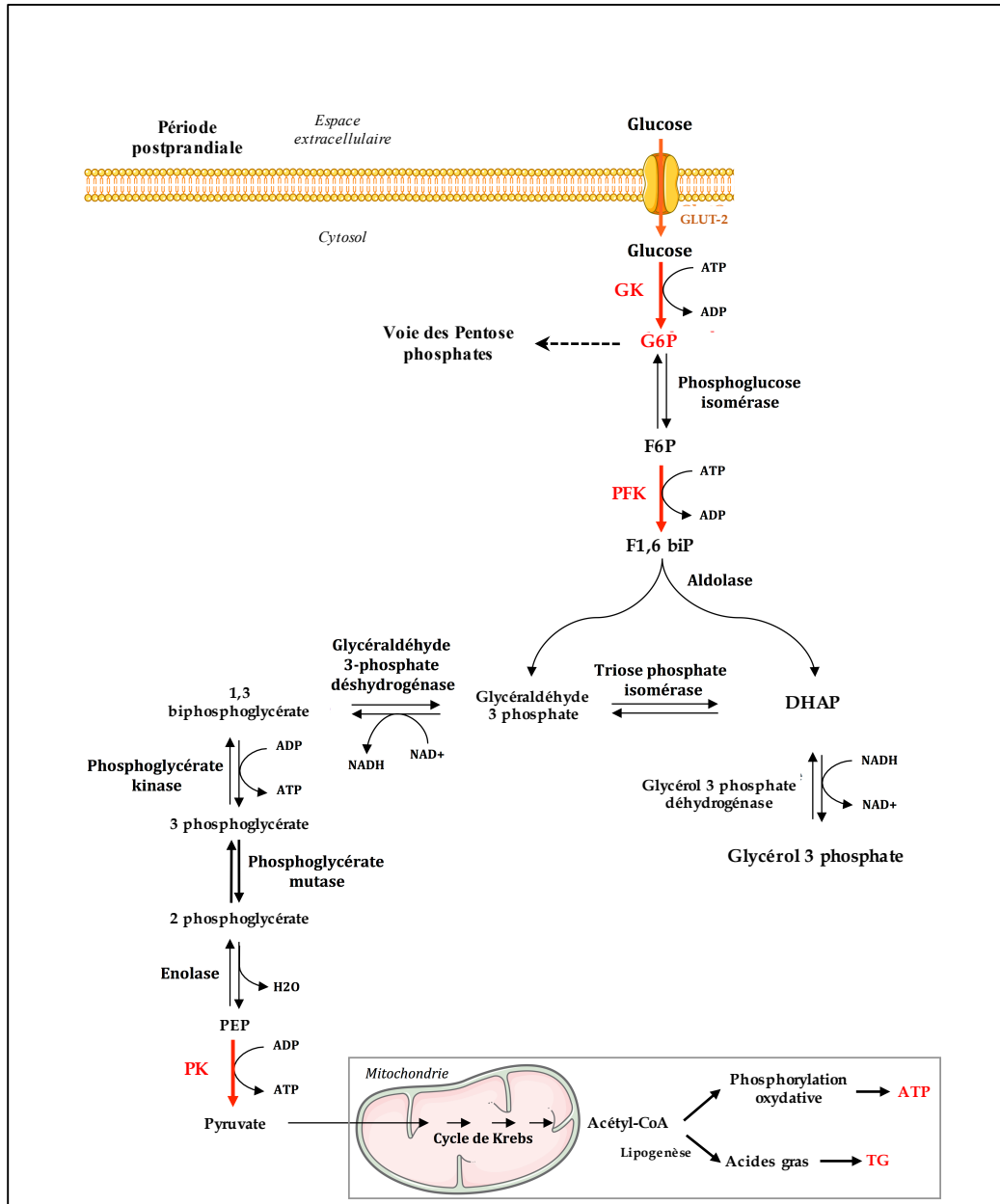


Figure 7. Représentation schématique des différentes étapes de la voie de la glycolyse. Adaptée à partir du Précis de biochimie de Harper, Murray et al. 1993.

Comme nous venons de le voir, la régulation enzymatique des 3 étapes de glycolyse, qui sont irréversibles, va alors permettre de finement réguler le flux glycolyse hépatique. Chacun des trois enzymes verra son activité être induite en période postprandiale et inhibée en période de jeûne :

- une régulation post-traductionnelle de la GK par la GK Regulatory Protein (GKRP) aura lieu au sein des hépatocytes de telle sorte qu'en présence de faibles concentrations de glucose, notamment en période de jeûne, la GKRP va séquestrer la GK dans le noyau et ainsi empêcher son action (42, 43). 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 pouvant alors exercer son activité enzymatique de phosphorylation dans le cytosol. D'un point de vue transcriptionnel, la GK verra son expression être régulée par les hormones pancréatiques : le glucagon va ainsi inhiber son expression en période de jeûne via l'Adénosine monophosphate (AMP) cyclique (AMPC) alors que l'insuline activera son expression grâce au facteur de transcription sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) (44, 45).
- la formation du F1,6 biP constitue également une étape limitante de la glycolyse et engage de façon irréversible la catalyse du glucose dans la voie glycolytique puisque, rappelons-le, la transformation du glucose en G6P est commune à la glycogénogenèse et la voie des pentose phosphates. L'activité de la PFK nécessite une régulation fine et précise de façon à éviter que la glycogénogenèse et la glycolyse ne se produisent simultanément. En effet, la F1,6 biPase demeure faiblement active pendant la glycolyse et inversement la PFK pendant la glycogénogenèse, ce qui donne lieu à de très faibles interconversions cycliques entre le F6P et le F1,6 biP. Parmi les activateurs allostériques de la PFK, il y a notamment l'AMP mais aussi et surtout le fructose 2,6 biphosphate (F2,6 biP) qui en se liant à l'enzyme PFK sous l'action du glucose et de l'insuline, va accroître l'affinité de cette dernière pour le F6P. De cette façon, le rendement glycolytique pourra alors être augmenté (46, 47). Parmi les inhibiteurs allostériques, il y a l'ATP lorsque présent à des niveaux élevés mais également le glucagon qui possède un effet inhibiteur indirect en activant la PKA. Cette dernière va

ainsi pouvoir inhiber l'enzyme permettant la production du F2,6 biP, ce qui aura pour effet de tout bonnement ralentir la glycolyse en période de jeûne (48).

- enfin, l'activité de la PK sera également activée de façon allostérique par le F1,6 biP. Une régulation hormono-dépendante de la PK peut également être observée par le glucagon qui a la capacité d'inhiber son activité par phosphorylation grâce à la PKA. L'insuline peut, quant à elle, stimuler l'activation de la PK en induisant sa déphosphorylation (41, 46, 49). Par ailleurs, on note aussi une régulation transcriptionnelle négative de la PK par le glucagon à l'état de jeûne et une régulation positive par l'insuline en période postprandiale (50-53).

1.4.3.2.2 *Glycogénogenèse hépatique*

La mise en réserve du glucose sous la forme de glycogène est assurée par la voie de glycogénogenèse, qui a lieu dans le cytosol des hépatocytes par l'action de 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 alors transformé en UDP-glucose (uridine diphosphate-glucose) par l'UDP-glucose phosphorylase. Les UDP-glucoses vont ensuite se lier les uns aux autres grâce à la GS pour finalement former les différents polymères de glucose, caractéristique du glycogène (54).

Cette voie métabolique sera essentiellement contrôlée par les concentrations sanguines de glucose mais aussi par les hormones telles que l'insuline et le glucagon. Ainsi, l'insuline aura pour effet d'activer la GS en empêchant son inactivation par inhibition de phosphorylation et en augmentant les quantités de G6P, son activateur allostérique. À l'inverse, le glucagon va, d'une part, inhiber la GS la phosphorylant par la PKA et, d'autre part, favoriser la dégradation du G6P par la G6Pase (55, 56).

1.4.3.2.3 Voie des pentoses phosphates

Mise en évidence en 1959 et aussi appelée voie Warburg-Dickens-Horecker, la voie des pentoses phosphates permet la production de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) utilisé lors de la biosynthèse des acides gras, du cholestérol mais aussi et surtout pour la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en deux molécules de glutathions réduits (GSH). Cette voie permet aussi la production de ribose 5 phosphate utilisé dans la synthèse des nucléotides et d'érythrose 4 phosphate qui est un précurseur majeur des acides aminés aromatiques. Le favisme, une maladie héréditaire interrompant cette voie métabolique, est causé par un déficit en G6P déhydrogénase qui est l'enzyme permettant la transformation du G6P en 6 phosphogluconolactone.

1.4.3.2.4 Biosynthèse des acides gras

La synthèse *de novo* des acides gras à partir du glucose permet, comme nous l'avons évoqué précédemment, de mettre en réserve l'excès d'énergie provenant du glucose sanguin sous forme de lipides. Cette voie anabolique a lieu dans le cytosol; l'acétyl-CoA tient le rôle de précurseur principal de cette voie en représentant la source de tous les atomes de carbone des acides gras (57). L'acétyl-CoA est synthétisé dans la mitochondrie par le complexe PDH en décarboxylant le pyruvate provenant de la glycolyse. L'acétyl-CoA est ensuite converti en citrate pour sortir de la mitochondrie grâce à une translocase (**Figure 8**). Dans le cytosol, le citrate sera de nouveau converti en acétyl-CoA par l'ACLY. Enfin, l'acétyl-CoA peut alors être transformé en palmitate grâce à deux enzymes clés de cette voie de synthèse que sont l'ACC et le FASN (**Figure 8**).

1.4.3.2.4.1 *Les mécanismes de régulation*

L'ACC catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA et se trouve être l'enzyme limitante de la lipogenèse (**Figure 7**). Pour éviter toute interconversion métabolique entre la synthèse des acides gras et l'oxydation de ces derniers, une régulation fine et précise va se mettre en place. Ainsi, l'inhibition de la CPT1 par le malonyl-CoA nouvellement synthétisé, va empêcher que l'oxydation mitochondriale des acides gras puisse avoir lieu en même temps que leur synthèse. D'un point de vue hormonal, l'insuline et le glucose vont induire l'expression de l'ACC en période postprandiale alors qu'en période de jeûne le glucagon va inhiber son expression (58-60). À court terme, l'activité de l'ACC sera également régulée par des effecteurs allostériques et par phosphorylation : l'acyl-CoA, qui est le produit terminal de cette voie de synthèse, est un inhibiteur allostérique de l'ACC alors que le citrate, quant à lui, en est un activateur (61). Par ailleurs, le citrate, caractérisé comme élément précurseur de la synthèse des acides gras, va stimuler la dimérisation de l'ACC pour la protéger de la phosphorylation inhibitrice induite par l'AMPK (62). En effet, en période de jeûne, l'augmentation du ratio AMP/ATP aura pour effet d'activer l'AMPK qui va à son tour pouvoir phosphoryler l'ACC et la rendre inactive (63). De plus l'expression transcriptionnelle de l'ACC sera aussi réprimée par l'action du glucagon (64). À l'inverse, en période postprandiale, l'insuline aura pour effet d'induire une phosphatase permettant la déphosphorylation de l'ACC ce qui va alors la rendre active (65).

La synthèse du palmitate, acide gras saturé à 16 atomes de carbones, est réalisée par le biais de la FASN par des condensations de Claisen successives d'unités malonyl-CoA sur de l'acétyl-CoA, jusqu'à obtention finale de l'acide palmitique à la suite de 7 cycles de réaction. Cette synthèse est dépendante de la présence d'un agent réducteur, le NADPH, qui provient de la voie des pentoses phosphates comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente. La régulation de la FASN va principalement être réalisée au niveau transcriptionnel par les hormones telles que l'insuline qui va augmenter son expression par l'activation des facteurs de

transcription ChREBP et SREBP-1c, ou le glucagon qui, par un mécanisme AMPc-dépendant, va inhiber son expression (66, 67).

1.4.3.2.4.2 *Élongation, désaturation et estérification des acides gras*

Les acides gras, qu'ils aient une origine endogène par le processus de biosynthèse que nous venons de décrire ou exogène, c'est à dire provenant de l'alimentation, vont ensuite passer par les étapes d'élongation et de désaturation. L'étape d'élongation permet l'obtention d'acides gras à longues ou très longues chaînes alors que la désaturation consiste en l'ajout d'insaturations dans leurs chaînes. Plusieurs enzymes vont intervenir dans ces deux processus afin d'obtenir des acides de longueurs et de natures totalement différentes.

La phase d'élongation se situe au niveau de la face cytoplasmique du RE et consiste en l'allongement de la chaîne carbonée de deux atomes de carbones pour chacune des réactions grâce aux protéines elongase very long chain (ELOVL) (**Figure 8**). Parmi les 7 isoformes connues de ces protéines, avec pour chacune d'entre elles une spécificité d'action bien particulière, seules les isoformes 1, 2, 3, 5 et 6 sont retrouvées dans le foie. L'isoforme majoritaire sera l'ELOVL5. De façon similaire à l'ACC et aux FASN, l'insuline va également augmenter leur activité en période postprandiale, notamment pour les ELOVL5 et 6 (68-70).

L'étape de désaturation des acides gras a également lieu au niveau du RE. L'enzyme responsable de cette modification, au niveau foie, est la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1), catalysant la biosynthèse des acides gras mono-insaturés à partir du palmitate et du stéarate (71). Une autre famille de désaturases va quant à elle intervenir dans le métabolisme des acides gras insaturés: les fatty acid desaturases (FADS). Celles-ci vont alors introduire une double liaison au niveau des acides gras dits essentiels ω 3 et ω 6 (72). L'insuline et le glucagon vont encore ici avoir des effets antagonistes au niveau de la régulation de l'expression transcriptionnelle de la SCD1 (73).

L'étape d'estérification va alors s'effectuer une fois que les acides gras ont été activés en acyl-CoA, allongés puis désaturés (**Figure 8**). Les acides gras vont alors être estérifiés en glycérolipides par liaison à une molécule de glycérol grâce à une liaison ester. Le glycérol, qui possède 3 groupements hydroxyles, peut en effet être estérifié par 1, 2 ou 3 acides gras au

niveau de leurs groupements carboxyles et ainsi former des monoglycérides, des diglycérides ou des TG (**Figure 8**). Par ailleurs, le glycérol peut dans certaines situations n'être estérifié que par 2 acides gras et réserver son troisième carbone à un groupe phosphaté donnant alors un composé phospholipidique, essentiel aux membranes biologiques.

La synthèse des TG va principalement reposer sur 4 étapes successives (**Figure 8**) :

- premièrement, l'estérification d'un acyl-CoA sur le premier carbone du glycérol 3 phosphate sera catalysée par la glycérol 3 phosphate acyltransférase (GPAT).
- ensuite, l'ajout d'un acyl-CoA sur le carbone 2 sera réalisée par l'acylglycérol phosphate acyltransférase (AGPAT), formant alors un acide phosphatidique.
- par la suite, les lipines vont catalyser la déphosphorylation de cet acide phosphatidique en diacylglycéride (DAG) grâce à leur activité hydrolase.
- 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 (74, 75).

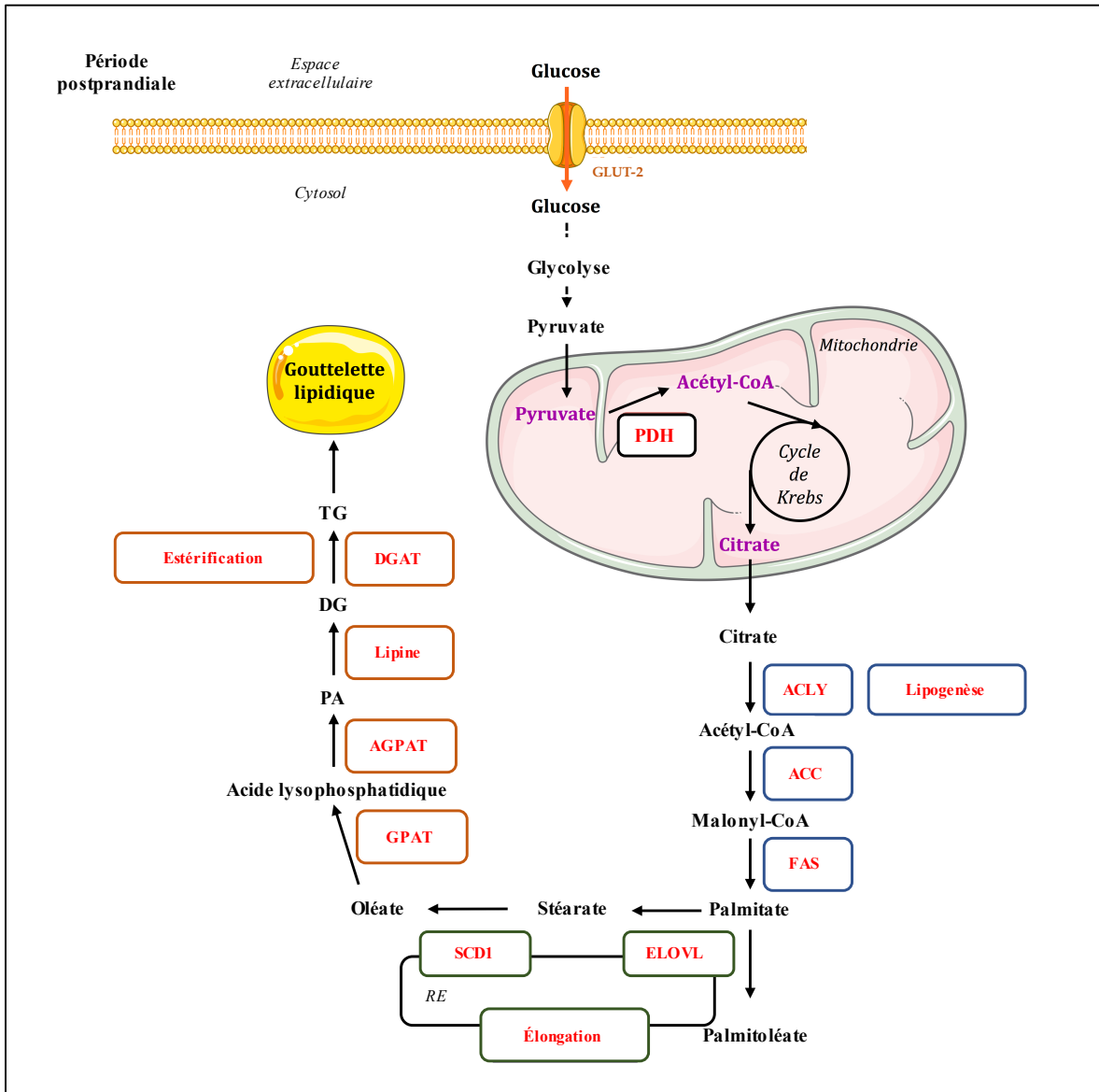


Figure 8. Représentation de la voie de synthèse, d'élongation et d'estérification des acides gras. Adaptée à partir du Précis de biochimie de Harper, Murray et al. 1993.

Comme nous venons de le voir, le foie occupe donc un rôle primordial dans l'homéostasie de l'organisme, tant par ses capacités de détoxification que par ses capacités métaboliques. Nous allons à présent nous intéresser à un autre aspect fonctionnel caractéristique du foie qu'est son étonnante capacité à pouvoir se régénérer.

1.5 Régénération hépatique

La connaissance de la capacité du foie à pouvoir se régénérer remonte à l'Antiquité. En effet, pour avoir dérobé le feu et l'avoir transmis à l'humanité, le titan Prométhée fut puni par Zeus en étant enchaîné par Héphaïstos au Mont Caucase où un vautour venait tous les jours lui dévorer le foie, avant de repartir rassasié à la tombée de la nuit (**Figure 9**). Selon le mythe, le foie se régénérait alors en une nuit seulement, renouvelant ainsi de jour en jour le supplice infligé par Zeus à Prométhée jusqu'à ce qu'Hercules, fils de Zeus, le délivre de nombreuses années plus tard.

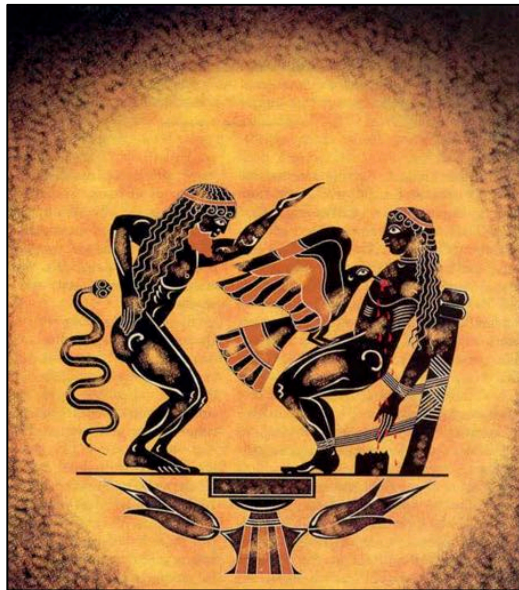


Figure 9. Vase antique représentant l'illustration du mythe de Prométhée.
Provenant du Gregorian Etruscan Museum.

Le foie démontre effectivement une capacité surprenante de régénération, que ce soit en condition d'hépatectomie partielle ou suite à une hépatite fulminante provoquant une destruction massive du parenchyme hépatique. En effet, la résection de 70% du foie chez un rat entraîne sa complète régénération en seulement 5 à 7 jours (76). Par notion de régénération, on entend alors la possibilité de pouvoir restaurer la masse tissulaire mais aussi la fonction du foie. Il est important de noter qu'il ne s'agit pas en soi d'une régénération au sens propre du

terme, comme nous pouvons notamment l'observer chez certains vers ou insectes, avec par exemple la patte de la salamandre. Dans le cas du foie, il s'agit plutôt d'une hypertrophie compensatrice des parties résiduelles du foie par hyperplasie cellulaire (77, 78).

En accord avec cette notion d'hyperplasie, des études ont par ailleurs démontré que les mécanismes mis en place pendant la régénération tissulaire du foie étaient différents de ceux retrouvés lors du développement embryonnaire. En effet, les facteurs de transcription exprimés lors de la phase de régénération hépatique ne correspondent pas à ceux retrouvés lors de la phase du développement embryonnaire du foie et seraient en réalité plutôt associés au phénomène de prolifération cellulaire (79). Cette observation se joint également à l'une des hypothèses avancées lors de la pathogenèse de l'hépatite C, qui postule que la régénération constante du parenchyme hépatique et l'importante prolifération hépatocytaire seraient à l'origine d'un raccourcissement prématuré des télomères. Ceci résulterait alors en une sénescence et perte de fonction des hépatocytes, mais aussi en une réponse fibrotique exagérée. Tout ceci mènerait donc à un risque accru d'hépatocarcinome (80). D'autres études ont également révélé que pendant ce phénomène de régénération du foie, les hépatocytes et les cellules non-parenchymateuses avaient la capacité de pouvoir sécréter une cytokine : le transforming growth factor- β (TGF- β). En effet, il a été démontré que le TGF- β jouait un rôle clef dans la régulation autocrine de la prolifération hépatocytaire lors du phénomène de régénération tissulaire (81, 82). Or, le TGF- β tient aussi une fonction importante dans l'activation des cellules stellaires (ou cellules de Ito) en myofibroblastes avec sécrétion de composantes de la matrice extracellulaire (MEC) telles que la fibronectine et le collagène. Ainsi, le TGF- β pourrait également tenir un rôle important dans la fibrose hépatique (83, 84). De plus, ce dernier aurait aussi des effets inhibiteurs sur les enzymes capables de dégrader la MEC telles que les élastases, les collagénases et les métalloprotéinases (85). La régénération continue du foie observée lors d'injures hépatiques, mais également lors du phénomène de fibrose et cirrhose, pourrait résulter en des niveaux élevés de TGF- β . À terme, cela pourrait grandement accentuer l'initiation ou l'aggravation de la fibrose, favorisant ainsi le développement d'un hépatocarcinome (86, 87).

Dans cette première partie d'introduction, nous avons ainsi pu réviser les grandes propriétés détenues par le foie en conditions physiologiques normales et constater que toutes ces fonctions étaient régies par un fin équilibre. Nous allons à présent dans cette deuxième partie d'introduction nous intéresser au foie dans un contexte pathologique précis: le carcinome hépatocellulaire.

2. Le carcinome hépatocellulaire

2.1 Épidémiologie et étiologie

Le cancer du foie est le 5^{ème} type de cancer le plus fréquent et représente la 3^{ème} cause de décès par cancer dans le monde (88). Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente entre 85 % et 90% des cancers primitifs du foie et présente par ailleurs plusieurs caractéristiques épidémiologiques intéressantes comme des différences de distribution entre certaines régions géographiques, les groupes ethniques, mais aussi selon le sexe et la présence de plusieurs facteurs de risque liés à l'environnement (89).

La survenue du CHC n'est pas uniformément répartie selon certaines régions du globe. En effet, la majorité des cas sont observés en Afrique sous-saharienne et en Asie de l'est (**Figure 10**). La Chine représente à elle seule plus de 50% des cas de CHC dans le monde avec des taux d'incidence remarquablement élevés: 35.2/100 000 pour les hommes et 13.3/100 000 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 (**Figure 10**).

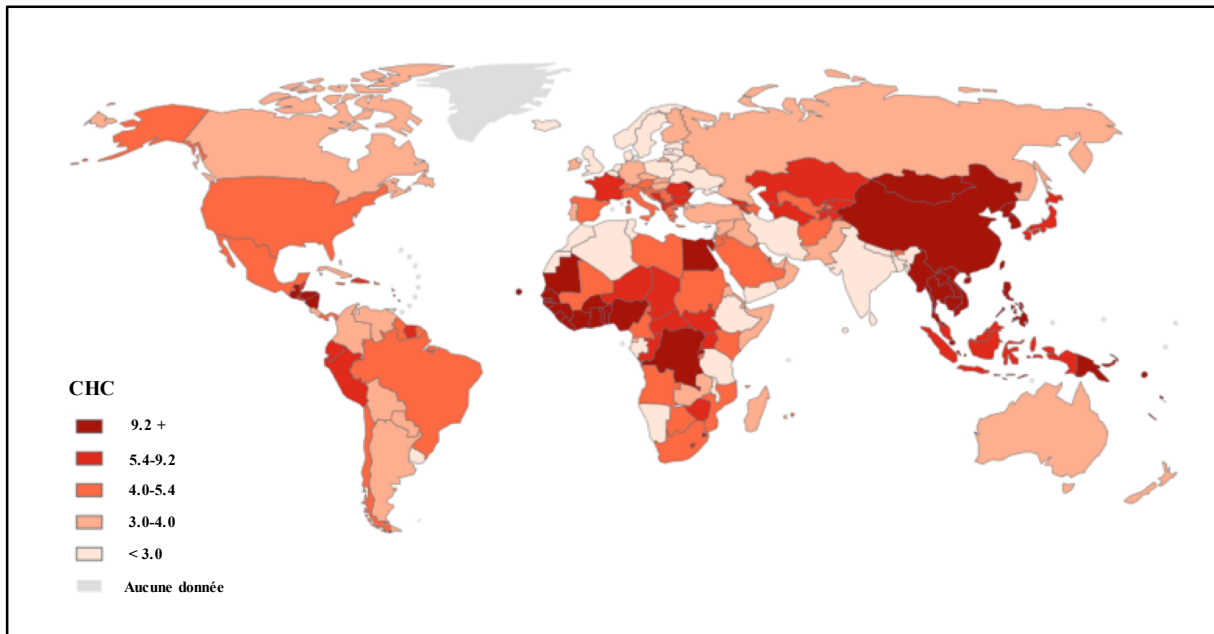


Figure 10. Taux de mortalité lié au CHC dans le monde. Les fréquences sont indiquées chez les deux sexes pour 100 000 personnes. *Tirée de GLOBOCAN 2012.*

Une variation considérable du taux d'incidence du CHC est également observée entre les différentes populations vivant dans une même région (**Figure 10**). En Asie par exemple, les taux d'incidence du CHC observés chez les hommes vivant en Inde et en Chine diffèrent grandement, allant de 7.8/100 000 chez les indiens à 21.2/100 000 chez les chinois. Cette observation est également applicable à la population féminine avec des taux d'incidence allant de 1.8/100 000 chez les femmes indiennes à 5.1/100 000 chez les femmes chinoises (89). Un autre exemple qui illustre parfaitement cette notion d'hétérogénéité se trouve aux États-Unis, où le nombre de nouveaux cas de personnes atteintes du CHC sera deux fois plus élevé chez les asiatiques par rapport à la population afro-américaine (90).

Une différence est aussi notée selon le sexe de l'individu car en effet, le cancer du foie est le 5^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme et le 9^{ème} chez la femme. Les raisons pouvant expliquer une telle différence résident probablement dans le mode de vie ou encore l'exposition à différents facteurs de risque, qui diffèrent selon le sexe. Les facteurs endogènes pourraient aussi être à l'origine de cette disparité comme par exemple les facteurs hormonaux.

En effet, il a été démontré lors d'études épidémiologiques, que l'utilisation de contraceptifs oraux sur le long terme et de stéroïdes anabolisants, pourrait avoir un rôle considérable dans l'induction et le développement de tumeurs du foie. Ainsi, cela pourrait être à l'origine de cette différence observée entre les hommes et les femmes (91). Cependant, aucune étude n'a jusqu'à présent pu directement démontrer un quelconque avantage de survie des patients traités aux anti-androgènes, suggérant ainsi que le CHC ne soit pas une tumeur hormono-sensible (92).

2.2 Facteurs de risque

Les causes d'hépatocarcinome sont multiples et comprennent notamment:

- le virus de l'hépatite B avec insertion de son ADN viral dans le génome des hépatocytes pouvant non seulement provoquer une instabilité génomique mais également altérer l'expression de certains gènes par mutagenèse insertionnelle (93). Par ailleurs, une activation transcriptionnelle de gènes en lien aux mécanismes de prolifération cellulaire va également avoir lieu grâce à la protéine trans-activatrice HBx (protéine X du virus de l'hépatite B) (94).
- le virus de l'hépatite C, un hépacivirus dont l'ARN ne s'intègre pas dans le génome mais qui à l'aide de sa protéine structurale "core" va induire la transformation maligne des hépatocytes par action sur les mécanismes de différenciation et prolifération cellulaire (95). Dans plus de 90% des cas de patients infectés par le virus de l'hépatite C, une évolution vers une hépatite chronique aura lieu. 10 à 30% d'entre eux évolueront au final vers un état cirrhotique 25 à 30 ans après l'infection, ce qui aura pour effet d'augmenter considérablement le risque d'hépatocarcinome (96, 97).
- l'alcool qui, consommé de façon importante, peut causer une cirrhose (98, 99). De plus, le métabolisme hépatique de l'éthanol va se traduire par la formation de molécules toxiques pour l'organisme et le tissu hépatique, mais également très réactives comme la formation d'acétaldéhyde et de radicaux libres. Ces composés vont alors avoir de grandes répercussions sur l'hépatocyte en modifiant par exemple l'équilibre des ROS

(espèces réactives de l'oxygène) ou augmenter le rapport NADH/NAD ce qui, à terme, va perturber de façon importante le métabolisme hépatocytaire. Des altérations du métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des protéines vont alors être observées (100).

- les maladies métaboliques, qui comme l'obésité et le diabète vont entraîner une production accrue de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, aboutissant *in fine* à une accumulation toxique des acides gras au sein des hépatocytes (101). On parle alors de stéatose hépatique ou de non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), qui peut par la suite évoluer vers une non-alcoholic steatohepatitis (NASH) et finalement aboutir à une cirrhose et au développement d'un CHC.
- l'aflatoxine B1, mycotoxine produite par des champignons, qui, lorsqu'elle est ingérée lors de contaminations de diverses graines de céréales stockées dans de mauvaises conditions, va être assimilée par le foie. Un métabolite secondaire toxique sera alors formé et sera à l'origine de lésions d'ADN génomique (102, 103).

2.3 Hépatocarcinogénèse

2.3.1 Origines

La carcinogénèse hépatique est un processus complexe, qui dans 80% des cas, va se développer sur un foie lésé depuis de nombreuses années avec, comme nous venons de le voir, des facteurs étiologiques divers et variés (89). Ce phénomène de genèse tumorale va donc être la résultante de plusieurs facteurs dont l'implication provoquera *in fine* la survenue du CHC. En effet, l'accumulation progressive d'éléments dommageables tels des altérations génétiques ou épigénétiques peut, sur le long terme, conduire à la dérégulation de voies de signalisation capitales au fonctionnement de la cellule et alors aboutir au développement d'un cancer du foie. Les phénomènes d'amplification et de délétion chromosomique ont été fréquemment décrits, alors que les modifications épigénétiques ont quant à elles souvent été associées à

l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs ou la réactivation de certains oncogènes/voies de signalisation cellulaires (104-106). Les principales mutations décrites sont localisées sur le gène p53 dans 25 à 40% des cas et celui codant pour la β -caténine (107). Enfin, l'implication des miARNs dans le phénotype tumoral des cellules d'hépatocarcinome a montré que ces derniers pouvaient en effet avoir un impact sur leur tumorigénicité, en modulant notamment l'expression de certains oncogènes et certains gènes suppresseurs de tumeurs (108).

2.3.2 Altérations chromosomiques

Durant le processus d'hépatocarcinogénèse, les hépatocytes tumoraux vont accumuler un grand nombre de réarrangements chromosomiques, ce qui à terme conduira 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 fait état de l'identification de bras chromosomiques les plus fréquemment perdus dans les cas d'hépatocarcinome, à savoir les chromosomes: 17p, 8p, 16q, 16p, 4q, 9p, 13q, 1p et 6q. 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 d'infection par le virus de l'hépatite B négatif; 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 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 (109). Par ailleurs, l'analyse de 125 tumeurs humaines issues d'hépatocarcinome a également pu mettre en évidence l'identification de 135 délétions homozygotes et de 994 mutations somatiques, avec pour impact une profonde modification de la signalisation cellulaire (107).

2.3.3 Modifications épigénétiques

L'état de la chromatine est la forme sous laquelle l'information génétique de l'ADN est organisée dans une cellule et va ainsi selon son état, fortement influencer les capacités d'activer ou d'éteindre l'expression de certains gènes. Par définition, l'épigénétique correspond à tous les changements héréditaires entre cellules influençant l'expression des gènes, indépendamment des modifications se trouvant dans la séquence même d'ADN. Ces mécanismes comprennent principalement la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'expression des petits miARNs, qui sont essentiels dans le maintien de l'expression des gènes, le développement normal, mais aussi dans la survenue d'états pathologiques comme le cancer (110, 111).

De nombreuses études s'étant intéressées au rôle des événements épigénétiques dans la cirrhose et la progression du CHC ont permis d'identifier un grand nombre de gènes et de voies de signalisation soumis à ces phénomènes de régulation, comme par exemple :

- la méthylation de l'ADN entraînant l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs tels que P53, P16 ou encore P21 lors de l'infection par le virus de l'hépatite B (112).
- la modification des histones avec une augmentation de la désacétylation, perturbant alors le métabolisme hépatique lors de l'infection par le virus de l'hépatite C (112).
- la production de miARNs modulant ainsi l'expression de gènes jouant un rôle clef dans la mort cellulaire ou encore les mécanismes de réparation de l'ADN lors de l'infection par les virus de l'hépatite B et C, mais également en présence d'une exposition à l'aflatoxine B1 (112).
- l'hypométhylation des îlots CpG (dinucléotides C-G sur le même brin) de régions promotrices de gènes impliqués non seulement dans la transition épithélio-

mésenchymateuse (TEM), l'hypoxie tumorale, mais également dans le phénomène de glycolyse aérobie ou d'*effet Warburg* (106).

2.3.4 Voies de signalisation cellulaires

2.3.4.1 P53

Le gène suppresseur de tumeur p53 est le plus fréquemment muté dans les cas de 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 (113, 114). 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 effet, normalement activée en réponse à différents agents génotoxiques causant des dommages à l'ADN ou en réponse à l'expression anormale de certains oncogènes, la mutation de p53 pourra s'avérer grandement profitable aux cellules cancéreuses et notamment celles issues de CHC. Ces dernières pourront ainsi échapper aux mécanismes de contrôles cellulaires. 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 (115-117).

2.3.4.2 Wnt/ β -caténine

Les protéines appartenant à cette famille sont des ligands sécrétés dans le milieu extracellulaire qui vont par la suite se fixer à différents récepteurs présents à la surface membranaire. La reconnaissance du ligand par son récepteur va alors activer cette voie par le biais de la β -caténine. La β -caténine est un facteur de transcription qui en l'absence de liaison de Wnt (Wingless-related integration site) au récepteur Frizzled et à la protéine LRP (LDL-

Related Protein) et donc d'activation, va être phosphorylée et sera ensuite adressée au protéasome pour finalement être dégradée. Ainsi, lors de la liaison à son récepteur, la β -caténine se dissocie du complexe de dégradation car n'étant plus phosphorylée. Elle pourra alors être exportée vers le noyau et ainsi jouer son rôle de facteur de transcription. Elle va alors induire la transcription de gènes cibles impliqués dans la différenciation, la prolifération, la migration mais également l'adhésion cellulaire. Cette voie sera par ailleurs constitutivement activée dans près d'un tiers des CHC à cause de mutations activatrices avec abolition de phosphorylation, ou encore de mutations entraînant la surexpression de Wnt (107, 118). De plus, la glypican-3, un corécepteur de Wnt surexprimé dans la majorité des CHC, va également stimuler la croissance tumorale en facilitant l'interaction de Wnt à ses récepteurs (119).

2.3.4.3 mTOR

Appartenant à la famille PI3K (phosphoinositide 3-kinase), mTOR (mechanistic target of rapamycin) est une protéine kinase jouant un rôle crucial dans la régulation de la croissance et du métabolisme des cellules cancéreuses. mTOR est composé de deux complexes: mTORC1 et mTORC2. En présence de nutriments, mTORC1 sera activé et va notamment stimuler la production de protéines, d'acides gras ou encore d'énergie. Dans 40-50% des cas de CHC, une suractivation constitutive de la voie mTOR sera retrouvée et sera également associée à un état de dédifférenciation plus important des cellules tumorales, mais également à un plus mauvais pronostic (120, 121).

Bien que l'activation prononcée de cette voie semble vraisemblablement être principalement régulée par la fixation et l'activation du ligand à son récepteur, des altérations génétiques ont été retrouvées. En effet, des mutations activatrices de PIK3CA (phosphoinositide 3-kinase catalytic alpha polypeptide), de FGF19 (fibroblast growth factor 19) et des mutations inactivatrices de RPS6KA3 (ribosomal protein S6 kinase A3) ont été notées de façon récurrente dans des cas de CHC, conduisant alors à une activation constitutive de la voie mTOR (107, 122).

2.3.5 miARNs

Bien que récent, l'engouement pour l'étude des miARNs dans la tumorigénicité des cellules d'hépatocarcinome a révélé des choses très intéressantes, en ouvrant notamment de nouvelles pistes dans la compréhension globale de ce cancer si morphologiquement et fonctionnellement hétérogène. Cependant, en raison non seulement des différentes méthodologies utilisées, de l'hétérogénéité inter et intratumorale, mais également de la constante évolution des bases de données, les profils d'expression de miARNs obtenus entre des échantillons de foie sain et cancéreux sont peu comparables et diffèrent d'une étude à l'autre. Néanmoins, plusieurs études indépendantes ont démontré la dérégulation de certains miARNs candidats à différentes étapes de l'hépatocarcinogénèse, établissant ainsi une sorte de signature génétique associée à la tumorigénicité de ces cellules.

Comme évoqué précédemment, les miARNs associés à leurs gènes cibles vont dans le cas du CHC, former un réseau complexe qui peut contrôler la progression et la croissance tumorale. Par ailleurs, ce réseau miARNs-gènes cibles peut également participer à l'inhibition de l'apoptose dans les cellules tumorales et à l'apparition de métastases. Parmi les plus étudiés, nous avons:

- MiR-21, qui est le plus souvent surexprimé dans les cancers et particulièrement dans les tumeurs hépatiques à stades avancés. En réprimant l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), il contribue alors à la progression tumorale du CHC (123, 124). Son inhibition sera associée à une diminution de la capacité des cellules à proliférer, mais aussi à une diminution de la migration et de l'invasion tumorale (125).
- MiR-122, qui est un suppresseur de tumeur spécifique au foie en représentant 70% des miARNs exprimés dans les hépatocytes. Son expression sera cependant fortement réduite dans les cas de CHC. MiR-122 va jouer un rôle dans de multiples processus biologiques tels que le métabolisme lipidique, le développement tissulaire du foie ou

encore la différenciation hépatocytaire. Sa forte diminution d'expression dans un contexte tumoral aura de grandes répercussions pour la cellule puisqu'en effet, une diminution de MiR-122 semble corrélée avec l'apparition de métastases et la perte des principales fonctions hépatiques (126, 127). À l'inverse, sa surexpression semble significativement réduire la tumorigénicité des cellules tumorales, avec une diminution de l'angiogenèse et du potentiel métastatique (128).

2.3.6 Classification moléculaire

Une classification moléculaire, principalement basée sur les caractéristiques énumérées ci-dessus, a été effectuée sur un grand nombre d'échantillons de CHC par des analyses transcriptomiques et a notamment permis de proposer 6 groupes de tumeurs, en corrélant d'une part les altérations génétiques et d'autre part les données cliniques de chacune des tumeurs (129):

- ainsi, le groupe G1 concerne majoritairement des jeunes patients africains, avec une forte instabilité génomique, un faible nombre de copies du virus de l'hépatite B, une surexpression de l'alpha-fœtoprotéine (AFP), des mutations du gène AXIN1 et l'absence de mutation du gène p53.
- le groupe G2 considère les CHC ayant une forte instabilité génomique, un nombre élevé de copies du virus de l'hépatite B, des mutations du gène p53, mais également des mutations du gène PIK3CA, tout comme le groupe G1. Ainsi, les groupes G1 et G2 auront des niveaux de phosphorylation plus importants s'agissant des protéines appartenant à la famille AKT (protéine kinase B) et donc une suractivation de cette voie de signalisation cellulaire sera alors notée au sein de ces 2 groupes.
- le groupe G3 témoigne des tumeurs d'hépatocarcinome ayant une forte instabilité génomique, un nombre inexistant de copies du virus de l'hépatite B, un nombre important de mutations affectant le gène p53 et une hyperméthylation au niveau du promoteur du gène CDKN2A, ce dernier étant impliqué dans la régulation négative du

cycle cellulaire. Par ailleurs, une surexpression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, mais également de gènes codant pour des protéines impliquées dans le passage au travers les pores nucléaires a aussi été démontrée dans ce groupe.

- le groupe G4 constitue quant à lui un groupe hétérogène de tumeurs d'hépatocarcinome, avec une certaine stabilité génomique et avec pour rares mutations celles affectant le gène TCF1 (gène impliqué entre autres dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine).
- et enfin les groupes G5 et G6 qui relatent des CHC ayant une stabilité génomique et une suractivation importante de la voie de signalisation cellulaire Wnt. En effet, des mutations du gène CTNNB1 seront retrouvées dans 70% et 100% des tumeurs appartenant aux groupes G5 et G6 respectivement. Par ailleurs, une réduction quant à l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire a été notée dans le groupe G5. De même, une diminution d'expression du gène CDH1 (codant pour la cadhérine E) pourra également être observée en raison d'un plus haut niveau de méthylation de son promoteur, expliquant alors la présence du grand nombre de nodules satellites retrouvés autour de la tumeur principale.

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 AKT 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 de l'intime lien qui existe entre la voie de signalisation AKT et mTOR et du rôle de ce dernier dans l'oncométabolisme (130), ces tumeurs pourraient avoir une plus grande capacité à métaboliquement se reprogrammer et ainsi s'adapter aux conditions parfois stringentes du microenvironnement, tout en maintenant un haut potentiel tumorigénique. Ce trait phénotypique pourrait ainsi grandement influencer sur la survie des patients et c'est notamment ce qui a été observé puisqu'un meilleur pronostic clinique a été noté dans les groupes G4-G6, par comparaison aux patients provenant des groupes G1 et G2 (129).

2.4 Caractéristiques pathologiques

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 (131).

2.4.1 Physiopathologie

Lors d'injures 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 MEC et le fonctionnement du microenvironnement hépatique (**Figure 11**). La fibrose peut au fil du temps évoluer vers la cirrhose, et dans ce cas-ci le tissu cicatriciel va alors entourer les amas de cellules hépatiques qui régénèrent: ce sont les nodules de régénération (**Figure 11**). 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'aboutissement à une cirrhose constituée. Considérée comme un état précancéreux en soi, la cirrhose est présente chez 80 à 90% des patients ayant un CHC. Elle est définie par une fibrose mutilante avec destruction de l'architecture normale du foie et la présence de nodules de régénération (97, 98, 132).

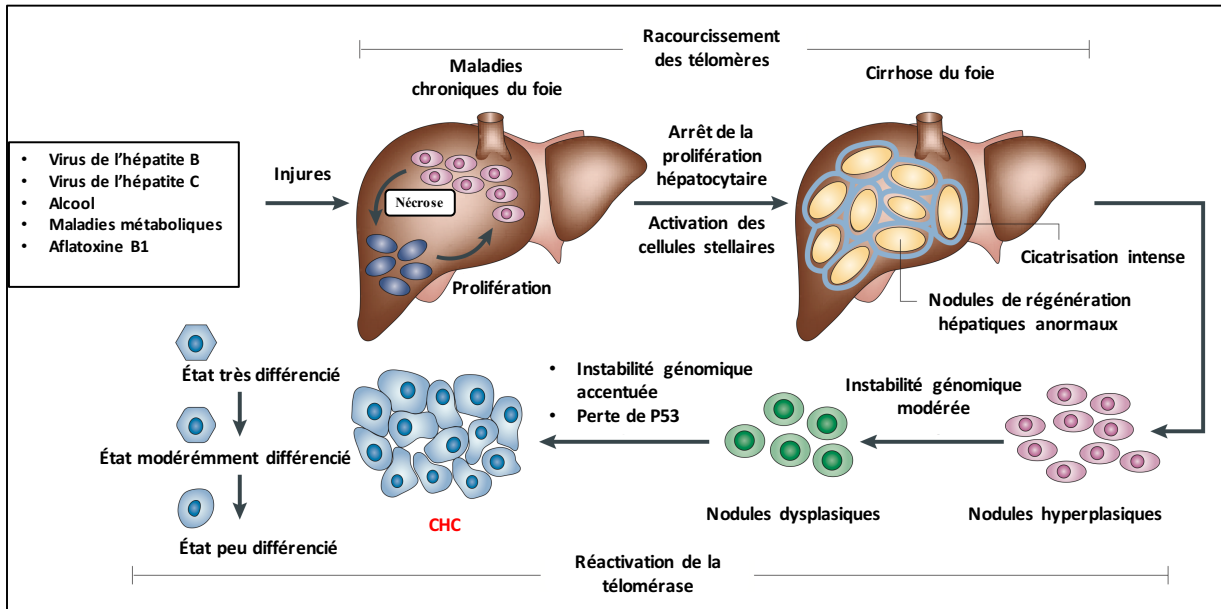


Figure 11. Progression histopathologique du CHC. Tirée de Farazi P. et al. *Nature Reviews Cancer*, 2006 (104).

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 (133, 134).

Parmi ces rares cas de CHC se développant potentiellement en l'absence de cirrhose et du rôle de certains génotoxiques, nous allons à présent parler de l'adénome hépatocellulaire et du risque de transformation en CHC. En effet, l'adénome hépatocellulaire est une tumeur bénigne rare du foie, survenant principalement chez les femmes sous contraception orale et sans hépatopathie chronique sous-jacente. Son incidence est estimée à 1/1 000 000 et la taille de la tumeur peut varier de 1 à 20 centimètres (135). Histologiquement, l'adénome hépatocellulaire se distingue du CHC par la présence d'hépatocytes bien différenciés, parcourue par des artères isolées à paroi fine. Une étude multicentrique française a permis d'établir une classification pathomoléculaire montrant 1) l'hétérogénéité de ces tumeurs et 2)

l'identification des sous-types les plus fréquemment associés au développement de complications (136). Quatre sous-types ont alors été reconnus: la forme télangiectasique et inflammatoire, la forme HNF (Hyperplasie nodulaire focale) 1- α mutée, la forme β -caténine activée et enfin la forme non classée (136). Bien que la fréquence globale de transformation maligne en CHC demeure faible: 4.2% selon une revue systématique basée sur une analyse de plus de 1600 patients, ce risque de transformation va dépendre de plusieurs facteurs dont le sexe, la taille mais surtout du sous-type d'adénome (137). Il a ainsi été démontré que les adénomes β -caténine activés étaient associés à un risque plus important de CHC. En effet, les mutations de la β -caténine vont aboutir à son accumulation intracellulaire et sa translocation dans le noyau, favorisant alors la transcription de gènes impliqués entre autres dans la différenciation, la prolifération et la migration (136). Morphologiquement, ces adénomes vont être caractérisés par la présence d'atypies cytonucléaires, de formations pseudo-glandulaires et parfois même accompagnés d'une cholestase (obstacle à l'évacuation de la bile entraînant une diminution de la sécrétion biliaire). Toutefois, il est important de noter que ces types d'adénome seront préférentiellement observés chez des sujets masculins et que le nombre de tumeurs ne sera en aucune façon associé à un risque accru de développement de CHC (136, 138).

2.4.2 Anatomopathologie

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 sinusoidal nettement diminué (**Figure 12**). Les travées de cellules tumorales sont typiquement plus épaisses que dans le foie normal. De même, les cellules issues d'hépatocarcinome peuvent aussi présenter une architecture pseudoglandulaire avec formation d'acini obtenus par

dilatation du canalicule biliaire, mais aussi des amas de cellules organisés de façon anarchique sans travée et sinusoïde, ou enfin des régions nécrotiques (139, 140).

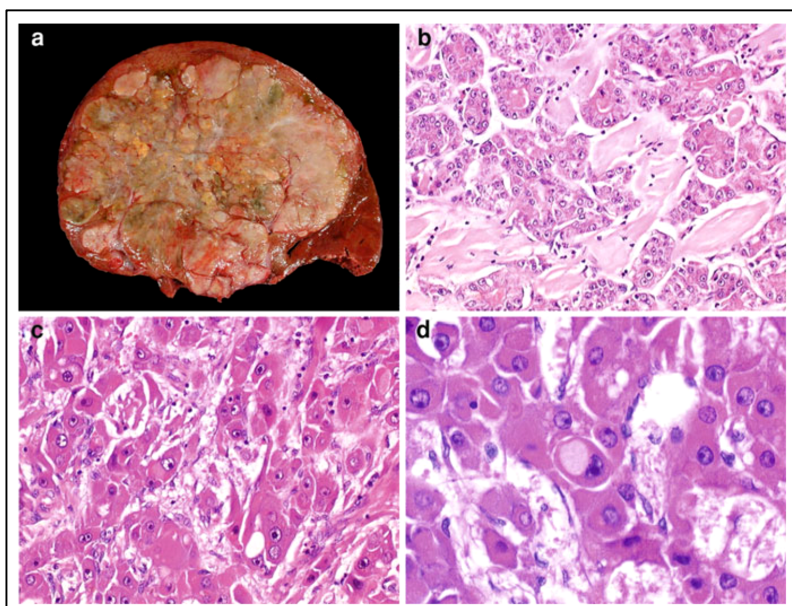


Figure 12. Caractéristiques histologiques du CHC. *Adaptée de Paradis V. et al. Recent Results in Cancer Research, 2013 (141).*

(A) Vue macroscopique d'une tumeur de CHC bien différenciée avec architecture trabéculaire, (B) Hépatocarcinome montrant des cellules tumorales stéatosiques, (C) CHC peu différencié avec présence de corps mitotiques et (D) Cellules issues de CHC montrant pour la plupart une positivité cytoplasmique pour la glypican-3.

2.4.3 Classifications anatomopathologiques

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

- 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 (142). Cependant, ce dernier élément va alors soulever une limite importante de cette classification car des points de discordance ont effectivement pu être notés dans l'interprétation donnée par certains pathologistes après analyse de tissus obtenus soit à partir de biopsies ou soit à partir de résections hépatiques (143). En effet, la taille des échantillons récupérés n'étant pas la même, le tissu récolté lors de la biopsie localisée/guidée peut ne pas être l'exact reflet de la tumeur hépatique *in situ*, menant alors vers une classification erronée (143). De même, d'autres études ont également démontré qu'une mauvaise gradation d'Edmondson-Steiner (fréquemment minorée) de la part des pathologistes pouvait avoir lieu face au manque de standardisation, mais que toutefois son association au pronostic clinique des patients était avérée dans plus de 60% des cas, que ce soit lors de la transplantation hépatique ou lors de la résection (144). Pour faire face à ces divergences, il a toutefois été proposé de coupler ces analyses histologiques à des critères reposant sur une plus grande objectivité telle que la classification moléculaire (144). Compte tenu de l'hétérogénéité métabolique du CHC telle que montrée précédemment (avec les groupes allant de G1 à G6), il serait alors tout à fait envisageable d'annexer à cette gradation l'analyse de biomarqueurs métaboliques afin de vérifier dans un premier temps si le degré de différenciation des tumeurs corrèle avec le niveau d'expression de ces biomarqueurs, pour au final tenter de prédire avec une plus grande précision le pronostic clinique des patients.

2.4.4 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 d'ordre général et sont souvent masqués par ceux de la cirrhose, notamment avec une altération de l'état général, anorexie et/ou perte pondérale. Les complications de la cirrhose peuvent aussi être révélatrices de la présence d'hépatocarcinome comme par exemple 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) (145, 146). Par ailleurs, l'existence chez un patient d'une cirrhose sous-jacente conduit l'équipe médicale à mener une surveillance régulière par échographie et dosage de l'AFP tous les 6 mois. Ceci dans le but de potentiellement dépister le CHC à un stade précoce et curable.

Parmi les principaux marqueurs biologiques utilisés lors du dépistage de l'hépatocarcinome, il y a :

- l'AFP, dont la synthèse diminue rapidement à la naissance pour au final s'interrompre à l'âge adulte. Son niveau d'élévation est souvent synonyme de la présence d'un CHC avec une spécificité allant de 76 à 94% (147). 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 récurrence de la tumeur. Elle a également une valeur pronostic indépendante: plus le niveau d'AFP est élevé, moins bon est le pronostic.
- 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% (148). 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.

- la glypican-3 qui, comme nous l'avons mentionné antérieurement, 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 (149).

2.5 Modèles d'étude du CHC

Comme nous venons de le constater, l'initiation et la progression de l'hépatocarcinome vont résulter de plusieurs facteurs. Ces derniers seront aussi bien environnementaux que cellulaires et mèneront tous à un déséquilibre homéostatique poussant alors l'hépatocyte sain à s'engager dans une voie de dédifférenciation tumorale. Le choix du modèle d'étude va donc être important dans la compréhension et l'analyse des mécanismes physiologiques utilisés par la cellule tumorale pour le maintien de son potentiel tumorigénique. Plusieurs modèles animaux ont ainsi été mis au point:

- le modèle chimique avec l'administration de N-nitrosodiéthylamine (DEN) chez la souris ou le rat qui provoque l'apparition du CHC en induisant l'alkylation de l'ADN et en stimulant la production des ROS par activation des cytochromes P450 (150, 151). Lorsqu'utilisé seul, le DEN nécessite plusieurs injections et une longue période avant l'apparition de tumeurs (151). Ainsi, une hépatectomie partielle précédant l'administration du DEN sera souvent réalisée dans le but d'augmenter la fréquence d'apparition de CHC et aussi de raccourcir la durée expérimentale.
- le modèle métabolique avec l'utilisation d'une diète déficiente en choline tel qu'observé dans les études de NASH. Ce modèle permet à très long terme d'observer le développement du CHC (152). De plus, l'utilisation d'un agent initiateur tel que le DEN permet un développement accéléré du CHC dans ce modèle (153).
- les modèles génétiques qui consistent à évaluer l'implication d'un gène dans le développement du CHC par ajout ou retrait du dit gène par recombinaison Cre-Lox ou

par système CRISPR/CAS9 (154, 155). Des modèles génétiques provoquant l'éclosion spontanée du CHC ont également été développés, comme le modèle PTEN, qui après avoir induit la NASH conduit à l'apparition de tumeurs (156).

- le modèle chirurgical consistant en l'implantation de cellules issues de CHC dans les animaux. Le site d'injection peut cependant varier d'un modèle chirurgical à l'autre comme à travers l'injection sous-cutanée. En effet, la xénotransplantation permet un suivi de la progression tumorale mais n'offre cependant pas un environnement adapté au développement du CHC (157). Un autre modèle dit HFA (Hollow Fibre Assay) va quant à lui consister en l'implantation d'un tube perméable contenant plusieurs lignées provenant d'hépatocarcinome, permettant ainsi l'étude de plusieurs lignées au sein d'un seul et même animal, ce qui en soi représente un bel avantage. Cependant, une fois de plus, le microenvironnement ne va en rien ressembler à celui du foie puisque ces tubes sont implantés par voie sous-cutanée (158, 159). Parmi les cellules utilisées dans les 2 modèles précédemment cités, nous allons notamment avoir les BEL-7402, SMMC-7721, Hep3B, HepG2 et SK-HEP-1, toutes des lignées ayant exclusivement une origine humaine (158). Toutefois, il est important de noter que ces modèles ectopiques vont principalement avoir recours à l'utilisation d'animaux présentant une défaillance dans leur système immunitaire, c'est à dire immunodéficients, afin de favoriser la croissance tumorale. Ainsi, la relevance fonctionnelle de ces tumeurs ne reflétera que difficilement celle des tumeurs provenant de patients atteints de CHC. L'implantation orthotopique devient alors une approche intéressante avec l'injection de cellules cancéreuses directement dans le foie, ou l'injection d'une quantité précise de cellules dans la rate qui par diffusion par les veines splénique et porte vont se rendre jusqu'au foie (157, 160, 161). Bien que cette approche nécessite une certaine expertise chirurgicale, elle offre néanmoins la possibilité d'évaluer *in situ* la progression de la tumeur au niveau du foie, mais également la capacité de ces cellules à envahir le tissu sain avoisinant. Elle permet ainsi de déterminer le nombre de foyers s'étant développés dans le foie. Par ailleurs, elle ne requiert pas l'utilisation d'animaux immunodéficients pour le développement tumoral et offre donc l'avantage d'être dans des conditions physiologiques plus pertinentes. Toutes ces caractéristiques rendent ce modèle plus transposable à l'homme

et c'est cette approche que nous avons par la suite choisi pour nos expériences menées *in vivo*. En utilisant des souris immunocompétentes et syngéniques (C57/bl6), nous avons alors non seulement pu isoler une lignée murine dérivée de cellules Hepa1-6: la Dt81Hepa1-6, mais également pu mettre en évidence une signature métabolique décrivant les stratégies métaboliques arborée par cette dernière dans le maintien de son potentiel tumorigénique *in vivo*.

Nous avons dans cette première et deuxième partie de thèse pu aborder les différentes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du foie, mais également constater que le CHC est un cancer fonctionnellement hétérogène avec une déstructuration profonde de l'architecture hépatique. Cette irrégularité architecturale propre au développement de l'hépatocarcinome sur un fond cirrhotique va avoir de multiples répercussions. Parmi elles, le métabolisme hépatocytaire entre autres avec l'activation par exemple de la voie de signalisation mTOR durant l'hépatocarcinogénèse. Mais alors en quoi le métabolisme tumoral va-t-il être un trait de caractère capital dans le phénotype des cellules cancéreuses? Et comment ce dernier sera-t-il détourné pour permettre leur survie et leur prolifération? C'est ce à quoi nous allons tenter de répondre dans cette troisième partie d'introduction.

3. Métabolisme des cellules cancéreuses

3.1 Perspectives historiques

Dans les années 1920, le métabolisme des cellules cancéreuses décrit par Otto Warburg va devenir une des caractéristiques assimilées au cancer, qui prendra beaucoup plus tard l'appellation "*d'effet Warburg*". Pourtant, peu d'études s'étaient intéressées au métabolisme des cancers. C'est inscrit dans ce contexte que, pour la première fois, une découverte majeure touchant le métabolisme des cellules cancéreuses va être réalisée. En effet, Otto Warburg va alors démontrer que les cellules tumorales puisent leur énergie essentiellement à partir du

glucose, à travers la glycolyse, afin de répondre à leur besoin en énergie, mais également à leur besoin en biomasse nécessaire à leur haut potentiel de prolifération.

Tout débute à la fin des années 1920 et début des années 1930 lorsqu'Otto Warburg remarque une concentration anormalement élevée d'ions lactate à partir d'échantillons tumoraux. Or, l'acide lactique, ou lactate, est typiquement le résultat de la fermentation du glucose par glycolyse anaérobie. Cette glycolyse exacerbée va alors engendrer une respiration cellulaire défectueuse illustrée notamment par une diminution de l'oxydation du succinate et de l'*effet Pasteur*. Fort de cette trouvaille avec la démonstration que les cellules cancéreuses peuvent changer leur métabolisme pour adopter un métabolisme anaérobie, Otto Warburg formule alors l'hypothèse selon laquelle la prolifération des cellules cancéreuses peut être maintenue quand bien même le milieu environnant se trouverait appauvri en oxygène. Otto Warburg établit alors un postulat selon lequel la formation de cellules cancéreuses à partir de cellules normales s'effectue en deux phases : premièrement, un dysfonctionnement irréversible de la respiration mitochondriale va prendre place, ce qui dans un deuxième temps entraîne une perte d'énergie fatale à certaines cellules. Parmi ces cellules, certaines vont alors s'adapter à cette diminution énergétique et modifier leur morphologie pour se différencier et croître de manière anarchique: on parle alors de cellules cancéreuses (162).

Fort de ses résultats, Otto Warburg ira même plus loin dans ses exposés notamment lors de la conférence des lauréats du prix Nobel en 1966 à Lindau, où il recommandera des régimes alimentaires riches en groupes activateurs des enzymes impliqués dans la respiration mitochondriale (fer, riboflavine, nicotinamide) pour la prévention et le traitement des cancers. Ses déclarations et son style percutant déclencheront à cette époque une vive polémique en Europe. Malgré l'avancée considérable qu'ont suscitée les travaux de Warburg, des pièces manquent au puzzle et ce n'est qu'avec l'arrivée plus tardive des outils de génétique et de biologie moléculaire que sa théorie va se concrétiser sous le nom d'*effet Warburg*. Plusieurs études menées bien des années après cette découverte ont toutefois démontré que les mitochondries pouvaient rester fonctionnelles et qu'elles pouvaient même sous certaines conditions procurer un certain avantage dans l'adaptation des cellules cancéreuses. Warburg n'avait en réalité pas démontré la cause principale du cancer, mais avait plutôt identifié une des caractéristiques majeures liée à la transformation maligne, qui suscitera par la suite

d'innombrables travaux. Rappelons néanmoins que malgré toutes ces controverses de l'époque, Otto Warburg reste à ce jour l'un des seuls scientifiques, devant Albert Einstein, Marie Curie ou même Linus Pauling, à avoir été nommé 47 fois pour le prix Nobel suite à sa première nomination et l'obtention en 1931 de son Prix Nobel. Parmi ses étudiants, le plus illustre est Hans Adolf Krebs, prix Nobel en 1953, pour sa découverte et la caractérisation du cycle de l'acide citrique.

Ainsi, selon Otto Warburg, les cellules cancéreuses peuvent adopter un nouveau mode opératoire de survie leur permettant de s'adapter à leur microenvironnement et de maintenir un niveau élevé de prolifération et de tumorigénicité: il s'agit de la reprogrammation métabolique tumorale.

3.2 Reprogrammation métabolique

3.2.1 Concepts émergents en bioénergétique

La rigidité métabolique est un concept définissant les tissus qui possèdent une organisation moléculaire des voies métaboliques qui leur est spécifique et qui détermine leur capacité à stocker ou transformer des substrats énergétiques donnés. Les adipocytes en sont un parfait exemple car ils vont pouvoir stocker les acides gras tout en étant incapables de pouvoir les consommer car ils ne possèdent pas la machinerie enzymatique permettant l'oxydation de ces derniers.

Par opposition, dans certains cas comme le cancer ou certaines maladies métaboliques telles que le diabète, le principe de rigidité métabolique ne sera plus respecté: une profonde modification des voies biochimiques existantes va alors s'opérer, pour non seulement maintenir l'homéostasie énergétique de la cellule, mais également permettre d'entretenir la biosynthèse de nombreux composés organiques. C'est le principe de flexibilité métabolique. En effet, certaines cellules vont ainsi démontrer une capacité à pouvoir remanier leurs voies biochimiques pour contourner certains obstacles, tout en maintenant leur survie grâce à

l'activation de voies compensatrices ou alternatives. Ce principe de flexibilité métabolique va reposer sur plusieurs déterminants:

- l'activation rapide de "switch" et de déviations métaboliques par des modifications post-traductionnelles ou par dégradations d'enzymes clefs de certaines voies. Par exemple, en situation d'hypoxie, la phosphorylation de la PDH inhibe la chaîne respiratoire et donc la phosphorylation oxydative.
- des sentinelles servant de senseurs telles que l'AMPK ou encore mTOR, qui vont activer des voies de signalisation permettant une réorganisation des circuits métaboliques.
- des mutations génétiques qui vont dans le cas de certains cancers, permettre une stabilisation de la voie de l'hypoxie et alors grandement favoriser le passage vers un "switch" glycolytique.
- des rétrocontrôles s'opérant par la loi d'action de masse: un taux important de NADH réduit par exemple l'activité des enzymes impliqués dans le TCA.
- les seconds messagers tels que les ROS ou le calcium. Par exemple, le clivage de l'aconitase par les ROS peut conduire à l'extrusion du citrate vers le cytosol où il va alors servir à synthétiser des lipides.

Bien qu'il s'agisse d'un concept plus ou moins récent, la flexibilité métabolique va alors être un trait de caractère de la cellule décrivant sa facilité à opérer un remodelage de ces voies métaboliques au niveau biochimique. La cinétique du remodelage de ces voies va comporter plusieurs phases. En effet, suite à un changement rapide de l'état énergétique cellulaire causé notamment par la disparition du glucose dans le microenvironnement, la cellule va alors se tourner vers les voies métaboliques dont elle dispose pour pallier à ce déficit d'une de ses principales sources d'énergie. Cela donnera par exemple lieu à l'activation de la gluconéogenèse. Cette activation soudaine de voies métaboliques préexistantes face à un changement de l'environnement va notamment inclure des déviations métaboliques et par la suite la redirection de certains métabolites vers des produits finaux devenus incontournables dans ce contexte. Le concept de remodelage ou de reprogrammation métabolique va alors être

une composante majeure de la faculté adaptative cellulaire, caractéristique des cellules cancéreuses.

3.2.2 Reprogrammation métabolique tumorale

Les cellules cancéreuses ont acquis au fil du temps certaines caractéristiques leur permettant de croître et de se diviser indéfiniment. Ces dernières vont ainsi pouvoir former une tumeur maligne et par la suite se propager à travers le corps pour former des métastases. D'un point de vue métabolique, quelles vont alors être ces différentes composantes biochimiques permettant à la cellule cancéreuse de pouvoir efficacement s'adapter à des microenvironnements différents?

3.2.2.1 Glycolyse aérobie ou *effet Warburg*

Comme évoqué précédemment, Otto Warburg observe en 1927 que les tumeurs présentent une consommation exacerbée en glucose et produisent de l'ATP principalement par voie de glycolyse dite anaérobie, malgré la présence en oxygène (163). Parallèlement, Warburg décrit une augmentation de la production de lactate et émet ainsi l'hypothèse selon laquelle la survenue du cancer aurait pour origine une altération du métabolisme oxydatif mitochondrial, expliquant alors pourquoi le pyruvate ne serait pas dégradé en acétyl-CoA mais plutôt en lactate. Des études menées ultérieurement ont par ailleurs démontré que cette dysfonction mitochondriale relatée par Warburg dans les années 30, pourrait être due à l'inhibition de la PDH par la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1), elle-même contrôlée par le facteur hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) et l'activité de la chaîne respiratoire (164, 165).

Une analyse récente basée sur un modèle informatique a révélé que l'*effet Warburg* n'est possible que grâce à la régulation de certains enzymes dont HK2 et que l'inhibition de ces

enzymes entraîne de façon irrémédiable une diminution de la production de lactate, ainsi qu'une augmentation de la respiration mitochondriale (166). Par ailleurs, une recrudescence de l'activité respiratoire mitochondriale est également observée lors d'une diminution de la production d'ATP grâce à l'AMPK, ce qui va alors favoriser la production d'ATP mitochondriale par phosphorylation oxydative. Cette dernière observation aura pour conséquence un rendement net plus important en molécules d'ATP (167). De plus, une inhibition de l'AMPK aura non seulement pour effet d'augmenter la consommation en glucose mais également la production de lactate (167). Dans l'hépatocarcinome, il a été démontré qu'une inhibition de HK2 avait également pour effet une recrudescence de l'activité mitochondriale et en particulier celle de la phosphorylation oxydative, permettant alors un maintien de la production en ATP et donc *in fine* du potentiel énergétique (168).

Ces dernières observations jettent alors un nouveau regard sur le rôle potentiel du métabolisme mitochondrial au sein des cellules cancéreuses. Paradoxalement au postulat de Warburg reposant sur la présence d'un dysfonctionnement des mitochondries, de nombreuses études réalisées ultérieurement ont ainsi soutenu l'idée selon laquelle les mitochondries continueraient à être parfaitement fonctionnelles, et ce même dans un contexte tumoral. Alors qu'en est-il vraiment? Les mitochondries des cellules tumorales sont-elles altérées? Peuvent-elles procurer un quelconque avantage aux cellules cancéreuses?

3.2.2.2 Cancers oxydatifs

De récentes études s'étant intéressées à l'*effet Warburg* ont montré que les mitochondries, plutôt qu'être dysfonctionnelles et inactives tel que proposé par Otto Warburg, présenteraient plutôt une activité quiescente et un plus faible rendement (169, 170). Les raisons de cette efficacité atténuée seraient multiples suivant les différentes conditions, comme par exemple l'identification de mutations dans l'ADN mitochondrial en lien avec une activité diminuée des complexes de la chaîne respiratoire, ou encore une modification de l'activité du TCA (169, 171, 172). Ainsi, la cellule tumorale aurait un métabolisme mitochondrial quiescent qui, sous certaines conditions, pourrait se réactiver comme par exemple pour

l'oxydation des acides gras, des corps cétoniques ou même de la glutamine. Ceci concourrait à procurer un avantage sélectif. L'*effet Warburg* n'étant désormais plus universel, certaines cellules cancéreuses pourraient effectivement maintenir leur activité de phosphorylation oxydative. On parle alors de tumeurs dites oxydatives et c'est ce dont nous allons parler dans les paragraphes qui vont suivre:

- La β -oxydation: les acides gras peuvent en effet être utilisés par la mitochondrie afin d'alimenter le TCA (**Figure 6**). Cela permettrait ainsi de faire fonctionner la chaîne respiratoire en condition défavorable, comme par exemple en l'absence de glucose environnant. L'acétyl-CoA formé sera oxydé dans le TCA et va alors permettre la production de cofacteurs nécessaires à la production mitochondriale d'ATP. De nombreuses études ont pu démontrer qu'une surexpression des différentes enzymes impliquées dans cette voie était notée dans plusieurs types de cancers, notamment celui de la prostate (173), du sein (174), du poumon (175) ou encore dans des tumeurs gliales (176). Dans le cas du CHC, l'implication de l'oxydation des acides gras dans la survie des cellules d'hépatocarcinome reste controversée. En effet, une diminution de la β -oxydation semble à la fois être associée à la progression tumorale et à une mortalité cellulaire accrue favorisée par une plus grande sensibilité aux agents chimiothérapeutiques (177, 178). C'est pour cette principale raison que nous avons décidé d'étudier cette voie afin de vérifier si nos cellules tumorales Dt81Hepa1-6 pouvaient utiliser les acides gras. D'autre part, l'inhibition de cette voie par outil génétique ou utilisation de drogues comme l'étomoxir inhibant le CPT1, permet d'observer une chute de la consommation en oxygène et de la production en ATP, mais également une inhibition de la prolifération et de la migration des cellules tumorales (179). Dans le cas du cancer de la prostate, l'étomoxir permet une augmentation de la survie de modèles murins xéno greffés alors que dans certaines leucémies, son effet sur la mort des cellules cancéreuses reste négligeable (173, 180). C'est ainsi que certaines études ont pu montrer que la combinaison d'étomoxir avec d'autres agents anticancéreux comme le CP ou le trioxyde d'arsenic permettait d'augmenter significativement l'effet antitumoral (180, 181).

- La formation des corps cétoniques: cette voie métabolique peut favoriser un métabolisme mitochondrial oxydatif en alimentant le TCA (**Figure 6**). En effet, de récentes études ont montré que l'utilisation des corps cétoniques par les cellules tumorales avait non seulement pour conséquence d'augmenter l'activité du TCA et la production d'ATP, mais également d'augmenter de manière considérable le volume tumoral et le potentiel métastatique de ces dernières (182, 183). Les corps cétoniques étant principalement produits en période de jeûne, cette nouvelle fonction dans le phénotype métabolique des cellules cancéreuses pourrait potentiellement expliquer l'importante croissance tumorale observée chez des rats soumis à une période de jeûne stricte (184). Étant produits par le foie, l'étude du métabolisme des corps cétoniques devient également intéressante dans le cas du CHC. En effet, une étude de Huang *et al.* datant de 2016 a démontré qu'en conditions défavorables, c'est à dire en l'absence de nutriments, les cellules d'hépatocarcinome avaient recours à l'utilisation et au catabolisme des corps cétoniques pour pouvoir croître et proliférer (185). Par ailleurs, l'augmentation de la production oxydative d'ATP générée par l'utilisation des corps cétoniques au niveau de la mitochondrie aura pour effet d'inhiber l'activation de l'AMPK (185). Ainsi, tout en maintenant une activité de leur métabolisme oxydatif mitochondrial, les cellules d'hépatocarcinome vont stratégiquement pouvoir conserver une importante activité glycolytique (167). Il existerait alors une sorte de symbiose entre d'une part le métabolisme mitochondrial et d'autre part le métabolisme glycolytique, nécessaire au potentiel tumorigénique des cellules cancéreuses. Par ailleurs, inhiber l'activation de l'AMPK grâce aux corps cétoniques protégerait les cellules d'hépatocarcinome de l'autophagie, favorisant ainsi la croissance tumorale (185).
- L'utilisation de la glutamine: la glutamine a la capacité de favoriser un métabolisme mitochondrial oxydatif en alimentant le TCA et ainsi permettre la génération d'ATP en conditions défavorables. En effet, une fois captée, la glutamine va être déaminée en glutamate par le biais de la glutaminase. Dans la mitochondrie, le glutamate sera pris en charge par la glutamate déhydrogénase pour donner de l' α -kétoglutarate, qui pourra alors alimenter l'activité du TCA et de la chaîne respiratoire mitochondriale. De

nombreuses études se sont penchées sur le rôle de la glutamine dans les cellules cancéreuses et ont démontré que ces dernières en étaient très avides, ce qui permettait de maintenir leur prolifération et leur survie (186). Ainsi, l'inhibition de la glutamate dehydrogénase dans des leucémies ou l'inhibition de la glutaminase dans des cellules cancéreuses de poumon ont eu pour conséquence une diminution de leur tumorigénicité (187, 188). Dans le CHC, une suractivation de cette voie aura cependant un effet inverse, à savoir une plus grande sensibilité des tumeurs à l'action du sorafénib, le tout médié par une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine et celle de l'autophagie (189). Par ailleurs, il a également été démontré qu'outre le fait de favoriser la survie des cellules néoplasiques, la glutamine jouait aussi un rôle dans le potentiel métastatique tumoral. En effet, afin d'augmenter leur fonction respiratoire, leur production d'ATP et la biosynthèse des acides aminés, les cellules issues de mélanomes métastatiques sont extrêmement dépendantes de la glutamine (190). Ce phénotype métastatique peut être réprimé par le blocage de cette voie en utilisant un inhibiteur de la glutaminase (190). D'autre part, une hétérogénéité dans l'utilisation mitochondriale de la glutamine par les tumeurs a été mise en évidence ces dernières années. En effet, les cellules de mélanome utiliseraient la grande majorité de la glutamine pour produire des intermédiaires métaboliques permettant la synthèse des acides gras, alors que les cellules tumorales issues de glioblastome utiliseraient la glutamine pour permettre une forte production et sécrétion de lactate (191, 192). Cette dernière observation marque une nouvelle fois cette notion de symbiose ou de couplage métabolique, permettant à la cellule cancéreuse d'arborer une certaine souplesse et plasticité métabolique, si essentielle à sa tumorigénicité.

3.2.2.3 Cancers glycolytiques, oxydatifs ou mixtes?

L'hétérogénéité métabolique des cellules cancéreuses a été observée: certains types de cancers étant tournés vers un phénotype glycolytique et d'autres vers un phénotype plus oxydatif. Ainsi, il a été démontré dans des lignées de type HLF-A qu'une grande majorité de la

production d'ATP était issue de la glycolyse, alors que dans d'autres lignées comme par exemple celles provenant d'adénocarcinome épithélial de la glande mammaire MCF-7, la génération d'ATP provenait de la phosphorylation oxydative mitochondriale (169, 193). Des études menées cette fois-ci en condition hypoxique ont montré que l'adaptation de certaines cellules tumorales à leur nouvel microenvironnement passait par leur capacité à pouvoir réorienter leur métabolisme. En effet, alors qu'elles présentaient un haut niveau de glycolyse en condition de normoxie (*effet Warburg*), certaines d'entre elles vont devenir fortement dépendantes de la phosphorylation oxydative en situation d'hypoxie (194). D'autres études ont également démontré qu'une inhibition de l'activité respiratoire dans des cellules dépendantes énergétiquement de la mitochondrie favorisait une réorientation de leur métabolisme oxydatif vers celui de la glycolyse (195). Ainsi, de récentes études ont pu démontrer que l'adaptation de la cellule tumorale face à son microenvironnement fluctuant (apport sanguin, oxygénation et nutriments) reposait sur sa capacité intrinsèque à pouvoir aisément modifier son métabolisme afin de maintenir un niveau d'énergie nécessaire à sa survie et croissance. Le microenvironnement jouant un rôle crucial, on parle alors de reprogrammation métabolique cancéreuse.

3.3 Microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral définit un système complexe, dynamique et tissu-spécifique. Il est entre autres composé de cellules endothéliales, de cellules immunitaires et également de fibroblastes (ou cellules étoilées dans le foie). C'est par interaction avec ces cellules ancrées dans la MEC (souvent anormale) que les cellules cancéreuses vont conserver une localisation particulière ou au contraire migrer et ainsi pouvoir se déplacer. En condition physiologique normale, le microenvironnement peut exercer le rôle de suppresseur de tumeurs, alors qu'en condition tumorale, une modification profonde de ce même microenvironnement sera orchestrée par les cellules cancéreuses afin de le rendre plus propice à la survie de ces dernières. Ce remaniement passe notamment par une sécrétion abondante de lactate produit lors de l'*effet Warburg* dans le milieu extracellulaire: ceci aura alors pour

conséquences une diminution du pH environnant et une augmentation de l'invasivité des cellules cancéreuses (196, 197).

En raison de leur différente localisation au sein du microenvironnement et d'une néovascularisation souvent compromise et anarchique, une variation importante de l'apport en oxygène et en nutriments pourra être constatée au sein des tumeurs. L'oxygénation jouant un rôle clef dans le métabolisme tumoral, de nombreuses études ont pu révéler que non seulement la consommation tumorale en oxygène était améliorée lorsque le flux sanguin était augmenté, mais également que la taille d'une tumeur était inversement corrélée à sa consommation en oxygène. En effet, plus une tumeur sera de grande taille et plus le flux sanguin diminuera en proportion (198, 199). Ainsi, chacune des tumeurs répondra de façon spécifique à son propre niveau d'oxygénation et d'apport nutritionnel, expliquant alors pourquoi on retrouve souvent au sein de différentes tumeurs provenant d'un seul et même organe des différences métaboliques. On parle dans ce cas d'hétérogénéité intertumorale.

Outre ces différences métaboliques intertumorales, des différences métaboliques majeures vont également pouvoir être constatées au sein d'une même tumeur. En effet, au sein d'une tumeur solide, certaines cellules cancéreuses sont situées en périphérie et d'autres au centre. Cette différente localisation va alors fortement influencer sur leur capacité à pouvoir métaboliquement s'adapter à leur microenvironnement. En effet, les cellules ne recevant pas le même apport en oxygène et en nutriments, des différences métaboliques pourront ainsi être observées au sein d'une même tumeur. On parle dans ce cas-ci d'hétérogénéité intratumorale. Dans une étude de Hirschhaeuser *et al.* effectuée sur des tumeurs générées *in vitro* grâce à la culture tridimensionnelle, il a ainsi été démontré l'existence d'un gradient, composé entre autres de glucose et d'oxygène au sein de la tumeur (200, 201). La concentration de glucose était rapidement diminuée de la périphérie vers l'intérieur, alors que le niveau d'oxygène restait quant à lui disponible plus longtemps. Les cellules cancéreuses se trouvant au centre de la tumeur utiliseraient donc la phosphorylation oxydative pour produire de l'énergie, la glycolyse étant inopérante due au manque de glucose.

L'efficacité de cette adaptation métabolique des cellules tumorales à leur microenvironnement laisse sous-entendre une sorte de dialogue permanent entre les cellules cancéreuses entre elles, mais également avec d'autres types cellulaires du

microenvironnement. Une communication s'établirait alors pour permettre un couplage non seulement métabolique mais surtout énergétique. De récentes études ont d'ailleurs pu démontrer que des cellules tumorales maintenues dans un environnement hypoxique allaient par le biais de la glycolyse sécréter d'importantes quantités de lactate dans le milieu extracellulaire. Ce dernier serait par la suite importé par des cellules tumorales issues d'un milieu riche en oxygène afin d'être catabolisé par le TCA et ainsi permettre la production d'énergie par phosphorylation oxydative. En utilisant préférentiellement et stratégiquement le lactate par rapport au glucose comme source d'alimentation du TCA, les cellules cancéreuses oxydatives permettent la diffusion de glucose jusqu'aux cellules en zones hypoxiques, qui l'utilisent alors pour produire de l'ATP par flux glycolytique (172, 202-205). Pavlides *et al.* a d'ailleurs pu mettre en évidence que des cellules stromales avaient également la possibilité de fournir les nutriments nécessaires aux cellules cancéreuses (206). En effet, la co-culture de fibroblastes et de cellules cancéreuses a permis de démontrer une sécrétion et un export du lactate produit par les fibroblastes vers les cellules tumorales et ce grâce à la surexpression de transporteurs du lactate. Cependant, lorsque mises en culture séparément, aucune surexpression des gènes impliqués dans le transport du lactate n'a pu être détectée. Ces observations laissent ainsi supposer que sous certaines conditions l'*effet Warburg* n'aurait plus lieu au sein même de la cellule cancéreuse, mais plutôt dans les cellules stromales. De cette façon, la cellule tumorale maintiendrait efficacement son haut potentiel énergétique si essentiel à sa croissance. De ces expériences, une nouvelle nomenclature désignant ce phénomène fût alors introduite: l'*effet Warburg inverse* (206).

Pour rester dans cette composante du microenvironnement, une récente étude s'est intéressée au rôle que pouvait avoir ce dernier non pas sur le métabolisme tumoral en soi, mais plutôt sur le métabolisme des cellules immunitaires (207). De façon intéressante, il a alors été démontré qu'une surexpression génique de la carnitine palmitoyltransférase induite par la présence d'acide linoléique (acide gras retrouvé dans les cas de stéatose hépatique), favorisait le développement du CHC en affectant spécifiquement la survie des cellules immunitaires T environnantes (207). Faisant suite à cette surexpression de la carnitine palmitoyltransférase, des dommages irréversibles induits par les ROS mitochondriaux auront effectivement pour principale conséquence l'apoptose des lymphocytes T CD4 (cluster de différenciation 4), ce

qui favorisera une diminution de l'immunosurveillance et donc la formation de tumeurs d'hépatocarcinome (207).

Comme nous venons de le voir, le microenvironnement va jouer un rôle décisif non seulement dans la plasticité métabolique et fonctionnelle des cellules cancéreuses, mais également dans sa survenue, son devenir et son maintien. Au coeur et à l'origine de toutes ces altérations métaboliques: l'*effet Warburg* et particulièrement la consommation exacerbée en glucose affichée par les cellules néoplasiques ou les cellules stromales. Mais alors en quoi ce haut niveau de glycolyse va-t-il être un trait de caractère si particulier des cellules tumorales? Quelle peut être son utilité pour le diagnostic du cancer? Et en quoi cette caractéristique a-t-elle permis de révolutionner le monde de l'imagerie médicale? C'est ce dont nous allons discuter dans la prochaine partie.

3.4 Tomographie par émission de positrons (TEP)

Initialement développée pour les études touchant le cerveau et le coeur, l'imagerie TEP est aujourd'hui devenue un outil de référence en oncologie. Dans la littérature, nous retrouvons effectivement un très grand nombre d'études cliniques portant sur cette modalité d'imagerie (208). Globalement, l'imagerie TEP dans le domaine du cancer est, ou peut être, utilisée tout le long de la prise en charge du patient: du diagnostic de la maladie au suivi clinique post-thérapeutique.

La TEP est une modalité d'imagerie fonctionnelle basée sur la détection *in vivo* de la désintégration d'un radiotracer émetteur de positrons dans l'organisme. Ce radiotracer est constitué d'une molécule vectrice et d'un isotope radioactif. Parmi les radiotraceurs les plus couramment utilisés, on retiendra le ^{18}F -FDG (^{18}F -fluoro-D-glucose), un analogue du glucose marqué au fluor. Mais alors en quoi la TEP constitue-t-elle une avancée majeure dans le monde de la cancérologie? Et surtout quel est le lien avec le métabolisme des cellules cancéreuses? Comme nous l'avons dit précédemment, la cellule cancéreuse démontre une grande capacité à utiliser la glycolyse et ce, même en présence d'oxygène (*effet Warburg* ou

glycolyse aérobie). Par conséquent, afin de maintenir un haut niveau énergétique et compte tenu surtout du faible rendement en ATP de la glycolyse (2 molécules), la cellule cancéreuse n'aura d'autre choix que d'augmenter son niveau de consommation de glucose. Ainsi, lors de l'examen TEP, le ^{18}F -FDG injecté par voie intraveineuse sera transporté dans la cellule pour être rapidement transformé en ^{18}F -FDG-6 phosphate par l'HK2. De cette façon, il sera piégé et va alors pouvoir s'accumuler au sein des cellules cancéreuses, permettant ainsi la détection des foyers tumoraux primitifs ou métastatiques.

Il est toutefois important de noter que, selon l'organe, le phénomène de captation du ^{18}F -FDG peut également se produire dans d'autres types de cellules que des cellules cancéreuses. En effet, d'autres phénomènes biologiques comme par exemple certaines pathologies infectieuses ou inflammatoires peuvent également démontrer une augmentation de la captation du ^{18}F -FDG, entrouvrant ainsi la possibilité d'éventuelles erreurs d'interprétation (209). Ainsi, malgré sa démocratisation dans le domaine de l'oncologie, l'imagerie TEP reste sujette à certaines limitations, aussi bien méthodologiques que scientifiques, comme par exemple le bruit et le faible contraste rencontré à certains endroits.

Après avoir détaillé l'avantage qu'offrait cette technique dans le diagnostic et la détection des cellules cancéreuses, nous allons à présent nous intéresser à son rôle dans le suivi clinique de la maladie avec :

- le ciblage de la radiothérapie : en effet, l'imagerie TEP fournit des informations biologiques importantes sur les voies métaboliques impliquées dans les phénomènes de radiorésistance. La TEP apparaît ainsi être intéressante dans la délimitation du volume tumoral macroscopique et dans la problématique du ciblage radiothérapeutique, notamment pour déterminer si la perception de la tumeur par la TEP permettrait une optimisation des champs d'irradiation lors de la radiothérapie. Certaines études ont démontré en effet que les informations fournies permettaient non seulement une meilleure définition des volumes irradiés, mais également une amélioration de la stratégie d'irradiation au sein de la tumeur, comme dans les cancers digestifs, de la prostate ou encore du système nerveux central (210).

- l'évaluation de la réponse thérapeutique et le suivi du patient. En effet, la TEP au ^{18}F -FDG permet d'évaluer de façon précoce les effets du traitement de radiothérapie. Provoquant une altération du métabolisme des cellules cancéreuses, les effets lors de la radiothérapie vont alors être précocement observables par la TEP. C'est ainsi que de nombreuses études ont pu se pencher sur l'extraction de ces paramètres caractérisant 1) le métabolisme tumoral et 2) son évolution en cours de traitement, pour évaluer de manière qualitative et quantitative la réponse tumorale à la radiothérapie (211, 212).
- la valeur pronostique sur la réponse thérapeutique de la tumeur et plus globalement le devenir du patient. L'activité métabolique de la tumeur et plus particulièrement son évolution en cours du traitement reflète l'agressivité de cette dernière, ainsi que sa résistance potentielle au traitement. La mesure quantifiée de l'information fournie par l'imagerie TEP peut donner une idée de la nature même de la tumeur, de prédire la réussite ou l'échec du traitement, mais également de l'adapter à chaque patient. De nombreuses études ont alors pu démontrer que des modifications de captation du FDG étaient prédictives du devenir du patient (survie globale), ou encore prédictives de la réponse histologique après chimiothérapie (213-215).



Figure 13. Image TEP montrant la répartition du ^{18}F -FDG dans l'organisme avec présence entre autres d'une tumeur mammaire droite. Extrait de Imagerie TEP au ^{18}F -FDG du cancer du sein.

Ainsi, comme nous venons de le voir, le métabolisme si spécifique des cellules tumorales aura entre autres non seulement permis le développement d'outils favorisant leur détection (l'imagerie TEP), mais également de mieux concevoir et d'appréhender à quel point le métabolisme, l'adaptation et l'agressivité tumorale formaient un réel continuum. Mais en est-il de même pour l'hépatocarcinome? Le métabolisme des cellules issues de CHC est-il intrinsèquement lié à leur phénotype tumoral? Le cas échéant, quelles vont être les voies métaboliques essentielles à leur croissance? L'imagerie TEP permet-elle une détection précoce et efficace de ces cellules cancéreuses? Si non, quelle va en être la principale raison? Toutes ces questions importantes pour la compréhension générale du CHC seront brièvement abordées dans la prochaine section, où nous allons tenter d'expliquer les raisons pour lesquelles nous nous sommes dirigés vers l'étude des cellules d'hépatocarcinome et plus particulièrement leur métabolisme.

3.5 Enjeux de la TEP avec l'hépatocarcinome

Cette dernière section marque la fin de l'introduction, partie à travers laquelle nous avons pu dans un premier temps décrire le foie en tant que tel, avec notamment ses différentes fonctions dans le corps humain; puis dans un second temps décrire de façon précise l'hépatocarcinome, avec entre autres les éléments jouant un rôle clef dans son développement. Enfin, nous avons terminé par une partie traitant du métabolisme des cellules tumorales au sens large, en prenant pour exemples plusieurs types de cancers dans l'illustration de nos propos. Alors pourquoi s'intéresser au métabolisme des cellules issues d'hépatocarcinome? Pour plusieurs raisons que nous allons détailler :

- premièrement, comme nous avons pu le constater, le foie a pour principale caractéristique son intense activité métabolique en condition physiologique. En effet, selon l'état nutritionnel plusieurs voies métaboliques vont être activées et entrer en jeu dans le maintien homéostatique de l'organisme, comme par exemple la glycolyse et la synthèse de glycogène, ou encore la gluconéogenèse et l'oxydation des acides gras.

Ainsi, les hépatocytes démontrent à l'état normal une plasticité métabolique innée leur permettant de répondre efficacement aux besoins de l'organisme. Or, nous venons de voir que la composante métabolique des cellules tumorales et particulièrement leur capacité à pouvoir s'adapter aux conditions microenvironnementales fluctuantes constituaient un trait de caractère fondamental et essentiel de leur tumorigénicité. Qu'en est-il alors de cette flexibilité métabolique au sein d'hépatocytes tumoraux qui de base présentent une aptitude à pouvoir facilement modifier leur métabolisme? Va-t-elle être la même que celle affichée par d'autres types de cellules cancéreuses?

- deuxièmement, pour la simple et bonne raison que des modifications métaboliques majeures seront affichées par les hépatocytes pendant l'hépatocarcinogénèse. Ces modifications vont alors souligner le rôle essentiel tenu par la composante métabolique dans la survenue, initiation et progression du CHC. En effet, différents acteurs tels que l'épigénétique et l'hypométhylation de régions promotrices de gènes impliqués dans la TEM ou dans le phénomène *Warburg* seront notés. Toujours pendant ce processus de genèse tumorale, l'activation constitutive de voies de signalisation cellulaires telle que mTOR sera aussi observée. Toutes ces modifications du métabolisme "préfigurant" le CHC vont ainsi procurer un avantage sélectif aux cellules cancéreuses. Ces dernières pourront alors facilement moduler leur métabolisme face à la stringence microenvironnementale (106, 120-122).
- troisièmement, nous avons vu que le microenvironnement tumoral allait être un élément crucial dans le devenir des cellules tumorales. Mais qu'en est-il dans le cas du CHC? De façon légitime, nous pouvons effectivement nous demander ce qu'il en est dans un organe tel que le foie. Ce dernier dispose effectivement d'une organisation structurelle et fonctionnelle bien définie en condition physiologique alors que de profondes modifications vont être notées lors de la cirrhose (**Figure 11**). En effet, la mise en place progressive d'un tissu cicatriciel sera retrouvée suite aux injures répétées du foie. Cela aura pour principales conséquences: 1) une synthèse abondante en fibres de collagène de la part des cellules étoilées dans le remplacement des cellules hépatiques endommagées, et 2) une altération profonde de la structure de la MEC (**Figure 11**) (97, 98). Dans ce contexte pré-tumoral et compte tenu de l'organisation

fonctionnelle précise définissant l'architecture hépatique (zonation métabolique), nous pourrions alors facilement concevoir que les phénomènes de fibrose et de régénération cellulaire auront de grandes répercussions sur le microenvironnement hépatique dans lequel "baignent" les hépatocytes, mais également sur leur phénotype métabolique. Étant indéniablement affectés par cet environnement délétère et hostile, les hépatocytes n'auront d'autre choix que de se reprogrammer métaboliquement pour survivre. Mais quel va être l'ampleur de cette reprogrammation métabolique? Et comment cette dernière va-t-elle agir sur la tumorigénicité des cellules d'hépatocarcinome? Quelles vont être les voies métaboliques les plus sollicitées face à ce changement/désordre structurel? Les hépatocytes vont-ils réagir de façon homogène et uniforme à ces modifications? La réponse semble vraisemblablement être non puisque'une certaine notion d'hétérogénéité métabolique a été retrouvée, notamment en ce qui concerne le métabolisme des acides gras et plus particulièrement l'oxydation. L'implication de cette voie a effectivement montré des divergences puisque son inhibition semble à la fois être associée à la progression tumorale et à une sensibilisation accrue des hépatocytes tumoraux face aux agents chimiothérapeutiques (177, 178). C'est face à toutes ces interrogations non encore totalement élucidées que nous avons choisi d'étudier le métabolisme des cellules issues de CHC, et plus particulièrement celui de la lignée Dt81Hepa1-6, dont on a pu démontrer la grande tumorigénicité à la fois *in vitro* et *in vivo* (161, 216).

- quatrièmement, nous avons pu constater que le phénomène de captation du ^{18}F -FDG dans les imageries de TEP pouvait également se produire dans d'autres types cellulaires, y compris dans des cellules saines. Possédant intrinsèquement une intense activité métabolique, les hépatocytes sains seront alors grandement affectés par cette contrainte technique à savoir qu'ils vont, tout comme les cellules tumorales, aussi capter avidement le ^{18}F -FDG pendant l'examen. Le contraste de détection étant diminué, la discrimination d'une cellule d'hépatocarcinome à partir d'un hépatocyte sain sera plus difficile, expliquant ainsi que la détection du CHC ne soit réalisable qu'à des stades déjà bien avancés de la maladie (217, 218). L'étude du métabolisme des cellules issues d'hépatocarcinome prend alors tout son sens puisqu'il pourrait éventuellement

permettre le développement de nouveaux traceurs glucidiques. Cela ouvrirait ainsi la possibilité d'augmenter le contraste de détection, mais également de pouvoir repérer les niches tumorales de CHC à un stade plus précoce de la maladie.

Le CHC se présente donc comme une maladie hétérogène tant du point vue morphologique que fonctionnel comme nous venons de le détailler. L'étude du métabolisme au sein de ces cellules va alors constituer un enjeu important, expliquant ainsi l'objet des expériences que nous allons détailler dans la prochaine partie.

II) Objectifs de la thèse

L'objectif général de ce travail de doctorat a été d'étudier le métabolisme des cellules issues d'hépatocarcinome et particulièrement leur capacité à pouvoir s'adapter métaboliquement aux changements du microenvironnement tumoral, en comparant leur métabolisme à celui de cellules non tumorales. Pour ce faire et tenter de répondre au mieux à cette notion de plasticité métabolique, nous avons eu recours à des systèmes *in vitro* et *in vivo* pour caractériser la morphologie et les fonctions de ces cellules.

1) Caractérisation de l'ampleur des modifications métaboliques s'opérant au sein des hépatocytes normaux au cours du processus d'isolation. L'extrême activité et plasticité métabolique affichée par les hépatocytes nous a amené d'abord à mieux caractériser les changements survenant dans ces cellules durant le processus d'isolation et de culture cellulaire. Ceci nous est apparu essentiel dans la mesure où nous désirions utiliser ces cellules comme étant des contrôles dans les expériences portant sur les cellules de CHC. Provenant de souris saines C57/bl6 et disposant ainsi de cette forte activité métabolique en condition physiologique, ces cellules auraient été de parfaites candidates dans la comparaison avec des hépatocytes tumoraux, si des modifications relevant de leur métabolisme n'avaient pas été détectées au fil des différentes étapes de leur isolation. L'objectif de ce premier travail a donc été de mesurer par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), l'ampleur et l'étendue des altérations métaboliques se produisant au sein des hépatocytes, du foie *in situ* jusqu'aux cellules cultivées *in vitro* pendant 48 heures.

2) Caractérisation des fonctions métaboliques et des caractéristiques néoplasiques de la lignée Dt81Hepa1-6 et de la lignée mère Hepa1-6. La lignée Dt81Hepa1-6 démontrant une tumorigénicité accrue à la fois en conditions *in vitro* et *in vivo*, nous avons voulu caractériser métaboliquement le phénotype fonctionnel de cette lignée par comparaison à la lignée mère Hepa1-6. Nous avons aussi évalué sa capacité à s'adapter à différents

microenvironnements et finalement déterminé les effets d'un inhibiteur de la glycolyse sur la survie et la prolifération de cette lignée cellulaire.

3) Mise en évidence des voies métaboliques les plus sollicitées dans le maintien du potentiel tumorigénique des cellules issues de CHC. Comme nous avons pu démontrer que les cellules de CHC avaient de fait une grande facilité à pouvoir reprogrammer leur métabolisme selon le microenvironnement, nous avons voulu identifier les voies métaboliques essentielles à leur tumorigénicité dans des conditions de culture cellulaire et de tumeur intrahépatique. Nous avons finalement recherché l'impact de ces voies métaboliques sur le pronostic de patients souffrant de CHC.

III) Résultats

Caractérisation de l'ampleur des modifications métaboliques s'opérant au sein des hépatocytes normaux au cours du processus d'isolation.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'objectif de ce premier travail a donc consisté à mieux caractériser les altérations métaboliques se produisant au sein des hépatocytes normaux pendant et après le processus d'isolation, du foie *in situ* jusqu'aux hépatocytes maintenus en culture pendant 48 heures. Aucune étude métabolomique n'avait jusqu'ici pu démontrer l'étendue et l'ampleur de ces modifications. Cette caractérisation métabolique hépatocytaire s'inscrivait normalement dans le cadre de notre projet sur métabolisme des cellules tumorales. Ceci nous aura permis en effet une éventuelle comparaison entre les cellules primaires et les cellules de CHC, mais aussi de nous éclairer d'avantage sur l'utilisation et la validation du modèle de culture primaire, modèle couramment utilisé au cours de ces 20-30 dernières années.

Article 1 "From *in vivo* to *in vitro*: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation." PLoS One. 2017 Dec 28;12(12)

Contribution des différents auteurs

SC : Conception du projet, réalisation des expériences et rédaction de l'article

VAR : Réalisation de certaines expériences et correction de l'article

PL : Correction de l'article

MB : Conception, supervision du projet, rédaction et correction de l'article

**From *in vivo* to *in vitro*: major metabolic alterations take place in
hepatocytes during and following isolation**

Shamir Cassim¹, Valérie-Ann Raymond¹, Pascal Lapierre^{1,2} and Marc Bilodeau^{1,2*}

¹ Laboratoire d'hépatologie cellulaire, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada.

² Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

* Corresponding author

Email: marc.bilodeau@umontreal.ca (MB)

Abstract

The liver plays a key role in maintaining physiological homeostasis and hepatocytes are largely responsible for this. The use of isolated primary hepatocytes has become an essential tool for the study of nutrient physiology, xenobiotic metabolism and several liver pathologies. Since hepatocytes are removed from their normal environment, the isolation procedure and *in vitro* culture of primary hepatocytes is partially known to induce undesired metabolic changes. We aimed to perform a thorough metabolic profiling of primary cells before, during and after isolation using state-of-the-art techniques. Extensive metabolite measurements using HPLC were performed *in situ* in the liver, during hepatocyte isolation using the two-step collagenase perfusion method and during *in vitro* cell culture for up to 48 hours. Assessment of mitochondrial respiratory capacity and ATP-linked respiration of isolated primary hepatocytes was performed using extracellular flux analysis. Primary hepatocytes displayed a drastic decrease in antioxidative-related metabolites (NADPH, NADP, GSH and GSSG) during the isolation procedure when compared to the *in situ* liver ($P < 0.001$). Parallel assessment of citric acid cycle activity showed a significant decrease of up to 95% in Acetyl-CoA, Isocitrate/Citrate ratio, Succinate, Fumarate and Malate in comparison to the *in situ* liver ($P < 0.001$). While the levels of several cellular energetic metabolites such as Adenosine, AMP, ADP and ATP were found to be progressively reduced during the isolation procedure and cell culture ($P < 0.001$), higher ATP/ADP ratio and energy charge level were observed when primary cells were cultured *in vitro* compared to the *in situ* liver ($P < 0.05$). In addition, a significant decrease in the respiratory capacity occurred after 24 hours in culture. Interestingly, this was not associated with a significant modification of ATP-linked respiration. In

conclusion, major metabolic alterations occur immediately after hepatocytes are removed from the liver. These changes persist or increase during *in vitro* culture. These observations need to be taken into account when using primary hepatocytes for the study of metabolism or liver physiopathology.

Introduction

The liver is central to the homeostatic maintenance of physiological metabolism. Among its many functions, it is involved in the metabolism of carbohydrates with gluconeogenesis, glycogenolysis and glycogenesis and in the metabolism of lipids with the synthesis and degradation of triglycerides, of cholesterol into bile acids as well as in lipoprotein synthesis. It also ensures the synthesis of a large fraction of plasma proteins such as albumin and apolipoproteins. Hepatocytes are the cells chiefly responsible for these functions and they are known to constitute approximately 70% of all cells present in the normal liver [1]. Hepatocytes have an extremely active intrinsic metabolic activity that can be modulated to adapt to physiological needs [2].

However much remains to be understood about the physiology and metabolism of hepatocytes. Therefore, several experimental models for the study of hepatocyte physiology, pharmacokinetics of drugs and pathogenesis of liver diseases have been developed and many of those rely on the use of isolated primary hepatocytes [3-5]. These experimental models, used in both fundamental research and pharmacological studies, were developed based on the assumption that isolated hepatocytes shared similar metabolic profiles as the ones of hepatocytes *in situ* [6]. However, the original descriptions of these similarities were made decades ago based on data acquired using tools and techniques available at the time [7-10].

Several studies that use primary hepatocytes use novel and sensitive techniques such as extracellular flux analysis to study the metabolism of isolated hepatocytes and conclude or propose hypotheses based on these results without knowing if the state of these primary hepatocytes reflect the state of hepatocytes *in vivo* [11, 12]. Therefore, a thorough

characterization of the effect of isolation and *in vitro* culture on primary hepatocytes using the latest techniques is of the utmost importance if we are to continue to use isolated hepatocytes as models of hepatocytes *in vivo*.

Herein, we found that major metabolic alterations occur during both hepatocyte isolation and *in vitro* culture compared to liver cells *in situ*. These modifications include decreased antioxidative metabolite levels, decreased citric acid cycle activity, progressive reduction in cellular energetic metabolites and significant alteration in respiratory capacity. This metabolic plasticity of hepatocytes according to their environment needs to be taken in consideration in future *in vitro* studies using these cells as a substitute to *in vivo* liver studies.

Materials and Methods

Animals and reagents

Male C57BL/6 mice (20g) were bought from Charles River (Saint-Constant, Qc, Canada) and fed *ad libidum* with normal chow. Animals were monitored daily for their appearance, state of hydration, behavior and clinical signs. Animals were sacrificed by exsanguination under anesthesia (induction with inhaled 4% Isoflurane and maintenance with inhaled 2% Isoflurane). All procedures were performed in accordance with the Canadian Council on animal care and approved by the *Comité institutionnel de protection animale (CIPA) du CHUM* (Canada). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Leibovitz's L-15 medium, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin/Streptomycin were from Life technologies (Burlington, ON, Canada). Type IV Collagenase was from Worthington-Biochemicals inc. (Lakewood, NJ). Unless stated otherwise, all other products and chemicals were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO).

Hepatocyte Isolation and Culture Conditions

Hepatocytes were isolated from adult male C57BL/6 mice using the two-step collagenase perfusion method as previously described [13]. Briefly, under anesthesia, the peritoneal cavity was opened, and the liver was perfused *in situ* via the portal vein for 4 minutes at 37°C with Calcium-Magnesium(CM)-free HEPES buffer and for 7 minutes with CM-free HEPES buffer containing Type IV collagenase (35mg/100ml) and CaCl₂ [10 mM]. Cells were used only if cell viability was above 80% as assessed by trypan blue exclusion. After three centrifugations (44g for 2min) in Leibovitz's L-15 washing media supplemented with 0,2% bovine albumin, cells were seeded onto plastic petri dishes (26000cells/cm²). Cells were cultured in high

glucose (25mM) DMEM supplemented with 10% FBS. All culture media contained penicillin (100units/ml) and streptomycin (100µg/ml). After cell attachment for 2 hours, the medium was replaced by fresh medium supplemented with 10% FBS. Primary cultures were kept in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for the indicated times: 0, 2, 4, 6, 24 and 48 hours following attachment.

HPLC analysis

Metabolites were assessed using HPLC (Agilent 1200 HPLC system, Agilent technologies Canada inc., Mississauga, ON, Canada) by the Metabolomics Core Facility of CRCHUM (Canada). Metabolic measurements were performed before, during and after the isolation procedure: 1) *In situ* liver; 2) following HEPES perfusion; 3) after collagenase perfusion; 4) following washes in Leibovitz's L-15 and 5) during *in vitro* culture between 0 and 48 hours after cell attachment. For *ex vivo* sample preparations, at each indicated steps and time points, liver samples or hepatocyte cell culture dishes (after removing culture medium) were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until HPLC analyses. Glutamate levels were not measured for cells in culture due to the inclusion of L-glutamine in the culture medium. To compare metabolite quantification between hepatocytes in liver tissue and hepatocytes in cell culture, samples were normalized based on protein content using the Bradford method [14]. Nucleotide content is expressed in picomole per mg of proteins and the Energy Charge (EC) was calculated using this formula: $([ATP] + \frac{1}{2}[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$.

Seahorse XF24 Extracellular Flux Analysis

Cells (26000/cm²) were seeded on the XF24 microplate in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS for the indicated times. According to manufacturer's recommended protocol for Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer, cell medium was replaced by conditional medium (culture medium without FBS and sodium bicarbonate) and incubated without CO₂ for one hour before completion of sensor cartridge calibration. Oxygen consumption rate (OCR) was measured in a Seahorse XF24 Flux Analyzer (Agilent technologies Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). Measurements were performed after injection of two compounds affecting bioenergetics: 10 mM glucose and 2 μM oligomycin. OCR was measured upon injection of glucose and ATP-linked respiration was calculated by measuring the decrease in OCR upon injection of oligomycin [15-17]. The measure of respiratory function could not be carried out reliably for the early steps of isolation (*In situ*, HEPES and Collagenase conditions) since glucose and oligomycin used in these assays did not adequately diffuse in hepatocytes maintained in tissue state (data not shown). Upon completion of the Seahorse XF24 Flux Analysis, cells were lysed to calculate the protein concentration. Results were normalized based on the total amount of proteins for each well.

Statistical analysis

All data represent the values of at least three independent experiments from groups of 3 animals. Data are expressed as means ± standard error (SEM) and were analyzed with GraphPad Prism7 software (GraphPad Software, CA). Differences between groups were analyzed using the analysis of variance (ANOVA) test with Tukey or Dunnet post-test and student *t*-test. A *P* value below 0.05 was considered significant (*=*P*<0.05, **=*P*<0.01, ***=*P*<0.001). All statistical tests were two sided.

Results

Primary hepatocytes show decreased levels of antioxidative stress-related metabolites following isolation and in vitro culture.

Primary hepatocytes displayed an important change in their antioxidative stress-related metabolites as shown by NADPH and NADP levels of isolated cells compared to *in situ* liver ($P<0.001$) (Fig. 1A-B). This decrease of up to 95% was observed during the earliest steps of the isolation procedure, collagenase perfusion, where both NADPH and NADP contents are reduced significantly ($P<0.05$) but also during cell culture from 0 to 48 hours where levels are further reduced ($P<0.001$). Interestingly, NADPH/NADP ratio also showed a significant decrease in all the different conditions in comparison to the *in situ* liver ($P<0.01$) (Suppl. Fig. 1B). The levels of reduced and oxidized forms of glutathione, GSH and GSSG, were also affected by isolation and culture. Levels of GSH and GSSG were reduced by up to 85% during collagenase perfusion and washing steps ($P<0.001$) but also during *in vitro* cell culture, ($P<0.001$ and $P<0.05$, respectively) (Fig. 1C-D). Moreover, primary cultured hepatocytes showed a reduction of 79% of the GSH/GSSG ratio compared to the *in situ* liver ($P<0.05$) whereas the HEPES, collagenase and washing steps did not lead to any significant modification of this ratio (Fig. S1C). In parallel, glutamate levels were also measured during the isolation procedure since it is one of the main precursor of glutathione. A lower content of glutamate was observed after the collagenase ($P<0.05$) and washing step ($P<0.01$) when compared to the *in situ* liver (Suppl. Fig. 1A).

Levels of citric acid cycle metabolites are significantly altered during isolation and culture.

The citric acid cycle or Krebs cycle is central to the energy metabolism of hepatocytes: it is possible that the alteration in the microenvironment of hepatocytes induced by cell isolation and culture result in changes in this crucial pathway. Acetyl-CoA levels were indeed decreased by 94% when primary hepatocytes were cultured *in vitro* as early as 2 hours after cell attachment ($P<0.05$) (Fig. 2A). The isocitrate/citrate ratio was decreased by up to 68% during the isolation procedure and remained low throughout the cell culture ($P<0.001$) (Fig. 2B). Succinate displayed reduced levels not only during the isolation process (collagenase ($P<0.05$) and washing step ($P<0.01$)) but also during *in vitro* culture ($P<0.05$ and $P<0.001$) (Fig. 2C). When Fumarate and Malate quantifications were performed, the same metabolic profile was observed: a strong reduction ranging from 57% to 98% of their abundance in the early steps of isolation in both HEPES ($P<0.001$), collagenase ($P<0.001$) and during washes ($P<0.001$) and low levels of both metabolites throughout *in vitro* culture ($P<0.001$) (Fig. 2D-E). Although no significant differences were found in NADH content (Suppl. Fig. 2A), NAD levels were strongly reduced during collagenase perfusion ($P<0.001$) and cell culture, by up to 60% and 93%, respectively ($P<0.001$) (Suppl. Fig. 2B). This led to significant increases in NADH/NAD ratio during these steps (Suppl. Fig. 2C).

Primary hepatocyte isolation and cell culture alters the level of cellular energetic metabolites.

The above changes in levels of citric acid cycle intermediates suggest that cellular energetic metabolites could also be altered in isolated and cultured hepatocytes. To characterize this possible alteration, the levels of Adenosine were measured: a significant decrease ranging from 79% to 99% was observed from the last isolation steps but most significantly during cell culture ($P<0.01$) (Fig. 3A). AMP, ADP and ATP levels were also measured and like

Adenosine these three energetic metabolites showed a drastic reduction in the early stages of the isolation process such as the collagenase ($P<0.001$) and washing ($P<0.001$) steps but mostly during cell culture ($P<0.001$) (Fig. 3B-C-D). In addition, the ATP/ADP ratio and energy charge levels were at least ten times greater during *in vitro* culture in comparison to the *in situ* liver (Fig. 3E-F).

Cell culture impacts the mitochondrial respiratory capacity of primary hepatocytes.

Glucose-stimulated respiration assessment of cultured hepatocytes showed that cells in culture for 2, 4 and 6 hours had a greater mitochondrial respiration rate than freshly seeded hepatocytes (0h) (respectively $P<0.01$, $P<0.05$ and $P<0.01$) (Fig. 4A). Interestingly, hepatocytes maintained in culture over an extended period, such as 24 and 48 hours, showed a significant drop in mitochondrial respiratory capacity when compared to those cultured for 2, 4 and 6 hours ($P<0.05$) (Fig. 4A). However, ATP-linked respiration, a measure of the ability of cells to generate ATP through mitochondrial respiration, did not show any significant alteration during cell culture (Fig. 4B).

Discussion

Primary liver cells have been the object of study from both a morphological and a functional aspect for several years. It is by the end of the 1970s that the use of primary hepatocytes in liver research became mainstream notably thanks to Bissell and Seglen who revolutionized both the procedure for their isolation and their *in vitro* culture [10, 18]. These technical innovations paved the way for novel *in vitro* studies such as those on the hepatic metabolism of drugs and hepatotoxicity [7]. Cultured hepatocytes were shown to maintain their crucial functions, such as respiration [8], lipid synthesis [9], albumin synthesis [10], and the ability to modulate their glycogen storage following insulin/glucagon stimulation [10]. Thus, isolated hepatocytes have been considered an excellent model to study liver metabolism and liver diseases *ex vivo*. However, considering the metabolic plasticity of hepatocytes *in vivo*, it is conceivable that isolated hepatocytes could modulate their metabolic activity based on their surrounding environment and therefore, differ metabolically from hepatocytes *in situ*.

Some metabolic alterations of primary hepatocytes have been reported, including a decrease in mitochondrial respiration according to culture conditions [8], ATP generation [10] or a lower level of total glutathione [19]. Our study aimed at defining the metabolic profile of hepatocytes from *in situ* to *in vitro* during their isolation using modern techniques with the aims of evaluating the extent of the metabolic changes that occurs at each steps of the isolation procedure and during *in vitro* culture.

In this study, we chose *in vitro* culture conditions based on what is frequently used in studies with primary hepatocytes. To limit the introduction of any bias from prolonged *in vitro* culture, hepatocytes were cultured for a maximum of 48 hours without addition of

glucocorticoids. Dexamethasone has been used in cell culture medium to improve and prolong the differentiation status of serum-containing cell cultures [20-23]. Dexamethasone can be useful for the long-term preservation of hepatocyte-specific functions, polyglonal hepatocyte morphology, as well as the structural integrity of cytoplasmic membranes, especially bile canaliculi-like structures [22, 23]. However, its use would have been a confounding factor for the analysis of metabolic changes occurring in hepatocytes kept in culture when compared to those found *in situ*. Primary hepatocytes were also directly plated on plastic petri dishes since this is the most frequently used method in studies with short-term *in vitro* culture of primary hepatocytes. However, matrix overlays (layers of gelled extracellular matrix proteins with collagen I and matrigel), 3-dimensional culture systems or improved air-liquid interface have been shown to dramatically influence the morphological development, cellular and metabolic functions, and survival of hepatocytes in culture [24-26].

The results herein show that there is an important alteration in antioxidative metabolites levels that occurs during and following the isolation process. A significant decrease in NADPH, NADP, GSH and GSSG levels were observed at each step of the isolation procedure compared to the *in situ* liver. Since oxidative stress can occur during the isolation step, especially during the collagenase step perfusion, it could affect the antioxidative status of cells [27]. These metabolic changes occurred early in the isolation process and were sustained during cell culture. Previously, minor modifications in the antioxidative status of isolated primary hepatocytes have been reported but modifications to NADPH and NADP were not assessed and levels of GSH and GSSG were found to fluctuate but remain within normal range during culture based on their measurement using an enzymatic assay [28].

In agreement with the decrease microsomal activity of cytochrome P450 enzymes previously described during isolation [29], our results show significantly reduced levels of NADPH, a molecule essential for the reducing activity of cytochrome P450 and the biodegradation of xenobiotics [30, 31]. Interestingly, previous studies had shown a significant decrease in catalase activity, an enzyme that protects cells from reactive oxygen species (ROS), in freshly isolated rat hepatocytes in comparison to liver homogenates [27, 32].

The citric acid or tricarboxylic acid (TCA) cycle, is a major metabolic pathway; its primary function is to oxidize acetyl groups to recover energy through electron transfer, subsequently allowing the generation of ATP by the mitochondrial respiratory chain [33]. Moreover, the TCA cycle occurs at the junction of several other major metabolic pathways such as gluconeogenesis and the oxidation of fatty acids [33]. Surprisingly, decreased levels of the citric acid cycle intermediates acetyl-CoA, isocitrate/Citrate, succinate, fumarate and malate were observed during the isolation and *in vitro* culture. These metabolic alterations during the various steps of isolation could therefore have a significant impact on primary hepatocyte functionality and especially, their metabolic phenotype. Therefore, attention should be paid to studies that previously focused on TCA activity in isolated primary hepatocytes because it may not perfectly reflect the state of hepatocytes *in situ* [34, 35].

ATP is a crucial energy molecule and while it is important for cellular function in general, it is also important for the homeostatic properties specific to liver cells [36]. Although a constant decrease in AMP, ADP and ATP was observed during the different steps, a significant increase in the ATP/ADP ratio and energy charge was also noted during cell culture. While this energy charge ratio is based on small absolute values and could be influenced by small fluctuations in absolute levels of AMP, ADP or ATP, it is stable over time and significantly

higher than the energy charge of liver cells *in situ*. These observations could be explained by the fact that hepatocytes maintained in culture for 24 to 48 hours gradually lose their intrinsic characteristics of intense metabolic activity thereby decreasing their respiratory rate or, simply by the fact that an increased mitochondrial respiratory capacity possibly take place within these cells. However, an increased respiratory capacity would be contrary to previous observations whereby a reduction in oxygen uptake is observed in hepatocytes maintained in culture media [8]. In addition, reactivation of respiratory capacity would likely have a positive impact on ATP content as opposed to the decreased levels we observed.

The analysis of respiratory function by extracellular flux analysis allowed us to detect a significant increase in oxygen consumption rate by the hepatocytes maintained in culture for 2 to 6 hours, compared to baseline ($t=0$). However, hepatocytes cultured for 24 to 48 hours showed a significant decrease in their respiratory capacity in comparison to the earlier timepoints. On the other hand, their ATP-linked respiration did not significantly vary during isolation or cell culture. Therefore, the possibility that the increased ATP/ADP ratio and energy charge is the consequence of an increased respiratory capacity is not confirmed by our observations since hepatocytes significantly decreased their oxygen consumption rate at 24 and 48 hours, this even though ATP-linked respiration levels remained stable. Thus, we believe that hepatocytes that remain in culture for longer periods of time, will see their intense metabolic activity being gradually reduced to a state reminiscent of a quiescent cell.

Interestingly, studies on the dedifferentiation of primary hepatocytes in culture found early transcriptomic modifications in these cells as early as four hours after plating [26, 37, 38]. These include genes related to the TCA cycle, mitochondrial dysfunction and oxidative phosphorylation [37]. These transcriptomic modifications led to proteomic modifications 24

hours after plating and these modifications were driven by non-coding microRNAs (miRNAs) [37]. These studies reveal how hepatocyte can respond rapidly to changing conditions and studies that rely on primary hepatocyte should ensure, either through metabolic assays as described herein or assessment of dedifferentiation through transcriptomic or proteomic assays[26, 37, 38] that primary hepatocyte maintain their phenotype for the duration of their *in vitro* studies.

In conclusion, isolation of primary hepatocytes leads to a decrease in antioxidative-related metabolites, citric acid cycle intermediates and also several energetic metabolites. A greater ATP/ADP ratio and energy charge level and a decrease in the respiratory capacity are observed when these cells are cultured *in vitro* but ATP-linked respiration remains unchanged. Some of these metabolic alterations occur immediately after hepatocytes are removed from the liver and persist during *in vitro* culture under standard conditions. These metabolic changes will need to be taken into account in studies that use primary hepatocytes and assess metabolic parameters.

Funding support

M. Bilodeau is Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair at the Université de Montréal.

Acknowledgements

We thank Erik Joly and Julien Lamontagne of the metabolomic core facility of the CRCHUM for performing the metabolomic measurements by HPLC.

References

1. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010;18(2):175-89. doi: 10.1016/j.devcel.2010.01.011. PubMed PMID: 20159590.
2. Alberti KG, Johnston DG, Piniewska-Hulas M, Whittaker J. Disturbances of metabolic homeostasis is liver disease. *Acta Med Port*. 1981;(Suppl 2):35-47. PubMed PMID: 7015794.
3. Tuschl G, Lauer B, Mueller SO. Primary hepatocytes as a model to analyze species-specific toxicity and drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(7):855-70. doi: 10.1517/17425255.4.7.855. PubMed PMID: 18624675.
4. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol*. 2010;640:1-40. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_1. PubMed PMID: 20645044.
5. Hu C, Li L. In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration. *Protein Cell*. 2015;6(8):562-74. doi: 10.1007/s13238-015-0180-2. PubMed PMID: 26088193; PubMed Central PMCID: PMC4506286.
6. LaBrecque DR, Howard RB. The preparation and characterization of intact isolated parenchymal cells from rat liver. *Methods Cell Biol*. 1976;14:327-40. PubMed PMID: 1004231.
7. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab*. 2003;4(4):292-312. PubMed PMID: 12871046.
8. Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol*. 1967;35(3):675-84. PubMed PMID: 4294245; PubMed Central PMCID: PMC2107157.
9. Jezyk PF, Liberti JP. Metabolic activities of mechanically and enzymatically prepared rat liver cells. *Arch Biochem Biophys*. 1969;134(2):442-9. PubMed PMID: 4311183.
10. Bissell DM, Hammaker LE, Meyer UA. Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies. *J Cell Biol*. 1973;59(3):722-34. PubMed PMID: 4357460; PubMed Central PMCID: PMC2109108.
11. Holmuhamedov EL, Czerny C, Beeson CC, Lemasters JJ. Ethanol suppresses ureagenesis in rat hepatocytes: role of acetaldehyde. *J Biol Chem*. 2012;287(10):7692-700. doi: 10.1074/jbc.M111.293399. PubMed PMID: 22228763; PubMed Central PMCID: PMC3293599.
12. Oosterveer MH, Matakic C, Yamamoto H, Harach T, Moullan N, van Dijk TH, et al. LRH-1-dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2817-26. doi: 10.1172/JCI62368. PubMed PMID: 22772466; PubMed Central PMCID: PMC3408738.
13. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Bilodeau M. Role of EGF receptor tyrosine kinase activity in antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280(6):G1360-9. PubMed PMID: 11352831.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54. PubMed PMID: 942051.

15. Robson-Doucette CA, Sultan S, Allister EM, Wikstrom JD, Koshkin V, Bhattacharjee A, et al. Beta-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion. *Diabetes*. 2011;60(11):2710-9. doi: 10.2337/db11-0132. PubMed PMID: 21984579; PubMed Central PMCID: PMC3198081.
16. Wikstrom JD, Sereda SB, Stiles L, Elorza A, Allister EM, Neilson A, et al. A novel high-throughput assay for islet respiration reveals uncoupling of rodent and human islets. *PLoS One*. 2012;7(5):e33023. doi: 10.1371/journal.pone.0033023. PubMed PMID: 22606219; PubMed Central PMCID: PMC3351473.
17. Mugabo Y, Zhao S, Lamontagne J, Al-Mass A, Peyot ML, Corkey BE, et al. Metabolic fate of glucose and candidate signaling and excess-fuel detoxification pathways in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2017;292(18):7407-22. doi: 10.1074/jbc.M116.763060. PubMed PMID: 28280244; PubMed Central PMCID: PMC5418042.
18. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976;13:29-83. PubMed PMID: 177845.
19. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Denizeau F, Bilodeau M. Resistance to Fas-induced apoptosis in hepatocytes: role of GSH depletion by cell isolation and culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283(3):G709-18. doi: 10.1152/ajpgi.00013.2002. PubMed PMID: 12181187.
20. Lambiotte M, Vorbrod A, Benedetti EL. Expression of differentiation of rat foetal hepatocytes in cellular culture under the action of glucocorticoids: appearance of bile canaliculi. *Cell Differ*. 1973;2(1):43-53. PubMed PMID: 4273096.
21. Kletzien RF, Pariza MW, Becker JE, Potter VR. A "permissive" effect of dexamethasone on the glucagon induction of amino acid transport in cultured hepatocytes. *Nature*. 1975;256(5512):46-7. PubMed PMID: 166322.
22. Laishes BA, Williams GM. Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology. *In Vitro*. 1976;12(12):821-32. PubMed PMID: 1035898.
23. Yamada S, Otto PS, Kennedy DL, Whayne TF, Jr. The effects of dexamethasone on metabolic activity of hepatocytes in primary monolayer culture. *In Vitro*. 1980;16(7):559-70. PubMed PMID: 6105997.
24. Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog*. 1991;7(3):237-45. doi: 10.1021/bp00009a007. PubMed PMID: 1367596.
25. Vorrink SU, Ullah S, Schmidt S, Nandania J, Velagapudi V, Beck O, et al. Endogenous and xenobiotic metabolic stability of primary human hepatocytes in long-term 3D spheroid cultures revealed by a combination of targeted and untargeted metabolomics. *FASEB J*. 2017;31(6):2696-708. doi: 10.1096/fj.201601375R. PubMed PMID: 28264975; PubMed Central PMCID: PMC5434660.
26. Rowe C, Gerrard DT, Jenkins R, Berry A, Durkin K, Sundstrom L, et al. Proteome-wide analyses of human hepatocytes during differentiation and dedifferentiation. *Hepatology*. 2013;58(2):799-809. doi: 10.1002/hep.26414. PubMed PMID: 23526496; PubMed Central PMCID: PMC3842115.
27. Duval DL, Sieg DJ, Billings RE. Regulation of hepatic nitric oxide synthase by reactive oxygen intermediates and glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(2):699-706. doi: 10.1006/abbi.1995.1093. PubMed PMID: 7532384.

28. Richert L, Binda D, Hamilton G, Viollon-Abadie C, Alexandre E, Bigot-Lasserre D, et al. Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2002;16(1):89-99. PubMed PMID: 11812644.
29. LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A, Hochman JH. Cultured rat hepatocytes. *Pharm Biotechnol*. 1996;8:121-59. PubMed PMID: 8791809.
30. Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, Cheng Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1245-51. doi: 10.1038/nprot.2009.121. PubMed PMID: 19661994; PubMed Central PMCID: PMC3843963.
31. Cederbaum AI. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol*. 2015;4:60-73. doi: 10.1016/j.redox.2014.11.008. PubMed PMID: 25498968; PubMed Central PMCID: PMC3843963.
32. Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Fariss MW. Glutathione-dependent regulation of nitric oxide production in isolated rat hepatocyte suspensions. *Antioxid Redox Signal*. 2000;2(4):767-77. doi: 10.1089/ars.2000.2.4-767. PubMed PMID: 11213481.
33. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30409-12. doi: 10.1074/jbc.R200006200. PubMed PMID: 12087111.
34. Henly DC, Berry MN. Relationship between the stimulation of citric acid cycle oxidation and the stimulation of fatty acid esterification and inhibition of ketogenesis by lactate in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1092(3):277-83. PubMed PMID: 1828700.
35. Bessman SP, Mohan C, Zaidise I. Intracellular site of insulin action: mitochondrial Krebs cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(14):5067-70. PubMed PMID: 3523482; PubMed Central PMCID: PMC323891.
36. Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA*. 1999;282(17):1659-64. PubMed PMID: 10553793.
37. Lauschke VM, Vorrink SU, Moro SM, Rezayee F, Nordling A, Hendriks DF, et al. Massive rearrangements of cellular MicroRNA signatures are key drivers of hepatocyte dedifferentiation. *Hepatology*. 2016;64(5):1743-56. doi: 10.1002/hep.28780. PubMed PMID: 27532775.
38. Chen Y, Wong PP, Sjeklocha L, Steer CJ, Sahin MB. Mature hepatocytes exhibit unexpected plasticity by direct dedifferentiation into liver progenitor cells in culture. *Hepatology*. 2012;55(2):563-74. doi: 10.1002/hep.24712. PubMed PMID: 21953633; PubMed Central PMCID: PMC3268884.

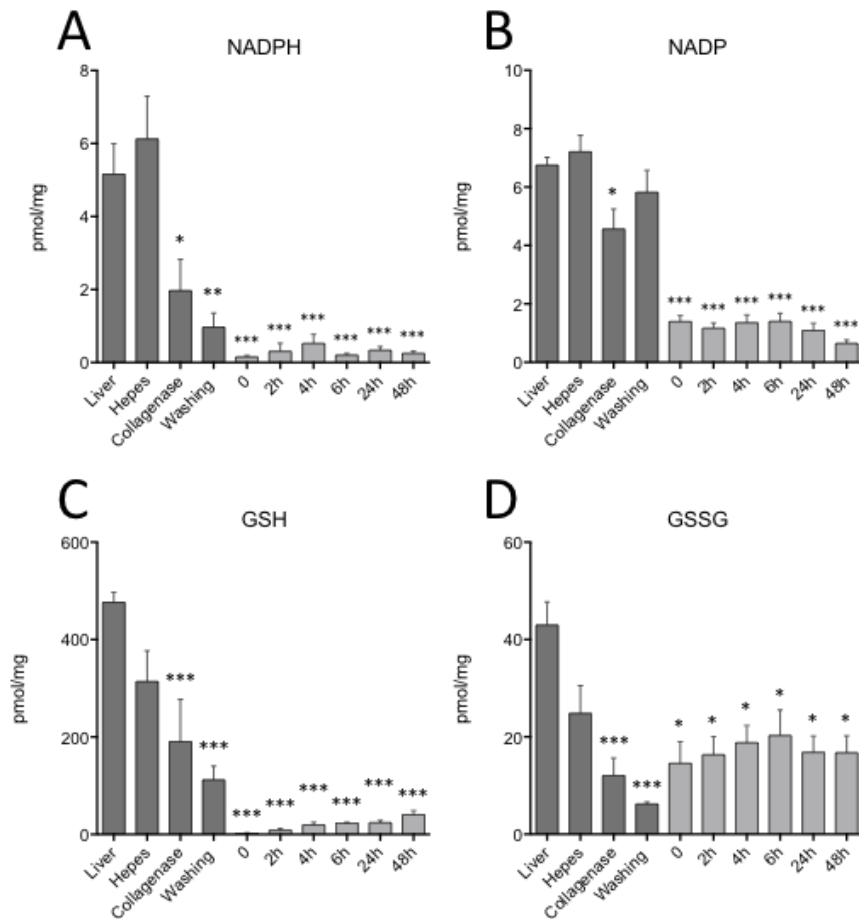


Figure 1: Decrease in antioxidative stress-related metabolites during the isolation procedure and cell culture. Evaluation of total intracellular NADPH, NADP, GSH and GSSG levels during the hepatocyte isolation procedure from *in situ* to the washing step in L-15 media and during cell culture over a period of up to 48 hours (A-D). Values are \pm SEM of 3 independent experiments. Asterisks indicate significance when compared to the *in situ* liver (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

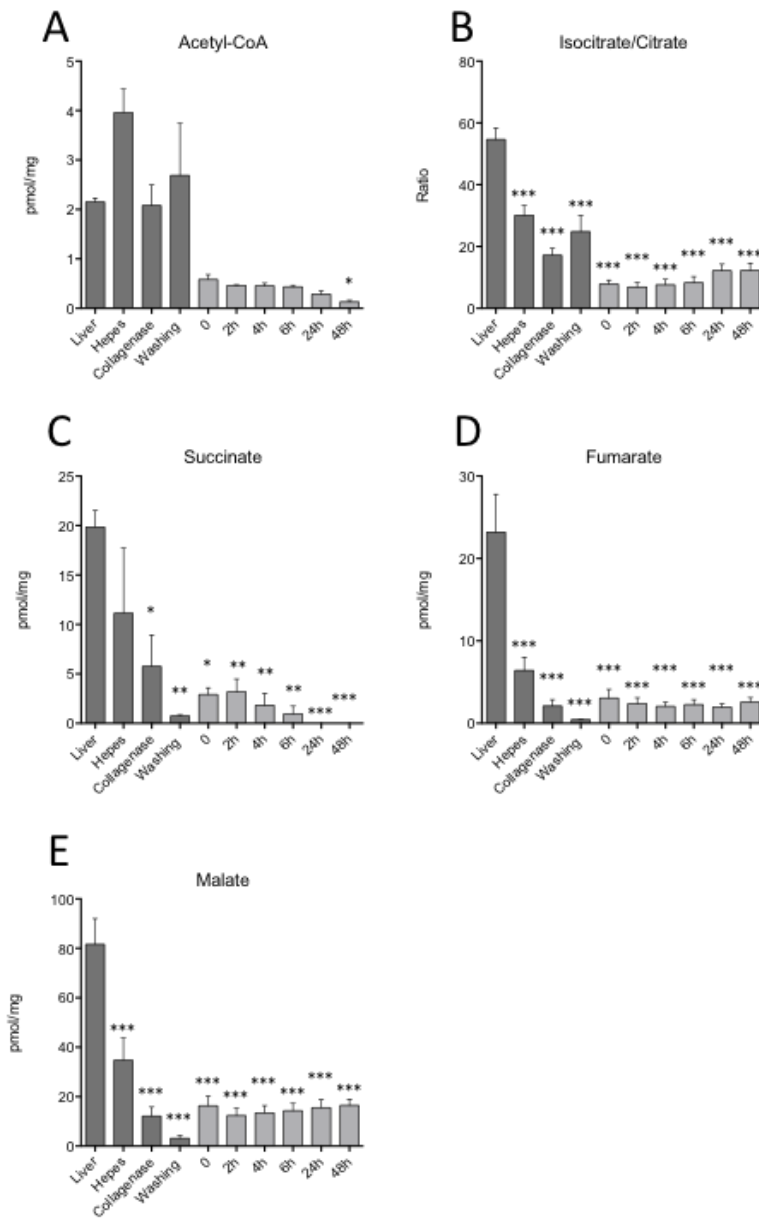


Figure 2: Reduction in TCA metabolites during the isolation procedure and cell culture.

Assessment of intracellular Acetyl-CoA, Isocitrate/Citrate ratio, Succinate, Fumarate and Malate during the hepatocyte isolation procedure and cell culture for a period of up to 48 hours (A-E). Values are \pm SEM of 3 independent experiments. Asterisks indicate significance when compared to the *in situ* liver (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

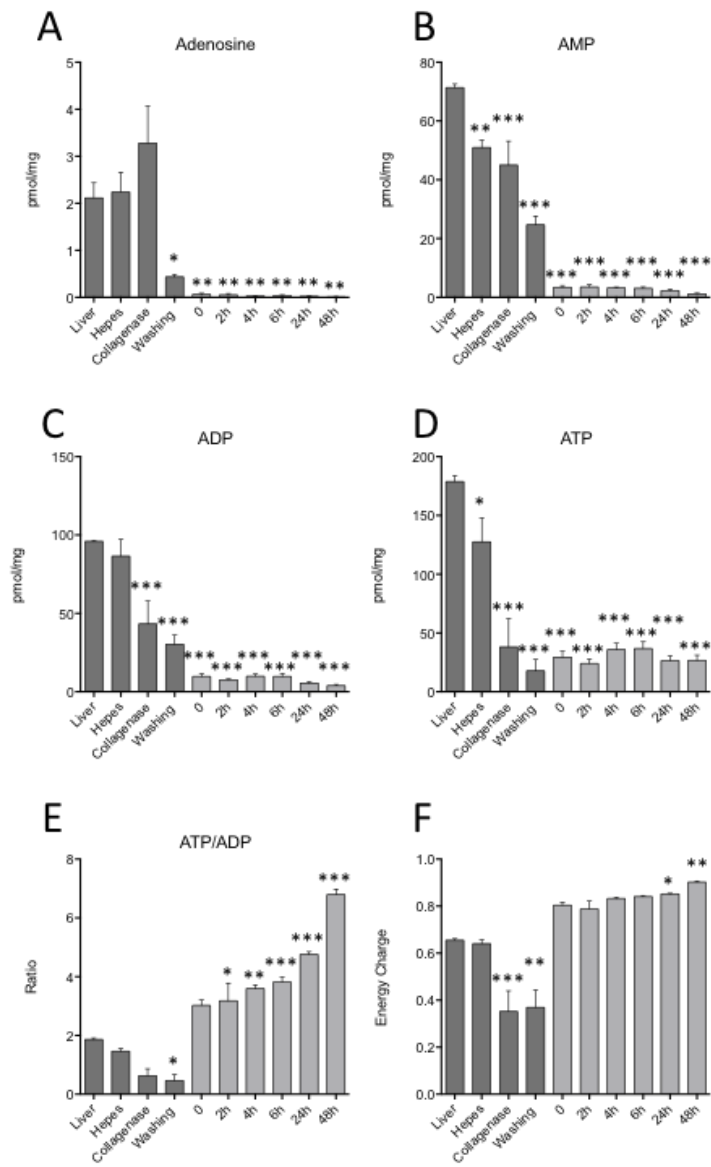


Figure 3: Reduced levels of cellular energetic metabolites during isolation and cell culture. Quantification of total intracellular hepatic Adenosine, AMP, ADP, ATP and ATP/ADP ratio during the isolation procedure and cell culture for a period of up to 48 hours (A-E). Calculated energy charge values during isolation and *in vitro* culture (F). Values are \pm SEM of 3 independent experiments. Asterisks indicate significance when compared to the *in situ* liver (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

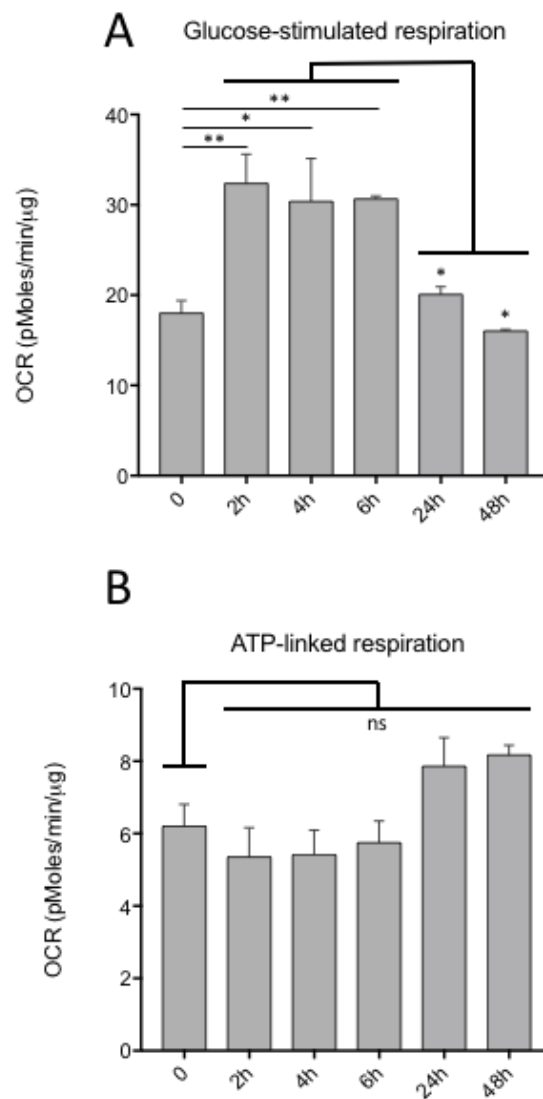
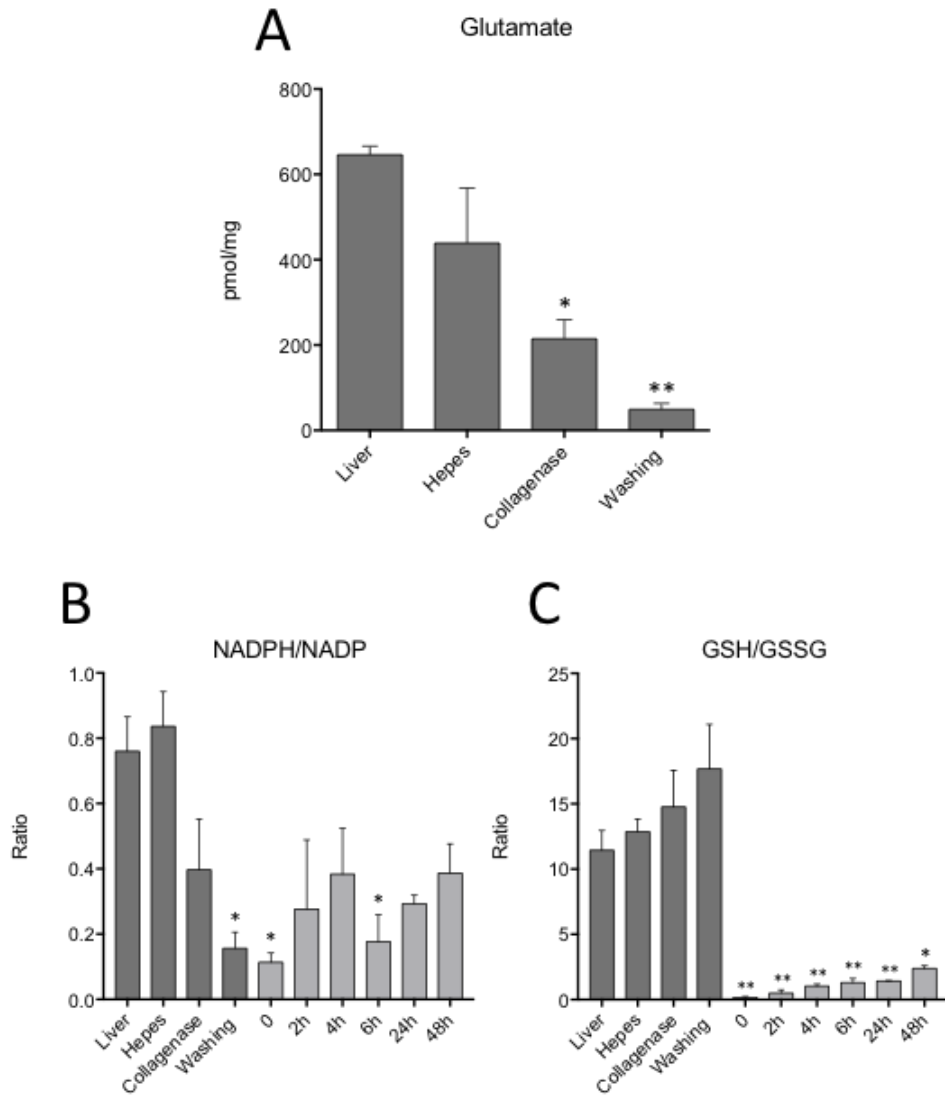
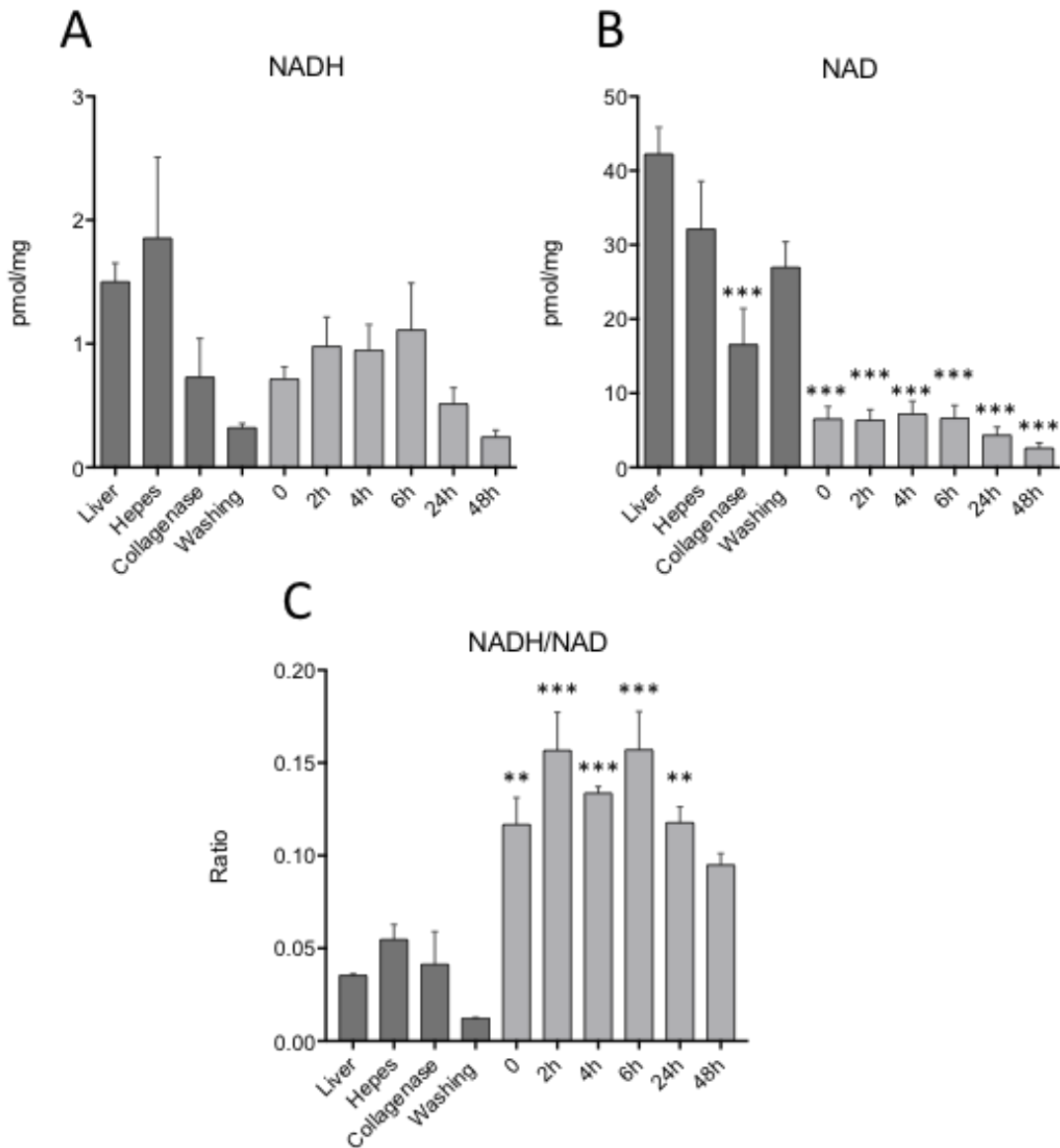


Figure 4: Primary hepatocyte cultures show a significant decrease in mitochondrial oxygen consumption rate but stable mitochondrial ATP production. Extracellular flux analysis was used to measure the mitochondrial function of primary hepatocytes cultured for 0 to 48 hours. A) Mitochondrial respiration (OCR levels) after glucose stimulation (10 mM). B) Assessment of ATP-linked respiration following the addition of oligomycin (2 μ M). Values are \pm SEM of 3 independent experiments (* P <0.05, ** P <0.01; # P <0.05 when compared to primary hepatocytes cultured for 2,4 and 6 hours).



Supplementary Figure 1: Reduced levels of glutamate and NADPH/NADP and GSH/GSSG ratios during primary hepatocyte isolation and cell culture. Quantification of total intracellular hepatic glutamate during the isolation of primary hepatocytes (A). NADPH/NADP and GSH/GSSG ratios during isolation and culture for a period of up to 48 hours (B-C). Values are \pm SEM of 3 independent experiments. Asterisks indicate significance when compared to the *in situ* liver (* P <0.05, ** P <0.01).



Supplementary Figure 2: Levels of NADH and NAD during isolation and cell culture.

Quantification of total intracellular hepatic NADH, NAD and calculated NADH/NAD ratio during the isolation procedure and cell culture for a period of up to 48 hours (A-C). Values are \pm SEM of 3 independent experiments. Asterisks indicate significance when compared to the *in situ* liver (** P <0.01, *** P <0.001).

Caractérisation des fonctions métaboliques et des caractéristiques néoplasiques de la lignée Dt81Hepa1-6 et de la lignée-mère Hepa1-6.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'objectif de ce second travail a donc été de caractériser métaboliquement et fonctionnellement la Dt81Hepa1-6, afin vérifier si sa capacité à pouvoir reprogrammer son métabolisme selon un microenvironnement fluctuant pouvait être à l'origine de sa plus grande tumorigénicité *in vitro* et *in vivo*. Pour ce faire et par le biais de différentes approches expérimentales, une caractérisation poussée des cellules de la lignée Dt81Hepa1-6 a été réalisée par comparaison à leur lignée mère Hepa1-6, notamment en faisant varier les concentrations en glucose extracellulaires ou en utilisant des drogues ciblant spécifiquement certaines voies métaboliques comme l'étomoxir et l'oxamate de sodium. Outre la mise en évidence de la plasticité métabolique affichée par certaines cellules tumorales, cette étude démontre également à quel point la pression de sélection est de mise et comment cette dernière peut influencer la morphologie et les fonctions de la lignée Dt81Hepa1-6, en parfaite opposition à ce qui est retrouvé dans la lignée mère Hepa1-6.

Article 2 "Metabolic reprogramming enables hepatocarcinoma cells to efficiently adapt and survive to a nutrient-restricted microenvironment." Cell Cycle. 2018 Apr 10:1-40

Contribution des différents auteurs

SC : Conception du projet, réalisation des expériences et rédaction de l'article

VAR : Réalisation de certaines expériences et correction de l'article

LDA: Réalisation de certaines expériences

PL : Correction de l'article

MB : Conception, supervision du projet, rédaction et correction de l'article

Metabolic reprogramming enables hepatocarcinoma cells to efficiently adapt and survive to a nutrient-restricted microenvironment

Authors: Shamir Cassim¹, Valérie-Ann Raymond¹, Layla Dehbidi-Assadzadeh¹, Pascal Lapierre^{1,2} and Marc Bilodeau^{1,2}.

Affiliation: ¹ Laboratoire d'hépatologie cellulaire, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada. ² Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Corresponding author: Marc Bilodeau, MD, CRCHUM, 900 Saint-Denis, Tour Viger, Pavillon R, Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9. (Fax: (514) 412-7314; Tel: (514)-890-8000 #35749; email: marc.bilodeau@umontreal.ca)

Conflict of interest: The authors declare no potential conflicts of interest.

Financial Disclosure: The authors have no financial interest or benefit to disclose.

Running title: HCC cells adaptation through metabolic reprogramming

Keywords: Liver, hepatocellular carcinoma, glucose, metabolism, microenvironment

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a metabolically heterogeneous cancer and the use of glucose by HCC cells could impact their tumorigenicity. Dt81Hepa1-6 cells display enhanced tumorigenicity compared to parental Hepa1-6 cells. This increased tumorigenicity could be explained by an enhanced capacity to adapt metabolically to more restrictive microenvironments. When cultured at high glucose concentrations, Dt81Hepa1-6 displayed an increased ability to uptake glucose ($P<0.001$), increased expression of 9 glycolytic genes, greater GTP and ATP ($P<0.001$), increased expression of 7 fatty acid synthesis-related genes ($P<0.01$) and higher levels of Acetyl-CoA, Citrate and Malonyl-CoA ($P<0.05$). Under glucose-restricted conditions, Dt81Hepa1-6 used their stored fatty acids with increased expression of fatty acid oxidation-related genes ($P<0.01$), decreased triglyceride content ($P<0.05$) and higher levels of GTP and ATP ($P<0.01$) leading to improved proliferation ($P<0.05$). Inhibition of lactate dehydrogenase and aerobic glycolysis with sodium oxamate led to decreased expression of glycolytic genes, reduced lactate, GTP and ATP levels ($P<0.01$), increased cell doubling time ($P<0.001$) and reduced fatty acid synthesis. When combined with cisplatin, this inhibition led to lower cell viability and proliferation ($P<0.05$). This metabolic-induced tumorigenicity was also reflected in human Huh7 by a higher glucose uptake and proliferative capacity in comparison to HepG2 cells ($P<0.05$). In HCC patients, increased expression of *Glut-1*, *Hexokinase II* and *Lactate dehydrogenase* by tumors correlated with poor survival ($P=2.47E^{-5}$, $P=0.016$ and $P=6.58E^{-5}$). In conclusion, HCC tumorigenicity can stem from a metabolic plasticity allowing them to thrive in a broader range of glucose concentrations. In HCC, combining glycolytic inhibitors with conventional chemotherapy could lead to improved treatment efficacy.

Introduction

The study of cancer cellular metabolism has led to several key findings on the impact of energy availability for cell proliferation and the importance of metabolic reprogramming in neoplastic cells [1, 2]. In 1956, Otto Warburg reported for the first time aerobic glycolysis in cancer cells [3]. In contrast to normally differentiated cells that rely primarily on mitochondrial oxidative phosphorylation, cancer cells rely mainly on aerobic glycolysis to generate energy [4]. Furthermore, cancer cells can show a selective growth advantage over normal cells through their increased ability to efficiently uptake glucose, sometimes resulting in an extremely aggressive phenotype. This metabolic feature has been observed in several types of cancer including breast [5], colorectal [6] and hepatocellular carcinoma (HCC) [7].

HCC is the fifth leading cause of cancer in the world and the third leading cause of death by cancer [8]. Primary liver cancer develops in the vast majority of cases on a cirrhotic background [9]. Its most frequent causes are hepatitis B and C virus infections, alcohol-induced cirrhosis and nonalcoholic steatohepatitis [10, 11]. Liver cirrhosis is characterized by extensive modifications of hepatic lobular structures with abundant accumulation of extracellular matrix [12]. This altered liver structure is thought to have a significant impact on normal hepatocytes but also on HCC tumor microenvironment and cancer cell metabolism.

Recent evidences have shown that solid tumors are exposed to various stresses such as low nutrient availability, energy depletion, hypoxia and oxidative stress during excessive growth and proliferation [1, 13]. Therefore, owing to the heterogeneous distribution of oxygen, glucose and other nutrients within the tumor, neoplastic cells have to adapt to a nutritionally-

restricted microenvironment. This capacity is likely to confer cancer cells a metabolic advantage over normal cells. The mechanisms that enable cancer cells to cope with this environment and sustain growth and proliferation remain poorly understood. Given the heterogeneous nature of a tumor microenvironment, especially in HCC that develops within a cirrhotic liver, adaptation mechanisms must exist in order to maintain energy and metabolic homeostasis [14, 15].

Herein, we found that HCC Dt81Hepa1-6 cells, a highly tumorigenic derivative of Hepa1-6 cells [16], displayed higher metabolic plasticity than their less tumorigenic parental cell line. This metabolic versatility manifested itself through a higher rate of aerobic glycolysis in presence of glucose, but also by their ability to degrade and use fatty acids for energy in glucose-deficient microenvironments. Inhibiting *Lactate dehydrogenase (Ldh)* and the *Warburg effect* via sodium oxamate confirmed this metabolic advantage, with a drastic decrease in high-energy metabolite production and increased cell doubling time. Furthermore, the combination of sodium oxamate and cisplatin had an additive effect on reducing the viability and proliferation of Dt81Hepa1-6 cells. This metabolic-induced tumorigenicity was also noticed in human tumorigenic HCC cells, where we not only found that increased glucose uptake capacity of Huh7 was intrinsically associated with their degree of tumorigenicity but also that increased expression of glycolytic genes (*Glut-1*, *Hexokinase II (Hk II)* and *Ldh*) by tumor cells from HCC patients correlated with poor survival. Therefore, the tumorigenicity of HCC cells can stem from their ability to metabolically adapt to a nutrient-poor microenvironment. Given that increased expression of glycolytic enzymes also correlates with poor prognosis in HCC patients, new drugs that target these metabolic enzymes could be used to improve or potentiate current treatment regimen.

Materials and methods

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin/Streptomycin, fluorescent glucose analog 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-dioxol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose (2-NBDG), TRIZOL[®] reagent, MitoTracker[®] Red CMXRos and MitoTracker[®] Red CM-H₂XRos were purchased from Invitrogen (Burlington, On, Canada). QuantiTect reverse transcription kit and QuantiTect SYBR Green PCR Kit were purchased from QIAGEN (Toronto, On, Canada). Unless stated otherwise, all other products were from Sigma-Aldrich (Oakville, On, Canada).

Cell lines and culture conditions

Authenticated Hepa1-6 murine, Huh7 and HepG2 human hepatoma cell lines were bought from the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). Dt81Hepa1-6 cell line was derived from Hepa1-6 cells through *in vivo* passage in C57BL/6 mice [16]. All cultures were maintained at 37°C and 5% CO₂. Cell lines were cultured in 0, 5.5 and 25 mM glucose DMEM supplemented with 10% FBS. All culture medium contained penicillin [100units/ml] and streptomycin [100µg/ml]. If not stated otherwise, cells were seeded at 0.125M cells/cm² for Hepa1-6, 0.25M cells/cm² for Dt81Hepa1-6, 0.0625M cells/cm² for Huh7 and 0.185M cells/cm² for HepG2 to achieve 70% of cell confluence [16]. Etomoxir [40 µM] and sodium oxamate [100 mM] were used to inhibit fatty acid oxidation and glycolysis respectively [17, 18].

Glucose uptake assay.

Following 30 minutes of glucose starvation, Hepa1-6, Dt81Hepa1-6, Huh7 and Hep G2 cells were incubated for 45 minutes in presence of a fluorescent glucose analog, 2-NBDG, at increasing concentrations [0 to 100 μ M]. All subsequent steps were performed in the dark. The 2-NBDG reaction was stopped by washing cells with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Glucose uptake was then quantified by measuring the fluorescent intensity of cells on a FACS BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada). Data analysis was performed using FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, Or, USA). Acquisition of fluorescent images was performed using a Leica Epifluorescence Microscope SP5 platform (Leica Microsystems, Richmond Hill, On, Canada). Quantitative analysis of 2-NBDG-labeled Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells was done using Fiji software (ImageJ, NIH, USA).

qPCR gene expression analysis.

mRNA was isolated with TRIZOL (Invitrogen Burlington, On, Canada) according to the manufacturer instructions. 250ng of mRNA was subjected to reverse transcription using the QuantiTect Reverse Transcription Kit. Quantitative PCR amplifications were performed using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit in a Rotor-Gene 3000 Real-Time Thermal Cycler (Corbett Research, Sydney, Australia). For each gene tested, 35 amplification cycles at 59°C (annealing) were used. The primer sequences are summarized in supplementary Table 1. Relative gene expression was evaluated using 3 reference genes: *HPRT1*, *Ppia* and *H2afz* [19]. Relative gene expression was calculated using the delta delta CT method [20].

HPLC analysis

All metabolites described in this study were assessed using HPLC (Agilent 1200 HPLC system, Agilent Technologies Canada Inc., Mississauga, On, Canada) by the Metabolomic Core Facility of CRCHUM. Metabolic measurements were done on Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells after a 48-hr incubation in each indicated culture conditions. Culture cells (after removal of cell culture medium) were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until HPLC analysis. HPLC peak areas were used for quantification of identified metabolites. Total protein content (Bradford protein assay [21]), was used to normalize the metabolite quantification.

Triglyceride assay

Cellular triglyceride (TG) content was measured on Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells after 48 hours of incubation in each indicated culture conditions. Cells were harvested on ice by scraping and washed with ice cold PBS. Samples were frozen over carbonated ice and kept at -80°C. Lipids were extracted overnight from cell pellets (4°C) with chloroform:methanol (2:1) (Folch extraction) [22]. Organic phases (chloroform) were transferred into new glass tubes and dried under nitrogen (N-Evap). Lipids were resuspended in isopropanol and TG were measured enzymatically with the GPO-Trinder kit. Triolein, dissolved in chloroform-methanol and processed similarly to samples, was used as standard. To normalize the TG content, total protein content of all samples was measured using the Bradford method.

Cell doubling time

Cells were seeded at 0.09M cells/cm² for Hepa1-6, 0.175M cells/cm² for Dt81Hepa1-6, 0.045M cells/cm² for Huh7 and 0.132M cells/cm² for HepG2 in DMEM supplemented with 10% FBS. Once cells became adherent, the medium was changed for serum-free DMEM for overnight culture. Media was finally changed with fresh DMEM supplemented with 10% FBS (time 0) and cell concentration was evaluated every 24 hours for 72 hours for each indicated culture condition. At each time point, cells were fixed, stained with crystal violet [0.05% w/v in 200mM MOPS buffer, pH6.0] and read through a Synergy HT plate reader at 570nm wavelength. Cell doubling time was evaluated using the last square fitting exponential method (Roth V. 2006, <http://www.doubling-time.com/compute.php>).

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) proliferation and viability assay

Cells were seeded and cultured overnight. Media was then replaced with fresh DMEM (0 or 25 mM glucose) supplemented with 10% FBS. According to the experiments and the culture conditions, Etomoxir [40μM], cisplatin [25μg/mL], sodium oxamate [100 mM] or sodium oxamate+cisplatin were added for periods ranging from 0 to 72 hours. For each time point, media was removed and cells were incubated for 3 hours with 1mL of MTT solution [2mg/mL] in DMEM. Media was removed and dimethylsulfoxide (1mL) was added and plates

gently shaken at room temperature for one hour. Plates were then read through a Synergy HT-spectrofluorometer plate reader at 495nm wavelength.

Mitochondrial staining

Mitochondrial membrane potential was assessed using MitoTracker[®] Red CMXRos fluorescent dye which accumulates in mitochondria depending on membrane potential [23]. Mitochondrial reactive oxygen species production was determined using MitoTracker[®] Red CM-H₂XRos for which fluorescence reflects the oxidative state of live cells [24]. Sodium oxamate-treated Dt81Hepa1-6 cells were seeded in a 12-well plate and left at 37°C for 48 hours. Control cells (unstained and unstained+sodium oxamate) were processed in parallel. After 48 hours, cells were incubated with prewarmed MitoTracker[®] staining solution (diluted in medium to a final concentration of 200 nM for MitoTracker[®] Red CMXRos and 1 μM for MitoTracker[®] Red CM-H₂XRos) for 30 minutes at 37°C. All subsequent steps were performed in the dark. The MitoTracker[®] reaction was stopped by washing cells with ice-cold PBS. Mitochondrial staining was then quantified by measuring the fluorescent intensity of cells in a FACS BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada). Data analyses were performed using FlowJo v10.

HCC Patient Survival Analysis

Survival analysis was performed using the PROGgene V2 Prognostic Database (<http://watson.compbio.iupui.edu/chirayu/proggene/database/?url=proggene>) as described [25,

26]. Each analysis used “liver cancer” as cancer type and “death” as survival outcome. The gene expression data was extracted from *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) database. The data were not adjusted for clinical status. The survival status was analyzed for expression levels of *Glut-1*, *Hexokinase II (Hk II)* and *Lactate Dehydrogenase (Ldh)*. To analyze the prognostic value of these genes, the Kaplan-Meier method was used to estimate survival curves and the log-rank test was used to compare survival curves between high and low *Glut-1*, *Hk II* and *Ldh* expression level groups.

Statistical analysis

All data represent the values of at least three independent experiments. Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) and analyzed with GraphPad Prism7 software. Differences between groups were analyzed using the analysis of variance (ANOVA) test, student *t*-test and Tukey post-test for multiple comparisons. A *P* value below 0.05 was considered significant (*= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$). All statistical tests were two sided.

Results

Tumorigenic HCC cells meet their energy requirements through increased aerobic glycolysis

To assess if the enhanced tumorigenicity displayed by Dt81Hepa1-6 cells could be explained by an increased glucose-related metabolic activity [16], the rate of glucose cell uptake (a prerequisite for increased glucose utilization) was evaluated using the 2-NBDG fluorescent glucose analog. At all doses of 2-NBDG tested [0 to 100 μ M], Dt81Hepa1-6 showed increased capacity to uptake glucose compared to Hepa1-6 ($P<0.0001$) (Fig. 1A). At a fixed 2-NBDG concentration [50 μ M], Dt81Hepa1-6 cells maintained the ability to uptake larger amounts of glucose irrespective of the extracellular glucose concentrations in comparison to Hepa1-6 ($P=0.004$) (Fig. 1B). Similarly, fluorescent labelling of Dt81Hepa1-6 exposed to a fixed dose of 2-NBDG revealed a greater avidity for glucose ($P<0.01$) (Fig. 1C). This observation was supported by a significantly higher level of expression of mRNA for glucose transporters *Glut-1* and *Glut-2* found in Dt81Hepa1-6 cells (Suppl. Fig. 1 A-B). Next, in order to evaluate the activity of glycolytic enzymes, we quantified the mRNA expression level of several glycolytic enzymes. In presence of high glucose concentration, Dt81Hepa1-6 cells displayed increased mRNA expression levels of *Hexokinase II (Hk II)* ($P<0.001$), *Glucose-6-phosphate isomerase (Gpi)* ($P<0.001$), *Phosphofructokinase liver (Pfk1)* ($P<0.001$), *Enolase (Eno)* ($P<0.001$), *Pyruvate kinase liver (Pkl)* ($P<0.001$) and *Lactate dehydrogenase (Ldh)* ($P<0.001$) (Fig. 1D) compared to Hepa1-6. In addition, the expression level of *Carbohydrate response element-binding protein (Chrebp)*, which is known to play a fundamental role in the induction

of aerobic glycolysis in cancer cells, was also found to be elevated in Dt81Hepa1-6 cells in comparison to Hepa1-6 ($P<0.01$) (Suppl. Fig. 1 C).

The *Warburg effect* observed in tumorigenic HCC cells leads to a change in the energetic profile

In order to assess if the higher aerobic glycolysis rate displayed by tumorigenic Dt81Hepa1-6 cells led to a significant increase in the production of high energy phosphate substrates, quantification of AMP, ADP, ATP and GMP, GDP, GTP was performed under high glucose concentration. Dt81Hepa1-6 had lower contents of AMP and ADP while displaying greater ATP production than parental Hepa1-6 cells (respectively $P<0.05$, $P<0.05$, and $P<0.001$) (Fig. 1E). In parallel, GMP and GDP levels were also reduced ($P<0.05$) whereas GTP levels were approximately 40 times greater than in Hepa1-6 cells ($P<0.001$) (Fig. 1F). Therefore, the increased glucose uptake and aerobic glycolysis observed in Dt81Hepa1-6 cells was associated with higher levels of high-energy metabolites.

Metabolic plasticity of tumorigenic HCC cells enables them to modulate the synthesis and oxidation of fatty acids in response to changes in extracellular glucose concentrations

Fatty acids are essential for cancer cell growth and survival [27]. Since fatty acid biosynthesis could potentially impact the tumorigenic phenotype of Dt81Hepa1-6 cells, we evaluated the expression level of several enzymes involved in this process. In presence of 25 mM glucose

DMEM, Dt81Hepa1-6 cells had increased mRNA expression levels of *Citrate synthase (CS)* ($P<0.001$), *Citrate carrier (CiC)* ($P<0.001$), *ATP citrate lyase (Acl)* ($P<0.001$), *Acetyl-CoA carboxylase (Acc)* ($P<0.01$), *Fatty acid synthase (Fasn)* ($P<0.01$), *Glycerol phosphate acyltransferase (Gpat)* ($P<0.01$) and *Acylglycerol phosphate acyltransferase (Agpat)* ($P<0.01$) in comparison to Hepa1-6 cells (Fig. 2A). Quantification of fatty acid biosynthesis-related metabolites also revealed significantly higher levels of Acetyl-CoA ($P<0.01$), Citrate ($P<0.05$) and Malonyl-CoA ($P<0.01$) in Dt81Hepa1-6 compared to parental Hepa1-6 cells (Fig. 2B). Therefore, Dt81Hepa1-6 cells have an increased ability to synthesize fatty acids in presence of high extracellular glucose concentrations. Since fatty acids can be assembled into triglycerides (TG), and that TG can release energy when broken down, we then investigated the ability of HCC cells to oxidize their stored fatty acids particularly in low extracellular glucose concentrations. To do so, 3 different concentrations of glucose were tested (0, 5.5 and 25 mM glucose DMEM), to reflect the fluctuating nutrient microenvironment found *in vivo*. mRNA analysis of genes involved in fatty acid oxidation revealed increased gene expression of *Acyl-CoA dehydrogenase long-chain (AcadL)* ($P<0.001$), *Acyl-CoA dehydrogenase medium-chain (AcadM)* ($P<0.001$) and *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1 α)* ($P<0.05$) in Dt81Hepa1-6 cells cultured in low extracellular glucose concentrations (Fig. 3A-C). Parental Hepa1-6 cells that have reduced tumorigenicity did not induce the expression of fatty acid oxidation genes in any of the glucose concentrations tested (Fig. 3A-C). Furthermore, we observed significantly lower levels of intracellular TG concentrations in Dt81Hepa1-6 cells when cultured in low extracellular glucose in comparison to cells cultured in a glucose-enriched microenvironment ($P<0.05$) (Fig. 3D). No significant

variation of TG content was found in Hepa1-6 cells which were at levels similar to the ones observed in Dt81Hepa1-6 cells at low glucose concentrations (Fig. 3D).

Fatty acid oxidation under glucose restriction improves the viability and ability of HCC cells to proliferate

Functional tests were performed to assess if fatty acid oxidation under glucose-restricted conditions was important for the functional phenotype of HCC cells. The level of cell proliferation of tumorigenic Dt81Hepa1-6 cells was higher in low glucose concentrations in comparison to parental Hepa1-6 (cell doubling time 57.9 ± 17.8 vs 135 ± 28.7 hours; $P < 0.01$) (Fig. 4A). Increasing the concentration of extracellular glucose significantly improved the ability of Hepa1-6 cells to proliferate whereas Dt81Hepa1-6 displayed similar rates of proliferation irrespective of glucose concentrations (Fig. 4A). This was associated with higher levels of GTP and ATP in Dt81Hepa1-6 cells in glucose-free DMEM compared to Hepa1-6 cells (Fig. 4B). Etomoxir, an inhibitor of fatty acid oxidation, was used to assess if the improved proliferative capacity of Dt81Hepa1-6 cells in reduced extracellular glucose conditions stemmed from their ability to metabolize fatty acids. Using the MTT proliferation and viability assay, Etomoxir-treated and untreated Dt81Hepa1-6 cells displayed similar viability and proliferation at baseline (Fig. 4C). However, as time progressed, inhibition of fatty acid oxidation prevented cell proliferation and, after 72 hours, the viability of Etomoxir-treated cells was significantly reduced compared to baseline ($P < 0.05$) (Fig. 4C). In contrast, untreated Dt81Hepa1-6 cells showed significantly increased proliferation and viability after 72 hours compared to baseline ($P < 0.001$) (Fig. 4C). To ensure that the decreased proliferation

and viability of Dt81Hepa1-6 in reduced glucose conditions was not due to an inherent toxicity of Etomoxir, assessment of Etomoxir-treated Dt81Hepa1-6 cell viability and proliferation was performed under high glucose conditions. Both Etomoxir-treated and untreated cells showed similar viability and proliferation after 72 hours compared to baseline (Suppl. Fig. 2).

Targeting the *Warburg effect* prevents metabolic reprogramming of tumorigenic HCC cells

To confirm the greater metabolic plasticity of Dt81Hepa1-6 cells, sodium oxamate, a known inhibitor of glycolysis, was used. Previous studies reported a dose-dependent response to sodium oxamate by tumor cell and found that maximal inhibition of glycolysis occurred at a concentration of 100 mM [18, 28]. Preliminary experiments also found a significant decrease in Lactate dehydrogenase (LDH) activity after treatment with 100 mM sodium oxamate in Dt81Hepa1-6 cells cultured at the highest glucose level (data not shown). Thus, 100 mM sodium oxamate was used thereafter to inhibit glycolysis. First, quantification of expression levels of mRNA of genes coding for several glycolytic enzymes was performed in sodium oxamate-treated and untreated Dt81Hepa1-6 cells in presence of 25 mM glucose DMEM. Sodium oxamate-treated Dt81Hepa1-6 had reduced mRNA expression levels of *Hk II* ($P<0.001$), *Gpi* ($P<0.001$), *Pfkl* ($P<0.01$), *Eno* ($P<0.001$) and *Ldh* ($P<0.01$) (Fig. 5A) when compared to untreated Dt81Hepa1-6. No significant variation was found in the expression of *Pkl* (Fig. 5A). In parallel, the levels of Lactate, GTP and ATP were all lower in sodium oxamate-treated Dt81Hepa1-6 cells ($P<0.01$) (Fig. 5B). Since we found that fatty acid

metabolism enabled Dt81Hepa1-6 cells to efficiently proliferate and survive in low glucose concentrations, we then assessed if exposure to sodium oxamate could affect the ability of Dt81Hepa1-6 to synthesize fatty acids. In sodium oxamate-treated Dt81Hepa1-6, the mRNA expression levels of 5 fatty acid-related genes *CS*, *CiC*, *Acly*, *Acc* and *Fasn* were significantly reduced ($P<0.001$) (Fig. 5C). Dt81Hepa1-6 cells also had lower contents of Malonyl-CoA following sodium oxamate treatment ($P<0.05$) (Fig. 5D). Measurement of intracellular TG concentrations confirmed the inhibitory effect of sodium oxamate on the capacity of these cells to switch to fatty acid biosynthesis at high extracellular glucose concentrations (25 mM) (0.18 ± 0.02 vs 0.28 ± 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ protein; $P<0.05$) (Fig. 5E). Moreover, in sodium oxamate-treated Dt81Hepa1-6, decreased levels of several TCA metabolites including Citrate ($P<0.001$), α -ketoglutarate ($P<0.05$), Succinate ($P<0.001$), Fumarate ($P<0.01$) and Malate ($P<0.001$) was observed (Suppl. Fig. 3) when compared to untreated Dt81Hepa1-6.

Inhibition of aerobic glycolysis reduces the viability and proliferation of tumorigenic HCC cells and potentiates cisplatin effect

Since the inhibition of aerobic glycolysis by sodium oxamate has the capacity to modify the metabolic profile of Dt81Hepa1-6 cells, we then assessed if it could also alter the tumorigenicity of these cells. Inhibition of aerobic glycolysis afforded by sodium oxamate significantly increased the cell doubling time of Dt81Hepa1-6 cells (92.9 ± 15.1 vs 32.1 ± 2.1 hours; $P<0.001$) (Fig. 6A). We also assessed the mitochondrial function of these cells by measuring the mitochondrial membrane potential and production of reactive oxygen species

(ROS) in sodium oxamate-treated conditions since a strong correlation has been observed between mitochondrial dysfunction and tumor development/progression [29, 30, 31, 32]. Sodium oxamate treatment significantly increased the mitochondrial membrane potential and ROS levels (respectively 25530 ± 967 vs 9702 ± 661 MFI; $P < 0.001$ and 12398 ± 825 vs 4697 ± 497 MFI; $P < 0.001$) (Fig. 6B-C). Based on these findings, we postulated that the inhibition of aerobic glycolysis could potentiate the chemotherapeutic effect of cisplatin on these cells. The inhibition of aerobic glycolysis with sodium oxamate by itself resulted in a reduction of cell viability and proliferation by approximately 11% (Fig. 6D). Dt81Hepa1-6 cells are partially resistant to cisplatin (25 $\mu\text{g/mL}$) when used alone with approximately a 46% reduction in viability and proliferation (Fig. 6D). However, when cells were exposed to a combination of cisplatin and sodium oxamate, we observed an additive effect with a reduction in viability and proliferation of approximately 67% (Fig. 6D).

Increased glucose uptake correlates with the enhanced tumorigenicity of human HCC Huh7 cells

To confirm if glucose metabolism is also a tumorigenic feature of human HCC cells, we evaluated the rate of glucose uptake of human HCC Huh7 and Hep G2 cells using 2-NBDG. At all doses of 2-NBDG tested [0 to 100 μM], Huh7 displayed higher capacity to uptake glucose compared to Hep G2 ($P = 0.0381$) (Fig. 7A). Moreover, cell doubling time analysis indicated that the time required for human Huh7 to divide was significantly reduced in

comparison to that of Hep G2 cells (28 ± 2.07 vs 33.93 ± 2.01 hours respectively for Huh7 and Hep G2; $P < 0.05$) (Fig. 7B).

High expression of *Glut-1*, *Hexokinase II* and *Lactate dehydrogenase* by tumors from patients with HCC correlates with poor survival

The increased glucose uptake displayed by tumorigenic human Huh7 cells correlates with an enhanced capacity of these cells to proliferate and, in Dt81Hepa1-6 cells, targeting glycolytic genes by sodium oxamate significantly reduced their tumorigenicity. Therefore, to assess if the overexpression of glycolytic genes could be associated with an increased tumorigenicity and mortality in patients with HCC, we examined the association between *Glut-1*, *Hexokinase II* (*Hk II*) and *Lactate dehydrogenase* (*Ldh*) mRNA expressions and patients' survival using publicly-available expression data sets from 293 HCC patients [25, 26]. HCC patients with high *Glut-1*, *Hk II* and *Ldh* tumoral gene expressions have significantly decreased survival when compared to patients with low *Glut-1*, *Hk II* and *Ldh* expressions (Fig. 8) ((n=293) respectively $P=2.47E^{-5}$, $P=0.016$ and $P=6.58E^{-5}$).

Discussion

The first tumor cell-specific metabolic alteration was discovered by Otto Warburg who observed increased glycolysis and lactate production by these cells. This was true even if tumors were maintained in conditions of high oxygen tension [3]. Although the *Warburg effect* is not universally applicable to all cancers [33], enhanced glucose uptake in tumor cells has revolutionized medical imaging by the use of the glucose analog 2-(¹⁸F)-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) for positron emission tomography (PET). FDG-PET has a sensitivity and specificity of more than 90% for the detection of metastases for most forms of epithelial cancers [34]. However, in the case of HCC, the detection of tumor foci is rendered difficult by the intense intrinsic metabolic activity of normal hepatocytes under basal physiological conditions [35, 36]. Therefore, understanding energy metabolism in HCC cells is of the utmost importance both to understand how these cells can survive and grow but also to identify HCC-specific metabolites that could be used to differentiate between healthy and tumor cell in imaging techniques. The first step is to understand why HCC cancer cells have an increased glucose consumption and aerobic glycolysis and how it is important for tumor growth.

Dt81Hepa1-6 HCC cells show enhanced tumorigenicity *in vivo* compared to parental Hepa1-6 cell line, with more frequent and rapid tumor development [16]. We hypothesized that the greater tumorigenicity observed with Dt81Hepa1-6 cells could originate from a modification in their glucose metabolism. Dt81Hepa1-6 HCC cells show a greater ability to uptake extracellular glucose compared to Hepa1-6. In addition, they show strong evidence of increased aerobic glycolysis as demonstrated by the increased mRNA expression of glycolytic

genes and increased high-energy metabolite contents. Therefore, tumorigenicity appears to be closely associated with the glycolytic activity of these cells. There are several reasons why enhanced glucose uptake and glycolytic ATP generation would constitute an advantage for tumor growth: 1) this gives a survival advantage for cancer cells in conditions of fluctuating oxygen tension that would otherwise be lethal for cells that rely mainly on the electron transport chain to generate ATP [37]; 2) by generating lactic acid, tumor cells can promote tumor invasion via the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 [38]; 3) tumors can metabolize glucose through the pentose phosphate pathway to help glycolytic cancer cells to meet their anabolic demands and combat oxidative stress [39, 40]; and 4) these cells could also reorient intermediates from the glycolytic pathways toward anabolic reactions that are often overexpressed in cancer [27, 41].

In recent years, a growing body of evidence points towards mitochondria as having a critical function in cancer cells that, combined with the *Warburg effect*, could lead to metabolic reprogramming [27, 29]. In contrast to the original Warburg hypothesis, many cancers maintain active mitochondria and flux through the electron transport chain to provide sufficient levels of ATP [31, 32]. Cancer cells can also rely on the activation of alternative metabolic pathways such as the use of glutamine or fatty acid oxidation to cope with the lack of available glucose [27, 42].

We found no significant differences in levels of monocarboxylate transporters, antioxidant-related metabolites or glutaminolysis between Dt81Hepa1-6 and parental Hepa1-6 cells suggesting that these are not involved in the increased tumorigenicity displayed by Dt81Hepa1-6 cells (data not shown). However, Dt81Hepa1-6 cells were shown not only to

have an increased ability to uptake surrounding glucose but also to have a greater capacity to synthesize fatty acids in presence of high extracellular glucose, as evidenced by significant higher levels of FA-related genes, as well as Acetyl-CoA, Citrate and Malonyl-CoA. Moreover, fatty acids can be assembled into TG, which is a potential important source of energy in a glucose-restricted microenvironment.

HCC develops mostly on a cirrhotic background, an environment characterized by a profound alteration in the structure of the hepatic lobule that can greatly alter nutrient availability [12]. To reproduce this environment, Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells were tested under a range of glucose concentration from below (low) and above (high) physiological levels. Dt81Hepa1-6 cells were shown to be able to use stored fatty acids for energy and growth in 0 mM glucose DMEM. When fatty acid oxidation was inhibited using Etomoxir, Dt81Hepa1-6 cells lost their ability to proliferate and survive in a glucose-restricted environment. This suggests that this metabolic plasticity is crucial to their survival within a nutrient-poor microenvironment.

Analysis of gene expressions and metabolites involved in glycolysis showed significantly lower expression levels of *Hk II*, *Gpi*, *Pfkl*, *Eno*, *Ldh* and of Lactate, GTP and ATP in sodium oxamate-treated Dt81Hepa1-6 cells, suggesting that the glycolytic activity of tumorigenic HCC Dt81Hepa1-6 cells is strongly affected following exposure to sodium oxamate. This confirms previous observations that sodium oxamate could act as an anti-cancer agent through its ability to target the *Warburg effect* [18, 28, 43].

Since we found that Dt81Hepa1-6 cells can modulate their use of glucose according to the surrounding microenvironment, their ability to synthesize fatty acids was assessed while glycolysis was inhibited using sodium oxamate. The capacity of sodium oxamate-treated

Dt81Hepa1-6 cells to synthesize fatty acids was significantly lower than controls suggesting that targeting the *Warburg effect* in HCC cells does not only decrease aerobic glycolysis but also prevents fatty acid biosynthesis. Interestingly, a recent study reported that lactate can be used to synthesize a large percentage of lipids in neoplastic cell lines and that decreasing lactate production through sodium oxamate led to a decrease in the mitochondrial respiratory capacity [44]. In line with this observation, two studies recently demonstrated that lactate can feed the TCA cycle in lung and pancreatic tumors [45, 46]. Therefore, this suggests that in tumors, lactate should now be considered a potential source of fuel for the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Therefore, since reduced levels of several TCA cycle metabolites were found in Dt81Hepa1-6 cells after sodium oxamate exposure, the decreased capacity of these cells to synthesize fatty acids could be explained by a reduced lactate production leading to decreased availability of TCA cycle intermediates involved in fatty acid biosynthesis.

Inhibition of sodium oxamate also affected the capacity of Dt81Hepa1-6 cells to proliferate and increased cellular stress as evidenced by the changes observed in mitochondrial membrane potential and ROS levels, two factors often involved in cell death processes [30, 32].

Recent evidence suggests that gluconeogenesis (GNG) could influence HCC cell tumorigenicity [47, 48]. By switching from aerobic glycolysis to GNG, the supply of newly synthesized high-energy metabolites would be decreased and the tumorigenicity displayed by HCC cells would be reduced as well. However, we found no expression of the GNG-related genes *PEPCK* and *G6Pase* when Dt81Hepa1-6 cells were cultured in glucose-free DMEM suggesting that the *de novo* synthesis of glucose does not occur in these cells (data not shown).

Tumorigenic HCC Dt81Hepa1-6 cells are relatively resistant to the antineoplastic effect of cisplatin in comparison to Hepa1-6 cells [16]. However, by combining the effect of cisplatin with that of the glycolytic inhibitor sodium oxamate, cell viability of Dt81Hepa1-6 cells was significantly reduced compared to cisplatin alone. In addition, functional characterization of human HCC Huh7 and Hep G2 cells revealed that increased glucose uptake of Huh7 correlates with an enhanced capacity of these cells to proliferate. Therefore, the strong glucose avidity displayed by HCC Dt81Hepa1-6 is also in use in human tumorigenic HCC cells and constitutes an essential requirement to favor an aggressive phenotype. Taken together, these data indicate that targeting the metabolic processes used by highly tumorigenic HCC cells could potentiate the effectiveness of current chemotherapeutic drugs especially in light of the correlation observed between the expression of glycolytic genes *Glut-1*, *Hk II* and *Ldh* in HCC tissues and overall patient survival.

In conclusion, these results show that increased tumorigenicity of HCC cells can stem from an increased metabolic plasticity allowing them to thrive in a broader range of glucose concentrations. The metabolic reprogramming of these HCC cells relies mainly on the *Warburg effect* in presence of glucose, but also on their ability to use fatty acids in glucose-restricted conditions. These observations were confirmed by analyzing the expression of 3 glycolytic genes in HCC tumoral tissues and patient survival. Finally, these results suggest that by combining glycolytic inhibitors as a new class of anticancer agents with conventional chemotherapy, current treatments for HCC patients could be potentiated.

Acknowledgements

This work was supported by a Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair at the Université de Montréal to M. Bilodeau. The authors thank Erik Joly and Julien Lamontagne of the Metabolomic Core Facility of the CRCHUM for performing the metabolomic measurements by HPLC and TG quantification. The authors also thank the laboratory of Dr. Alexandre Prat specifically, Dr. Soufiane Ghannam and Dr. Marc-André Lécuyer, for their assistance during the FACS and microscopy experiments.

References

1. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008 Jun;13(6):472-82. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005. PubMed PMID: 18538731.
2. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008 Jan;7(1):11-20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002. PubMed PMID: 18177721.
3. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309-14. PubMed PMID: 13298683.
4. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809. PubMed PMID: 19460998; PubMed Central PMCID: PMCPMC2849637.
5. Robey IF, Stephen RM, Brown KS, et al. Regulation of the Warburg effect in early-passage breast cancer cells. *Neoplasia*. 2008 Aug;10(8):745-56. PubMed PMID: 18670636; PubMed Central PMCID: PMCPMC2481565.
6. Sun Y, Zhao X, Zhou Y, et al. miR-124, miR-137 and miR-340 regulate colorectal cancer growth via inhibition of the Warburg effect. *Oncol Rep*. 2012 Oct;28(4):1346-52. doi: 10.3892/or.2012.1958. PubMed PMID: 22895557.
7. Iansante V, Choy PM, Fung SW, et al. PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nat Commun*. 2015 Aug 10;6:7882. doi: 10.1038/ncomms8882. PubMed PMID: 26258887; PubMed Central PMCID: PMCPMC4918319.
8. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2557-76. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.061. PubMed PMID: 17570226.
9. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, et al. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S35-50. PubMed PMID: 15508101.
10. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 May;142(6):1264-1273 e1. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.061. PubMed PMID: 22537432; PubMed Central PMCID: PMCPMC3338949.
11. Cassim S, Bilodeau M, Vincent C, et al. Novel Immunotherapies for Autoimmune Hepatitis. *Front Pediatr*. 2017;5:8. doi: 10.3389/fped.2017.00008. PubMed PMID: 28184367; PubMed Central PMCID: PMCPMC5266689.
12. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008 Mar 08;371(9615):838-51. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9. PubMed PMID: 18328931; PubMed Central PMCID: PMCPMC2271178.
13. Chaube B, Malvi P, Singh SV, et al. AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1alpha-mediated mitochondrial biogenesis. *Cell Death Discov*. 2015;1:15063. doi: 10.1038/cddiscovery.2015.63. PubMed PMID: 27551487; PubMed Central PMCID: PMCPMC4979508.

14. Huang Q, Tan Y, Yin P, et al. Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. *Cancer Res.* 2013 Aug 15;73(16):4992-5002. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0308. PubMed PMID: 23824744.
15. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011 May;11(5):325-37. doi: 10.1038/nrc3038. PubMed PMID: 21508971.
16. Lacoste B, Raymond VA, Cassim S, et al. Highly tumorigenic hepatocellular carcinoma cell line with cancer stem cell-like properties. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171215. doi: 10.1371/journal.pone.0171215. PubMed PMID: 28152020.
17. Schoors S, Bruning U, Missiaen R, et al. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature.* 2015 Apr 9;520(7546):192-197. doi: 10.1038/nature14362. PubMed PMID: 25830893; PubMed Central PMCID: PMC4413024.
18. Yang Y, Su D, Zhao L, et al. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 2014 Dec 15;5(23):11886-96. doi: 10.18632/oncotarget.2620. PubMed PMID: 25361010; PubMed Central PMCID: PMC4323009.
19. Mamo S, Gal AB, Bodo S, et al. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007 Mar 06;7:14. doi: 10.1186/1471-213X-7-14. PubMed PMID: 17341302; PubMed Central PMCID: PMC1832186.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 07;72:248-54. PubMed PMID: 942051.
22. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957 May;226(1):497-509. PubMed PMID: 13428781.
23. Maharjan S, Oku M, Tsuda M, et al. Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci Rep.* 2014 Jul 31;4:5896. doi: 10.1038/srep05896. PubMed PMID: 25077633; PubMed Central PMCID: PMC4116626.
24. Voccoli V, Tonazzini I, Signore G, et al. Role of extracellular calcium and mitochondrial oxygen species in psychosine-induced oligodendrocyte cell death. *Cell Death Dis.* 2014 Nov 20;5:e1529. doi: 10.1038/cddis.2014.483. PubMed PMID: 25412308; PubMed Central PMCID: PMC4260741.
25. Goswami CP, Nakshatri H. PROGene: gene expression based survival analysis web application for multiple cancers. *J Clin Bioinforma.* 2013 Oct 28;3(1):22. doi: 10.1186/2043-9113-3-22. PubMed PMID: 24165311; PubMed Central PMCID: PMC43875898.
26. Goswami CP, Nakshatri H. PROGeneV2: enhancements on the existing database. *BMC Cancer.* 2014 Dec 17;14:970. doi: 10.1186/1471-2407-14-970. PubMed PMID: 25518851; PubMed Central PMCID: PMC4300843.

27. Rohrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016 Nov;16(11):732-749. doi: 10.1038/nrc.2016.89. PubMed PMID: 27658529.
28. Zhai X, Yang Y, Wan J, et al. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2013 Dec;30(6):2983-91. doi: 10.3892/or.2013.2735. PubMed PMID: 24064966.
29. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Oct;12(10):685-98. doi: 10.1038/nrc3365. PubMed PMID: 23001348; PubMed Central PMCID: PMC4371788.
30. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Jun;9(6):447-64. doi: 10.1038/nrd3137. PubMed PMID: 20467424.
31. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol*. 2008 Apr;18(4):165-73. doi: 10.1016/j.tcb.2008.01.006. PubMed PMID: 18296052.
32. Kroemer G. Mitochondria in cancer. *Oncogene*. 2006 Aug 07;25(34):4630-2. doi: 10.1038/sj.onc.1209589. PubMed PMID: 16892077.
33. Funes JM, Quintero M, Henderson S, et al. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6223-8. doi: 10.1073/pnas.0700690104. PubMed PMID: 17384149; PubMed Central PMCID: PMC1851087.
34. Mankoff DA, Eary JF, Link JM, et al. Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res*. 2007 Jun 15;13(12):3460-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0074. PubMed PMID: 17575208.
35. Gharib AM, Thomasson D, Li KC. Molecular imaging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S153-8. PubMed PMID: 15508079.
36. Lee Z, Luo G. Issues pertaining to PET imaging of liver cancer. *J Fasting Health*. 2014 Spring;2(2):62-64. PubMed PMID: 25599084; PubMed Central PMCID: PMC4295519.
37. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):437-43. doi: 10.1038/nature04871. PubMed PMID: 16724055.
38. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Jun;26(2):299-310. doi: 10.1007/s10555-007-9064-0. PubMed PMID: 17415526.
39. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov;4(11):891-9. doi: 10.1038/nrc1478. PubMed PMID: 15516961.
40. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014 Aug;39(8):347-54. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005. PubMed PMID: 25037503; PubMed Central PMCID: PMC4329227.
41. Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, et al. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene*. 2005 May 19;24(22):3574-82. doi: 10.1038/sj.onc.1208463. PubMed PMID: 15806173.
42. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010 Jan 21;29(3):313-24. doi:

- 10.1038/onc.2009.358. PubMed PMID: 19881548; PubMed Central PMCID: PMCPMC2809806.
43. Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, et al. Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One*. 2014;9(1):e85576. doi: 10.1371/journal.pone.0085576. PubMed PMID: 24465604; PubMed Central PMCID: PMCPMC3897486.
 44. Chen YJ, Mahieu NG, Huang X, et al. Lactate metabolism is associated with mammalian mitochondria. *Nat Chem Biol*. 2016 Nov;12(11):937-943. doi: 10.1038/nchembio.2172. PubMed PMID: 27618187; PubMed Central PMCID: PMCPMC5069139.
 45. Faubert B, Li KY, Cai L, et al. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell*. 2017 Oct 5;171(2):358-371 e9. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.019. PubMed PMID: 28985563; PubMed Central PMCID: PMCPMC5684706.
 46. Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*. 2017 Nov 2;551(7678):115-118. doi: 10.1038/nature24057. PubMed PMID: 29045397.
 47. Ma R, Zhang W, Tang K, et al. Switch of glycolysis to gluconeogenesis by dexamethasone for treatment of hepatocarcinoma. *Nat Commun*. 2013;4:2508. doi: 10.1038/ncomms3508. PubMed PMID: 24149070.
 48. Wang B, Hsu SH, Frankel W, et al. Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. *Hepatology*. 2012 Jul;56(1):186-97. doi: 10.1002/hep.25632. PubMed PMID: 22318941; PubMed Central PMCID: PMCPMC3355233.

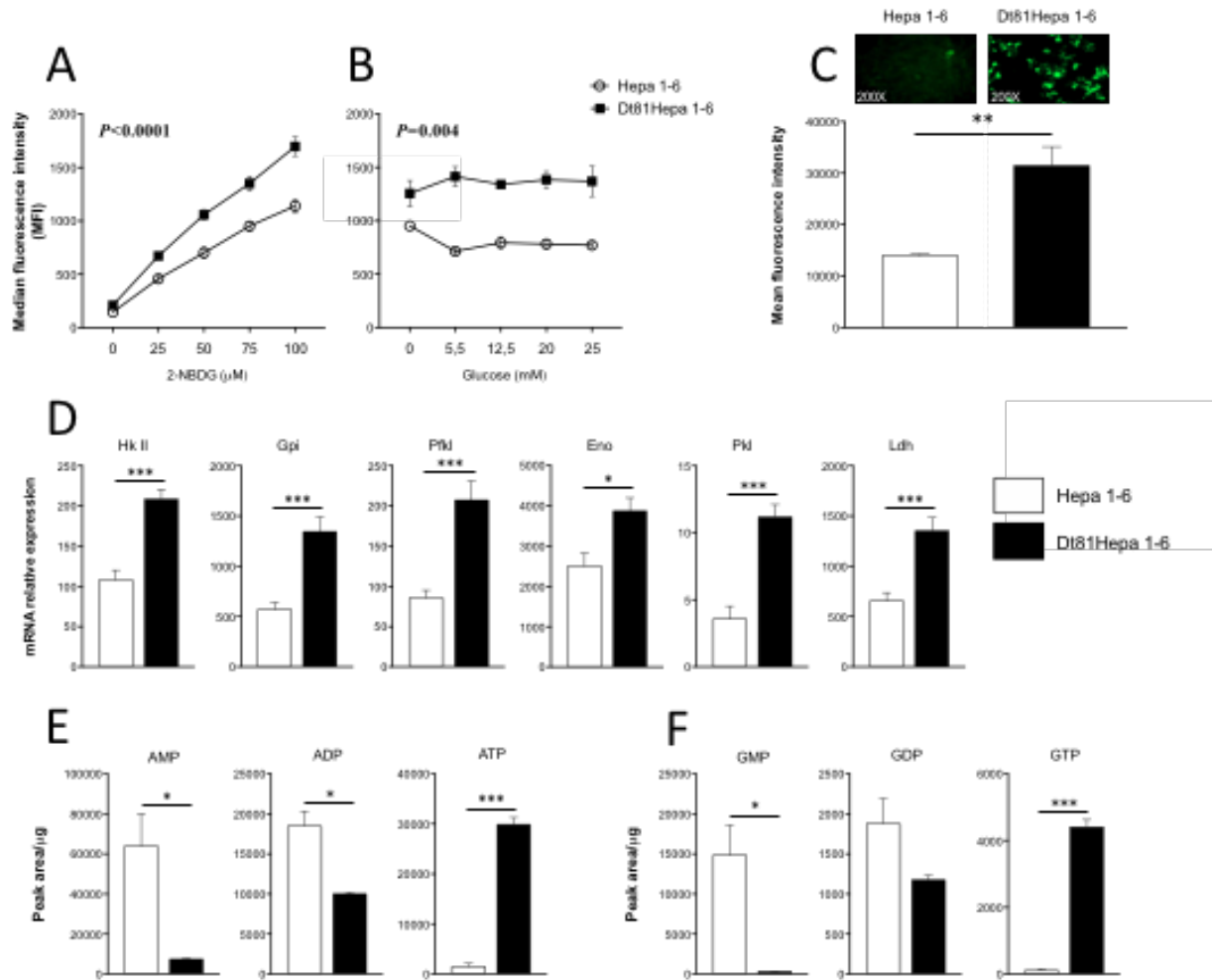


Figure 1: Dt81Hepa1-6 cells show an improved ability to uptake and use glucose through aerobic glycolysis. Evaluation of glucose uptake was performed using a fluorescent analog of glucose: 2-NBDG. Median fluorescence intensity analysis of glucose uptake with (A) increasing doses of 2-NBDG [0-100 μM] in glucose-free DMEM and: (B) fixed dose of 2-NBDG [50 μM] in 0 to 25 mM glucose DMEM. (C) Representative microphotographs of 2-NBDG-labeled Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells [50 μM of 2-NBDG]. (D) mRNA relative gene expression of *Hexokinase II (Hk II)*, *Glucose-6-phosphate isomerase (Gpi)*, *Phosphofructokinase liver (Pfk)*, *Enolase (Eno)*, *Pyruvate kinase liver (Pkl)* and *Lactate*

dehydrogenase (Ldh) by Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells after a 48 hours incubation in 25 mM glucose DMEM. (E-F) Quantification of total intracellular AMP, ADP, ATP and GMP, GDP, GTP in Dt81Hepa1-6 and Hepa1-6 cells after a 48 hours incubation in 25 mM glucose DMEM. Values are \pm SEM of 3 independent experiments. (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

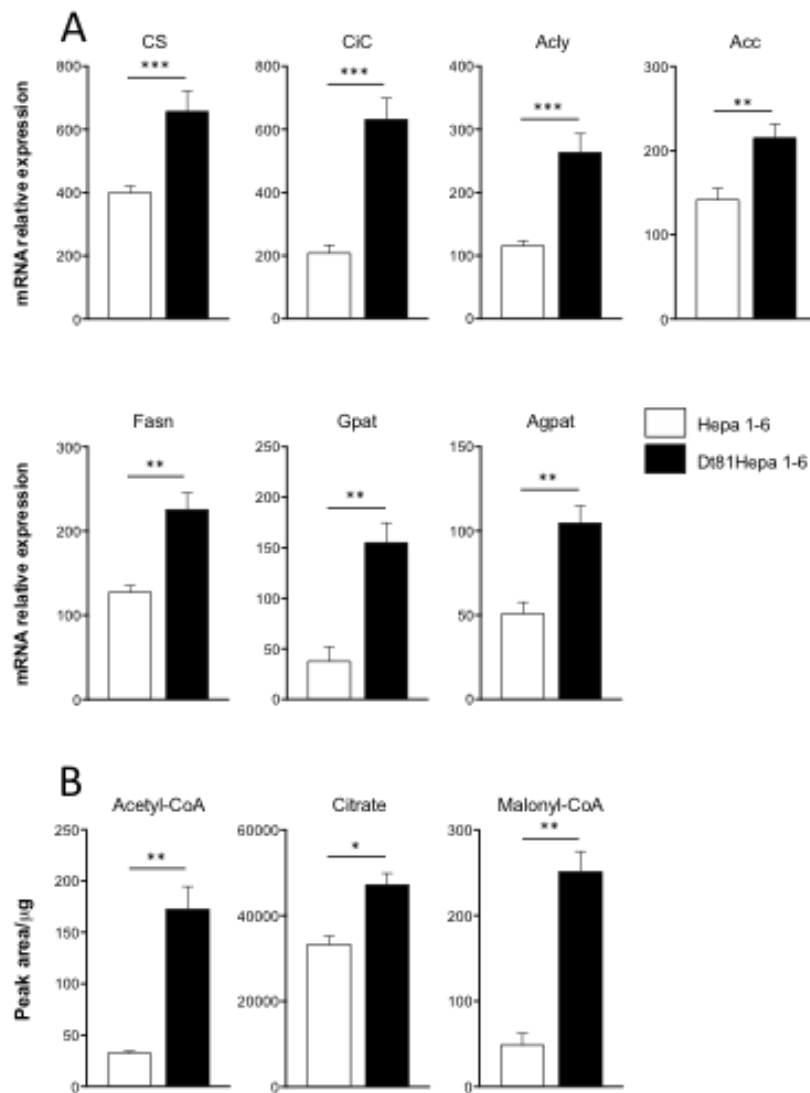


Figure 2: Dt81Hepa1-6 cells showed a greater ability to synthesize fatty acids in presence of glucose. Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells were cultured in 25 mM glucose DMEM for 48 hours. (A) mRNA relative gene expression of *Citrate synthase (CS)*, *Citrate carrier (CiC)*, *ATP citrate lyase (Acly)*, *Acetyl-CoA carboxylase (Acc)*, *Fatty acid synthase (Fasn)*, *Glycerol phosphate acyltransferase (Gpat)* and *Acylglycerol phosphate acyltransferase (Agpat)*. (B) Evaluation of total intracellular Acetyl-CoA, Citrate and Malonyl-CoA. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

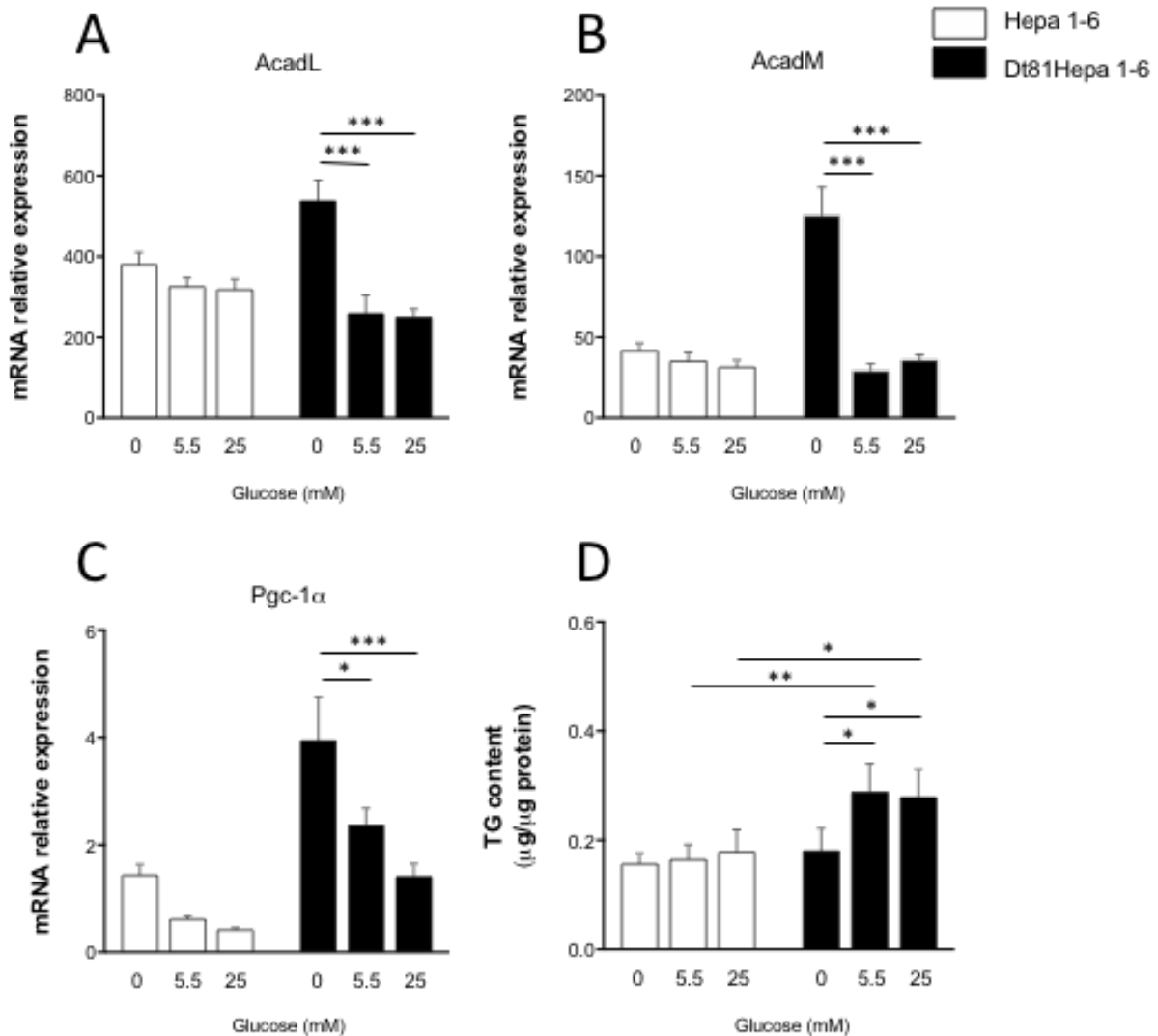


Figure 3: In glucose-restricted condition, Dt81Hepa1-6 cells can oxidize their stored fatty acids. Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells were cultured in 0, 5.5 and 25 mM glucose DMEM for 48 hours. (A-C) mRNA relative gene expression of *Acyl-CoA dehydrogenase long-chain (AcadL)*, *Acyl-CoA dehydrogenase medium-chain (AcadM)* and *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1α)*. (D) Quantification of triglyceride content. Values are \pm SEM of at least 8 independent experiments. (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

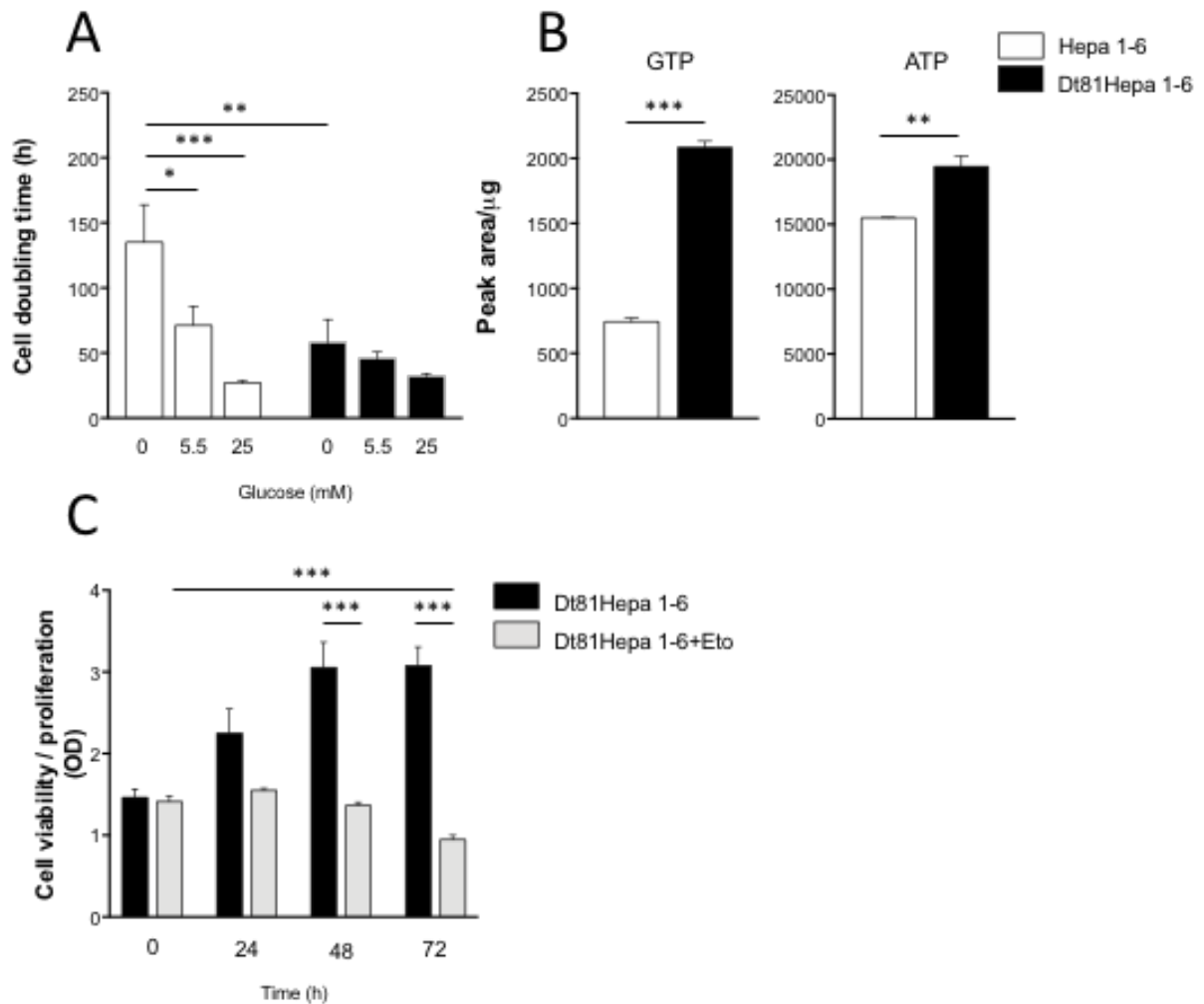


Figure 4: Fatty acid oxidation in low glucose concentrations improves the viability and ability of Dt81Hepa1-6 cells to proliferate. (A) Cell doubling time of Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells cultured in 0, 5.5 and 25 mM glucose DMEM for 72 hours. (B) Quantification of total intracellular GTP and ATP in Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells after a 48 hours incubation in glucose-free DMEM. (C) Proliferation/viability of Dt81Hepa1-6 cells in glucose-free DMEM following *in vitro* exposure to Etomoxir (Eto) [40 μM] for 72 hours compared to untreated Dt81Hepa1-6 cells. Values are ±SEM of at least 3 independent experiments. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

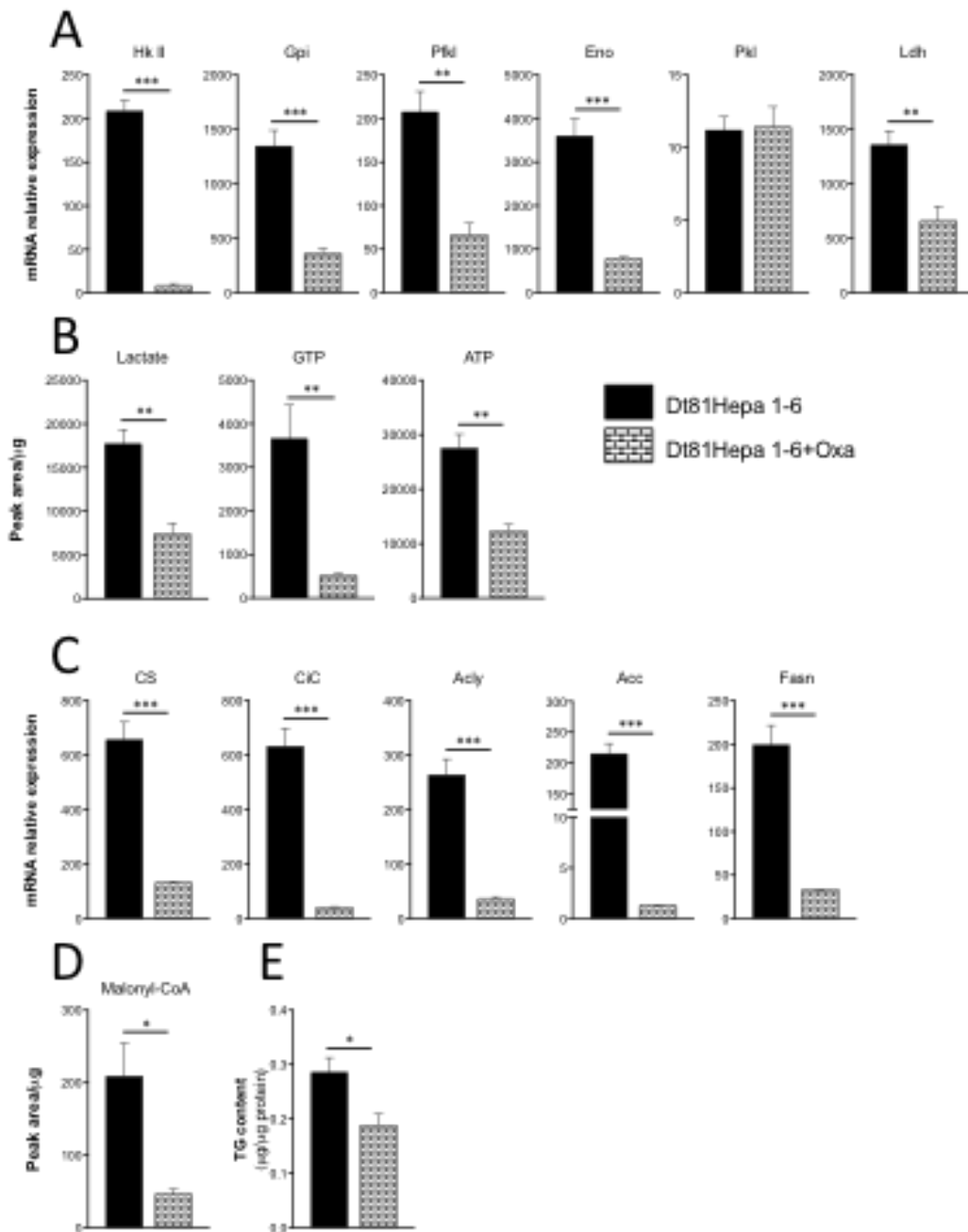


Figure 5: Targeting the *Warburg effect* prevents aerobic glycolysis and fatty acid biosynthesis in Dt81Hepa1-6 cells. Dt81Hepa1-6 cells were cultured in 25 mM glucose DMEM after a 48 hours incubation. (A) mRNA relative gene expression of *Hexokinase II (Hk II)*, *Glucose-6-phosphate isomerase (Gpi)*, *Phosphofructokinase liver (Pfk)*, *Enolase (Eno)*, *Phosphofructokinase (Pfk)*, and *Lactate dehydrogenase (Ldh)*.

Pyruvate kinase liver (Pkl) and *Lactate dehydrogenase (Ldh)* in Dt81Hepa1-6 and Oxa-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM] after a 48 hours incubation. (B) Quantification of total intracellular Lactate, GTP and ATP in Dt81Hepa1-6 and Oxa-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM]. (C) mRNA relative gene expression of *Citrate synthase (CS)*, *Citrate carrier (CiC)*, *ATP citrate lyase (Acl)*, *Acetyl-CoA carboxylase (Acc)* and *Fatty acid synthase (Fasn)* in Dt81Hepa1-6 and sodium oxamate (Oxa)-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM]. (D) Quantification of total intracellular Malonyl-CoA and (E) assessment of triglyceride (TG) content, in Dt81Hepa1-6 and Oxa-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM]. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

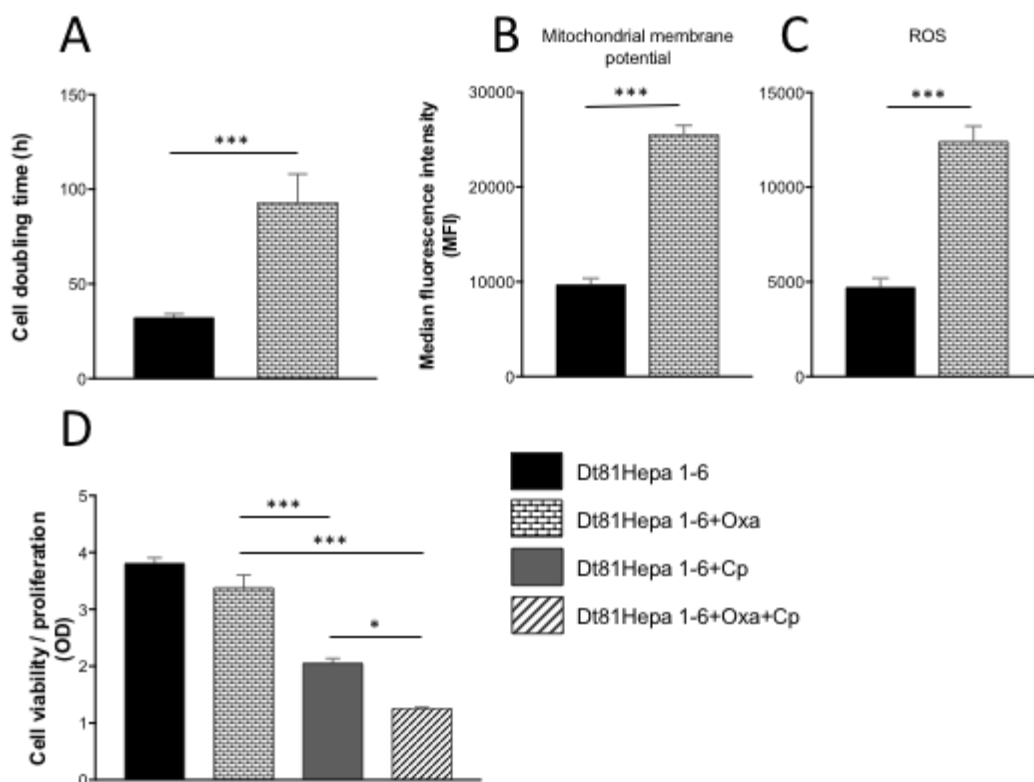


Figure 6: Inhibition of aerobic glycolysis reduces the viability and proliferation of Dt81Hepa1-6 cells and potentiates cisplatin chemotherapy. Dt81Hepa1-6 cells were cultured in 25 mM glucose DMEM. (A) Cell doubling time of Dt81Hepa1-6 and sodium oxamate (Oxa)-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM]. (B) Assessment of mitochondrial membrane potential of Dt81Hepa1-6 and Oxa-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM] using MitoTracker[®] Red CMXRos [200 nM]. (C) Quantification of reactive oxygen species (ROS) in Dt81Hepa1-6 and Oxa-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM] using MitoTracker[®] Red CM-H₂XRos [1 μM]. (D) Proliferation/viability of Dt81Hepa1-6 cells following *in vitro* exposures to sodium oxamate (Oxa) [100 mM], cisplatin (Cp) [25 mg/mL] and both sodium oxamate and cisplatin (Oxa+Cp) for 48 hours. Values are ±SEM of at least 3 independent experiments. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

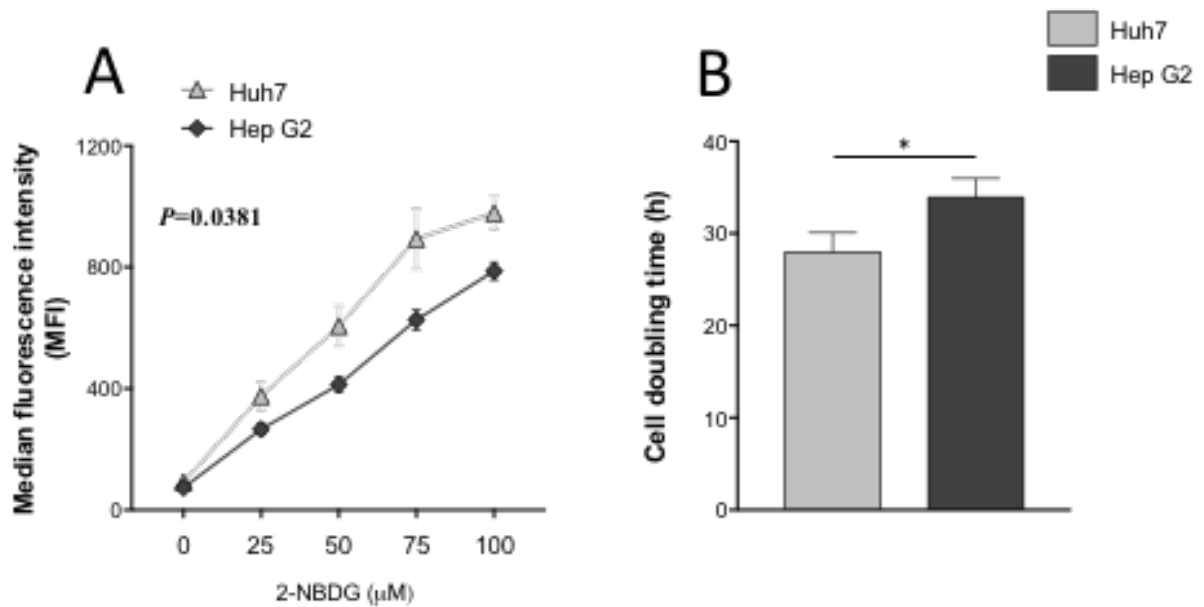


Figure 7: Functional characterization of human HCC Huh7 and Hep G2 cells. Evaluation of glucose uptake was performed using 2-NBDG. (A) Median fluorescence intensity analysis of glucose uptake in Huh7 and Hep G2 cells with increasing doses of 2-NBDG [0-100 μM] in glucose-free DMEM. (B) Cell doubling time of Huh7 and Hep G2 cells cultured in 25 mM glucose DMEM for 72 hours. Values are $\pm\text{SEM}$ of at least 4 independent experiments. (* $P < 0.05$).

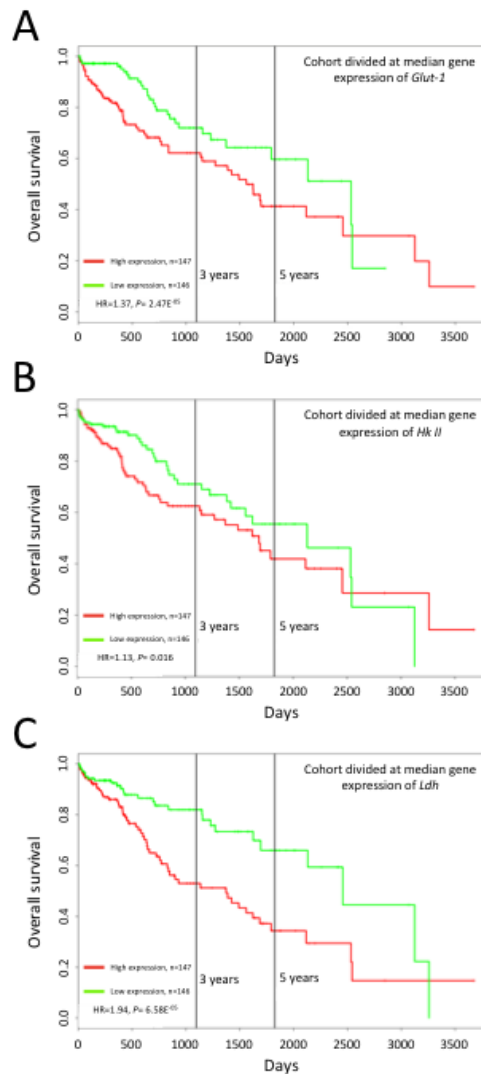
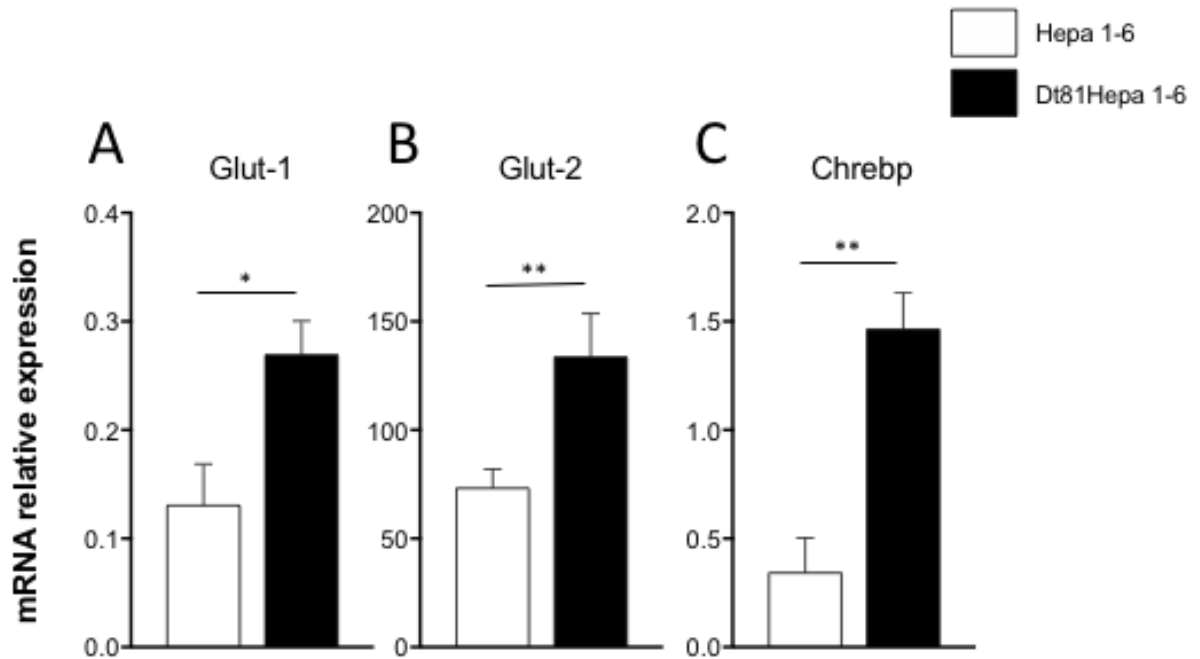
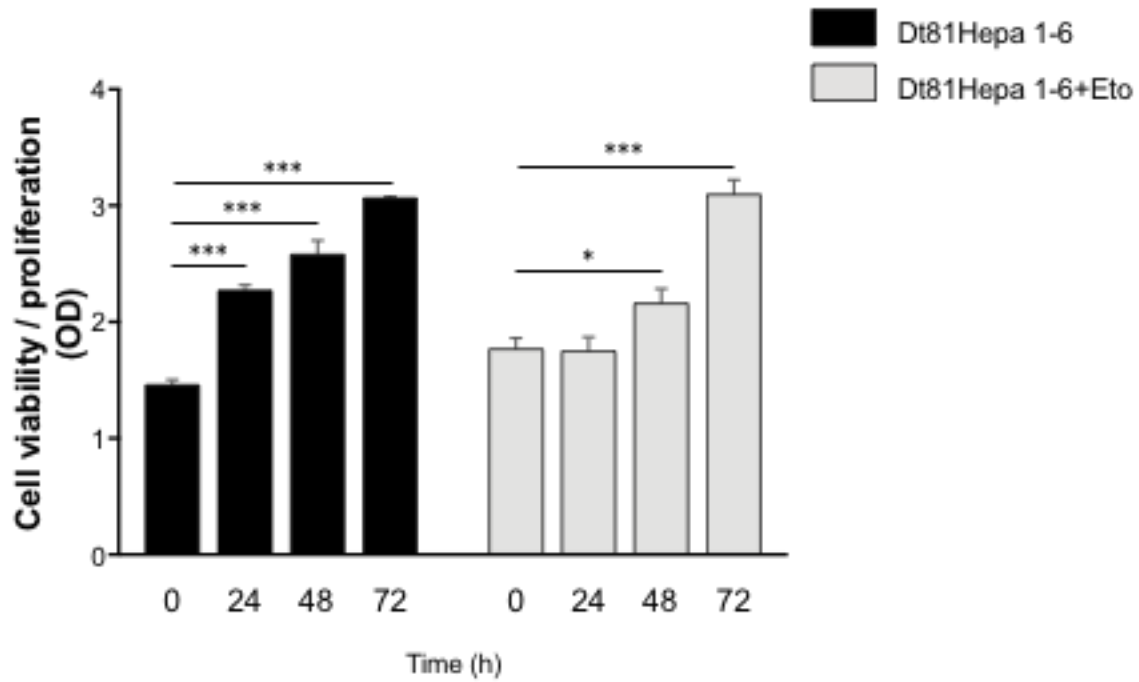


Figure 8: Prognostic value of *Glut-1*, *Hk II* and *Ldh* expressions by Hepatocellular Carcinoma (HCC) patients for survival. (A-C) Kaplan-Meier (KM) plots of overall survival probability (plotted on Y-axis) of HCC cancer patients is shown (TCGA data). Patients have been stratified into high (red lines) or low (green lines) expression-based ‘risk-groups’ by their mean of median transcript-expressions of *Glut-1*, *Hk II* and *Ldh*, respectively. The patient follow-up is indicated in days on the X-axis. Respective Log-rank test p-values and Hazard Ratio (HR) are shown. The numbers of patients for each group are indicated below the respective KM plots.



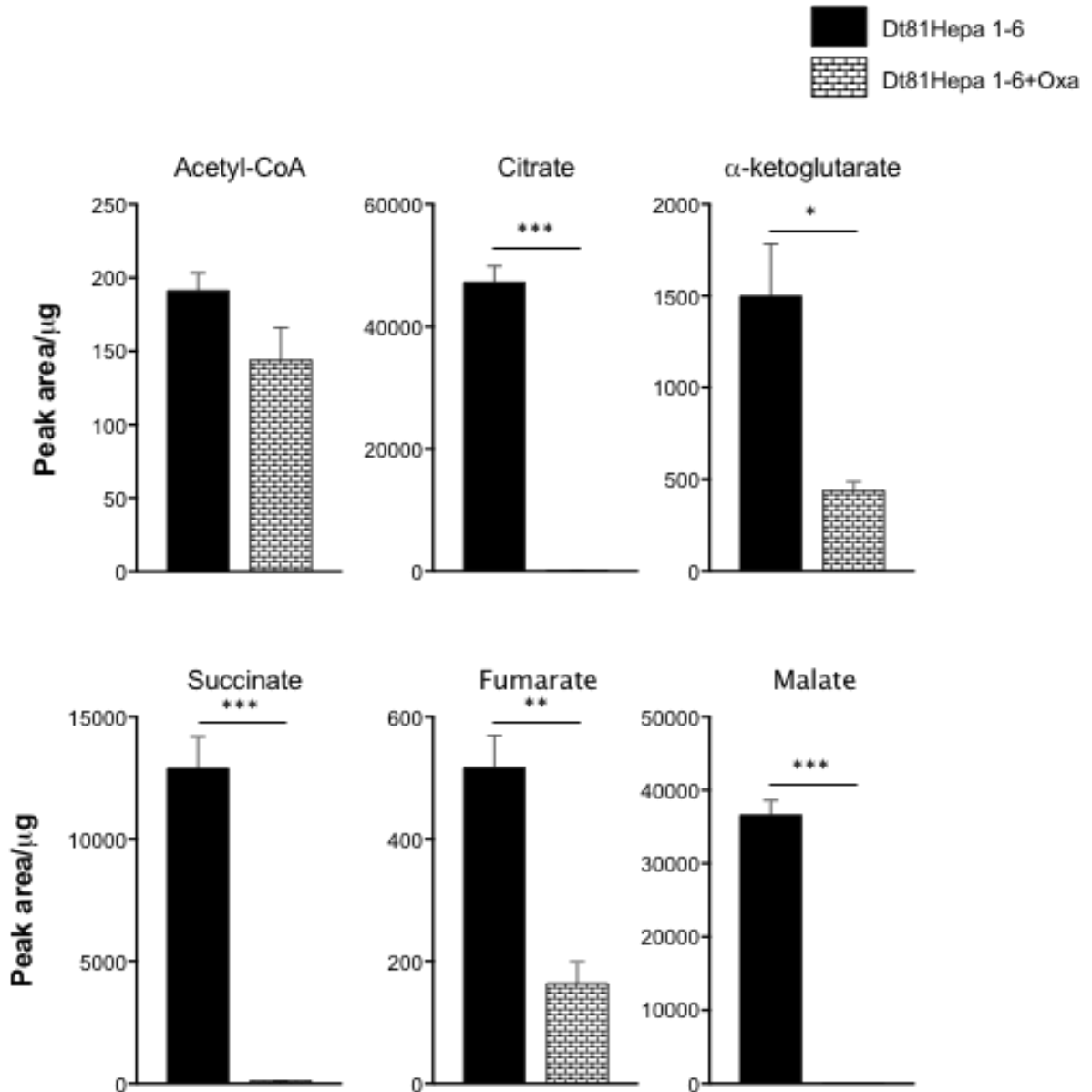
Supplementary Figure 1: Gene expression levels of *Glut-1*, *Glut-2* and *Chrebp*. mRNA relative expression of glycolytic-related genes. (A) *Glucose transporter 1*, (B) *Glucose transporter 2* and (C) *Carbohydrate response element-binding protein (Chrebp)* in Hepa1-6 and Dt81Hepa1-6 cells after a 48 hours incubation in 25 mM glucose DMEM. Values are \pm SEM of at least 8 independent experiments. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).



Supplementary Figure 2: Viability of Dt81Hepa1-6 after *in vitro* exposure to Etomoxir.

Viability and proliferation of Dt81Hepa1-6 cells in 25 mM glucose DMEM following *in vitro* exposures to Etomoxir (Eto) [40 μ M] for 72 hours compared to untreated Dt81Hepa1-6 cells.

Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (* P <0.05, *** P <0.001).



Supplementary Figure 3: Quantification of total intracellular TCA metabolites after *in vitro* exposure to sodium oxamate. Quantification of Acetyl-CoA, Citrate, α -ketoglutarate, Succinate, Fumarate and Malate in Dt81Hepa1-6 and sodium oxamate (Oxa)-treated Dt81Hepa1-6 cells [100 mM] after a 48 hours incubation in 25 mM glucose DMEM. Values are \pm SEM of 3 independent experiments. (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

Supplementary Table 1: Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primers	Reverse primers
Glycolysis-related molecules		
<i>Hk II</i>	TGATCGCCTGCTTATTCACGG	AACCGCCTAGAAATCTCCAGA
<i>Gpi</i>	GTGGTCAGCCATTGGACTTT	CTGGAAATAGGCAGCAAAGC
<i>Pfkl</i>	AGCTCAGAACTACGCACACT	AGTGGTAGTGATGGCGTCAA
<i>Eno</i>	ACCCTCTTTCCTTGCTTTGC	GAAGAGACCTTTTGCGGTGT
<i>Pkl</i>	GAACTTGCCAAATGCCGA	CACGCCTTCATGGTTCTCG
<i>Ldh</i>	GTGCACTAGCGGTCTCAAA	GTCAACAAGGGCAAGCTCAT
<i>Glut-1</i>	AGTGACGATCTGAGCTACGG	GCGGTGGTTCCATGTTTGAT
<i>Glut-2</i>	CCGGGATGATTGGCATGTTT	ACCTGGCCCAATCTCAAAGA
<i>Chrebp</i>	CAGTATGTGCAACGGAGGAAG	ACTTACGGAGCCGCTTTTTG
Fatty acid metabolism-related molecules		
<i>Cs</i>	GGACAATTTTCCAACCAATCTGC	TCGGTTCATTCCCTCTGCATA
<i>CiC</i>	CTGGAGGCATCGAAATCTGC	GGTTGGAGGAAGTCTGGTCA
<i>Acly</i>	TGGATGCCACAGCTGACTAC	GGTTCAGCAAGGTCAGCTTC
<i>Acc</i>	GAGAGGGGTCAAGTCCTTCC	CTGCTGCCGTCATAAGACAA
<i>Fasn</i>	AAGTTGCCCGAGTCAGAGAA	CGTCGAACTTGGAGAGATCC
<i>Gpat</i>	CAACACCATCCCCGACATC	CCGCAGCATTCTGATAACGC
<i>Agpat</i>	TTCATCAACCGCCAGCAAG	CATTGTCGTTGCGTGTACCCT
<i>AcadL</i>	GTAGCTTATGAATGTGTGCAACTC	GTCTTGCGATCAGCTCTTTCATTA
<i>AcadM</i>	GGCAAATGCCTGTGATTCTT	ACCCATTGCGATCTTGAAAC
<i>Pgc-1α</i>	ATACCGCAAAGAGCACGAGAAG	CTCAAGAGCAGCGAAAGCGTCACAG
Reference genes		
<i>HPRT1</i>	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG	CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT
<i>Ppia</i>	CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG	TGTAAAGTCACCACCCTGGCACAT
<i>H2afz</i>	ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA	TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA

Mise en évidence des voies métaboliques les plus sollicitées dans le maintien du potentiel tumorigénique des cellules issues de CHC.

L'objectif de ce troisième et dernier travail de mon doctorat a consisté en l'évaluation et l'identification des voies métaboliques essentielles dans l'acquisition du pouvoir tumorigène des cellules d'hépatocarcinome. Par approche métabolomique, nous avons mis en évidence les voies métaboliques associées à un phénotype tumoral *in vitro* et *in vivo*. L'importance de ces voies métaboliques a été confirmée chez l'humain par une corrélation de l'expression des gènes exprimés dans les tumeurs retrouvées chez l'humain et le pronostic vital des patients. Cette caractérisation *pan*-métabolique s'inscrit parfaitement dans le cadre des études ayant eu recours au criblage à haut débit afin d'identifier les potentielles molécules ou voies de signalisation cellulaires impliquées dans le cancer.

Article 3 "Metabolite profiling identifies a signature of tumorigenicity in hepatocellular carcinoma." *Oncotarget*. 2018 Jun 1;9(42)

Contribution des différents auteurs

SC : Conception du projet, réalisation des expériences et rédaction de l'article

VAR : Réalisation de certaines expériences et correction de l'article

BL : Réalisation de certaines expériences

PL : Conception, rédaction et correction de l'article

MB : Conception, supervision du projet, rédaction et correction de l'article

Metabolite profiling identifies a signature of tumorigenicity in hepatocellular carcinoma

Authors: Shamir Cassim¹, Valérie-Ann Raymond¹, Benoit Lacoste¹, Pascal Lapierre^{1,2} and Marc Bilodeau^{1,2}.

Affiliation: ¹ Laboratoire d'hépatologie cellulaire, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada. ² Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Corresponding author: Marc Bilodeau, MD, CRCHUM, 900 Saint-Denis, Tour Viger, Pavillon R, Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9. (Fax: (514) 412-7314; Tel: (514)-890-8000 #35749; email: marc.bilodeau@umontreal.ca)

Keywords: Liver, Hepatocellular carcinoma, Glucose, Tumorigenicity, Metabolic signature

Abstract

HCC (Hepatocellular carcinoma) cells exhibit greater metabolic plasticity than normal hepatocytes since they must survive in a dynamic microenvironment where nutrients and oxygen are often scarce. Using a metabolomic approach combined with functional *in vitro* and *in vivo* assays, we aimed to identify an HCC metabolic signature associated with increased tumorigenicity and patient mortality. Metabolite profiling of HCC Dt81Hepa1-6 cells revealed that their increased tumorigenicity was associated with elevated levels of glycolytic metabolites. Tumorigenic Dt81Hepa1-6 also had an increased ability to uptake glucose leading to a higher glycolytic flux that stemmed from an increased expression of glucose transporter GLUT-1. Dt81Hepa1-6-derived tumors displayed increased mRNA expressions of glycolytic genes, *Hypoxia-inducible factor-1alpha* and of *Cyclin D1*. HCC tumors also displayed increased energy charge, reduced antioxidative metabolites and similar fatty acid biosynthesis compared to healthy liver. Increased tumoral expression of glycolytic and hypoxia signaling pathway mRNAs was associated with decreased survival in HCC patients. In conclusion, HCC cells can rapidly alter their metabolism according to their environment and switch to the use of glucose through aerobic glycolysis to sustain their tumorigenicity and proliferative ability. Therefore, cancer metabolic reprogramming could be essential for the tumorigenicity of HCC cells during cancer initiation and invasion.

Introduction

The ability of cancer to grow and proliferate in harsh environments has been a subject of interest for several decades [1, 2]. Since the demonstration that aerobic glycolysis took place in cancer cells by Otto Warburg [3], several important discoveries on the metabolic pathways of cancer cells have led to a better overall understanding of their ability to proliferate and adapt to their microenvironment [4]. Within a fluctuating microenvironment, such as in a low oxygen environment or with limited access to glucose, tumor cells will use other metabolic pathways such as the glutamine [5], lactate [6, 7] or fatty acid pathway [8] to overcome the low nutrient availability and generate energy essential to sustain their proliferation and survival. This metabolic reprogramming has been observed in several tissues including breast [9], lung [10] and liver cancer [11].

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer worldwide and the third most lethal one [12]. Primary liver cancer develops in the vast majority of cases on a cirrhotic background [13]. Liver cirrhosis is characterized by an extensive modifications of hepatic lobular architecture with increased formation and deposition of extracellular matrix, eventually leading to a decrease in liver function [14]. These changes could significantly alter the microenvironment and metabolism of HCC tumors.

The liver is central to the homeostasis of global metabolism [15]. Among its many functions, it is involved in the metabolism of carbohydrates with gluconeogenesis, glycogenolysis and glycogenesis and in the metabolism of lipids with the synthesis and oxidation of triglycerides (TG) and fatty acids, the synthesis and transformation of cholesterol into bile acids, and in lipoprotein synthesis [16, 17]. All these metabolic functions are performed by hepatocytes

which represent approximately 70% of the total number of hepatic cells and 90% of its mass [18]. The intrinsically high metabolic activity displayed by hepatocytes under physiological conditions hinders our ability to detect liver tumor foci by positron emission tomography (PET) since both neoplastic and healthy hepatocytes consume significant amounts of glucose [19]. Thus, studies on HCC and the metabolism of cancer cells are critical if we are to develop new carbohydrate tracers to better discriminate tumor cells from healthy liver cells. Fluctuations that occur within the environment of HCC cells could also impact their functional phenotype including when these cells are cultured *in vitro*. HCC cells can adapt to fluctuating conditions in the complex physiological conditions found in the normal liver such as within metabolic zonation where different oxygen tension gradients take place [20]. Therefore, metabolic reprogramming of HCC cells could be key to their tumorigenicity and the aggressiveness of HCC.

Metabolomics has made great strides in recent years especially in the identification of biomarkers that correlate with specific diseases or environmental exposure [21]. Moreover, metabolomics has recently been used to identify specific alterations in pathways in an effort to identify putative mechanisms that underlie various physiological conditions including several diseases [21]. Metabolites can be mapped and analyzed within metabolic pathways to link metabolites together and target specific pathways for studies [21].

Herein, using a metabolomic approach combined with functional *in vitro* and *in vivo* assays, we identified a metabolic signature associated with increased tumorigenicity in HCC cells and increased mortality in patients with HCC. We found that HCC Dt81Hepa1-6 cells, a highly tumorigenic derivative of Hepa1-6 cells [22], displayed increased metabolic plasticity *in vitro*

and *in vivo* compared to primary hepatocytes or healthy liver tissues respectively. Their tumorigenicity was associated with increased levels of specific aerobic glycolysis metabolites and an increased ability to uptake glucose. This increased glucose uptake stemmed from an increased expression of glucose transporters. These HCC cells also showed increased expression of key glycolytic enzymes, enhanced levels of highly energetic metabolites and reduced levels of antioxidative stress-related metabolites. The functional phenotype of these HCC cells, unlike healthy hepatocytes, could rapidly change depending on their microenvironment; whereas these cells had a very active fatty acid synthesis *in vitro*, this was not apparent *in vivo* where extremely efficient aerobic glycolysis took place. Finally, HCC patients with high tumoral expression of glycolytic and hypoxia signaling pathway genes have a significantly decreased overall survival compared to patients with low expression of these genes. These observations suggest that metabolic reprogramming could be a driving factor for the tumorigenicity of these cells and critical for cancer stem cells, particularly during HCC initiation and invasion.

Results

Metabolomics reveals that Dt81Hepa1-6 cell tumorigenicity stems from enhanced aerobic glycolysis and glucose utilization. To identify the metabolic adaptations associated with the observed enhanced tumorigenicity of Dt81Hepa1-6 cells, we characterized the metabolic profile of Dt81Hepa1-6 and primary hepatocytes. Metabolomic analysis showed a clearly different profile for Dt81Hepa1-6 cells compared to primary hepatocytes. Heatmap analysis revealed that key aerobic glycolysis metabolites such as dihydroxyacetone phosphate (DHAP), lactate, ATP and GTP were increased in Dt81Hepa1-6 cells when compared to primary hepatocytes (Figure 1A). To assess the functional relevance of these observations, glucose uptake was measured using 2-NBDG, a fluorescent glucose analog. With increasing doses of 2-NBDG, Dt81Hepa1-6 consistently showed a higher capacity to uptake glucose in comparison to primary hepatocytes ($P<0.0001$) (Figure 1B). Similarly, quantification of fluorescent images of cells exposed to a fixed dose of 2-NBDG revealed a greater glucose avidity by Dt81Hepa1-6 cells ($P<0.01$) (Figure 1C).

To confirm that these HCC cells depend on the *Warburg effect* to drive their tumorigenicity, we studied glycolysis in both cell types using extracellular flux analysis (Seahorse XF24). Measurement of the extracellular acidification rate (ECAR) demonstrated a significantly higher glycolytic activity by Dt81Hepa1-6 cells compared to primary hepatocytes in culture for 48 hrs (Figure 1D). This analysis revealed that Dt81Hepa1-6 cells showed a higher level of non-glycolytic acidification baseline activity, an increased response to extracellular glucose, a higher glycolytic capacity as well as a higher glycolytic reserve ($P<0.001$) (Figure 1E). Thus, Dt81Hepa1-6 cell tumorigenicity seems to be intimately linked to tumoral aerobic glycolysis.

To ensure that the *in vitro* culture of primary hepatocytes for 48 hrs did not affect their glycolytic profile [23], we also compared the glycolytic phenotype of freshly isolated primary hepatocytes to that of hepatocytes cultured for 48 hrs (Suppl. Fig. 1). Freshly isolated and primary cells cultured for 48 hrs demonstrated a very similar glycolytic profile (Suppl. Fig. 1).

The higher glycolytic activity of Dt81Hepa1-6 is associated with a rearrangement in glucose transporters at the cell surface. Given the capacity of Dt81Hepa1-6 cells to uptake large amounts of extracellular glucose and use this additional glucose for glycolytic activity, we evaluated the expression level of glucose transporters *in vitro* and *in vivo* to ascertain if the enhanced tumorigenicity and glycolytic activity of Dt81Hepa1-6 *in vivo* originated from a rearrangement in glucose transporters at the cell surface. First, to ensure the validity of our *in vivo* tumoral, non-tumoral and healthy liver samples, histological analysis was performed and the expression levels of *Alfa-fetoprotein (AFP)* and *Epithelial cell adhesion molecule (Epcam)* were measured in these samples (Suppl. Fig. 2). Histology confirmed the status of the liver samples and only Dt81Hepa1-6-derived tumors showed expression of *AFP* and *Epcam* ($P<0.001$) (Suppl. Fig. 2). Expression of glucose transporter GLUT-1 was increased exclusively in tumorigenic Dt81Hepa1-6 cells and Dt81Hepa1-6-derived tumors ($P<0.001$) (Figure 2A). However, the expression of the GLUT-2 was differentially modulated according to the cell localization/environment (*in vitro* or *in vivo*) (Figure 2B). *In vitro*, Dt81Hepa1-6 cells displayed high protein levels of GLUT-2 compared to primary hepatocytes ($P<0.001$) whereas *in vivo*, Dt81Hepa1-6-derived tumors showed a significantly lower GLUT-2 protein expression level when compared to healthy and peri-tumoral liver specimens ($P<0.001$) (Figure 2B).

***In vivo* metabolic adaptation by tumorigenic Dt81Hepa1-6 leads to increased expression of aerobic glycolysis genes.** To assess the metabolic flexibility of tumorigenic Dt81Hepa1-6 cells, the activity of aerobic glycolysis was evaluated and compared with normal hepatocytes and between *in vitro* and *in vivo* conditions. mRNA quantification of several glycolytic genes was performed. First, both Dt81Hepa1-6 cells and Dt81Hepa1-6-derived tumors displayed increased mRNA levels of *Hexokinase II (Hk II)* ($P<0.01$), *Phosphofructokinase liver (Pfk1)* ($P<0.05$), *Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (Pdk1)* ($P<0.01$) and decreased mRNA expression levels of *Pyruvate dehydrogenase (Pdh)* ($P<0.001$) and *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1 α)* ($P<0.001$) (Figure 3A), in comparison to primary hepatocytes and healthy and peri-tumoral liver specimens. Interestingly, Dt81Hepa1-6-derived tumors displayed lower *Hk II* expression ($P<0.001$) but higher *Pdh* and *Pdk1* expressions in comparison to Dt81Hepa1-6 cells *in vitro* ($P<0.01$) (Figure 3A). Dt81Hepa1-6 cells and Dt81Hepa1-6-derived tumors also showed higher expression levels of *Hypoxia-inducible factor-1alpha (Hif-1 α)* and *Cyclin D1* compared to primary hepatocytes and healthy and peri-tumoral liver specimens ($P<0.001$) (Figure 3B-C). While the *Hif-1 α* mRNA expression *in vivo* was lower in tumors than *in vitro* ($P<0.001$) (Figure 3B), the expression of *Cyclin D1* was increased both *in vitro* and *in vivo* in Dt81Hepa1-6 cells (Figure 3C).

Dt81Hepa1-6-derived tumors display an increased energetic profile compared to healthy and peri-tumoral liver tissue. If Dt81Hepa1-6-derived tumors display a *Warburg effect* and an increased ability to proliferate *in vivo*, this should translate into an increased capacity to produce energy. Therefore, we quantified three major cellular energetic metabolites: AMP, ADP and ATP. Dt81Hepa1-6-derived tumors displayed higher ATP levels and a higher ATP/ADP ratio when compared to healthy and peri-tumoral liver specimens ($P<0.05$) (Figure

4A). On the other hand, normal healthy liver had significantly higher levels of AMP and ADP ($P<0.05$) (Suppl. Fig. 3). Dt81Hepa1-6-derived tumors also displayed a higher energy charge level when compared to healthy and peri-tumoral liver specimens ($P<0.001$) (Figure 4B). Finally, elevated NADH/NAD and Lactate/Pyruvate ratios were found only in tumoral tissue ($P<0.05$ and $P<0.001$, respectively) (Figure 4C-D).

Dt81Hepa1-6-derived tumors and peri-tumoral liver specimens have lower levels of antioxidative stress-related metabolites. Hypoxia, oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) can influence metabolic reprogramming of cancer cells and play a fundamental role in tumor invasion and maintenance [24, 25]. Therefore, we evaluated the levels of antioxidative stress-related metabolites in our cells and tissue specimens. First, the degree of hypoxia was assessed *in vivo* by measurement of HIF-1 α protein level. This analysis found high HIF-1 α protein levels only in tumoral tissues ($P<0.01$) (Suppl. Fig. 4) corroborating the increased *Hif-1 α* mRNA observed in tumors ($P<0.001$) (Figure 3B). Dt81Hepa1-6-derived tumors had lower NADP ($P<0.001$), NADPH ($P<0.001$), GSH ($P<0.001$) and GSSG ($P<0.001$) contents in comparison to healthy liver specimens (Figure 5A-B). Interestingly, similar differences were found between non-tumoral samples and healthy liver specimens including NADP ($P<0.01$), NADPH ($P<0.001$) and GSH levels ($P<0.01$) (Figure 5A-B). Only GSSG levels were similar between non-tumoral and control healthy tissues.

Role of fatty acid metabolism in Dt81Hepa1-6 cells tumorigenicity and in the survival of HCC patients. Fatty acids derived from glucose metabolism can be pivotal for cancer cell growth and survival. Hence, their rate of biosynthesis could impact the tumorigenicity of HCC cells *in vitro* and *in vivo*. Therefore, to evaluate if the fatty acid biosynthesis pathway is involved in Dt81Hepa1-6 tumorigenicity, we quantified the genes and metabolites involved in

this biosynthetic process. When cultured *in vitro* at the highest glucose concentration, Dt81Hepa1-6 cells displayed higher mRNA expression levels of *ATP citrate lyase (Acly)* ($P<0.05$), *Acetyl-CoA carboxylase (Acc)* ($P<0.001$) and *Fatty acid synthase (Fasn)* ($P<0.05$) in comparison to primary hepatocytes (Figure 6A). Analysis of TG content also showed increased levels only in cultured Dt81Hepa1-6 cells ($P<0.001$) (Figure 6B). Interestingly, Dt81Hepa1-6-derived tumors displayed lower mRNA expression levels of *Acly* ($P<0.05$), *Acc* ($P<0.001$) and *Fasn* ($P<0.05$) as well as decreased TG content ($P<0.001$) when compared to healthy control and non-tumoral liver specimens (Figure 6A-B). The only difference observed between *in vitro* Dt81Hepa1-6 cells and *in vivo* Dt81Hepa1-6-derived tumors was a decreased mRNA expression level of *Acc* in tumors ($P<0.001$) (Figure 6A). No significant differences in TG content were found between *in vitro* and *in vivo* Dt81Hepa1-6 cells (Figure 6B). Healthy control and non-tumoral liver specimens displayed higher mRNA levels of *Acly* ($P<0.05$), *Acc* ($P<0.05$) and *Fasn* ($P<0.01$) and increased TG content ($P<0.001$) when compared to primary hepatocytes (Figure 6A-B). Finally, to evaluate if fatty acid biosynthesis could correlate with increased tumorigenicity and mortality in patients with HCC, we examined the association between the levels of tumoral mRNA expressions of 13 genes involved in this anabolic pathway (listed in Supplemental Table 2) with patients' survival using publicly-available expression datasets from HCC patients [26, 27]. No significant difference was found in overall survival of patients with high- and low-level expressing tumors (*Ptges3*, *Fads1*, *Ptgs1*, *Mcat*, *Fads2*, *Cd74*, *Brcal*, *Mif*, *Oxsm*, *Ptgds*, *Lta4h*, *Hpgd* and *Degs1*) (Figure 6C) ((n=293) $P=0.242$).

Increased expression of glycolytic and hypoxia-induced response genes by tumors from patients with HCC correlates with poor survival. The previous results suggest that the

tumorigenicity of Dt81Hepa1-6-derived tumors *in vivo* stems from an increased glycolytic activity and a higher hypoxia-induced response. To assess if activation of these biological pathways is associated with increased tumorigenicity and mortality in patients with HCC, we examined the association between the levels of glycolytic and hypoxia signaling mRNA expressions (27 genes for each biological pathway, listed in Supplemental Table 2) and patient survival using the PROGgene V2 expression datasets from HCC patients [26, 27]. HCC patients with tumors displaying higher levels of glycolytic (*Eno1*, *Eno2*, *Eno3*, *Aldoa*, *Aldob*, *Aldoc*, *Gapdh*, *Gapdhs*, *Gpi*, *Pfkfb1*, *Pfkfb2*, *Pfkfb3*, *Pfkfb4*, *Pfkl*, *Pfkm*, *Pfkp*, *Pgam1*, *Pgam2*, *Pgk1*, *Pklr*, *Pkm2*, *Ppp2ca*, *Ppp2cb*, *Ppp2r1a*, *Ppp2r1b*, *Ppp2r5d* and *Tpi1*) and hypoxia signaling (*Cldn3*, *Pdia2*, *Arnt2*, *Pml*, *Egln2*, *Bnip3*, *Egln1*, *Tgfb2*, *Alas2*, *Plod1*, *Plod2*, *Cxcr4*, *Ang*, *Chrna4*, *Cd24*, *Mt3*, *Epas1*, *Nf1*, *Crebbp*, *Smad4*, *Smad3*, *Hsp90b1*, *Ep300*, *Hif1a*, *Vegfa*, *Narfl* and *Chrn2*) mRNA were shown to have a significantly decreased overall survival when compared to patients with lower levels of expressing tumors (Figure 7) ((n=293) respectively $P=0.020$ and $P=0.004$).

Discussion

The first tumor cell-specific metabolic alteration was described by Otto Warburg: he showed an increase in the activity of glycolysis that was maintained in conditions of high oxygen tension [3]. Since then, metabolic reprogramming has often been described as a hallmark of cancer cell transformation [1, 2]. Owing to the heterogeneous distribution of crucial nutrients (in particular oxygen and glucose) and the ability of tumor cells to adapt to a nutritionally-restricted microenvironment, the question remains as to how cancer cells can cope with these stresses and still maintain growth and proliferation. Given the heterogeneous nature of the HCC tumoral microenvironment, adaptive mechanisms to maintain energy production and metabolic homeostasis must exist in HCC cells if proliferation is to be maintained. These cells have to adapt metabolically to the changing, nutrient-restricted environment characteristic of liver fibrosis and cirrhosis to maintain their tumorigenic potential. Understanding how the metabolism of HCC cells is changed according to different microenvironments could lead to the identification of novel putative HCC-specific metabolites. This could allow for the identification of novel tracers that would help discriminate between healthy and tumoral liver tissues [19, 28].

Using a metabolomic approach, we found that Dt81Hepa1-6 HCC cells behave metabolically very differently than primary hepatocytes under identical *in vitro* conditions. This suggests that these cells have developed metabolic strategies in order to thrive. The metabolite signature of these cells suggests that they have the capacity to modify their bioenergetic and fatty acids metabolism as well as their glycolytic activity.

To understand the origin of the increase in glycolytic activity, we studied glucose metabolism from its entry into the cells to the production of energetic metabolites. Dt81Hepa1-6 cells displayed an enhanced ability to efficiently uptake extracellular glucose and a greater avidity for it compared to primary hepatocytes under identical conditions. The entry of glucose in cells is mediated by transporters located at the plasma membrane and their expression level correlates with cancer aerobic glycolysis [29, 30]. GLUT-1 and GLUT-2 are the two main glucose transporters in the liver [31]. Dt81Hepa1-6 HCC cells showed significantly higher levels of GLUT-1 and GLUT-2 *in vitro* in comparison to normal hepatocytes. *In vivo*, Dt81Hepa1-6-derived tumors also had higher levels of GLUT-1 but decreased levels of GLUT-2 in comparison to normal liver. Several observations could explain the decreased expression of GLUT-2 by tumoral liver specimens. *In vivo*, extracellular glucose supply can fluctuate; in order to optimize glucose uptake, neoplastic cells have the ability to use glucose transporters differently such as increasing expression of GLUT-1 [32]. GLUT-1 offers a steady influx of glucose to cells in contrast to GLUT-2 that will drive glucose entry preferentially in conditions of hyperglycemia. In HCC, increased expression of GLUT-1 and reduced expression of GLUT-2 have been shown to correlate with an aggressive phenotype [11, 33]. This decrease in GLUT-2 is likely the result of a loss of differentiation since hepatocytes are characterized by high GLUT-2 expression *in vivo* [34]. Therefore, the change between *in vitro* conditions where GLUT-1 and GLUT-2 expression are tightly regulated and the physiologically more complex *in vivo* environment where tumor cells need to adopt new metabolic strategies, would lead to a rearrangement of glucose transporters expressed at the cell surface in order to 1) efficiently uptake glucose and 2) maintain a high tumorigenic potential through sustained glycolysis.

Evaluation of glycolysis using extracellular flux analysis also showed an increased glycolytic activity by Dt81Hepa1-6 with an increased glycolytic capacity and glycolytic reserve suggesting that the increased uptake of glucose is coupled with an increased in glucose metabolism. Evaluation of mRNA expression of several glycolytic genes (*Hk II*, *Pfkl*, *Pdh*, *Pdk1*, *Pgc-1 α*) showed that their levels were significantly increased when compared to primary hepatocytes or healthy liver. Interestingly, Dt81Hepa1-6-derived tumors had reduced *Hk II* expression and increased *Pdh* and *Pdk1* expressions in comparison to Dt81Hepa1-6 cells in culture suggesting that the expression of these enzymes is also modulated according to the environment. These changes could occur in order to sustain the production of energetic metabolites despite changes in the availability of nutrients. We observed a significant increase in the ATP content, ATP/ADP ratio and energy charge level in tumoral liver samples suggesting that the modulations we observed in the expression of glycolytic enzymes did translate into improved energy production.

In recent years, a growing body of evidence points towards a critical function for mitochondria in neoplastic cells that could combine with the *Warburg effect* during cancer metabolic reprogramming [35]. In contrast to the original Warburg hypothesis, many cancers maintain functional mitochondria and flux through the electron transport chain. This helps provide optimal levels of ATP, essential for their survival [36, 37]. Our observations suggest, based on the increased NADH/NAD and Lactate/Pyruvate ratios, and increased gene expressions of *Pdh* and *Pdk1*, that Dt81Hepa1-6 cells shift away from mitochondrial activity and direct their metabolic activity toward aerobic glycolysis.

Cancer cells can also rely on the activation of alternative metabolic pathways to maintain their

proliferative capacities, such as the synthesis and use of fatty acids. These compounds are essential for the synthesis of new plasma membranes, for lipid-based post-translational modification of proteins, to promote DNA replication and induce rapid cell division but also to prevent cell death through the activation of anti-apoptotic proteins [38, 39]. Thus, the ability of cancer cells to synthesize fatty acids represents a critical aspect of HCC cell tumorigenicity. *In vitro*, Dt81Hepa1-6 cells displayed an increased ability to synthesize fatty acids, as evidenced by their increased expression of fatty acid-related genes and TG content. However, *in vivo*, this was not observed when healthy and non-tumoral tissues were compared. In addition, the expression of fatty acid biosynthesis gene by tumors from patients with HCC was not associated with overall patient survival. Therefore, the constraints exerted by the microenvironment would lead HCC cells to adapt and use the most metabolically effective pathways to maintain their tumorigenicity. In the case of Dt81Hepa1-6-derived tumors, they display a metabolic adaptation for the preferential use of glucose for aerobic glycolysis and ATP production over the synthesis of fatty acids.

Interestingly, we observed the same metabolic change of glycolytic activity in human HepG2 vs Huh7 HCC cells that we noticed in mice Dt81Hepa1-6 HCC cells: the increased glycolytic activity was only observed in highly tumorigenic Dt81Hepa1-6 and Huh7 HCC cells [40].

In conjunction with the nucleus, mitochondria are able to transcribe and translate genes encoding components of the electron transport chain via the production of ROS [41]. However, mitochondrial signaling can be altered in cancer cells and an increase in ROS production has been described in tumor cells [42, 43]. Mitochondrial-generated ROS have been proposed to behave as initiation factors for many important signaling pathways in which

a mitochondrial signal induces changes in nuclear gene expression, thus influencing overall cellular function. Therefore, the type and amount of ROS found within each type of neoplastic cells for a given microenvironment could have a significant influence on its tumorigenicity. *In vivo*, Dt81Hepa1-6-derived tumors displayed lower contents of redox metabolites NADP, NADPH, GSH, and GSSG. Interestingly, some significant variations were also noticed between non-tumoral and healthy liver samples. These differences could be explained by the non-homogeneous ROS distribution from tumors to non-tumoral adjacent tissues, highlighting the effect of tumoral cells on surrounding healthy tissue [44-46]. This deleterious effect could lead to a metabolic instrumentalization of non-cancerous cells to generate energy in favor of neoplastic cells, but also to the gradual transformation of healthy cells into tumoral cells [45-47]. This emphasizes the notion of intratumoral heterogeneity and has notably been observed in breast cancer, giving rise to the terminology of *Reverse Warburg effect* [48, 49].

Tumor hypoxia has been shown to be involved in tumorigenicity and malignancy since it can push cancer cells into metabolic reprogramming. However, the assessment of tumor hypoxia used to be based on direct pO_2 tissue measurements which had important disadvantages including the invasive nature of the procedure and the technical difficulty of accessing tumors [50]. Recently, novel biomarkers of hypoxia such as HIF-1 α and GLUT-1 have been described [51, 52]. Since HIF-1 α is absent in *in vitro*-cultured Dt81Hepa1-6 cells when maintained under normoxic conditions (data not shown), the elevated HIF-1 α and GLUT-1 levels observed *in vivo* indicate that these cells are in a hypoxic environment with low O_2 tension and that this environment could be responsible for the metabolic changes observed in these cells *in vivo*. In addition, tumor progression, angiogenesis and anaerobic metabolism enable cancer cells to survive under hypoxia as Hk II was shown to be selectively regulated through a HIF-

1 α -dependent mechanism [53, 54]. Thus, cells that could respond effectively to these environmental cues could rapidly adapt to sustain their growth and tumorigenicity.

Therefore, the increased tumorigenicity of Dt81Hepa1-6-derived HCC tumors would stem from an increased glycolytic activity and an increased hypoxia-induced response. Interestingly, we found that HCC patients with increased tumoral glycolytic and hypoxic mRNAs expressions have significantly decreased survival rate. This suggests that these metabolic pathways are directly linked with HCC tumor aggressiveness and therefore, could be targeted in order to reduce tumorigenicity and potentiate current therapies.

In conclusion, these results strongly suggest that HCC cells can rapidly adapt to their environment and adopt a metabolic strategy aimed at using glucose through aerobic glycolysis to sustain their energy requirements, tumorigenicity, and proliferative ability. These observations suggest that cancer metabolic reprogramming constitutes an essential factor for the tumorigenicity of these cells and could be critical for cancer stem cells, particularly during HCC initiation and invasion.

Materials and methods

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Leibovitz's L-15 medium, Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin/streptomycin, fluorescent glucose analog 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-dioxol-4-yl) amino]-2- deoxyglucose (2-NBDG) and TRIZOL[®] reagent were purchased from Invitrogen (Burlington, On, Canada). QuantiTect reverse transcription kit and QuantiTect SYBR Green PCR Kit were purchased from QIAGEN (Toronto, On, Canada). Type IV Collagenase was from Worthington-Biochemicals inc. (Lakewood, NJ). Unless stated otherwise, all other products were from Sigma-Aldrich (Oakville, On, Canada).

Hepatocyte Isolation

Hepatocytes were isolated from adult male C57BL/6 mice using the two-step collagenase perfusion method as previously described [55]. Briefly, under anesthesia, the peritoneal cavity was opened, and the liver was perfused *in situ* via the portal vein for 4 min at 37°C with calcium-magnesium(CM)-free HEPES buffer and for 7 min with CM-free HEPES buffer containing Type IV collagenase (35mg/100ml) and CaCl₂ [10 mM]. Cells were used only if cell viability was above 80% as assessed by trypan blue exclusion. After three centrifugations (44g for 2min) in Leibovitz's L-15 media supplemented with 0,2% bovine albumin, cells were seeded onto plastic Petri dishes. After cell attachment for 2 hrs, the medium was replaced by fresh medium supplemented with 10% FBS.

Cell culture conditions

Authenticated Hepa1-6 murine hepatoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA). Dt81Hepa1-6 cell line was derived from

Hepa1-6 cells through *in vivo* passage in C57BL/6 mice [22]. Primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ and cultured in standard 25 mM glucose DMEM, supplemented with 10% FBS for 0 or 48 hrs following cell attachment (2 hrs for primary hepatocytes and overnight for Dt81Hepa1-6 cells). A concentration of 25 mM glucose was used since primary hepatocytes display important morphological alterations when maintained under lower glucose concentrations [23]. 25 mM glucose DMEM was used for both primary and Dt81Hepa1-6 cell culture to be able to compare each other under the same culture conditions. All culture media contained penicillin [100units/ml] and streptomycin [100µg/ml]. Cells were seeded at 0.026M cells/cm² for primary hepatocytes and 0.250M cells/cm² for Dt81Hepa1-6 to achieve 70% of cell confluence.

Animals

Male C57BL/6 mice (20g) were purchased from Charles River (Saint-Constant, Qc, Canada) and fed *ad libidum* with normal Chow. Animals were monitored daily for their appearance, state of hydration, behavior and clinical signs. Animals were sacrificed by exsanguination under anesthesia (induction with inhaled 4% Isoflurane and maintenance with inhaled 2% Isoflurane). All procedures were performed in accordance with Canadian Council on Animal Care and approved by the *Comité institutionnel de protection animale (CIPA) du CHUM*.

Intrasplenic Dt81Hepa1-6 cell injection

The Dt81Hepa1-6 cell line was trypsinized and resuspended in a saline solution containing 0.25% albumin. An aliquot (200µL) of 1M Dt81Hepa1-6 cells was loaded in 25G syringes for intrasplenic injection. Under anesthesia, an abdominal incision was performed and the spleen

was pulled out on a 37°C saline-soaked gauze. The syringe was mixed and the needle inserted in the spleen parenchyma and cells were slowly injected. When the spleen regained its bright red color, the needle was slowly drawn back and a droplet of Vetbond veterinary glue (3M, London, On, Canada) applied. The spleen was put back into the abdominal cavity and the abdominal incision closed.

***In vivo* characterization of Dt81Hepa1-6-derived tumors**

For *in vivo* analyzes, intrahepatic tumors were obtained following intrasplenic injection of Dt81Hepa1-6 cells (1M) in mice that were sacrificed 21 days later. Dt81Hepa1-6-derived tumors (Tumoral), neighboring normal liver parenchyma (Non-tumoral) were dissected, snap-frozen and then kept at -80°C until analysis. Additional healthy liver tissue (not subjected to any surgical procedure) were used as controls.

Histological analysis

Formalin-fixed liver samples obtained at the time of sacrifice were set in paraffin blocks, sliced (4µm sections) and stained with hematoxylin-phloxine-saffron by the Pathology Department of CHUM. Microphotographs were taken with a Carl-Zeiss Axioplan 2 microscope (Göttingen, Germany) at 10x magnifications using the Northern Eclipse 6.0 software (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada).

Glucose uptake assay

Following 30 min of glucose starvation, primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells were incubated in glucose-free DMEM for 45 min in the presence of a fluorescent analog, 2-NBDG, at concentrations ranging from 0 to 100 µM. All subsequent steps were performed in the dark.

The 2-NBDG reaction was stopped by washing cells with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Glucose uptake was then quantified by measuring the fluorescent intensity of cells on a FACS BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada). Data analysis was performed using FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, Or, USA). Acquisition of fluorescent images was performed using a Leica Epifluorescence Microscope SP5 platform (Leica Microsystems, Richmond Hill, On, Canada). Quantitative analysis of 2-NBDG-labeled primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells was done using Fiji software (ImageJ, NIH, USA).

qPCR gene expression analysis

mRNA was isolated with TRIZOL (Invitrogen (Burlington, On, Canada) according to the manufacturer guidelines. 250ng of mRNA was subjected to reverse transcription using the QuantiTect Reverse Transcription Kit. Quantitative PCR amplifications were performed using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit in a Rotor-Gene 3000 Real-Time Thermal Cycler (Corbett Research, Sydney, Australia). For each gene tested, 35 amplification cycles at 59°C (annealing) were used. The primer sequences are summarized in Supplementary Table 1. Relative gene expression was evaluated using 3 reference genes: *HPRT1*, *Ppia* and *H2afz* [56]. Relative gene expression was calculated using the delta-delta CT method [57].

HPLC analysis

All metabolites described in this study were assessed using HPLC (Agilent 1200 HPLC system, Agilent technologies Canada Inc., Mississauga, On, Canada) by the Metabolomic Core Facility of CRCHUM. Metabolic measurements were done both on cells and liver

specimens. Cells (after removal of cell culture medium) and liver samples were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until HPLC analysis. HPLC peak areas were used for quantification of each metabolite. To normalize the metabolite relative quantification in primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells, total protein content was measured (Bradford protein assay [58]). For quantification of metabolites in liver specimens, the same amount of biological material (20 mg) was used for each of the samples tested. Energy Charge was calculated using this formula: $([\text{ATP}] + \frac{1}{2}[\text{ADP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])$ [23]. Graphic representation of the differential metabolite expression between primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells by heatmap was produced using Heatmapper [59].

Seahorse XF24 Extracellular Flux analyzer

Primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells were seeded in the XF24 microplate in 25 mM glucose DMEM supplemented with 10% FBS for 0 and 48 hrs following cell attachment. According to manufacturer's recommended protocol, cell medium was replaced by conditional medium (culture medium without FBS and sodium bicarbonate) and incubated without CO_2 for one hour before completion of sensor cartridge calibration. Extracellular acidification rate (ECAR) was measured in the Seahorse XF24 Flux analyzer (Agilent Technologies Canada Inc., Mississauga, On, Canada). Measurements were performed after injection of the following 4 compounds: 10 mM glucose, 2 μM oligomycin, 30 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) and rotenone/antimycin, respectively at 1 and 2 μM . Glycolytic capacity and glycolytic reserve were calculated by measuring the increase in ECAR after injection of oligomycin [60]. Upon completion of the Seahorse XF24 Flux analysis, cells

were lysed to calculate the protein concentration using the Bradford method. Results were normalized based on the total amount of proteins in each well.

Western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer containing phosphatase and protease inhibitors. Proteins were quantified in supernatants using the Bradford method. Samples were boiled during 5 min (except for GLUT-1 quantification) and then loaded (10 µg protein/well) onto 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and SDS-PAGE migration was performed (1 hr, 150V). Proteins were transferred to PVDF membranes (30 min, 25V). Membranes were blocked in PBST containing 5% milk at room temperature for 1 hr and then probed overnight with the following antibodies: anti-GLUT-1 (1:10 000, Abcam, Toronto, On, Canada), anti-GLUT-2 (1:250, Santa Cruz Biotechnology Inc, Mississauga, On, Canada), anti-HIF-1 α (1:1000, Abcam, Toronto, On, Canada) and anti-GAPDH (1:10 000, Cell Signaling, Whitby, On, Canada) in PBST containing 1% milk at 4°C. Membranes were washed and then incubated with HRP-conjugated secondary anti-rabbit IgG (1:5000, BD Pharmingen, San Diego, California, USA) antibody at room temperature in PBST containing 1% milk during 1 hr. After extensive washes in PBST, bound peroxidase was detected with enhanced chemiluminescence blotting substrate (Perkin-Elmer, Woodbridge, On, Canada), according to the manufacturer's instructions.

Triglyceride assay

Measurement of the TG content from cellular and liver specimens was performed by the Metabolomics Core Facility of CRCHUM. Samples were snap-frozen and kept at -80°C until

TG determinations. Briefly, lipids from cell pellets were extracted overnight (4°C) in chloroform:methanol (2:1) (Folch extraction [61]). Organic phases (chloroform) were transferred into new glass tubes and dried under nitrogen (N-Evap). Lipids were resuspended in isopropanol and TG were measured enzymatically with the GPO-Trinder kit. Triolein, dissolved in chloroform-methanol and processed similarly to samples, was used as a standard. To normalize the TG content quantification, total protein contents of all samples were measured using the Bradford method.

Survival analysis

Survival analysis was performed using the PROGgene V2 Prognostic Database (<http://watson.compbio.iupui.edu/chirayu/proggene/database/?url=proggene>) as described [26, 27]. Each analysis used “liver cancer” as cancer type and “death” as the outcome. The gene expression data was extracted from *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) database. The data were not adjusted for clinical status. The survival status was analyzed for expression levels of genes involved in fatty acid biosynthesis, glycolysis and hypoxia-induced response. To analyze the prognostic value of these genes, the Kaplan-Meier method was used to estimate survival curves and the log-rank test was used to compare survival curves of high and low gene expression groups. All the genes studied are listed in Supplementary Table 2.

Statistical analysis

All data represent the values of at least three independent experiments. Data are expressed as means \pm standard error (SEM) and were analyzed with GraphPad Prism7 software. Differences between groups were analyzed using the analysis of variance (ANOVA) test,

student *t*-test and Tukey post-test for multiple comparisons. A *P* value below 0.05 was considered significant (*= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$). All statistical tests were two-sided.

Abbreviations

HCC: Hepatocellular Carcinoma; TG: Triglyceride; PET: Positron Emission Tomography; 2-NBDG: 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-dioxol-4-yl) amino]-2- deoxyglucose; DHAP: Dihydroxyacetone Phosphate; ECAR: Extracellular Acidification Rate; GLUT-1/2: Glucose Transporter-1/2; AFP: Alfa-fetoprotein; Epcam: Epithelial Cell Adhesion Molecule; Hk II: Hexokinase II; Pfk1: Phosphofructokinase liver; Pdh: Pyruvate dehydrogenase; Pdk1: Pyruvate dehydrogenase kinase 1; Pgc-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor-1 α ; AMP: Adenosine Monophosphate; ADP: Adenosine Diphosphate; ATP: Adenosine Triphosphate; GMP: Guanosine Monophosphate; GDP: Guanosine Diphosphate; GTP: Guanosine Triphosphate; NAD/H: Nicotinamide Adenine Dinucleotide; NADP/H: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; GSH: Glutathione; GSSG: Glutathione disulfide; Acly: ATP citrate lyase; Acc: Acetyl-coA carboxylase; Fasn: Fatty acid synthase; TCGA: The Human Cancer Genome Atlas; KM: Kaplan Meier; ROS: Reactive Oxygen Species.

Author Contributions

SC, PL and MB conceived and designed the project. SC, VAR and BL performed the experiments and collected the data. SC, VAR, PL and MB interpreted the results and drafted the manuscript. SC, VAR, PL and MB provided critical revisions of the manuscript and all authors approved the final version.

Acknowledgments

We thank Erik Joly and Julien Lamontagne of the Metabolomic Core Facility of the CRCHUM for performing the metabolomic measurements by HPLC and the analysis of TG. We also thank the laboratory of Dr. Alexandre Prat specifically, Dr. Soufiane Ghannam and Dr. Marc-André Lécuyer for their assistance during the FACS and microscopy experiments.

Conflicts of Interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Funding support

M. Bilodeau is Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair at the Université de Montréal.

References

1. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008; 134: 703-7. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021.
2. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008; 13: 472-82. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
3. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123: 309-14. doi:
4. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013; 19: 1423-37. doi: 10.1038/nm.3394.
5. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010; 29: 313-24. doi: 10.1038/onc.2009.358.
6. Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, Yang C, Do QN, Doucette S, Burguete D, Li H, Huet G, Yuan Q, et al. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell*. 2017; 171: 358-71 e9. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.019.
7. Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, Jang C, Teng X, Lu W, Esparza LA, Reya T, Le Z, Yanxiang Guo J, White E, Rabinowitz JD. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*. 2017; 551: 115-8. doi: 10.1038/nature24057.
8. Rohrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16: 732-49. doi: 10.1038/nrc.2016.89.
9. Shen L, O'Shea JM, Kaadige MR, Cunha S, Wilde BR, Cohen AL, Welm AL, Ayer DE. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer through Myc suppression of TXNIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112: 5425-30. doi: 10.1073/pnas.1501555112.
10. Hensley CT, Faubert B, Yuan Q, Lev-Cohain N, Jin E, Kim J, Jiang L, Ko B, Skelton R, Loudat L, Wodzak M, Klimko C, McMillan E, et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell*. 2016; 164: 681-94. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.034.
11. Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, Agaimy A, Marienhagen J, Weiss TS, Stoeltzing O, Warnecke C, Scholmerich J, Oefner PJ, Kreutz M, Bosserhoff AK, Hellerbrand C. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2009; 174: 1544-52. doi: 10.2353/ajpath.2009.080596.
12. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007; 132: 2557-76. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.061.
13. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004; 127: S35-50. doi:
14. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008; 371: 838-51. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9.
15. van den Berghe G. The role of the liver in metabolic homeostasis: implications for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 1991; 14: 407-20. doi:
16. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2008; 92: 272-83. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x.
17. Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Z Gastroenterol*. 2007; 45: 51-62. doi: 10.1055/s-2006-927394.
18. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010; 18: 175-89. doi: 10.1016/j.devcel.2010.01.011.

19. Gharib AM, Thomasson D, Li KC. Molecular imaging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004; 127: S153-8. doi:
20. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*. 1992; 53: 275-354. doi:
21. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17: 451-9. doi: 10.1038/nrm.2016.25.
22. Lacoste B, Raymond VA, Cassim S, Lapierre P, Bilodeau M. Highly tumorigenic hepatocellular carcinoma cell line with cancer stem cell-like properties. *PLoS One*. 2017; 12: e0171215. doi: 10.1371/journal.pone.0171215.
23. Cassim S, Raymond VA, Lapierre P, Bilodeau M. From in vivo to in vitro: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation. *PLoS One*. 2017; 12: e0190366. doi: 10.1371/journal.pone.0190366.
24. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett*. 1995; 358: 1-3. doi:
25. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010; 20: 51-6. doi: 10.1016/j.gde.2009.10.009.
26. Goswami CP, Nakshatri H. PROGene: gene expression based survival analysis web application for multiple cancers. *J Clin Bioinforma*. 2013; 3: 22. doi: 10.1186/2043-9113-3-22.
27. Goswami CP, Nakshatri H. PROGeneV2: enhancements on the existing database. *BMC Cancer*. 2014; 14: 970. doi: 10.1186/1471-2407-14-970.
28. Lee Z, Luo G. Issues pertaining to PET imaging of liver cancer. *J Fasting Health*. 2014; 2: 62-4. doi:
29. Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics*. 2007; 8: 113-28. doi:
30. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 2005; 202: 654-62. doi: 10.1002/jcp.20166.
31. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*. 2003; 89: 3-9. doi: 10.1079/BJN2002763.
32. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaiba MM, Begnami MD, Vilela RS, Paiva GR, Andrade RG, Soares FA. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66: 965-72. doi:
33. Grobholz R, Hacker HJ, Thorens B, Bannasch P. Reduction in the expression of glucose transporter protein GLUT 2 in preneoplastic and neoplastic hepatic lesions and reexpression of GLUT 1 in late stages of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 1993; 53: 4204-11. doi:
34. Fitamant J, Kottakis F, Benhamouche S, Tian HS, Chuvin N, Parachoniak CA, Nagle JM, Perera RM, Lapouge M, Deshpande V, Zhu AX, Lai A, Min B, et al. YAP Inhibition Restores Hepatocyte Differentiation in Advanced HCC, Leading to Tumor Regression. *Cell Rep*. 2015. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.027.
35. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 685-98. doi: 10.1038/nrc3365.
36. Kroemer G. Mitochondria in cancer. *Oncogene*. 2006; 25: 4630-2. doi: 10.1038/sj.onc.1209589.

37. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 2008; 18: 165-73. doi: 10.1016/j.tcb.2008.01.006.
38. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition.* 2000; 16: 202-8. doi:
39. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 763-77. doi: 10.1038/nrc2222.
40. Cassim S, Raymond VA, Dehbidi-Assadzadeh L, Lapierre P, Bilodeau M. Metabolic reprogramming enables hepatocarcinoma cells to efficiently adapt and survive to a nutrient-restricted microenvironment. *Cell Cycle.* 2018; 1-40. doi: 10.1080/15384101.2018.1460023.
41. Kotiadis VN, Duchen MR, Osellame LD. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840: 1254-65. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.041.
42. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2014; 2: 17. doi: 10.1186/2049-3002-2-17.
43. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014; 24: R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
44. Luanpitpong S, Talbott SJ, Rojanasakul Y, Nimmannit U, Pongrakhananon V, Wang L, Chanvorachote P. Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. *J Biol Chem.* 2010; 285: 38832-40. doi: 10.1074/jbc.M110.124958.
45. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell.* 2011; 147: 992-1009. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016.
46. Zhou D, Shao L, Spitz DR. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Adv Cancer Res.* 2014; 122: 1-67. doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00001-3.
47. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010; 44: 479-96. doi: 10.3109/10715761003667554.
48. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle.* 2009; 8: 3984-4001. doi: 10.4161/cc.8.23.10238.
49. Wang YY, Attane C, Milhas D, Dirat B, Dauvillier S, Guerard A, Gilhodes J, Lazar I, Alet N, Laurent V, Le Gonidec S, Biard D, Herve C, et al. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight.* 2017; 2: e87489. doi: 10.1172/jci.insight.87489.
50. Nozue M, Lee I, Yuan F, Teicher BA, Brizel DM, Dewhirst MW, Milross CG, Milas L, Song CW, Thomas CD, Guichard M, Evans SM, Koch CJ, et al. Interlaboratory variation in oxygen tension measurement by Eppendorf "Histogram" and comparison with hypoxic marker. *J Surg Oncol.* 1997; 66: 30-8. doi:
51. Airley R, Loncaster J, Davidson S, Bromley M, Roberts S, Patterson A, Hunter R, Stratford I, West C. Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 928-34. doi:
52. Le QT, Courter D. Clinical biomarkers for hypoxia targeting. *Cancer Metastasis Rev.* 2008; 27: 351-62. doi: 10.1007/s10555-008-9144-9.
53. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 266-76. doi:

54. Riddle SR, Ahmad A, Ahmad S, Deeb SS, Malkki M, Schneider BK, Allen CB, White CW. Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278: L407-16. doi: 10.1152/ajplung.2000.278.2.L407.
55. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Bilodeau M. Role of EGF receptor tyrosine kinase activity in antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280: G1360-9. doi:
56. Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol*. 2007; 7: 14. doi: 10.1186/1471-213X-7-14.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
58. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54. doi:
59. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DS. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: W147-53. doi: 10.1093/nar/gkw419.
60. Lopes-Rodrigues V, Di Luca A, Mleczko J, Meleady P, Henry M, Pesic M, Cabrera D, van Liempd S, Lima RT, O'Connor R, Falcon-Perez JM, Vasconcelos MH. Identification of the metabolic alterations associated with the multidrug resistant phenotype in cancer and their intercellular transfer mediated by extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2017; 7: 44541. doi: 10.1038/srep44541.
61. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226: 497-509. doi:

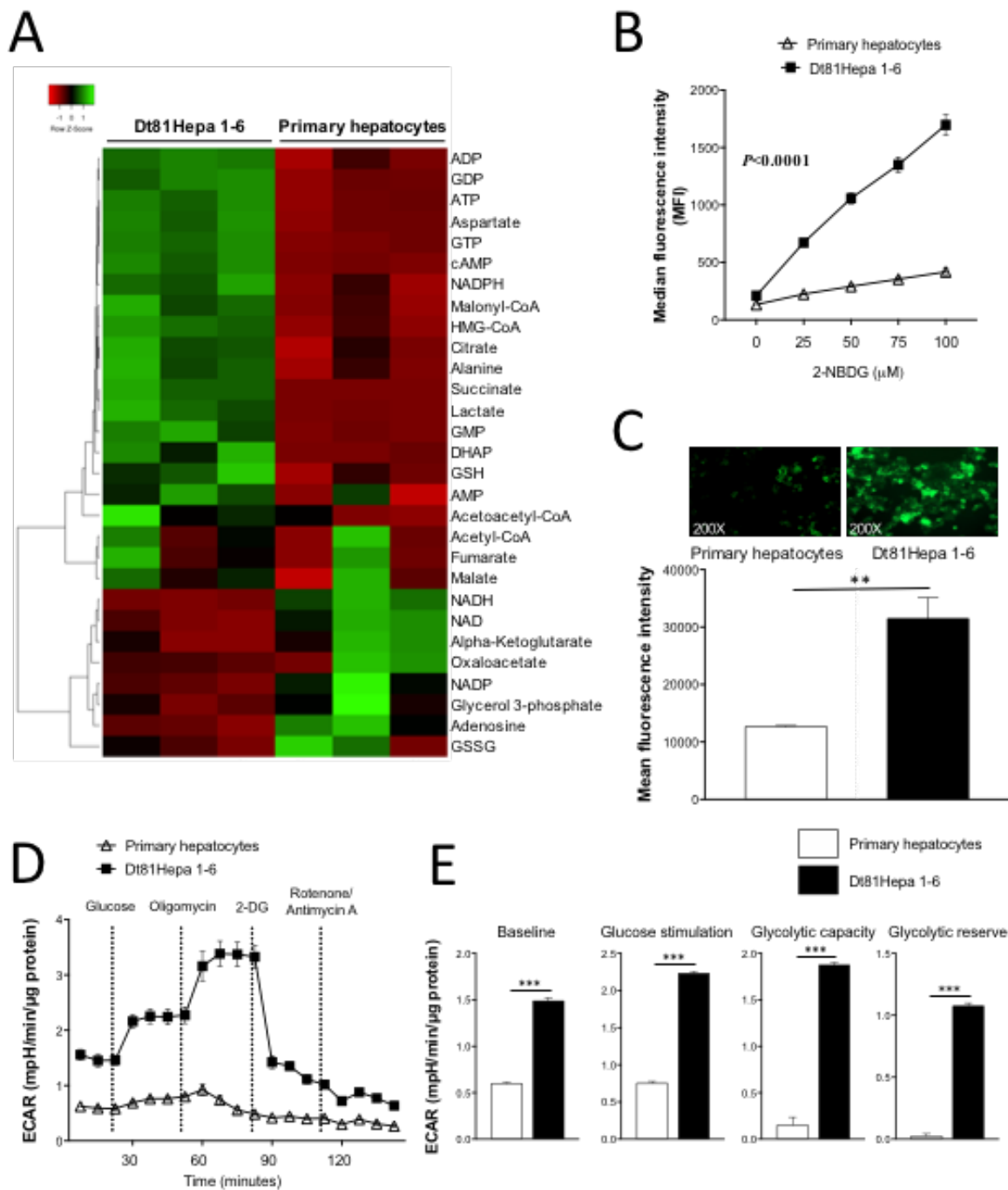


Figure 1: Metabolomic and glucose metabolism analysis of Dt81Hepa1-6 cells. (A) Heatmap depicting the metabolomic analysis of 29 metabolites in Dt81Hepa1-6 cells and primary hepatocytes both cultured in 25 mM glucose for 48 hrs. **(B)** Median fluorescence

intensity analysis of glucose uptake with increasing doses of glucose fluorescent analog 2-NBDG [0-100 μ M] in glucose-free DMEM. (C) Fluorescent signal quantification and representative microphotographs of 2-NBDG-labeled primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells [50 μ M of 2-NBDG]. (D-E) Extracellular acidification rate (ECAR) measurements using Seahorse XF24 Extracellular Flux analyzer. Primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells were cultured in 25 mM glucose DMEM for 48 hrs. Glycolytic capacity and glycolytic reserve were calculated based on the increase in ECAR after injection of oligomycin. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (** P <0.01, *** P <0.001).

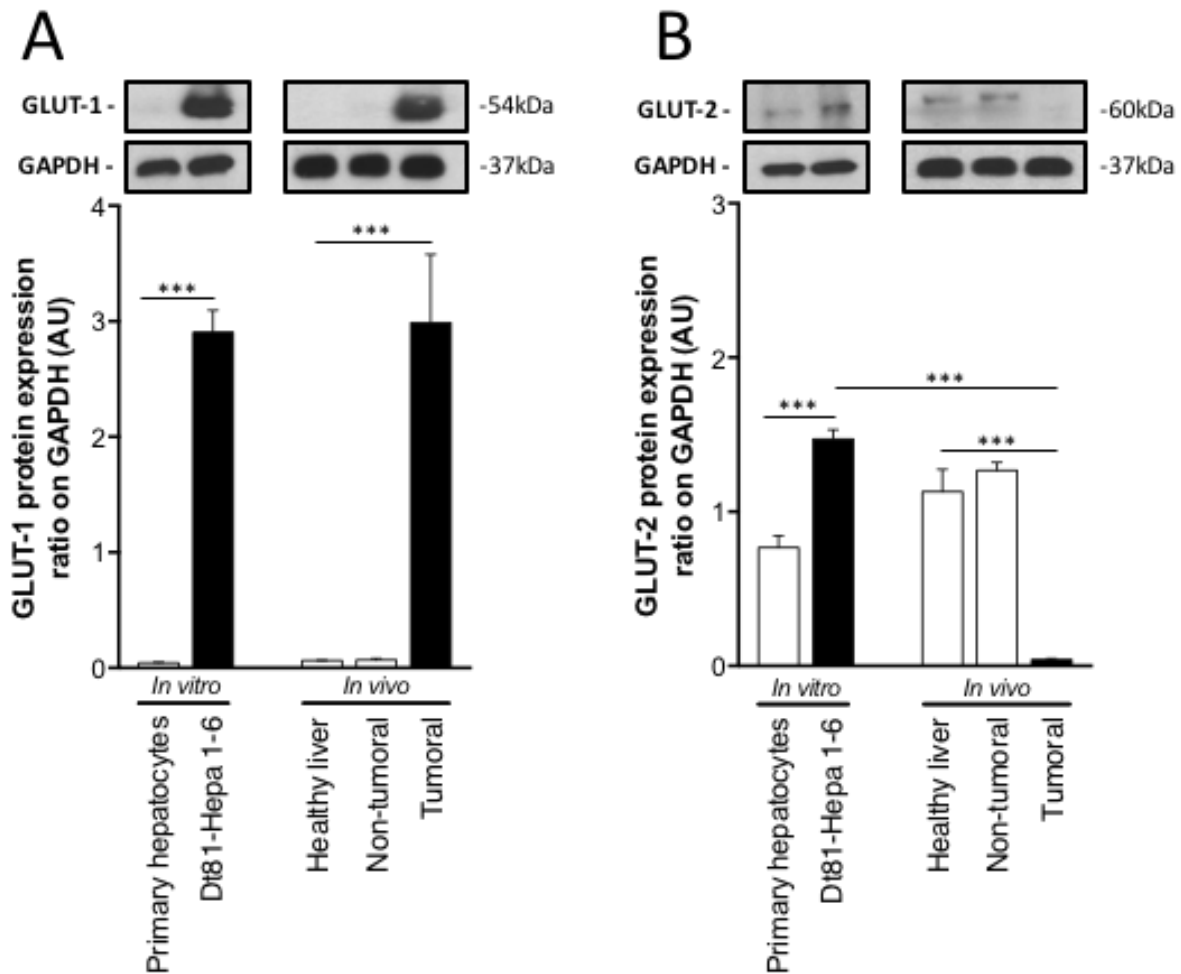


Figure 2: Increased glucose uptake by Dt81Hepa1-6 is mediated by a rearrangement of glucose transporters. (A-B) Protein levels of Glucose transporter 1 (GLUT-1) and Glucose transporter 2 (GLUT-2) in primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells after 48 hrs incubation in 25 mM glucose DMEM (*In vitro*) and in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens (*In vivo*). Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (***) $P < 0.001$.

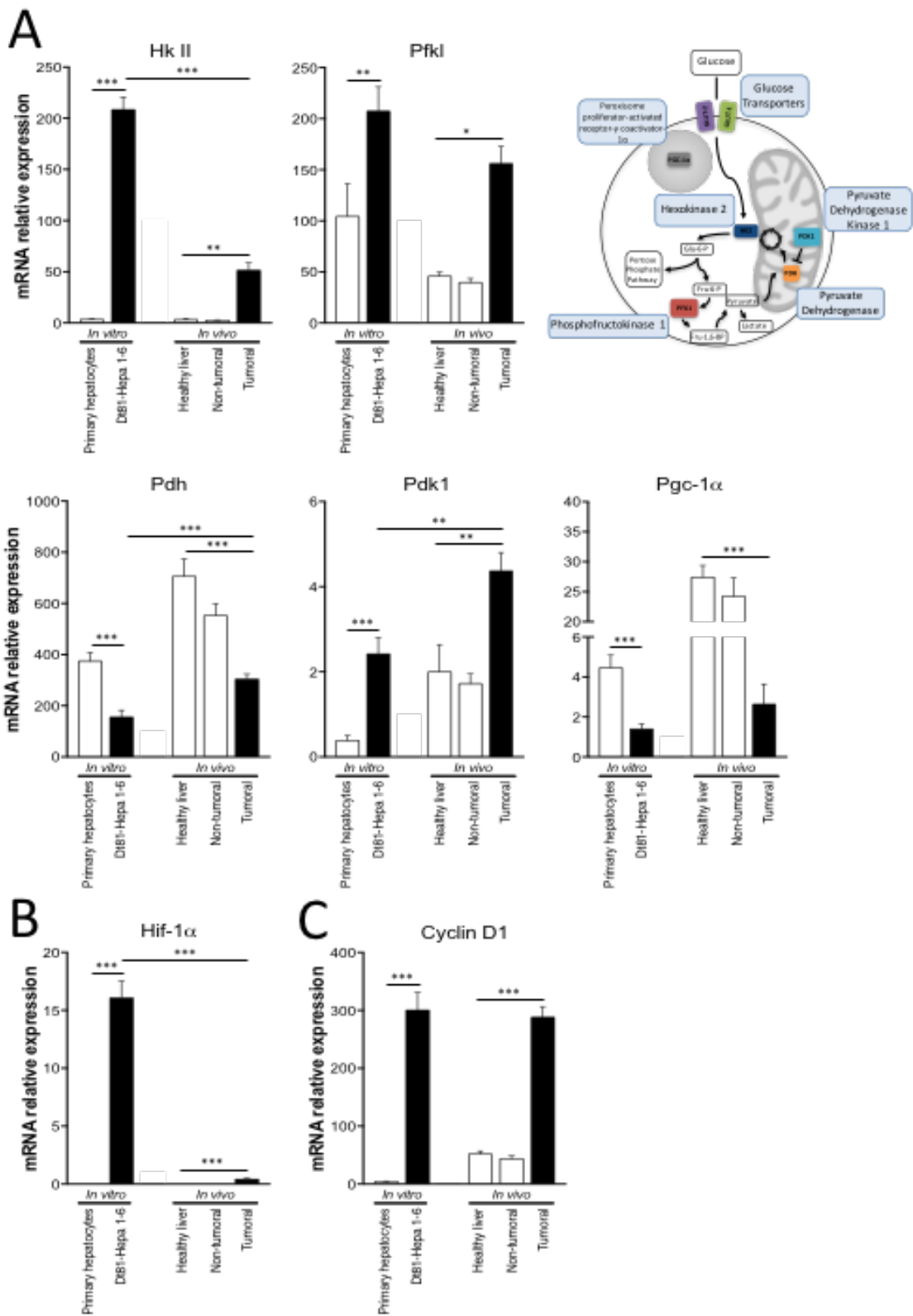


Figure 3: Expression of glycolysis-related genes by Dt81Hepa1-6 cells and Dt81Hepa1-6-derived tumors. mRNA gene expression of (A) *Hexokinase II (Hk II)*, *Phosphofructokinase liver (Pfk1)*, *Pyruvate dehydrogenase (Pdh)*, *Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (Pdk1)*, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc-1 α)*, (B) *Hypoxia inducible factor-1alpha (Hif-1 α)* and (C) *Cyclin D1*, in primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells after a 48 hrs incubation in 25 mM glucose DMEM (*In vitro*) and in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens (*In vivo*). Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

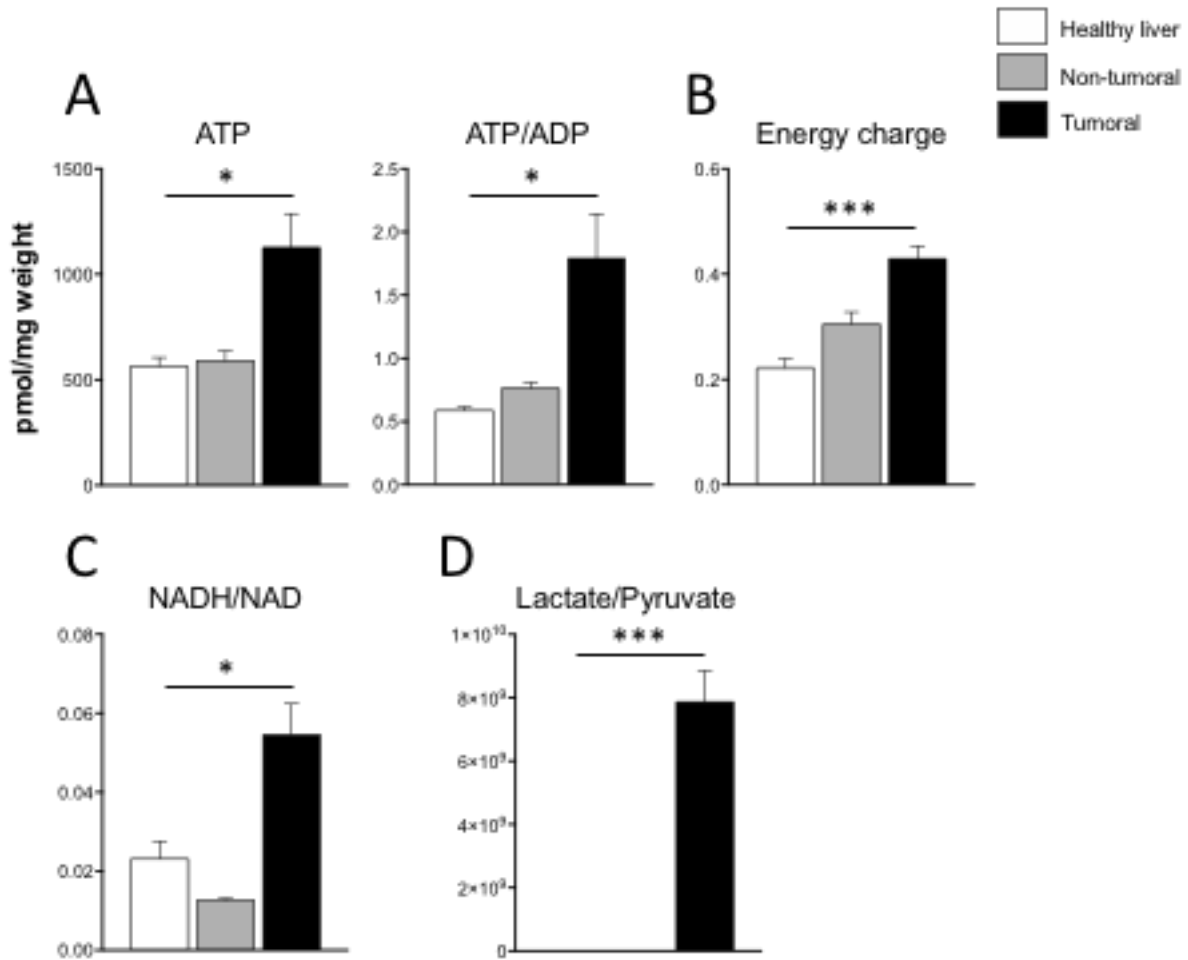


Figure 4: Energetic profile of Dt81Hepa1-6-derived tumors greatly differs from that of healthy liver and non-tumoral samples. (A) Evaluation of total intracellular ATP and ATP/ADP ratio, (B) calculated Energy charge values, (C) NADH/NAD and (D) Lactate/Pyruvate ratios in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (* P <0.05, *** P <0.001).

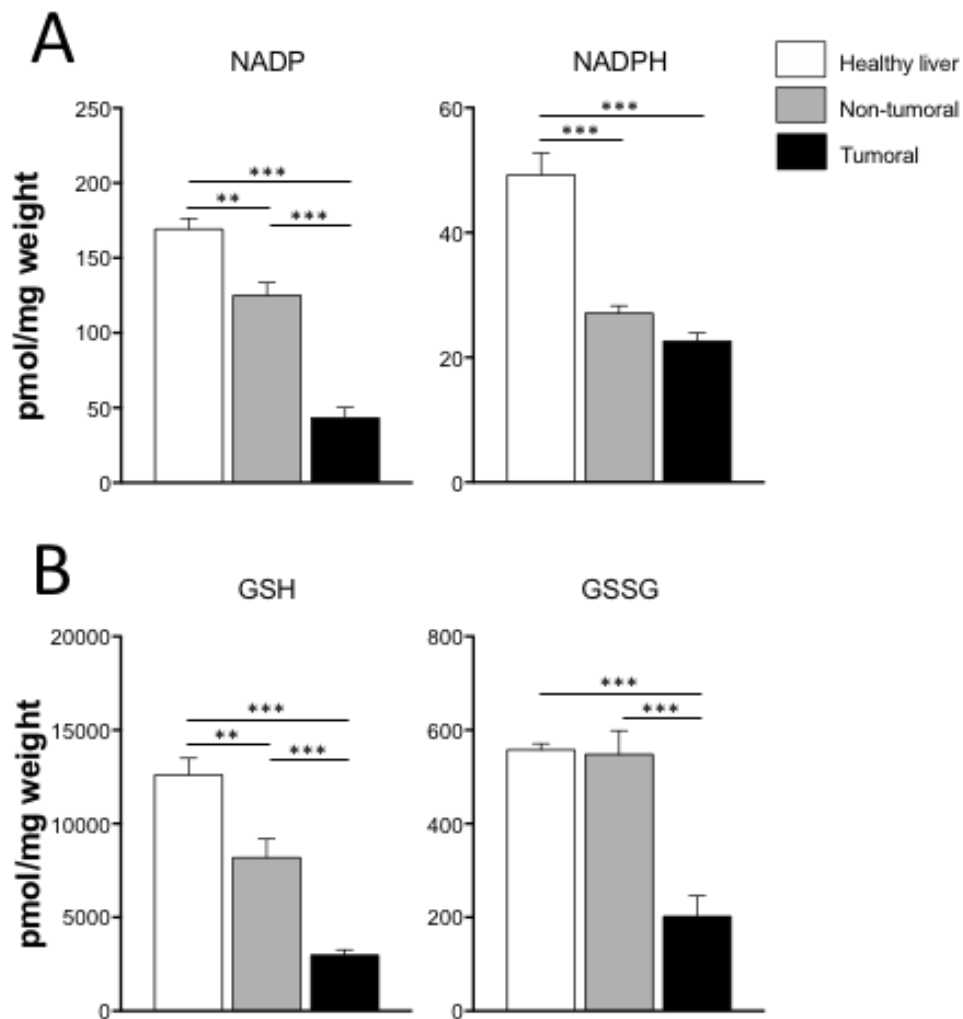


Figure 5: Dt81Hepa1-6-derived tumors show lower contents of antioxidative-related metabolites. (A-B) Total intracellular NADP, NADPH and GSH, GSSG levels in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

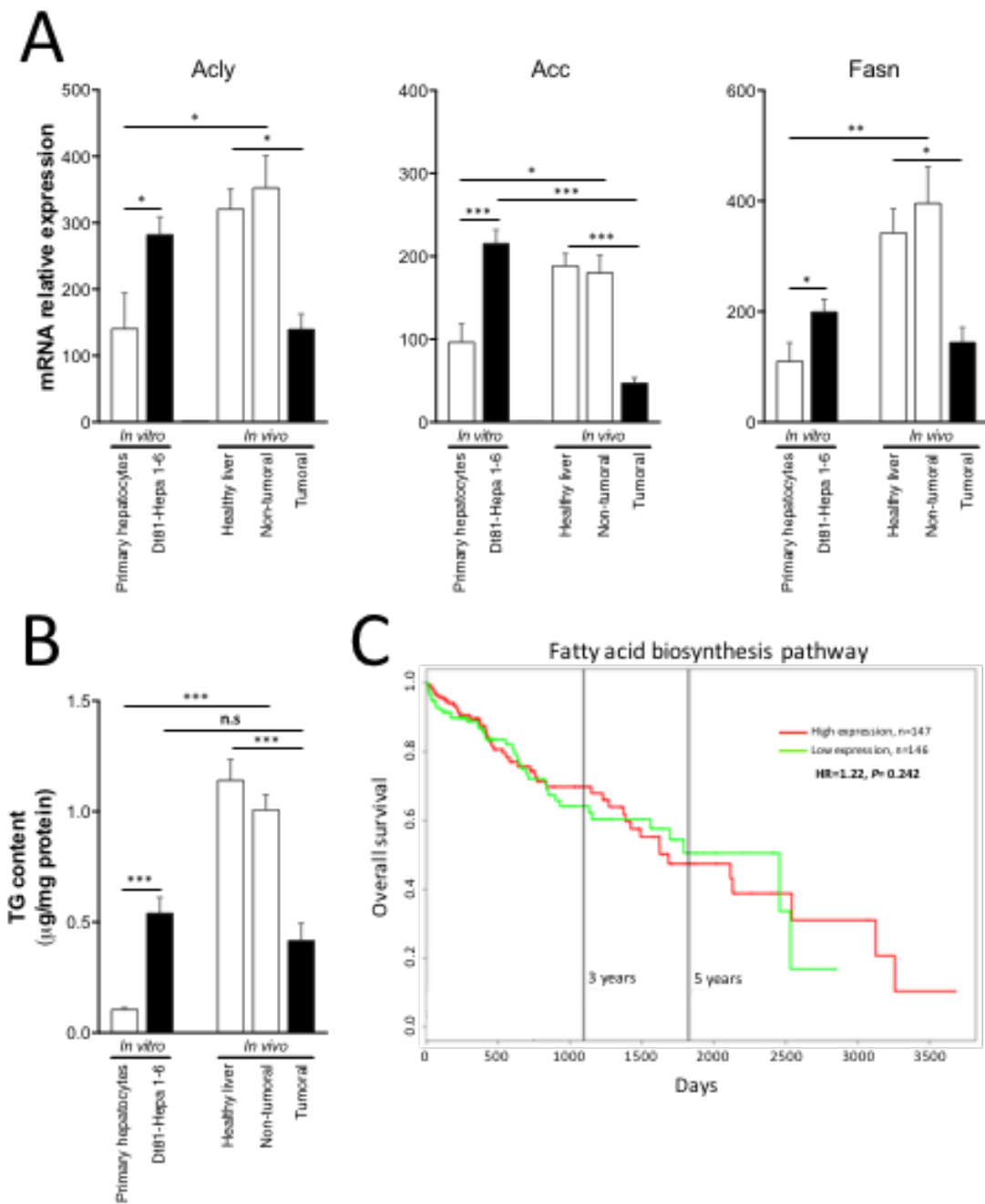


Figure 6: Fatty acid biosynthesis in HCC cells. (A) mRNA relative gene expression of *ATP citrate lyase (Acly)*, *Acetyl-CoA carboxylase (Acc)*, *Fatty acid synthase (Fasn)*, (B) assessment of triglyceride (TG) content, respectively in primary hepatocytes and Dt81Hepa1-6 cells after

a 48 hrs incubation in 25 mM glucose DMEM (*In vitro*) and in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens (*In vivo*). (C) Kaplan-Meier (KM) plots of Overall survival probability of HCC cancer patients (TCGA data). Patients have been stratified into high (red lines) or low (green lines) expression-based ‘risk-groups’ by their mean of median transcript-expressions of fatty acid biosynthesis related genes. The patient follow-up is indicated in days. Respective Log-rank test p-values and Hazard Ratio (HR) are shown. The numbers of patients for each group are indicated below the respective KM plots. Studied genes are described in supplementary Table 2.

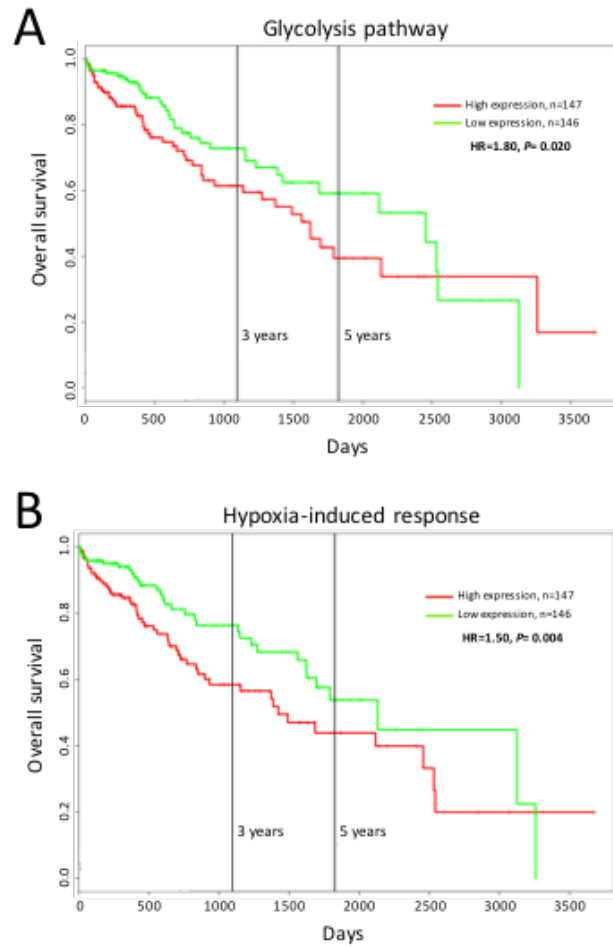
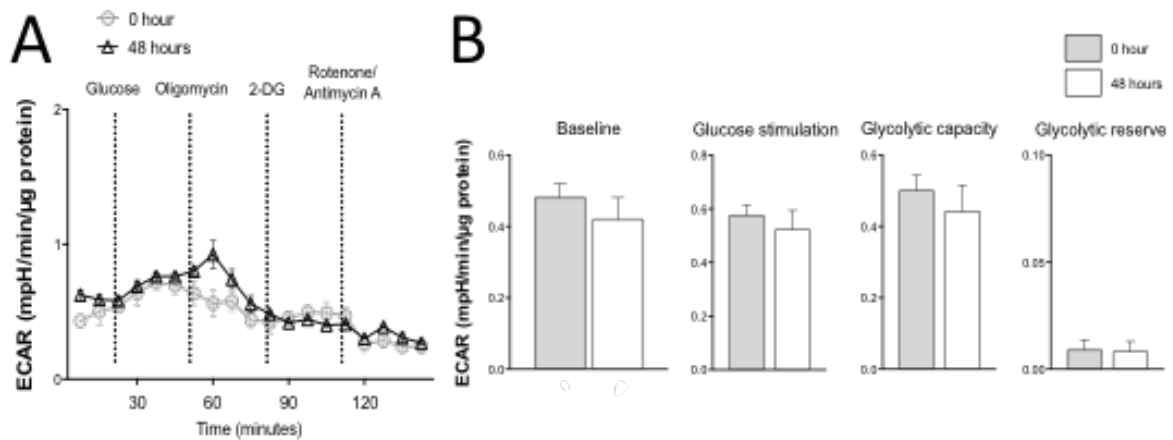
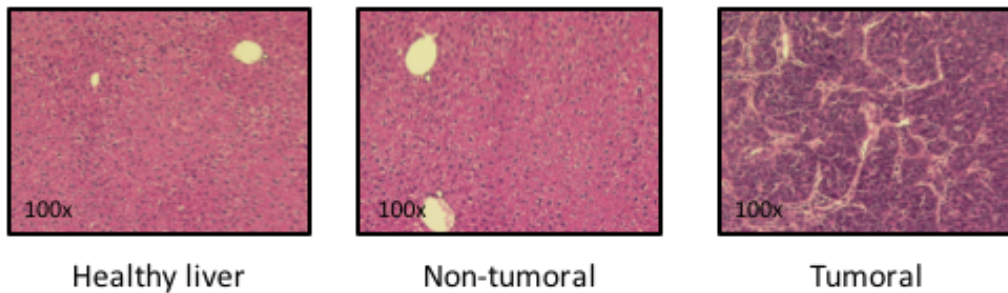


Figure 7: High expressions of glycolysis and hypoxia-induced response genes are associated with poor prognosis in HCC patients. Kaplan-Meier (KM) plots of Overall survival probability of HCC cancer patients (TCGA data). Patients have been stratified into high (red lines) or low (green lines) expression-based ‘risk-groups’ by their mean of median transcript-expressions of (A) glycolytic and (B) hypoxia-induced response genes. Patient follow-up is indicated in days. Respective Log-rank test p-values and Hazard Ratio (HR) are shown. The numbers of patients for each group are indicated below the respective KM plots. Studied genes are described in supplementary Table 2.

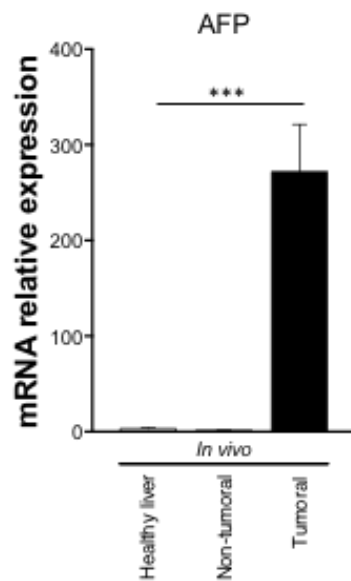


Supplementary Figure 1: Glycolytic profile of primary hepatocytes *in vitro*. (A-B) Extracellular acidification rate (ECAR) measurements using the Seahorse XF24 Extracellular Flux analyzer 2 hrs after attachment in freshly isolated (0 hr after attachment) and seeded hepatocytes (48 hrs after attachment) in 25 mM glucose DMEM. Glycolytic capacity and glycolytic reserve were calculated based on the increase in ECAR after injection of oligomycin. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments.

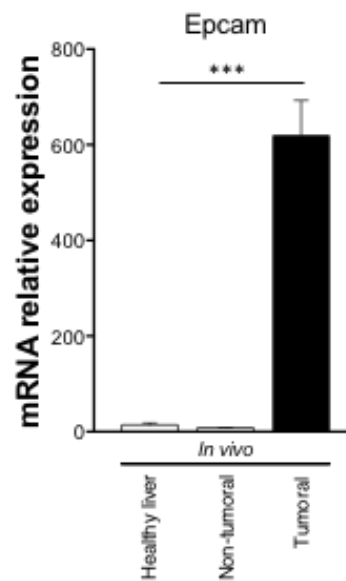
A



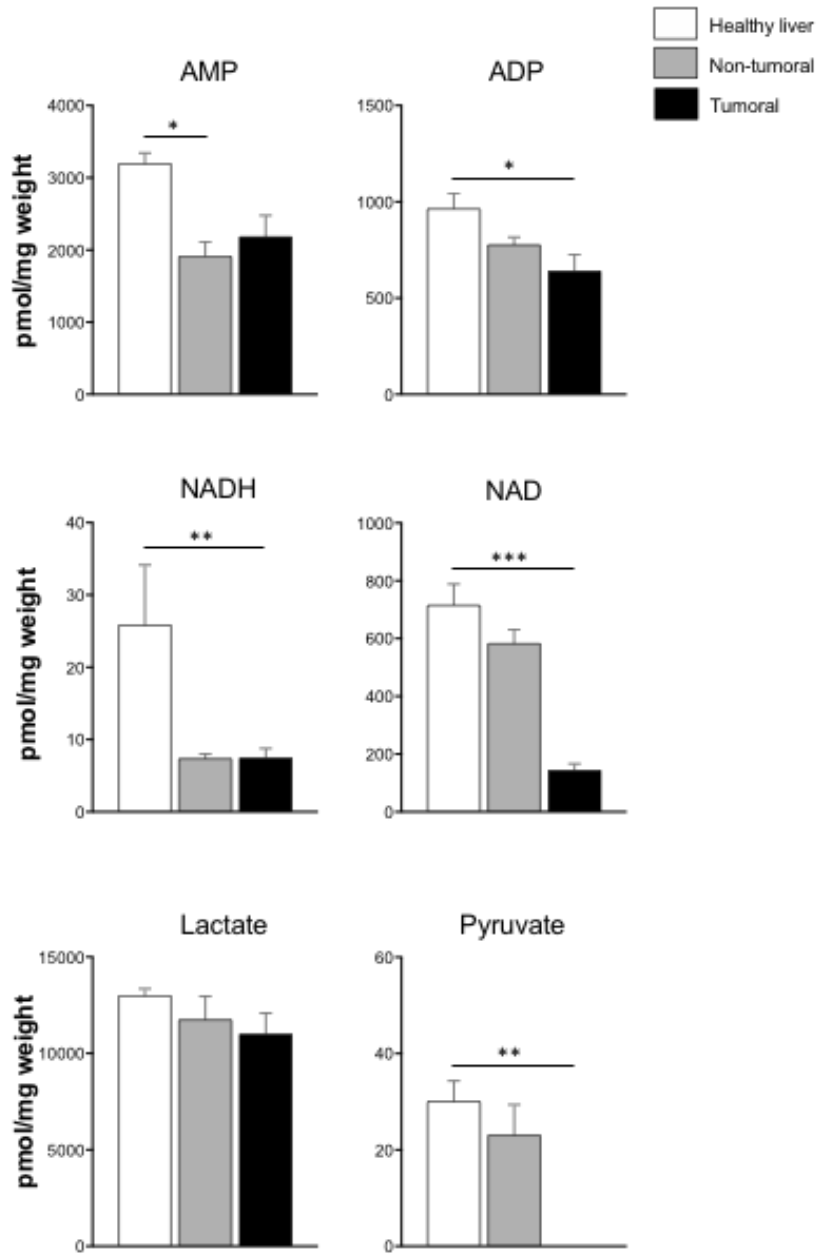
B



C

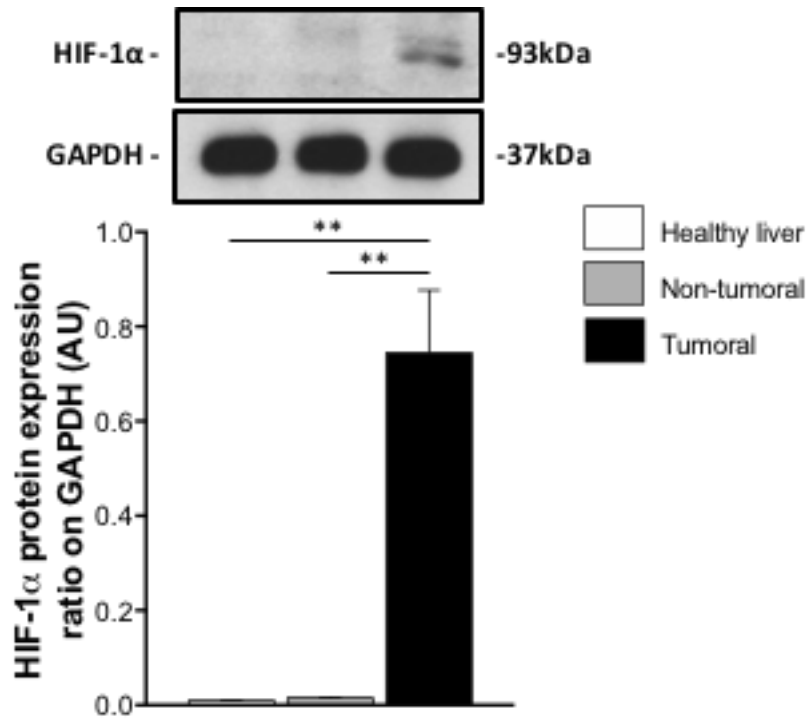


Supplementary Figure 2: Characterization of Dt81Hepa1-6-derived tumoral and non-tumoral liver specimens. (A) Representative microphotographs at 100x magnification of HPS-stained liver slices obtained from healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens. (B-C) mRNA relative expression of *Alfa-fetoprotein (AFP)* and *Epithelial cell adhesion molecule (Epcam)* in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (***) $P < 0.001$.



Supplementary Figure 3: Tumorigenic profile of Dt81Hepa1-6-derived tumors.

Evaluation of total intracellular AMP, ADP, NADH, NAD, Lactate and Pyruvate in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).



Supplementary Figure 4: Quantification of HIF-1 α *in vivo*. HIF-1 α protein levels in healthy liver, non-tumoral and tumoral liver specimens. Values are \pm SEM of at least 3 independent experiments. (** P <0.01).

Supplementary Table 1: Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primers	Reverse primers
Tumor and glycolysis-related molecules		
<i>Hk II</i>	TGATCGCCTGCTTATTCACGG	AACCGCCTAGAAATCTCCAGA
<i>Pfkl</i>	AGCTCAGAACTACGCACACT	AGTGGTAGTGATGGCGTCAA
<i>Pdh</i>	GGGACGTCTGTTGAGAGAGC	TGTGTCCATGGTAGCGGTAA
<i>Pdk1</i>	CTATGAAAGGCCCCGTTTT	TAAGTGGACCTCGCAGATGG
<i>Pgc-1α</i>	ATACCGCAAAGAGCACGAGAAG	CTCAAGAGCAGCGAAAGCGTCACAG
<i>HIF-1α</i>	CCAGTTCCTCATCCTTCCCC	ACCGGCATCCAGAAGTTTTTC
<i>Cyclin D1</i>	TCCCTGGCTTGCTCAGTGCCTA	TGCCACACGCCATGAGACCA
<i>Afp</i>	TCCTCCTGCTACATTTGCT	AGGCTTTGCTTGTGCTGAAT
<i>Epcam</i>	AAAGCCAAGCAGTGCAACGGCA	TGTGAACGCCTCTTGAAGCGCA
Fatty acid metabolism-related molecules		
<i>Acly</i>	TGGATGCCACAGCTGACTAC	GGTTCAGCAAGGTCAGCTTC
<i>Acc</i>	GAGAGGGGTCAAGTCCTTCC	CTGCTGCCGTCATAAGACAA
<i>Fasn</i>	AAGTTGCCCGAGTCAGAGAA	CGTCGAACTTGGAGAGATCC
Reference genes		
<i>HPRT1</i>	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG	CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT
<i>Ppia</i>	CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG	TGTAAAGTCACCACCCTGGCACAT
<i>H2afz</i>	ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA	TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA

Supplementary Table 2: List of genes used for survival analysis

Fatty acid biosynthesis pathway			
<i>Ptges3</i>	<i>Prostaglandin E Synthase 3</i>	<i>Mif</i>	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
<i>Fads1</i>	<i>Fatty Acid Desaturase 1</i>	<i>Oxsm</i>	<i>3-Oxoacyl-ACP Synthase, Mitochondrial</i>
<i>Ptgs1</i>	<i>Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1</i>	<i>Ptgds</i>	<i>Prostaglandin D2 Synthase</i>
<i>Mcat</i>	<i>Malonyl-CoA-Acyl Carrier Protein Transacylase</i>	<i>Lta4h</i>	<i>Leukotriene A4 Hydrolase</i>
<i>Fads2</i>	<i>Fatty Acid Desaturase 2</i>	<i>Hpgd</i>	<i>15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase</i>
<i>Cd74</i>	<i>CD74 Molecule</i>	<i>Degs1</i>	<i>Delta 4-Desaturase, Sphingolipid 1</i>
<i>Brcal</i>	<i>BRCA1, DNA Repair Associated</i>		
Glycolysis			
<i>Eno1</i>	<i>Enolase 1</i>	<i>Pfkm</i>	<i>Phosphofructokinase, Muscle</i>
<i>Eno2</i>	<i>Enolase 2</i>	<i>Pfkp</i>	<i>Phosphofructokinase, Platelet</i>
<i>Eno3</i>	<i>Enolase 3</i>	<i>Pgam1</i>	<i>Phosphoglycerate Mutase 1</i>
<i>Aldoa</i>	<i>Aldolase, Fructose-Bisphosphate A</i>	<i>Pgam2</i>	<i>Phosphoglycerate Mutase 2</i>
<i>Aldob</i>	<i>Aldolase, Fructose-Bisphosphate B</i>	<i>Pgk1</i>	<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>
<i>Aldoc</i>	<i>Aldolase, Fructose-Bisphosphate C</i>	<i>Pklr</i>	<i>Pyruvate Kinase, Liver And RBC</i>
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	<i>Pkm2</i>	<i>Pyruvate Kinase, Muscle 2</i>
<i>Gapdhs</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, spermatogenic</i>	<i>Ppp2ca</i>	<i>Protein Phosphatase 2 Catalytic Subunit Alpha</i>
<i>Gpi</i>	<i>Glucose-6-Phosphate Isomerase</i>	<i>Ppp2cb</i>	<i>Protein Phosphatase 2 Catalytic Subunit Beta</i>
<i>Pfkfb1</i>	<i>6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6- Biphosphatase 1</i>	<i>Ppp2r1a</i>	<i>Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Aalpha</i>
<i>Pfkfb2</i>	<i>6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6- Biphosphatase 2</i>	<i>Ppp2r1b</i>	<i>Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Abeta</i>
<i>Pfkfb3</i>	<i>6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6- Biphosphatase 3</i>	<i>Ppp2r5d</i>	<i>Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B'Delta</i>
<i>Pfkfb4</i>	<i>6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-</i>	<i>Tpi1</i>	<i>Triosephosphate Isomerase 1</i>

	<i>Biphosphatase 4</i>		
<i>Pfkl</i>	<i>Phosphofructokinase, Liver Type</i>		
Hypoxia-induced response			
<i>Cldn3</i>	<i>Claudin 3</i>	<i>Cd24</i>	<i>CD24 Molecule</i>
<i>Pdia2</i>	<i>Protein Disulfide Isomerase Family A Member 2</i>	<i>Mt3</i>	<i>Metallothionein 3</i>
<i>Arnt2</i>	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator 2</i>	<i>Epas1</i>	<i>Endothelial PAS Domain Protein 1</i>
<i>Pml</i>	<i>Promyelocytic Leukemia</i>	<i>Nf1</i>	<i>Neurofibromin 1</i>
<i>Egln2</i>	<i>Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 2</i>	<i>Crebbp</i>	<i>CREB Binding Protein</i>
<i>Bnip3</i>	<i>BCL2 Interacting Protein 3</i>	<i>Smad4</i>	<i>SMAD Family Member 4</i>
<i>Egln1</i>	<i>Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 2</i>	<i>Smad3</i>	<i>SMAD Family Member 3</i>
<i>Tgfb2</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 2</i>	<i>Hsp90b1</i>	<i>Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1</i>
<i>Alas2</i>	<i>5'-Aminolevulinate Synthase 2</i>	<i>Ep300</i>	<i>E1A Binding Protein P300</i>
<i>Plod1</i>	<i>Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1</i>	<i>Hif1a</i>	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit</i>
<i>Plod2</i>	<i>Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2</i>	<i>Vegfa</i>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
<i>Cxcr4</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>	<i>Narfl</i>	<i>Nuclear Prelamin A Recognition Factor Like</i>
<i>Ang</i>	<i>Angiogenin</i>	<i>Chrn2</i>	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Beta 2 Subunit</i>
<i>Chrna4</i>	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 4 Subunit</i>		

IV) Discussion générale

Nous avons abordé au travers des parties précédentes différents aspects traitant de la fonctionnalité du foie en condition physiologique normale et tumorale en présence d'hépatocarcinome. Après un bref rappel des points importants à retenir et découlant directement de ce travail de doctorat, nous allons par la suite élargir un peu plus notre champs de vision afin d'identifier quels peuvent être les autres acteurs moléculaires et métaboliques impliqués dans la tumorigénicité des cellules cancéreuses de façon générale.

Première partie: Rappels

L'objectif de ce premier travail a ainsi consisté à évaluer l'ampleur des modifications métaboliques s'opérant au sein des hépatocytes normaux pendant et après le processus d'isolation. Pourquoi avoir ainsi effectué une telle caractérisation dans le cadre de l'étude du CHC? Quel est le lien entre ces observations et celles sur le métabolisme des cellules d'hépatocarcinome? Et enfin, quel est l'impact potentiel de ces observations sur les travaux de recherche portant sur le foie? L'étude du métabolisme des cellules de CHC nous avait effectivement dans un premier temps amené à considérer une condition contrôle, c'est à dire des cellules non cancéreuses avec *in fine* la possibilité de comparer leur métabolisme à celui des cellules tumorales. Cependant, la littérature semblait indiquer que des modifications du métabolisme prenaient effectivement place au sein des hépatocytes primaires. En effet, une diminution de la quantité totale de glutathion avait été notée au fil des différentes étapes de l'isolation (219). Or, voulant initialement étudier et comparer le métabolisme des hépatocytes normaux à celui des cellules tumorales, une caractérisation poussée visant à mieux connaître ces dites modifications est devenue inévitable si on voulait utiliser les cellules primaires en tant que contrôles. Nous avons ainsi constaté qu'outre une diminution des métabolites impliqués dans la réponse face au stress oxydant, une altération importante de plusieurs autres métabolites était aussi observée non seulement pendant les différentes étapes de l'isolation

mais aussi en condition de culture primaire. Parmi ces métabolites, nous avons retrouvé ceux jouant un rôle clef dans le métabolisme mitochondrial, en particulier une diminution drastique de ceux du TCA et du potentiel énergétique de la cellule. L'augmentation flagrante et à la fois paradoxale du ratio ATP/ADP et de la charge énergétique au fil du temps nous a alors incité à vérifier la capacité respiratoire fonctionnelle de ces hépatocytes primaires *in vitro*. Nous avons ainsi démontré que ce surplus énergétique n'était en réalité que la résultante d'une quiescence cellulaire. Il est primordial de noter à cette occasion qu'aucune altération des métabolites associés à la voie de la glycolyse n'a été observée dans les conditions étudiées, ce qui nous a permis de pouvoir par la suite comparer le métabolisme glycolytique des Dt81Hepa1-6 avec celui des hépatocytes primaires dans la troisième étude. En dehors du fait de la vigilance que nous nous devons donc d'avoir dans l'utilisation d'hépatocytes primaires comme contrôles comparatifs avec le métabolisme des cellules de CHC, nos observations nous amènent également à réévaluer les études ayant eu recours à ce modèle dans la caractérisation physiologique du foie. En effet, ces 20-30 dernières années ont été marquées par une avancée considérable de connaissances grâce à l'utilisation de cultures primaires d'hépatocytes, entre autres pour des études de métabolisme et de toxicité (220-222). Bien que la véracité de ces études ne soient aucunement remises en cause dans l'interprétation des données jusqu'ici présentées, les altérations métaboliques majeures que nous venons de décrire nous amènent légitimement à penser que les résultats émanant de ces études ne soient pas toujours l'exact reflet de ce qui se passe *in vivo*. En effet, les hépatocytes en culture primaire ne réagissant pas métaboliquement de la même façon lorsque sortis de leur microenvironnement tridimensionnel, une attention toute particulière devra alors être accordée aux études utilisant ces cellules. Ainsi, ce premier volet nous aura permis d'avoir une meilleure conception et délimitation des champs d'application associés à ce modèle, tant dans l'étude du métabolisme des cellules cancéreuses, que dans celui des xénobiotiques ou de la physiologie normale du foie.

Le deuxième volet de cette thèse a consisté à décrire fonctionnellement la lignée Dt81Hepa1-6 par comparaison à la lignée mère dont elle est issue: la lignée Hepa1-6. Au-delà d'une simple caractérisation phénotypique et fonctionnelle visant à établir des différences entre ces deux lignées issues d'hépatocarcinome, ce second volet nous aura surtout permis de mieux

aborder la notion d'hétérogénéité tumorale. Nous avons ainsi démontré que la lignée Dt81Hepa1-6 disposait non seulement d'une plus grande facilité à adapter son métabolisme en présence d'un microenvironnement hostile, mais également que c'était bel et bien cette plasticité métabolique qui semblait être à l'origine de sa plus grande tumorigénicité. Par leur capacité à pouvoir puiser dans leurs réserves en acides gras, les cellules de la lignée Dt81Hepa1-6 arrivent alors par opposition à celles de la lignée Hepa1-6 à maintenir leur potentiel énergétique. Elles peuvent ainsi proliférer en l'absence de glucose. Cette capacité de la Dt81Hepa1-6 à pouvoir passer d'un phénotype hautement glycolytique en présence saturante de glucose (25 mM) à un métabolisme purement mitochondrial en l'absence de glucose souligne ainsi cette notion de flexibilité métabolique des cellules cancéreuses, mais ouvre également la porte à de nouvelles interrogations. Comment expliquer qu'une telle différence fonctionnelle puisse être retrouvée entre une lignée fille et une lignée mère? Et enfin, comment concevoir que la tumorigénicité d'une même cellule puisse à la fois dépendre du potentiel glycolytique et de celui de la mitochondrie? Plusieurs études s'étant penchées sur l'initiation et la progression tumorale ont révélé qu'il s'agissait en réalité d'un processus dynamique. Dynamique dans le sens où certains mécanismes comme les mutations, qu'elles soient d'ordre somatiques ou germinales, peuvent influencer le phénotype fonctionnel de ces cellules tumorales "en devenir" et alors leur procurer un certain avantage sélectif. Ainsi, certaines cellules tumorales seront positivement sélectionnées et vont donc pouvoir proliférer et coloniser de façon prédominante la niche tumorale, aux dépens des cellules désavantagées qui soumises à cette même pression de sélection finiront par mourir faute de pouvoir s'accommoder (223-226). Pour pousser un peu plus loin le raisonnement, nous pouvons finalement nous demander si ces mutations qui semblent préfigurer l'apparition du cancer peuvent également avoir lieu une fois la tumeur mise en place? La réponse semble être oui car comme évoqué dans l'introduction, une hétérogénéité fonctionnelle a également été notée au sein des cellules cancéreuses d'une seule et même tumeur. Ceci explique ainsi: 1) qu'elles ne disposent pas toutes de la même machinerie enzymatique et que l'activation de voies métaboliques différentes pourra alors être retrouvée face à un même microenvironnement, et 2) que certaines de ces cellules présentent une tumorigénicité bien plus élevée par rapport à d'autres cellules tumorales avoisinantes. Par analogie, nous pouvons alors présumer que la différence de plasticité métabolique observée entre la Dt81Hepa1-6 et la Hepa1-6 puisse être

le fruit d'une multitude de mutations étant non seulement à l'origine de sa sélection mais surtout de sa grande agressivité. Il aurait toutefois été souhaitable et pertinent d'effectuer des analyses génétiques et/ou épigénétiques pour tenter de répondre au mieux à cette question. Ainsi, comme nous avons pu le voir, la grande tumorigénicité de la Dt81Hepa1-6 est liée à sa plasticité métabolique, cette dernière reposant à la fois sur le métabolisme de la glycolyse et sur celui de la mitochondrie. *De facto*, cette dernière observation contraste alors avec l'hypothèse de Warburg affirmant que si les cellules cancéreuses sont amenées à avoir un taux élevé de glycolyse, c'est parce qu'elles disposent en réalité de mitochondries non fonctionnelles. Cette affirmation émise dans les années 20 s'est par la suite avérée erronée comme l'ont démontré plusieurs études y compris la nôtre. En effet, les cellules cancéreuses disposent non seulement de mitochondries parfaitement fonctionnelles, mais peuvent métaboliquement aussi faire appel à ces dernières en situation de "détresse". Dans notre cas, l'absence de glucose engendre l'activation de la voie d'oxydation des acides gras au sein de la Dt81Hepa1-6, ce qui aura pour conséquences une production accrue de GTP et d'ATP et donc un maintien du potentiel prolifératif. Cette capacité de "switch" métabolique est, selon nous, un trait de caractère particulier et essentiel à la tumorigénicité de la lignée Dt81Hepa1-6. Une des limites de cette étude repose sur le fait de n'avoir effectivement étudié cette notion de reprogrammation métabolique qu'au sein du couple Hepa1-6 /Dt81Hepa1-6. Il aurait ainsi été très intéressant de constater si de telles différences métaboliques auraient également pu être constatées au sein d'autres couples de lignées mère/fille, pour au final voir si cela aurait été de nouveau bénéfique dans la survie des cellules cancéreuses. De même, une caractérisation métabolique plus poussée des cellules Huh7 et HepG2 nous aurait permis de souligner avec plus de précision si l'une de ces deux lignées disposent d'une plus grande capacité à pouvoir métaboliquement se reprogrammer face à un microenvironnement délétère. L'autre limite de cette étude réside dans le fait d'avoir eu recours à l'utilisation de cisplatine. Par opposition au sorafénib, le cisplatine n'est en effet pas utilisé en clinique dans le traitement du CHC. Alors pourquoi avoir eu recours à cet agent cytotoxique dans le cadre de notre étude? Et surtout, en quoi l'usage du sorafénib, qui en plus d'être cliniquement plus relevant, pourrait-il permettre de mieux cibler le métabolisme tumoral? Contextuellement parlant, nous étions amenés dans le cadre de ce projet à essayer de comprendre par quel(s) mécanisme(s) la Dt81Hepa1-6 arrivait à maintenir une plus grande tumorigénicité et c'est alors que nous nous sommes intéressés au

phénomène de l'apoptose. Or, de par ses propriétés à modifier la conformation locale du double brin d'ADN et donc de favoriser l'apoptose, le cisplatine était ainsi devenu le candidat idéal. Le sorafénib, quant à lui, est un inhibiteur de tyrosine kinase et pourra notamment agir sur la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinases). Or, étant intimement liée à la voie mTOR, une diminution de la voie des MAPK pourrait ainsi avoir de grandes répercussions sur le métabolisme des cellules tumorales (227). L'usage du sorafénib à la place du cisplatine nous aurait ainsi permis d'apprécier son impact sur la plasticité métabolique des Dt81Hepa1-6, sans pour autant nous renseigner sur leur niveau d'apoptose.

Dans ce troisième et dernier volet de nos travaux, nous avons par une approche métabolique identifié les voies métaboliques jouant un rôle essentiel dans la tumorigénicité des cellules issues d'hépatocarcinome. Nous avons constaté que seules les voies de la glycolyse et de la signalisation visant à contrer le stress oxydatif étaient associées au maintien du potentiel tumorigénique des Dt81Hepa1-6. En effet, de l'*in vitro* à *in vivo* en passant chez l'humain, nous avons démontré une plus forte activité de ces voies métaboliques au sein de la Dt81Hepa1-6, mais surtout que la surexpression de ces gènes dans les tumeurs humaines était corrélée à un plus mauvais pronostic clinique des patients atteints de CHC. Outre cette mise en évidence cruciale dans la compréhension fonctionnelle d'une cellule de CHC, cette dernière étude nous a également ouvert la porte à bien d'autres observations. En effet, bien que la β -oxydation permette à la Dt81Hepa1-6 de maintenir sa tumorigénicité en l'absence de glucose, cette fonctionnalité semble être absente *in vivo* et, qui plus est, ne pas affecter la survie des patients. Alors, comment expliquer ces observations contradictoires? Comme mentionné précédemment, la pression de sélection semble avoir joué un rôle décisif dans la sélection et le devenir de la lignée Dt81Hepa1-6. L'avantage alors procuré à cette dernière lui aurait ainsi permis de croître et de proliférer aux dépens des autres cellules environnantes. Si on veut pousser plus loin notre raisonnement, nous pouvons expliquer que cette capacité qu'ont les Dt81Hepa1-6 à pouvoir oxyder leur réserve en acides gras semble avoir été intimement liée à leur processus de sélection. Disposant d'une machinerie enzymatique hautement efficace et fonctionnelle, la Dt81Hepa1-6 peut selon un microenvironnement donné avoir recours à l'activation de cette voie alternative en l'absence de glucose. Cependant, dans un contexte physiologique plus intégré où la privation en glucose ne peut être contrôlée de façon stricte, un

choix des voies métaboliques devra être fait par la Dt81Hepa1-6 dans le seul but de maintenir sa tumorigénicité. Ainsi, seules les voies de la glycolyse et de la signalisation induite par l'hypoxie seront essentielles à son maintien tumorigénique. Toutefois, il aurait été important de s'intéresser à la voie des pentoses phosphates. En effet, découlant directement de la glycolyse, mais également impliquée dans la protection face au stress oxydant induit lors de l'hypoxie, l'étude de cette voie aurait également pu nous fournir de précieuses données. La seconde information apportée par cette étude concerne la notion de plasticité métabolique: cette observation étant tout à fait cohérente avec les conclusions de notre première étude. En effet, une modulation des niveaux d'expression des transporteurs du glucose GLUT-1 et GLUT-2 a été observée dans nos expériences. Cette différence a été mise en évidence en comparant les Dt81Hepa1-6 aux cellules non tumorales, mais également entre les cellules tumorales issues d'une même lignée *in vitro* versus *in vivo*. Ainsi, alors qu'une surexpression homogène de GLUT-1 a été notée chez la Dt81Hepa1-6 à la fois *in vitro* et *in vivo*, une variation significative de l'expression de GLUT-2 a été notée dans ces mêmes conditions, son expression étant fortement atténuée *in vivo*. Mais alors pourquoi la Dt81Hepa1-6 serait-elle amenée à moduler différemment l'expression de GLUT-2 *in vitro* et *in vivo*? Et en quoi cette observation constitue-t-elle une caractéristique majeure de la notion de plasticité métabolique? Comme nous avons pu le décrire, les conditions de culture peuvent être modifiées *ad infinitum*, en faisant varier par exemple le niveau d'oxygénation ou encore la concentration de glucose. *A contrario*, les conditions *in vivo* correspondent à un environnement beaucoup plus complexe et physiologiquement plus significatif, où l'expérimentateur n'a que peu de contrôle sur les paramètres mentionnés ci-dessus. Par conséquent, pour pouvoir faire face à ce changement drastique du microenvironnement et à la fois maintenir un niveau de tumorigénicité élevé, les cellules de la lignée Dt81Hepa1-6 doivent absolument procéder à une adaptation métabolique. Les concentrations de glucose étant tout à fait aléatoires au sein d'une tumeur, les Dt81Hepa1-6 devront avoir recours de façon préférentielle au récepteur GLUT-1. GLUT-1 et GLUT-2 ayant respectivement une forte et faible affinité pour le glucose, cette capacité qu'ont les Dt81Hepa1-6 à pouvoir efficacement modifier leur manière de capter le glucose traduit ainsi de façon exemplaire cette notion de plasticité métabolique. Ainsi, peu importe qu'il ait une origine tumorale ou non, un hépatocyte délogé de son microenvironnement hépatique doit obligatoirement s'adapter pour survivre aux nouvelles

conditions, comme nous l'avons démontré dans notre première étude portant sur les hépatocytes primaires. Cette dernière observation pourrait être d'une grande utilité à l'examen TEP car en effet il a été démontré que l'augmentation de captation de ^{18}F -FDG par les cellules cancéreuses était accompagnée d'une surexpression de GLUT-1 (228, 229). Or, n'étant exclusivement retrouvé qu'au sein des tumeurs d'hépatocarcinome et que très faiblement exprimé dans le tissu hépatique sain, GLUT-1 pourrait hypothétiquement permettre une meilleure discrimination des cellules tumorales issues d'hépatocarcinome, en augmentant le contraste de détection par rapport aux cellules hépatiques saines. Il ne s'agit cependant que d'une supposition, qui mériterait au préalable d'être testée sur le petit animal.

Deuxième partie: Rédecouverte du métabolisme

Nous allons dans cette deuxième partie de discussion nous intéresser à l'apport des autres voies métaboliques, dont l'implication dans le métabolisme des cellules cancéreuses a également été démontrée. Une redécouverte de ces voies ayant pour certaines d'entre elles une origine purement mitochondriale, a effectivement permis durant ces dernières années une meilleure compréhension du métabolisme des cellules tumorales.

Avant tout, il apparaît important de revenir à cet endroit précis de la discussion sur le phénomène étant à l'origine de toutes ces découvertes: l'*effet Warburg*. Comme nous l'avons vu, et ce d'une façon indiscutable, le haut niveau de glycolyse aérobie arboré par les cellules cancéreuses en présence d'oxygène joue un rôle primordial dans la tumorigénicité cellulaire. Mais depuis sa découverte datant des années 20, quelles sont les nouvelles évidences à ce propos? Conceptuellement, y a-t-il eu une évolution dans la compréhension de ce phénomène? En effet, l'idée selon laquelle cette hausse d'activité de glycolyse pourrait être une conséquence d'une altération de l'activité mitochondriale est apparue inexacte car, comme mentionné antérieurement, la mitochondrie continue à être fonctionnellement active. Elle peut même dans certains cas procurer un certain avantage dans la survie des cellules tumorales. Alors, comment expliquer l'existence de l'*effet Warburg*? Plusieurs études menées chez la

levure ont mené à émettre l'hypothèse que l'origine de ce "switch" ne serait en réalité que la conséquence d'un excès d'approvisionnement en glucose. Ce trop-plein de glucose disponible pour les cellules aurait en effet eu pour résultante une diminution du potentiel oxydatif mitochondrial, et donc de la respiration mitochondriale. Cela aurait alors poussé ces cellules vers un phénotype exclusivement glycolytique (230). En s'intéressant de plus près aux propriétés enzymatiques de la pyruvate décarboxylase (PDC) et de la PDH, il a ainsi été démontré qu'en présence d'une faible concentration de pyruvate, le phénomène de respiration mitochondriale devenait prédominant en raison de la forte affinité de la PDH pour le pyruvate. *A contrario*, en cas d'une forte concentration de pyruvate (ce qui est le cas en situation où le glucose est en excès), la glycolyse prendrait alors le dessus grâce à la PDC et son fort Km (231). Également décrites dans les cellules cancéreuses, ces observations ont donc amené une partie de la communauté scientifique à repenser l'*effet Warburg* en la définissant alors comme étant une unique composante munies de 2 variables: l'*effet Crabtree* lequel est réversible à court terme + l'*effet Warburg* proprement dit, n'étant irréversible que sur le long terme (232, 233). Faisant référence à la fermentation du glucose observé chez la levure, l'*effet Crabtree* interviendrait donc initialement dans le devenir glycolytique de la cellule tumorale. Étant peint comme un processus réversible notamment grâce à diverses régulations d'ordre moléculaire, nous serions alors à même d'affirmer que l'*effet Crabtree* puisse aussi être impliqué dans le phénomène de sélection des cellules cancéreuses. Ainsi, seules les cellules ayant primitivement acquis et conservé ce trait métabolique auraient la possibilité d'adopter un phénotype irréversible de glycolyse aérobie. Ces cellules tumorales auraient ainsi un avantage certain pour leur survie et leur prolifération. Dans le CHC, ce serait cette même glycolyse qui serait responsable de la tumorigénicité démontrée par les hépatocytes. Mais le foie étant lui-même un organe composé de plusieurs types cellulaires, qu'en est-il du métabolisme de ces autres cellules en présence d'un CHC? Quelle est l'évidence de l'implication primordiale de la glycolyse au sein de ces cellules? Une étude portant sur les cellules stellaires a de fait démontré que l'origine de leur différenciation en myofibroblastes était liée à leur capacité de reprogrammation métabolique par activation de la glycolyse. L'inhibition de la glycolyse par le biais du 2-Deoxyglucose ou du FX1 a ainsi eu pour conséquences un maintien des cellules stellaires en état de quiescence et donc un blocage de leur activation en myofibroblastes (234). Ceci s'apparente donc à un phénotype « d'*effet*

Warburg ». Dès lors, cette conversion vers une glycolyse quasi-exhaustive va ainsi grandement influencer la mise en place d'un microenvironnement délétère, favorisant le développement et la croissance des hépatocytes tumoraux. Ces derniers pourront en effet bénéficier du lactate produit par les myofibroblastes environnants. En accord donc avec ce que nous venons de voir, l'*effet Warburg* va ainsi être un élément important dans l'initiation, le maintien et la progression du CHC.

L'émergence de ces différents concepts nous aura alors une nouvelle fois montré à quel point le processus de genèse tumorale demeure un phénomène complexe. Bien que débattues, ces observations pointent toutes vers une seule et même direction: l'avantage métabolique procuré aux cellules néoplasiques. C'est ce dont nous allons maintenant discuter.

Plusieurs études ont en effet démontré une corrélation entre la forte activité glycolytique des cellules cancéreuses et leur capacité à proliférer et ce, notamment par le biais de la voie des pentoses phosphates (235-237). N'ayant jusqu'ici que très peu parlé de cette voie, nous allons rapidement la détailler afin de mieux discerner son implication dans la fonctionnalité des cellules cancéreuses. Découlant directement de la glycolyse à partir du G6P, cette voie peut mener à la production de NADPH, de Ribose-5-phosphate et d'Érythrose-4-phosphate. Cette voie va non seulement permettre une optimisation de l'équilibre des ROS et donc un maintien adéquat de l'oxygéno-protection, mais également favoriser la production d'intermédiaires essentiels à la croissance cellulaire. Pour ce faire, la voie des pentoses phosphates est composée de 2 phases: la première est une phase oxydative irréversible permettant la production de NADPH par réduction du NADP, et la seconde étant non oxydative mais réversible aboutissant potentiellement à la synthèse du ribose. Intuitivement et en raison de son lien direct avec la glycolyse, il serait alors logique de proposer l'hypothèse qu'une augmentation de l'activité de cette voie puisse également être observée au sein des cellules cancéreuses. Les études portant sur cette voie ont démontré son rôle crucial dans le métabolisme des cellules tumorales. En effet, une surexpression de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) a été notée dans plusieurs types de tissus et cellules cancéreux. Première enzyme intervenant dans cette voie, la G6PDH permet la catalyse du G6P en 6-phosphogluconolactone et ainsi le contrôle du flux de cette voie. Sa surexpression révélée dans différents types de cancers, notamment l'adénocarcinome pulmonaire et colorectal, souligne

donc l'importance de cette voie (238, 239). En effet, les cellules surexprimant *in vitro* la G6PDH vont perdre leur inhibition de contact et vont croître plus rapidement (240). *In vivo*, ces mêmes cellules lorsque injectées dans des souris immunodéficientes conduiront à l'apparition d'un plus grand nombre de tumeurs par rapport à la condition contrôle, mais aussi au développement de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces résultats suggèrent alors un rôle potentiel de la G6PDH et donc de la voie des pentoses phosphates dans le phénomène d'angiogénèse tumorale (240). Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle cette voie pourrait approvisionner la cellule cancéreuse en composés essentiels à son potentiel réplicatif est supportée par l'observation d'une augmentation de l'activité G6PDH à certaines étapes du cycle cellulaire, particulièrement les phases S et G2 (241). De plus, comme la G6PDH est impliquée dans la phase oxydative irréversible permettant le maintien de la balance redox, un déficit ou même diminution de son expression aurait des conséquences néfastes pour la cellule cancéreuse. En effet, l'homéostasie tumorale risquerait alors d'être profondément altérée. Il a ainsi été démontré qu'une déficience en G6PDH allait avoir pour principales conséquences une diminution de la viabilité des cellules tumorales et donc *a fortiori* une atténuation de leur potentiel tumorigénique, en raison notamment d'une augmentation de la présence des ROS (242, 243). Nous ne rentrerons volontairement pas dans le détail des ROS ici car nous y reviendrons par la suite. D'autres études s'étant cette fois-ci intéressées aux composantes de la phase non oxydative réversible de la voie des pentoses phosphates, par l'étude des activités de la transcétolase (TKT) et de la transaldolase (TALDO), ont révélé qu'une surexpression de ces gènes était notée dans plusieurs types de cancers comme celui du cerveau, du sein, de l'œsophage et du CHC (244-246). Inhiber l'activité de ces enzymes devrait alors théoriquement mener à une modification du phénotype tumoral et c'est effectivement ce qui a été mis en évidence avec des cellules de CHC. Après avoir démontré qu'une surexpression de la TKT était effectivement retrouvée dans des formes très agressives de CHC, les auteurs ont par la suite bloqué l'activité de cette dernière grâce à un inhibiteur spécifique (l'oxythiamine) et ont alors constaté une diminution de la croissance tumorale *in vivo*. Par ailleurs, une amélioration de la sensibilité de ces cellules cancéreuses au sorafenib a aussi été observée (246). De plus, une diminution de l'expression de la G6PDH chez des patients traités par le sorafenib a également été associée à un meilleur pronostic clinique chez ces derniers (247).

L'avidité des cellules tumorales à capter le glucose environnant va alors jouer un rôle déterminant dans le devenir métabolique de ces dernières. Suite à l'entrée massive du glucose, la cellule cancéreuse pourra alors induire et entretenir sa tumorigénicité, notamment par le biais de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. Mais que se passerait-il si l'on inhibait ces voies? Non pas grâce à des inhibiteurs, mais plutôt par l'intermédiaire d'une voie métabolique, que se passerait-il si une voie fonctionnellement et diamétralement opposée à celle de glycolyse se mettait en marche dans ces cellules tumorales? Leur tumorigénicité en serait-elle réduite? Dans le cas du CHC, cette voie est illustrée par la gluconéogenèse et c'est ce dont nous allons discuter à présent.

Bien que le nombre d'études traitant de l'implication de cette voie dans le phénotype fonctionnel des cellules de CHC soit peu élevé, quelques constats importants peuvent néanmoins être portés. Comme évoqué précédemment, c'est par l'important flux glycolytique qu'une augmentation des intermédiaires métaboliques impliqués dans la biosynthèse de macromolécules se produira. Contrecarrer la voie de la glycolyse aérobie par une voie métabolique inverse, en l'occurrence la gluconéogenèse, permettrait donc de diminuer la synthèse d'intermédiaires métaboliques essentiels. Une étude de 2013 de Ma *et al.* a effectivement mis en évidence qu'une baisse significative de l'activité gluconéogénique survenant au sein de cellules d'hépatocarcinome pouvait être à l'origine d'un certain avantage tumorigénique, notamment en termes de masse et de survie tumorale (248). Mais alors, quels vont être les mécanismes moléculaires à la base de cette diminution d'activité ? Il faut d'abord se remémorer que la voie de la gluconéogenèse est principalement régulée par les glucocorticoïdes. Ces derniers étant contrôlés grâce à certaines enzymes permettant leur passage d'une forme inerte vers une forme active, une quelconque modification de l'expression de ces enzymes pourrait alors affecter l'état d'activation de cette voie. Dans le but de maintenir une glycolyse optimale, on s'attendrait à ce que les cellules de CHC présentent une baisse de l'activité de ces enzymes. Pour en revenir à l'étude, c'est ainsi qu'il a été démontré qu'un très faible niveau de PEPCCK et de G6Pase était effectivement retrouvé *in vitro* et ce, même en période de jeûne prolongé. Par ailleurs, la confirmation de ce phénotype a également pu être notée lors d'expériences réalisées cette fois à partir d'échantillons de foie humains: une nette diminution d'expression d'enzymes activant les glucocorticoïdes et *in fine* un faible taux de

gluconéogenèse (248). Des mécanismes régulateurs de la gluconéogenèse autres que celui que nous venons de discuter ont également été décrits dans d'autres études portant sur le CHC. Une étude de Wang *et al.* relatant pour la première fois l'implication possible des miARNs dans la gluconéogenèse a ainsi démontré que MiR-23a pouvait en effet inhiber spécifiquement les gènes *Pgc1-α* et *G6pase*, éléments clefs de la gluconéogenèse (249). Des mesures d'ARNm par qPCR ont alors démontré des niveaux élevés de MiR-23a aussi bien chez les souris présentant des tumeurs hépatiques que dans des échantillons humains. Des constructions comportant des mutations des sites de fixation de MiR-23a ont par la suite permis de vérifier que cette inhibition se faisait bel et bien de façon spécifique (249). Afin d'élucider le mécanisme responsable de cette augmentation de MiR-23a, des analyses de la région promotrice de MiR-23a ont alors permis de mettre en évidence un site potentiel de fixation pour Stat3, déjà connu pour sa fonction inhibitrice de la gluconéogenèse. Cette liaison permettrait ainsi de réguler à la baisse les niveaux de *Pgc1-α*, *G6pase* et *Pepck*. D'autres expériences ayant cette fois-ci utilisé un inhibiteur spécifique de la forme activée de Stat3 (phospho-stat3), en plus d'une construction de siRNA dirigée spécifiquement contre MiR-23a, ont finalement permis d'affirmer qu'une réduction significative de l'expression de MiR-23a était observée. Ainsi, Stat3 régule positivement MiR-23a, qui va à son tour pouvoir inhiber l'expression de gènes impliqués dans la gluconéogenèse (249). Enfin, une autre étude s'intéressant toujours à l'hépatocarcinome a démontré que le gène suppresseur de tumeur P53 pouvait aussi agir sur la gluconéogenèse, apportant ainsi une toute autre interprétation de la mécanique de régulation de l'activité de cette voie (250). En effet, P53 favoriserait l'expression de gènes codant pour les précurseurs gluconogéniques, contrecarrant ainsi efficacement l'activité glycolytique des cellules issues d'hépatocarcinome. Par le biais de siRNA et d'un activateur spécifique de P53 (la Nutlin), il a été constaté que non seulement P53 tenait un rôle activateur dans l'expression des gènes clefs de cette voie, mais également qu'il favorisait la libération de glucose *de novo* (250). En effet, l'exposition des cellules HepG2 à la Nutlin a eu pour conséquence une augmentation significative de la quantité de glucose libérée par comparaison aux cellules non traitées (250). Cette observation nous amène à prédire le corollaire suivant: comme le gène codant la protéine P53 est endommagé dans la majorité des cancers (251), une diminution de la capacité des cellules tumorales à synthétiser et libérer du

glucose *de novo* serait de mise. Cela permettrait alors de conserver un flux/des réserves de glucose entrant optimaux à la tumorigénicité.

Nous venons ainsi de voir que l'agressivité d'une cellule tumorale ne reposait d'une certaine façon que sur la mise en place d'un équilibre métabolique nouveau, où seules les voies favorisant le maintien et la progression des cellules tumorales seront actives. Bien que la glycolyse et la gluconéogenèse soient conceptuellement et fonctionnellement opposées dans le métabolisme tumoral, le dénominateur commun à chacune de ces deux voies demeure le lactate. Longtemps considéré comme étant le biomarqueur par excellence de l'*effet Warburg*, le lactate sert aussi de précurseur à la gluconéogenèse et est donc situé à l'interface de ces deux voies. Le lactate a pour ainsi dire souvent été décrit comme appartenant à un métabolisme non oxydatif. Mais est-ce vraiment le cas? Ne peut-il pas, comme le pyruvate, alimenter le TCA et maintenir une certaine charge énergétique? Détient-il un rôle autre que celui de d'abaisser le pH du microenvironnement tumoral et donc de favoriser l'invasion tumorale? C'est ce dont nous allons discuter dans le prochain paragraphe.

Deux récentes études datant de 2017, la première étant parue dans *Cell* et la seconde dans *Nature*, nous ont ainsi permis d'entrevoir une toute autre conception sur le rôle métabolique du lactate. À partir d'une hétérogénéité métabolique mise en exergue dans certaines tumeurs humaines et plus particulièrement leur façon d'utiliser le [U-¹³C] glucose injecté par voie intraveineuse, la première étude de Faubert *et al.* s'est ainsi penchée sur le rôle que pourrait avoir le lactate circulant dans le métabolisme des cellules tumorales. Il a alors pu être remarqué suite à des injections de ¹³C-lactate auprès de patients présentant des tumeurs pulmonaires, qu'une quantité importante de métabolites marqués était retrouvé au sein des tumeurs et notamment des intermédiaires impliqués dans le TCA (le citrate, le glutamate ou encore le malate) (172). Cette première observation laisserait donc présumer que le lactate circulant puisse alimenter le TCA. Si tel est le cas, supprimer les transporteurs impliqués dans la captation du lactate c'est à dire les monocarboxylate transporters (MCTs), devrait permettre de réduire la proportion de ces intermédiaires du lactate marqués du TCA. Par le biais d'un modèle murin, il a alors été démontré que le lactate pouvait servir de précurseurs au TCA. En effet, par comparaison aux souris contrôles ayant reçu des cellules cancéreuses possédant un vecteur vide, les tumeurs de souris injectées avec des cellules cancéreuses présentant une

déficiences dans l'expression des MCTs affichaient de plus faibles niveaux de citrate, de glutamate et de malate marqués (172). À concentrations égales de glucose et de lactate, il devenait nécessaire de déterminer lequel des deux serait préférentiellement oxydé et utilisé par le TCA dans les cellules tumorales. Par le biais de trois modèles murins génétiquement modifiés comportant à la fois des tumeurs pulmonaires et pancréatiques, la seconde étude de Hui *et al.* parue dans *Nature* a ainsi démontré que le flux qui ravitaillait majoritairement le TCA des cellules tumorales était principalement celui en provenance du lactate et non celui du glucose (205).

Dans ce contexte tumoral, cette dernière observation nous amène donc à recadrer le phénomène d'*effet Warburg*. Il ne s'agirait alors pas d'un processus distinct et séparé de la mitochondrie, mais plutôt d'une voie communiquant de la glycolyse vers la mitochondrie grâce au lactate. Un continuum s'instaurerait ainsi entre ces différentes voies métaboliques et permettrait alors aux cellules cancéreuses non seulement de mieux pouvoir s'adapter face à la stringence microenvironnementale, mais également de maintenir une tumorigénicité nécessaire et suffisante à leur développement. L'hypothèse initialement émise par Otto Warburg selon laquelle les cellules tumorales possèderaient des mitochondries non fonctionnelles est désormais caduque puisque comme nous venons de le voir, il a été démontré hors de tout doute qu'une activité métabolique importante était retrouvée en son sein. Mais en dehors du métabolisme des acides gras et de l'oxydation de la glutamine et du lactate, par quel autre moyen la mitochondrie arrivera-t-elle à procurer un avantage significatif aux cellules cancéreuses? C'est ce dont nous allons à présent discuter en nous intéressant aux ROS.

Nous avons jusqu'ici très peu parlé des ROS et de leurs fonctions dans le métabolisme de la cellule tumorale. Pour ce faire, nous allons dans un premier temps brièvement les définir et ensuite parler de leur implication dans le métabolisme tumoral. Les ROS sont définis comme des espèces chimiques contenant de l'oxygène et possédant des propriétés réactives. Parmi les plus connus, il y a l'anion superoxyde O_2^- , le radical hydroxyl OH, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et enfin l'acide hypochlorique. Bien qu'ils puissent être produits dans le cytoplasme à partir du complexe NADPH Oxydase, la grande majorité des ROS est issue de la mitochondrie et aura pour origine la chaîne de transport des électrons. Par ailleurs, on estime qu'environ 1 à 2% de l'oxygène consommé par la mitochondrie sera incomplètement réduit, ce

qui aura pour conséquence un relargage des ROS vers d'autres compartiments cellulaires. Plusieurs études ont montré que les cellules cancéreuses présentaient une quantité élevée de ROS et que ces derniers pouvaient contribuer à leur tumorigénicité (252). En effet, il a ainsi été démontré qu'une concentration importante de ROS était à l'origine de l'activation de la voie PI3K dans des cellules leucémiques, favorisant ainsi leur survie (253). Une autre étude portant sur le métabolisme tumoral de cellules pancréatiques a mis en évidence une régulation négative de l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse oxydative induite par les ROS (254). En effet, les ROS activeraient grâce à la voie NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) MiR-155, lequel inhiberait par la suite l'expression de la superoxyde dismutase et de la catalase (254). Par ailleurs, les ROS sembleraient aussi promouvoir l'instabilité génétique et ainsi contribuer à la progression tumorale, comme l'a suggéré une étude faisant état de dommages irréversibles à l'ADN simple brin provoqués par les ROS (255). Mais alors, quels sont les mécanismes à l'origine de cette augmentation délétère du niveau des ROS dans les cellules tumorales? Une étude portant sur l'instabilité génomique et plus spécifiquement sur l'ADN mitochondrial a révélé que les altérations retrouvées en son sein pouvaient être à l'origine d'une perturbation dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Dans le cancer du rein, il a en effet été noté que des mutations du complexe II de la chaîne respiratoire (la succinate déhydrogénase) favorisaient une libération accrue en ROS (256). Similairement, une mutation germinale de la fumarase (une enzyme du TCA) a aussi été démontrée comme étant à l'origine d'une production exacerbée de ROS, et ce grâce l'accumulation d'intermédiaires métaboliques du TCA (257). À part ces mutations, le microenvironnement tumoral semble jouer un rôle significatif dans la genèse des ROS tumoraux. En effet, comme nous avons pu nous même le constater dans notre troisième étude, l'hypoxie retrouvée au sein des tumeurs hépatiques serait une composante fondamentale dans la capacité de ces dernières à pouvoir modifier leur métabolisme. Il a ainsi été mis en évidence une prédisposition du complexe III de la chaîne respiratoire (la coenzyme Q-cytochrome c réductase) à libérer d'importantes quantités de ROS en présence de HIF-1 α . De plus, il a aussi été démontré que HIF-1 α pouvait lui même être stabilisé par les ROS, ce qui souligne l'importance de la première observation (258). Cependant, bien que la production de ROS soit importante au maintien de la cellule néoplasique, un fin équilibre doit toutefois exister. En effet, une trop faible concentration de ROS pourrait être néfaste aux cellules tumorales en

empêchant l'activation de certains oncogènes nécessaires à leur survie. D'un autre côté, une concentration trop élevée de ROS pourrait être délétère par activation notamment de la cascade apoptotique. Alors comment cette régulation cellulaire va-t-elle s'opérer? Notons en passant que c'est en raison de l'observation d'une production importante de ROS par les cellules tumorales que la communauté scientifique a pensé que c'est dans l'objectif de conserver leur intégrité que les cellules tumorales avaient progressivement délaissé leurs mitochondries. Si l'on revient à présent aux mécanismes de régulation des ROS, plusieurs études ont démontré que des niveaux élevés de superoxyde dismutase, de glutathion peroxydase et de catalase étaient affichés par certaines cellules tumorales (259, 260). Par ailleurs, une quantité non négligeable de pouvoir "antioxydant" peut aussi provenir de l'activité des autres voies métaboliques telles que la glycolyse, l'oxydation des acides gras ou même le métabolisme de la glutamine. Un maintien du pool de NADPH et donc *in fine* de GSH s'effectuerait donc, permettant ainsi de contrôler efficacement le niveau de ROS intracellulaire.

Il a aussi été suggéré que les ROS tumoraux pouvaient agir à titre de "messagers" dans l'établissement d'un dialogue avec des cellules adjacentes non tumorales, favorisant alors une certaine notion de coopérativité entre cellules tumorales et stromales. Dans un modèle de co-culture, il a été observé que les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse avaient effectivement la capacité de transmettre aux cellules leucémiques un précurseur important du glutathion: la cystéine. Ceci permettrait alors à ces cellules tumorales d'éliminer le surplus de ROS et d'éviter ainsi leur mort cellulaire programmée (261). Comme évoqué dans notre troisième étude, cette communication induite par les ROS pourrait être à l'origine d'une potentielle symbiose métabolique instaurée avec les cellules adjacentes non tumorales. Ceci aurait pour effet de favoriser: 1) l'échange de métabolites hautement énergétiques vers les cellules cancéreuses, et 2) une conversion graduelle de ces cellules encore non tumorales vers un phénotype néoplasique. Ces observations ont également été constatées dans le cancer du sein et ont par la suite donné naissance à un nouveau concept: l'*effet Warburg inverse* (206, 262, 263). Outre leur fonction essentielle dans la reprogrammation métabolique des cellules tumorales, les ROS semblent également être impliqués dans la formation de métastases, en agissant notamment sur la TEM (transition épithélio-mésenchymateuse). En effet, certaines

études ont démontré que l'activité de certaines métalloprotéinases matricielles, enzymes nécessaires à la digestion de la MEC, pouvait être positivement régulée par les ROS et ce, notamment dans les cancers du sein et du pancréas. Cela favoriserait ainsi leur potentiel invasif et métastatique (264-266). Pour en revenir à ce concept de symbiose métabolique précédemment évoquée, une récente étude publiée dans *Nature Medicine* de *Zhang et al.* a ainsi mis en évidence le rôle GLUT-1 dans le maintien homéostatique de la balance redox (267). En effet, la délétion de *glut-1* a eu pour effets: 1) de diminuer l'entrée en glucose, 2) de diminuer le flux de la glycolyse et donc celui de la voie des pentoses phosphates, 3) de réduire la production de NADPH et donc de GSH disponible, 4) d'augmenter la concentration de ROS et 5) de diminuer la survie cellulaire (267). Ainsi, l'étude d'une voie métabolique à part entière ne devient évidente, mais surtout significative, que lorsqu'on s'intéresse aux autres voies métaboliques apparentées. Dans cette optique, et surtout étant donné l'interconnexion de ces différentes voies, un élément favorisant de manière générale l'anabolisme des cellules tumorales devrait également pouvoir influencer la production intracellulaire en ROS. C'est notamment le cas dans des études qui se sont penchées sur le rôle de mTOR, qui comme évoqué dans l'introduction, peut jouer un rôle fondamental dans le métabolisme tumoral. Il a alors été démontré que ce dernier pouvait effectivement participer au maintien cellulaire de la balance redox (268). Cependant, il a aussi été observé dans ces cellules issues de CHC qu'une inactivation de mTOR se produisait si on induisait une déplétion en cystéine, rendant alors ces cellules plus vulnérables à la mort cellulaire (269). La cystéine, acide aminé non essentielle pour l'homme, semblerait donc être impliquée dans la régulation de la balance redox et *a fortiori* dans le métabolisme tumoral. Mais qu'en est-il du réel rôle des acides aminés dans le domaine oncométabolique? Est-il déterminant? Va-t-il leur procurer un certain avantage? Si oui, comment? C'est ce dont nous allons brièvement discuter dans le prochain paragraphe.

Les acides aminés tiennent une position double car ils servent à la fois de précurseurs à la synthèse des protéines et d'intermédiaires métaboliques pouvant alimenter d'autres réactions biochimiques. Les quelques études qui se sont penchées sur leur rôle dans le métabolisme des cellules tumorales ont pu mettre en évidence certains éléments importants. Nous n'allons volontairement pas dans cette partie faire de nouvelle référence à la glutamine (*Cf.* Introduction), mais plutôt nous intéresser au rôle des autres acides aminés, tels que l'arginine,

le tryptophane, la sérine, la glycine, la méthionine et enfin l'asparagine. Précurseur important des protéines, de l'urée, de la créatine, mais également d'effecteurs moléculaires, plusieurs études ont effectivement pu démontrer que l'arginine tenait un rôle capital dans la croissance des cellules tumorales (270). Il a en effet été démontré dans l'ostéosarcome et le cancer de la vessie, que les cellules tumorales présentant de faibles niveaux d'arginosuccinate synthétase 1 (ASS1), enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'arginine, proliféraient moins bien. *Per se*, l'arginine semble donc tenir un rôle important (271, 272). Pour confirmer cette hypothèse, il a ensuite été démontré qu'une privation des cellules tumorales en arginine provoquait une augmentation du phénomène d'apoptose, notamment grâce à l'activation de Bax (protéine Bcl-2-associated X) (273). Notons d'ailleurs qu'il existe des essais cliniques actuellement en cours visant à cibler de manière spécifique la dépendance des cellules tumorales à l'arginine, et ce notamment dans le cas des CHC (274). Le rôle du tryptophane semble quant à lui, surtout associer à la réponse des cellules immunitaires constituant le microenvironnement tumoral. En effet, la dégradation du tryptophane s'opère par la voie de la kynurénine grâce à l'enzyme indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO). Cela permet ainsi la catalyse du tryptophane en kynurénine. Compte tenu de la grande capacité du tryptophane à traverser la membrane plasmique, mais également de la forte expression de IDO retrouvée au sein des cellules dendritiques, il a alors pu être démontré que l'activation des lymphocytes T était grandement dépendante de la concentration locale en tryptophane (275, 276). En effet, les cellules dendritiques sont particulièrement dépendantes du tryptophane environnant: toute diminution du tryptophane aura un impact marqué sur les lymphocytes T. Un continuum entre activation lymphocytaire d'une part et régression tumorale de l'autre semblerait donc s'opérer dans le microenvironnement, le tout avec IDO comme potentiel médiateur principal. C'est inscrit dans ce contexte qu'une étude de Ino *et al.* a mis en évidence l'existence d'une corrélation entre d'une part la quantité de cellules T activées infiltrant le site tumoral et d'autre part le niveau d'activation de IDO (277). Par ailleurs, une étude a également démontré que les souris injectées avec des cellules tumorales déficientes en IDO ne développaient pas de tumeur en comparaison avec des cellules contrôles (278). Au vu de ces différents éléments, le métabolisme du tryptophane est donc intimement lié à l'initiation et à la progression tumorale. Le métabolisme de la sérine et de la glycine va quant à lui être important dans la production de cofacteurs essentiels à la biosynthèse nucléotidique. Les cellules tumorales se divisant

rapidement, plusieurs études ont alors pu faire état d'une augmentation dans leur capacité à synthétiser *de novo* la sérine, et ce notamment grâce à la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) (279-282). Enzyme intervenant dans la transformation 3-phosphoglycérate glycolytique en 3-phosphohydroxypyruvate, une augmentation de son activité a effectivement été relatée dans plusieurs types de cancers tels que le mélanome ou le cancer du sein (283, 284). La glycine étant liée à la sérine par la sérine hydroxyméthyl transférase (SHMT), plusieurs études ont non seulement pu souligner le rôle fondamentale tenu par la glycine dans le métabolisme tumoral, mais également qu'une régulation positive de la SHMT avait été décrite par l'oncogène c-myc (285, 286). Cependant, nous avons précédemment vu que toutes voies métaboliques étant amenées à diminuer ou contrecarrer la glycolyse devenaient néfastes à la cellule tumorale. C'est notamment le cas avec la PHGDH qui catalyse le 3-phosphoglycérate et qui, par conséquent, entraîne une diminution d'intermédiaires glycolytiques. Alors comment expliquer cette observation? Par le simple fait que la sérine et la glycine constituent également une source majeure de groupements méthyles. Ces derniers pourront alors être utilisés pour modifier l'expression de certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, et ce notamment grâce à la méthylation de l'ADN. Ce dernier constat nous amène donc vers la méthionine qui est également un acide aminé jouant un rôle clef dans l'épigénétique.

Dans le métabolisme des cellules tumorales, l'épigénétique a été décrit comme favorisant l'agressivité des cellules tumorales (287). En effet, il a été démontré qu'une déplétion en méthionine allait non seulement favoriser l'arrêt de la prolifération cellulaire, mais également permettre une augmentation dans l'efficacité antitumorale de certains composés cytotoxiques (288, 289). Par ailleurs, une inhibition de la carcinogenèse colorectale a également pu être observée lors d'une privation en méthionine (290). Enfin, pour en revenir à cette notion de méthylation, la forte dépendance des cellules cancéreuses pour la méthionine est notamment étayée par une hausse dans le niveau de transméthylation de certaines régions promotrices (291, 292). Cette observation a pour conséquences soit l'activation de certains gènes impliqués dans la croissance et division cellulaire, ou encore l'inhibition de gènes à l'origine de la mort cellulaire programmée (291, 292). Terminons enfin ce paragraphe dédié aux acides aminés et à leurs rôles dans le métabolisme des cellules cancéreuses, en parlant de

l'asparagine. En effet, deux études récentes datant de 2018 ont ainsi révélé le rôle essentiel détenu par cet acide aminé dans les cellules tumorales (293, 294). La première parue dans *Cell Metabolism* de Pavlova *et al.* décrit une certaine hiérarchisation métabolique dans l'utilisation de la glutamine et de l'asparagine par les tumeurs (293). En effet, en présence de glutamine dans le microenvironnement, ce dernier peut être utilisé par la cellule tumorale pour synthétiser des protéines, mais également pour générer de l'asparagine, lui-même servant à synthétiser des protéines. La source de synthèse protéique étant double avec d'une part la glutamine et d'autre part l'asparagine, la cellule tumorale peut privilégier l'une ou l'autre. Alors qu'il a été remarqué que l'absence de glutamine était associée à une incapacité des cellules tumorales à pouvoir synthétiser des protéines et donc une mort de ces dernières par apoptose, une réversion de ce phénotype a pu être constatée par simple ajout d'asparagine (293). En effet, l'asparagine permet une synthèse protéique à la fois directe et indirecte grâce à la glutamine générée par le TCA. De cette façon, la cellule cancéreuse pourra efficacement maintenir son potentiel prolifératif même en absence exogène de glutamine (293). Par conséquent, le métabolisme des tumeurs va donc en premier lieu reposer sur la glutamine présente dans l'environnement pour au final se rabattre sur l'asparagine en conditions défavorables. En utilisant un modèle murin de cancer du sein, la seconde étude publiée dans *Nature* de Knott *et al.* a par la suite mis en évidence le rôle fondamental de l'asparagine dans le développement de métastases (294). En effet, limiter la présence de l'asparagine à l'aide de siRNA, d'asparaginase ou même d'un régime alimentaire carencé, a eu pour conséquence une diminution significative du potentiel métastatique des cellules tumorales, sans toutefois compromettre la croissance de la tumeur primitive (294). Cette récente redécouverte de l'asparagine nous montre donc à quel point cet acide aminé peut être fondamental pour l'agressivité des cellules cancéreuses (295).

Au travers de ce travail de doctorat, nous venons ainsi de voir que le métabolisme des cellules tumorales était fortement impliqué dans la tumorigénicité de ces dernières et ce, à plusieurs niveaux. Qu'en est-il à présent des études ayant eu pour objectif de cibler spécifiquement ces différentes composantes métaboliques? Cibler le métabolisme tumoral constitue-t-il un moyen efficace pour lutter contre les cellules cancéreuses? La réponse semble

incontestablement être oui compte tenu de nos résultats : c'est de cet aspect thérapeutique dont nous allons à présent brièvement discuter.

Troisième partie: Ouvertures thérapeutiques

Les premières études s'étant intéressées à cette nouvelle classe d'agents thérapeutiques dits "antimétabolites" remontent à 1940, c'est à dire peu de temps après la découverte de l'*effet Warburg*. Sidney Farber, l'un des pères fondateurs de la chimiothérapie moderne, avait alors remarqué qu'une rémission temporaire de la leucémie aigüe lymphoblastique chez les enfants pouvait être obtenue grâce à l'aminoptérine (296). Ce composé a la propriété de pouvoir inhiber les réactions enzymatiques de transfert des groupes monocarbonés, limitant ainsi entre autres la synthèse *de novo* de nucléotides (297). Le concept visant ainsi à cibler le métabolisme des cellules hautement prolifératives s'est ensuite vu évoluer et ce notamment par le biais de nouveaux "antimétabolites".

Le phénomène de glycolyse aérobie ou d'*effet Warburg* étant important dans les cellules tumorales, plusieurs études se sont donc d'abord focalisées sur l'inhibition de cette voie et des transporteurs du glucose. Il a ainsi été démontré *in vitro* et *in vivo* que l'utilisation d'un inhibiteur de GLUT-1 (le WZB117) permettait d'inhiber la croissance tumorale (298, 299). Par ailleurs, une restauration de la croissance tumorale a également été observée lors d'une augmentation de la concentration intracellulaire en ATP. Cette dernière observation démontre ainsi une nouvelle fois l'importance capitale du maintien bioénergétique, mais également cette notion de coopérativité métabolique entre les différentes voies (298). De nombreuses études se sont aussi penchées sur HK2 en démontrant que son inhibition grâce au lonidamine ou au 3-bromopyruvate était à l'origine d'une régression tumorale (300-302). Dans les cellules issues d'hépatocarcinome, son inhibition a également été corrélée à une nette diminution de leur tumorigénicité, ceci étant associée à une réorientation de leur métabolisme vers la phosphorylation oxydative (168). D'autre part, l'inhibition du PK grâce à TNL232 a également conduit à une réduction de 60 à 80% du volume tumoral dans le cancer du sein et

de la prostate (303). Depuis peu, cette molécule a d'ailleurs été testée en essai clinique de phase II dans le traitement du mélanome (304, 305). Les études portant sur le LDH et notamment son inhibition par le gossipol, le FX-11 ou même l'oxamate de sodium, ont également mené à une diminution de la capacité des cellules tumorales à pouvoir croître, proliférer et se disséminer (216, 306, 307). Enfin, des études s'étant cette fois non pas attardées à l'étude de la glycolyse seule mais plutôt aux autres voies métaboliques situées en aval, ont également montré des résultats encourageants. En effet, l'inhibition de la surexpression de PDK dans plusieurs types de tissus tumoraux grâce au dichloroacétate, a aussi démontré un effet protecteur chez les patients (308). Or on sait que PDK inhibe le complexe PDH: inhiber PDK revient donc indirectement à activer la PDH et *in fine* activer le flux entrant de pyruvate dans la mitochondrie. Par conséquent et en accord avec ce qui a pu être décrit dans les parties précédentes, forcer la cellule tumorale à adopter un métabolisme oxydatif et donc un métabolisme semblable à celui d'une cellule saine revient 1) à contrecarrer "métaboliquement" l'effet Warburg, 2) à diminuer le potentiel tumorigénique et 3) à augmenter potentiellement le niveau de sensibilité des cellules tumorales aux ROS. Cette dernière observation nous permet alors de faire le pont avec la mitochondrie.

Comme nous venons de le voir, la mitochondrie peut et va dans certaines conditions procurer un avantage pour la survie des cellules cancéreuses. Alors qu'en est-il de ces "antimétabolites" mitochondriaux? Fonctionnent-ils? Et surtout arrivent-ils à diminuer la tumorigénicité de ces cellules? Intéressons-nous premièrement à la voie des acides gras puisqu'une oxydation de ces derniers dans un microenvironnement tumoral donné semble vraisemblablement être associée à une augmentation de tumorigénicité (216, 309). Il a ainsi été démontré qu'une inhibition du CPT1 grâce à l'étomoxir permettait non seulement une réduction de la viabilité des cellules cancéreuses prostatiques, mais également une expression accrue de caspase 3 (173). Dans ces cellules, l'apoptose sera alors favorisée (173). De façon similaire, une étude de Camarda *et al.* parue dans *Nature Medicine* a également démontré que l'utilisation d'étomoxir permettait non seulement une réduction efficace de la croissance tumorale, mais aussi que ce phénotype était corrélé à une sévère diminution des concentrations d'ATP (310).

Les ROS étant d'une part produits majoritairement par la mitochondrie et d'autre part impliqués dans l'agressivité des cellules cancéreuses, plusieurs études les ont ciblés. Il a ainsi été démontré que l'inhibition de la synthèse de glutathion avait pour effet d'empêcher l'initiation et la progression tumorale (311, 312). Par ailleurs, l'administration de vitamine C sous forme oxydée à des cellules cancéreuses de type colorectal provoquait non seulement une déplétion en glutathion, mais était aussi corrélée 1) à une augmentation du stress oxydant et donc une accumulation de ROS, 2) à une diminution de la charge énergétique et 3) à une mort cellulaire augmentée (313). De même, l'utilisation de roténone, un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, a également été associée à une augmentation du contenu en ROS et *in fine* de la mort cellulaire par apoptose (314, 315). Cette notion de fin équilibre antérieurement discutée est donc de nouveau ici retrouvée.

Terminons enfin cette partie dédiée aux "antimétabolites" avec la voie de la glutamine. Cette voie étant suractivée dans plusieurs cancers, certaines études ont démontré que cibler cette utilisation excessive de la glutamine pouvait effectivement être d'un grand intérêt. Il a ainsi été noté que l'inhibition de SLC1A5 (Solute Carrier Family 1 Member 5), un transporteur permettant l'entrée de la glutamine, favorisait grandement la régression tumorale dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire (316). De même, l'inhibition de l'activité des glutaminases par le CB839 a également démontré une activité antitumorale (190, 317).

Par ailleurs, je tenais néanmoins à revenir sur un très récent concept visant à considérer la mitochondrie comme étant un élément étranger à la cellule. En effet, selon la théorie endosymbiotique, les mitochondries actuelles ne seraient le fruit que de l'incorporation de bactéries avec lesquelles les cellules mères auraient entretenu une relation de symbiose au cours de l'évolution. Certains chercheurs se sont alors attardés à tester l'utilisation d'antibiotiques pour le traitement de tumeurs cancéreuses. On a ainsi pu mettre en évidence qu'un traitement des cellules souches cancéreuses à la doxycycline ou à l'azithromycine permettait une éradication efficace des tumeurs, tout en épargnant les cellules normales dites limitrophes (318, 319). Ce concept visant donc à traiter le cancer comme étant une maladie infectieuse est innovant et potentiellement prometteur, et devrait à terme mener vers de nouvelles découvertes.

Nous venons donc de voir que cibler spécifiquement le métabolisme des cellules tumorales allait constituer un enjeu majeur dans la diminution de leur tumorigénicité. Dès lors, cette nouvelle cible thérapeutique devient ainsi très prometteuse. Mais hormis le métabolisme des cellules tumorales, qu'en est-il de celui des cellules immunitaires? Va-t-il pouvoir influencer sur l'apparition et le développement tumoral? Et peut-il également devenir une cible thérapeutique?

En effet, à l'heure où l'immunologie des tumeurs est à son paroxysme, nous allons à présent rapidement nous intéresser à cet aspect très récent qu'est l'étude du métabolisme des cellules immunitaires. Et pour se faire, nous allons parler des lymphocytes T. Tout d'abord, plusieurs études ont fait état de profondes modifications du métabolisme de la cellule T lors de son activation, c'est à dire lors de la rencontre avec son antigène (320, 321). Parmi elles, une augmentation de la captation de glucose environnant et du phénomène de glycolyse, une consommation accrue en glutamine et enfin une biosynthèse en acides gras augmentée (320, 322, 323). Toutes ces modifications métaboliques vont alors toutes concourir à ce que la cellule T effectrice puisse 1) rapidement se répliquer et 2) produire un nombre important de cytokines, afin d'éliminer le plus efficacement possible l'élément étranger. Par ailleurs, plusieurs études ont également mis en évidence que cette suractivation métabolique s'opérant au sein des cellules T activées s'accompagnait d'un remaniement profond de certaines voies de signalisation cellulaires telles que la voie PI3K/AKT/mTOR ou encore celle des MAPK (324, 325). Par ailleurs, le métabolisme semble également impacter sur le devenir du lymphocyte T et plus spécifiquement sur le phénomène de différenciation comme l'a démontré Berod *et al.* dans une étude publiée dans *Nature Medicine*, où l'inhibition de synthèse *de novo* en acides gras a eu pour effets 1) une réduction significative du développement des cellules T_H17 et 2) un enrichissement en cellules T régulatrices (326). Dans le cancer, où l'immunosurveillance est souvent compromise, des modifications affectant le métabolisme lymphocytaire seront également constatées (327). Il a effectivement été remarqué que le microenvironnement tumoral allait en soi être grandement délétère à l'activation des cellules T de par l'intense activité métabolique des cellules cancéreuses et *de facto* le manque de glucose environnant disponible, mais également par le manque d'oxygénation (328). De façon remarquable, il a toutefois été noté que ce même microenvironnement tumoral allait être propice au

développement des T régulateurs, notamment grâce à la protéine HIF-1 α (329). Outre l'hypoxie tumorale, il a aussi été souligné que la production accrue en lactate découlant des cellules cancéreuses pouvait non seulement maintenir cette population de T régulateurs, mais également réprimer avec ferveur l'activation et la fonction cytotoxique des T CD8 (cluster de différenciation 8) (330, 331). Possédant des propriétés immunosuppressives, ce maintien des T régulateurs pourrait alors servir de frein à l'activation des cellules T effectrices et ainsi permettre aux cellules tumorales d'échapper aux mécanismes de défense immunitaire (320). Ce même constat a également été noté dans le CHC où un enrichissement intratumoral en cellules T régulatrices a été observé en situation d'hypoxie (332).

De façon indirecte, les cellules tumorales vont ainsi pouvoir contrôler l'activation du système immunitaire adaptatif, en agissant notamment sur le microenvironnement. Mais peuvent-elles de façon directe intervenir dans l'activation lymphocytaire? Et le cas échéant, une reprogrammation métabolique des cellules T va-t-elle de nouveau être observée? Pour tenter de répondre à ces questions, nous allons nous intéresser à PD-L1 qui est un ligand immunosuppresseur présent à la surface des cellules tumorales (333). Lorsque fixé à son récepteur PD-1, présent à la surface des lymphocytes T, une inhibition sévère de l'activation lymphocytaire sera constatée (333). Cette fixation ligand-récepteur va pour ainsi dire être grandement néfaste d'un point de vue clinique, puisqu'en réprimant l'immunosurveillance, elle permettra non seulement l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire, mais également leur croissance (333). L'un des enjeux de l'immunothérapie, domaine fraîchement récompensé par l'obtention d'un prix Nobel attribué à James Allison et Tasuku Honjo, va alors consister à lever cette inhibition pour *in fine* réactiver le système immunitaire, notamment par le biais d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre PD-1 ou PD-L1, afin d'empêcher cette interaction (333). De façon importante, il a été observé que lors de cette interaction PD-1/PD-L1, des altérations métaboliques étaient retrouvées à la fois au sein des cellules T, mais également dans les cellules cancéreuses. Dans les cellules T, une réduction prononcée du phénomène de glycolyse et donc d'activation était notée (334), alors que dans les cellules tumorales, le phénomène inverse se produisait: à savoir une suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR et une recrudescence de la voie de la glycolyse (335). Par ailleurs, il a également été suggéré que PD-L1 puisse servir de bouclier aux cellules tumorales, en les

protégeant notamment de la mort cellulaire induite par le ligand FAS (336). Par interaction directe, nous venons donc de voir que la cellule tumorale pouvait de façon efficace métaboliquement instrumentaliser le lymphocyte T et ainsi contourner le système immunitaire.

L'immunométabolisme devient donc un domaine extrêmement relevant dans le traitement et l'éradication du cancer et peut en soi constituer un attrait thérapeutique. Dans l'hépatocarcinome, cet aspect est d'autant plus relevant puisqu'une réduction significative d'infiltrats lymphocytaires CD4 et CD8 semble être causée par un profond remaniement métabolique du microenvironnement (337). À nouveau, les résultats prometteurs obtenus avec le Nivolumab (anticorps monoclonal dirigé contre PD-1) dans le traitement des patients ayant un CHC avancé (338), laissent également présager que le métabolisme des lymphocytes T serait une cible thérapeutique importante dans le traitement de l'hépatocarcinome.

Quatrième partie: Perspectives

Comme nous venons de le voir, l'oncométabolisme est à l'heure actuelle un domaine qui est en plein essor. Les perspectives touchant à cette thématique prometteuse vont alors constituer un enjeu important.

Dans le cas de l'hépatocarcinome, nous avons pu constater qu'inhiber *in vitro* l'activité du LDH grâce à l'oxamate de sodium empêchait la cellule cancéreuse de se reprogrammer métaboliquement. Outre cette différence, l'oxamate permettait également d'augmenter la sensibilité des cellules de CHC face au CP. Mais en est-il de même *in vivo*? Une quelconque régression tumorale pourrait-elle être mise en évidence en présence d'oxamate? Par ailleurs, serait-il aussi possible d'observer une action concomitante de l'oxamate et du CP sur les tumeurs d'hépatocarcinome? Pour tenter de répondre à ces questions, il serait alors intéressant de tester cette hypothèse en utilisant le même modèle murin d'induction de CHC de notre troisième étude: l'implantation orthotopique des Dt81Hepa1-6 injectées dans la rate. Ainsi, nous serions à même d'affirmer 1) si l'oxamate seul joue un rôle sur le développement du CHC et 2) si lorsque couplé au CP une régression efficace de la charge tumorale est observée. Nos

premiers résultats laissent sous-entendre un potentiel rôle inhibiteur de l'oxamate sur le développement des tumeurs de CHC. Cependant, d'autres analyses devraient nous confirmer si cet effet s'opère par une action directe sur les cellules cancéreuses ou si cette diminution de la charge tumorale résulterait plutôt d'une modification systémique ou microenvironnementale induite par l'oxamate.

Pour rester sur la composante microenvironnementale, nous allons à présent parler de la fibrose, qui peut évoluer en cirrhose. En effet, la condition fibrotique semble être un prérequis fondamental à l'avènement du CHC puisque 80 à 90% des patients atteints de CHC présentent un état de cirrhose. Or, en présence de fibrose/cirrhose le microenvironnement dans lequel baignent les hépatocytes est perturbé, de même que le métabolisme hépatocytaire. Mais existe-t-il un lien entre la fibrose/cirrhose d'une part et le métabolisme des cellules d'hépatocarcinome? La cirrhose et ses composantes peuvent-elles directement agir sur l'*effet Warburg* de ces cellules? Étant donné que la glycolyse soit à l'origine de la différenciation des cellules stellaires en myofibroblastes et donc de la fibrose (234), cette dernière peut-elle réciproquement favoriser la glycolyse des cellules issues de CHC? Et si oui, par quels mécanismes? Pour tenter de répondre à ces questions, nous pourrions à la fois utiliser des modèles *in vitro* et *in vivo*. La simple condition \pm collagène *in vitro* devrait nous indiquer si le phénotype métabolique des cellules d'hépatocarcinome est premièrement modifié. Si tel est le cas, l'implantation orthotopique murine des Dt81Hepa1-6 devrait ensuite nous permettre de confirmer qu'une régulation du métabolisme tumoral s'opère bien par la composante fibrotique. Pouvant choisir la présence ou non de fibrose lors de l'induction de l'hépatocarcinome, ce modèle offre donc la possibilité de pouvoir comparer le métabolisme des tumeurs issues de différentes conditions: \pm fibrose et \pm CHC. Cela devrait à terme nous fournir de précieuses informations.

Enfin, une continuité logique de ce projet de thèse pourrait être l'étude des flux métaboliques au sein des cellules issues de CHC. Par opposition au HPLC permettant la mesure quantitative d'un métabolite à un temps donné, la résonance magnétique nucléaire (RMN) permet l'observation de l'activité d'une voie métabolique au complet (339). En effet, par le biais d'atomes radiomarqués (généralement le ^{13}C ou ^{31}P), l'étude du flux métabolique devient ainsi possible. Alors en quoi cette caractéristique devient-elle importante pour l'étude

du métabolisme tumoral? Comme évoqué antérieurement, le microenvironnement tumoral peut varier très rapidement et les cellules cancéreuses doivent alors promptement s'adapter pour survivre. L'étude du flux par RMN va alors offrir l'avantage de pouvoir identifier la/les voies métaboliques sollicitée(s) par la cellule cancéreuse dans son adaptation et maintien tumorigénique. À l'instar du HPLC, cette technique offre aussi la possibilité de déterminer simultanément l'activation de plusieurs voies métaboliques par analyse du chemin emprunté par les atomes/métabolites radiomarqués (339). Les voies métaboliques étant en grande partie interconnectées, la RMN permet aussi d'identifier la provenance exacte d'un atome radiomarqué, chose pas toujours évidente lorsqu'un métabolite se trouve être à l'intersection de plusieurs voies (339). En effet, une meilleure discrimination est alors rendue possible grâce à des isotopomères spécifiques, rendant cette technique extrêmement puissante dans l'analyse du métabolisme tumoral (339). Dans l'étude du CHC, cet outil pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses dans leur survie.

V) Conclusion

Tout au long de cette thèse de doctorat, nous venons donc de voir que le métabolisme des cellules cancéreuses était intimement lié à leur tumorigénicité. En effet, par le biais d'une réelle symbiose s'opérant au sein de ces cellules, ces dernières ont la capacité de modifier aisément leur métabolisme en fonction de conditions microenvironnementales très souvent fluctuantes et parfois néfastes à leur survie. Alors que la mitochondrie a pendant longtemps en quelque sorte été mise de côté en raison de l'hypothèse proposée par Otto Warburg, les études réalisées depuis ces 20 dernières années ont prouvé le contraire. En effet, en complément d'une activité de glycolyse aérobie fortement augmentée, certaines cellules cancéreuses vont également avoir recours à l'activation de voies métaboliques mitochondriales: nos études ont notamment démontré que c'était le cas dans le CHC. Nous avons ainsi pu constater que les cellules issues d'hépatocarcinome avaient la capacité de pouvoir dégrader leurs réserves en acides gras pour survivre en l'absence de glucose environnant. Il va sans dire que cette flexibilité métabolique résulte certainement d'une pression de sélection importante, expliquant alors l'hétérogénéité fonctionnelle observée par exemple entre les lignées Hepa1-6 et Dt81Hepa1-6. Outre cette hétérogénéité intertumorale, il faut se rappeler que l'hétérogénéité intratumorale est bel et bien existante et que par conséquent, elle sera intrinsèquement liée à l'adaptation des cellules tumorales à leur microenvironnement. Cette grande hétérogénéité va faire en sorte que selon le type de cancer, le modèle d'étude ou même la région étudiée au sein d'une seule et même tumeur, le profil métabolique pourra être différent si ce n'est opposé dans certains cas. Enfin, les différences métaboliques relevées dans le cas de l'hépatocarcinome devraient à terme permettre l'identification d'un radiotracer facilitant une détection précoce de ces tumeurs hépatiques, qui jusqu'ici rappelons-le, reste compromise en raison de l'intense activité métabolique du foie en condition physiologique.

Bibliographie

1. Lamers WH, Hilberts A, Furt E, Smith J, Jonges GN, van Noorden CJ, Janzen JW, et al. Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. *Hepatology* 1989;10:72-76.
2. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992;53:275-354.
3. Jungermann K. Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* 1995;103:81-91.
4. Braeuning A, Ittrich C, Kohle C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, Schwarz M. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J* 2006;273:5051-5061.
5. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 1996;16:179-203.
6. Jungermann K, Kietzmann T. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* 2000;31:255-260.
7. Agius L, Peak M, Alberti KG. Regulation of glycogen synthesis from glucose and gluconeogenic precursors by insulin in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Biochem J* 1990;266:91-102.
8. Katz NR, Fischer W, Ick M. Heterogeneous distribution of ATP citrate lyase in rat-liver parenchyma. Microradiochemical determination in microdissected periportal and perivenous liver tissue. *Eur J Biochem* 1983;130:297-301.
9. Katz NR, Fischer W, Giffhorn S. Distribution of enzymes of fatty acid and ketone body metabolism in periportal and perivenous rat-liver tissue. *Eur J Biochem* 1983;135:103-107.
10. Guzman M, Castro J. Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem J* 1989;264:107-113.
11. Li AC, Tanaka RD, Callaway K, Fogelman AM, Edwards PA. Localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase in the rat liver and intestine is affected by cholestyramine and mevinolin. *J Lipid Res* 1988;29:781-796.
12. Singer II, Kawka DW, Kazazis DM, Alberts AW, Chen JS, Huff JW, Ness GC. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase-containing hepatocytes are distributed periportally in normal and mevinolin-treated rat livers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5556-5560.
13. Cheng HC, Yang CM, Shiao MS. Zonation of cholesterol and glycerolipid synthesis in regenerating rat livers. *Hepatology* 1993;17:280-286.
14. Ugele B, Kempen HJ, Kempen JM, Gebhardt R, Meijer P, Burger HJ, Princen HM. Heterogeneity of rat liver parenchyma in cholesterol 7 alpha-hydroxylase and bile acid synthesis. *Biochem J* 1991;276 (Pt 1):73-77.
15. Andersen ME, Mills JJ, Jirtle RL, Greenlee WF. Negative selection in hepatic tumor promotion in relation to cancer risk assessment. *Toxicology* 1995;102:223-237.
16. Abu-Zahra TN, Pang KS. Effect of zonal transport and metabolism on hepatic removal: enalapril hydrolysis in zonal, isolated rat hepatocytes in vitro and correlation with perfusion data. *Drug Metab Dispos* 2000;28:807-813.

17. Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 2008;132:171-183.
18. Doweiko JP, Nompleggi DJ. The role of albumin in human physiology and pathophysiology, Part III: Albumin and disease states. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1991;15:476-483.
19. Gkouvatzos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:188-202.
20. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 2002;22:439-458.
21. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004;279:48487-48490.
22. Bohm F, Kohler UA, Speicher T, Werner S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med* 2010;2:294-305.
23. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 1999;369:1-10.
24. Villeneuve JP, Pichette V. Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr Drug Metab* 2004;5:273-282.
25. Riordan SM, Williams R. Treatment of hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 1997;337:473-479.
26. Wijdicks EF. Hepatic Encephalopathy. *N Engl J Med* 2016;375:1660-1670.
27. Lester R, Schmid R. Bilirubin Metabolism. *N Engl J Med* 1964;270:779-786.
28. Black M, Billing BH. Hepatic bilirubin udp-glucuronyl transferase activity in liver disease and gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 1969;280:1266-1271.
29. Kamisako T, Kobayashi Y, Takeuchi K, Ishihara T, Higuchi K, Tanaka Y, Gabazza EC, et al. Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J Gastroenterol* 2000;35:659-664.
30. Pohl J, Ring A, Eehalt R, Herrmann T, Stremmel W. New concepts of cellular fatty acid uptake: role of fatty acid transport proteins and of caveolae. *Proc Nutr Soc* 2004;63:259-262.
31. Eehalt R, Fullekrug J, Pohl J, Ring A, Herrmann T, Stremmel W. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem* 2006;284:135-140.
32. Gimeno RE. Fatty acid transport proteins. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:271-276.
33. Coleman RA, Lewin TM, Van Horn CG, Gonzalez-Baro MR. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr* 2002;132:2123-2126.
34. Ellis JM, Frahm JL, Li LO, Coleman RA. Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:212-217.
35. McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J Biol Chem* 1978;253:4128-4136.
36. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997;244:1-14.
37. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G852-858.
38. McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 1980;49:395-420.

39. Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:243-251.
40. Gibbons GF, Brown AM, Wiggins D, Pease R. The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly. *J R Soc Med* 2002;95 Suppl 42:23-32.
41. Pilkis SJ, el-Maghrabi MR, Claus TH. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem* 1988;57:755-783.
42. Van Schaftingen E, Detheux M, Veiga da Cunha M. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J* 1994;8:414-419.
43. de la Iglesia N, Mukhtar M, Seoane J, Guinovart JJ, Agius L. The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J Biol Chem* 2000;275:10597-10603.
44. Iynedjian PB. Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* 1993;293 (Pt 1):1-13.
45. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12737-12742.
46. Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase and pyruvate kinase in the liver. Indirect evidence for an action via a phosphatase. *J Biol Chem* 1990;265:7202-7206.
47. Nishimura M, Fedorov S, Uyeda K. Glucose-stimulated synthesis of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver. Dephosphorylation of fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase and activation by a sugar phosphate. *J Biol Chem* 1994;269:26100-26106.
48. Okar DA, Wu C, Lange AJ. Regulation of the regulatory enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Adv Enzyme Regul* 2004;44:123-154.
49. Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 1998;6:195-210.
50. Vaulont S, Munnich A, Decaux JF, Kahn A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J Biol Chem* 1986;261:7621-7625.
51. Decaux JF, Antoine B, Kahn A. Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* 1989;264:11584-11590.
52. Girard J, Ferre P, Foufelle F. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr* 1997;17:325-352.
53. Yamada K, Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* 1999;337 (Pt 1):1-11.
54. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 2008;414:1-18.
55. Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 1998;336 (Pt 1):19-31.
56. Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernandez-Novell JM, Garcia-Rocha M, de la Iglesia N, Cid E, et al. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 2003;546:127-132.
57. Lynen F, Ochoa S. Enzymes of fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1953;12:299-314.
58. Girard J, Perdereau D, Foufelle F, Prip-Buus C, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 1994;8:36-42.

59. Foufelle F, Girard J, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Adv Enzyme Regul* 1996;36:199-226.
60. Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, Magnuson MA, et al. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2004;279:20314-20326.
61. Thampy KG, Wakil SJ. Regulation of acetyl-coenzyme A carboxylase. II. Effect of fasting and refeeding on the activity, phosphate content, and aggregation state of the enzyme. *J Biol Chem* 1988;263:6454-6458.
62. Munday MR, Hemingway CJ. The regulation of acetyl-CoA carboxylase--a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:205-234.
63. Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* 1989;186:129-136.
64. Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 2002;366:377-391.
65. Gaussin V, Skarlas P, Ching YP, Hardie DG, Hue L. Distinct type-2A protein phosphatases activate HMGCoA reductase and acetyl-CoA carboxylase in liver. *FEBS Lett* 1997;413:115-118.
66. Koo SH, Dutcher AK, Towle HC. Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J Biol Chem* 2001;276:9437-9445.
67. Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res* 1997;36:43-53.
68. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Okazaki H, et al. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res* 2002;43:911-920.
69. Qin Y, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXRalpha-SREBP-1c. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:140-147.
70. Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair MG, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res* 2006;47:2028-2041.
71. Guillou H, Zdravec D, Martin PG, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 2010;49:186-199.
72. de Antueno RJ, Knickle LC, Smith H, Elliot ML, Allen SJ, Nwaka S, Winther MD. Activity of human Delta5 and Delta6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 2001;509:77-80.
73. Mauvoisin D, Mounier C. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* 2011;93:78-86.
74. Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi J. Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *J Lipid Res* 2006;47:1928-1939.

75. Villanueva CJ, Monetti M, Shih M, Zhou P, Watkins SM, Bhanot S, Farese RV, Jr. Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids. *Hepatology* 2009;50:434-442.
76. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
77. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-130.
78. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003;197:634-659.
79. Otu HH, Naxerova K, Ho K, Can H, Nesbitt N, Libermann TA, Karp SJ. Restoration of liver mass after injury requires proliferative and not embryonic transcriptional patterns. *J Biol Chem* 2007;282:11197-11204.
80. Tillmann HL, Manns MP, Rudolph KL. Merging models of hepatitis C virus pathogenesis. *Semin Liver Dis* 2005;25:84-92.
81. Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995;21:760-766.
82. Braun L, Mead JE, Panzica M, Mikumo R, Bell GI, Fausto N. Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1539-1543.
83. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807.
84. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004;18:816-827.
85. Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
86. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg* 1987;206:30-39.
87. Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E, Kato T, Oriyama T, Fujimoto J, Furukawa K, et al. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology* 1993;18:79-85.
88. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-2917.
89. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
90. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5-S16.
91. De Maria N, Manno M, Villa E. Sex hormones and liver cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2002;193:59-63.
92. Di Maio M, Daniele B, Pignata S, Gallo C, De Maio E, Morabito A, Piccirillo MC, et al. Is human hepatocellular carcinoma a hormone-responsive tumor? *World J Gastroenterol* 2008;14:1682-1689.
93. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001;34:194-203.

94. Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA, Jay G. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet* 1995;9:41-47.
95. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2010;29:2309-2324.
96. Bruno S, Crosignani A, Maisonneuve P, Rossi S, Silini E, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology* 2007;46:1350-1356.
97. Cassim S, Bilodeau M, Vincent C, Lapierre P. Novel Immunotherapies for Autoimmune Hepatitis. *Front Pediatr* 2017;5:8.
98. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:S35-50.
99. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver D, Practice Parameters Committee of the American College of G. Alcoholic liver disease. *Hepatology* 2010;51:307-328.
100. Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease. *Hepatology* 2007;46:2032-2039.
101. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010;51:1820-1832.
102. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT, Henderson BE, Wogan GN, et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:3-10.
103. Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect* 2010;118:818-824.
104. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006;6:674-687.
105. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007;27:55-76.
106. Puszyk WM, Trinh TL, Chapple SJ, Liu C. Linking metabolism and epigenetic regulation in development of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2013;93:983-990.
107. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro J, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:694-698.
108. Zucman-Rossi J. Molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010;42 Suppl 3:S235-241.
109. Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001;120:1763-1773.
110. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
111. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:37-50.
112. Herceg Z, Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res* 2011;727:55-61.
113. Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1973-1977.
114. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991;350:427-428.

115. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991;350:429-431.
116. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 2003;1:1001-1008.
117. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006;13:1027-1036.
118. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2012;142:219-232.
119. Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, Filmus J. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005;65:6245-6254.
120. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, Tovar V, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1972-1983, 1983 e1971-1911.
121. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004;10:8421-8425.
122. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* 2012;44:760-764.
123. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647-658.
124. Huang CS, Yu W, Cui H, Wang YJ, Zhang L, Han F, Huang T. Increased expression of miR-21 predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:7234-7238.
125. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006;130:2113-2129.
126. Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, et al. MicroRNA122 is a key regulator of alpha-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2011;2:338.
127. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 2009;28:3526-3536.
128. Nakao K, Miyaaki H, Ichikawa T. Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2014;49:589-593.
129. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45:42-52.
130. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007;12:9-22.
131. Roncalli M. Hepatocellular nodules in cirrhosis: focus on diagnostic criteria on liver biopsy. A Western experience. *Liver Transpl* 2004;10:S9-15.
132. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-851.

133. Lubrano J, Huet E, Tsilividis B, Francois A, Gorla O, Riachi G, Scotte M. Long-term outcome of liver resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic nonfibrotic liver with no viral hepatitis or alcohol abuse. *World J Surg* 2008;32:104-109.
134. Gaddikeri S, McNeeley MF, Wang CL, Bhargava P, Dighe MK, Yeh MM, Dubinsky TJ, et al. Hepatocellular carcinoma in the noncirrhotic liver. *AJR Am J Roentgenol* 2014;203:W34-47.
135. Edmondson HA, Henderson B, Benton B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1976;294:470-472.
136. Zucman-Rossi J, Jeannot E, Nhieu JT, Scoazec JY, Guettier C, Rebouissou S, Bacq Y, et al. Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* 2006;43:515-524.
137. Stoot JH, Coelen RJ, De Jong MC, Dejong CH. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinomas: a systematic review including more than 1600 adenoma cases. *HPB (Oxford)* 2010;12:509-522.
138. Dokmak S, Paradis V, Vilgrain V, Sauvanet A, Farges O, Valla D, Bedossa P, et al. A single-center surgical experience of 122 patients with single and multiple hepatocellular adenomas. *Gastroenterology* 2009;137:1698-1705.
139. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014;20:15955-15964.
140. Calderaro J, Couchy G, Imbeaud S, Amaddeo G, Letouze E, Blanc JF, Laurent C, et al. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol* 2017;67:727-738.
141. Paradis V. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2013;190:21-32.
142. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954;7:462-503.
143. Pirisi M, Leutner M, Pinato DJ, Avellini C, Carsana L, Toniutto P, Fabris C, et al. Reliability and reproducibility of the edmondson grading of hepatocellular carcinoma using paired core biopsy and surgical resection specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:1818-1822.
144. Martins-Filho SN, Paiva C, Azevedo RS, Alves VAF. Histological Grading of Hepatocellular Carcinoma-A Systematic Review of Literature. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:193.
145. Jegou J, Perruzi P, Arav E, Pluot M, Jaussaud R, Remy G. [Cutaneous and bone metastases revealing hepatocarcinoma]. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:804-806.
146. Katyal S, Oliver JH, 3rd, Peterson MS, Ferris JV, Carr BS, Baron RL. Extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 2000;216:698-703.
147. Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, Domenicali M, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001;34:570-575.
148. Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, Lok AS. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology* 2003;37:1114-1121.

149. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89-97.
150. Gray R, Peto R, Brantom P, Grasso P. Chronic nitrosamine ingestion in 1040 rodents: the effect of the choice of nitrosamine, the species studied, and the age of starting exposure. *Cancer Res* 1991;51:6470-6491.
151. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 1996;71:57-81.
152. Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818.
153. de Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, de Mello ES, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;49:1055-1061.
154. Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.
155. Liu Y, Qi X, Zeng Z, Wang L, Wang J, Zhang T, Xu Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated p53 and Pten dual mutation accelerates hepatocarcinogenesis in adult hepatitis B virus transgenic mice. *Sci Rep* 2017;7:2796.
156. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004;113:1774-1783.
157. He L, Tian DA, Li PY, He XX. Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations. *Oncotarget* 2015;6:23306-23322.
158. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol* 2009;90:367-386.
159. Brown ZJ, Heinrich B, Greten TF. Mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and highlights for immunotherapy research. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018.
160. Kuriyama S, Yamazaki M, Mitoro A, Tsujimoto T, Kikukawa M, Tsujinoue H, Nakatani T, et al. Hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model metastasizes intrahepatically in cirrhotic but not in normal liver. *Int J Cancer* 1999;80:471-476.
161. Lacoste B, Raymond VA, Cassim S, Lapierre P, Bilodeau M. Highly tumorigenic hepatocellular carcinoma cell line with cancer stem cell-like properties. *PLoS One* 2017;12:e0171215.
162. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123:309-314.
163. Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 1927;8:519-530.
164. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005;39:359-407.
165. Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 2002;62:6674-6681.
166. Yizhak K, Le Devedec SE, Rogkoti VM, Baenke F, de Boer VC, Frezza C, Schulze A, et al. A computational study of the Warburg effect identifies metabolic targets inhibiting cancer migration. *Mol Syst Biol* 2014;10:744.

167. Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, Dupuy F, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab* 2013;17:113-124.
168. DeWaal D, Nogueira V, Terry AR, Patra KC, Jeon SM, Guzman G, Au J, et al. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin. *Nat Commun* 2018;9:446.
169. Bellance N, Benard G, Furt F, Begueret H, Smolkova K, Passerieux E, Delage JP, et al. Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:2566-2577.
170. Jose C, Bellance N, Chatelain EH, Benard G, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Antiproliferative activity of levobupivacaine and aminoimidazole carboxamide ribonucleotide on human cancer cells of variable bioenergetic profile. *Mitochondrion* 2012;12:100-109.
171. Mayr JA, Meierhofer D, Zimmermann F, Feichtinger R, Kogler C, Ratschek M, Schmeller N, et al. Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocyoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:2270-2275.
172. Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, Yang C, et al. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* 2017;171:358-371 e359.
173. Schlaepfer IR, Rider L, Rodrigues LU, Gijon MA, Pac CT, Romero L, Cimic A, et al. Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2014;13:2361-2371.
174. Park JH, Vithayathil S, Kumar S, Sung PL, Dobrolecki LE, Putluri V, Bhat VB, et al. Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep* 2016;14:2154-2165.
175. Harris FT, Rahman SM, Hassanein M, Qian J, Hoeksema MD, Chen H, Eisenberg R, et al. Acyl-coenzyme A-binding protein regulates Beta-oxidation required for growth and survival of non-small cell lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014;7:748-757.
176. Lin H, Patel S, Affleck VS, Wilson I, Turnbull DM, Joshi AR, Maxwell R, et al. Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro Oncol* 2017;19:43-54.
177. Huang, Li T, Li X, Zhang L, Sun L, He X, Zhong X, et al. HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression. *Cell Rep* 2014;8:1930-1942.
178. Chen CL, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, Hess S, et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab* 2016;23:206-219.
179. Pike LS, Smift AL, Croteau NJ, Ferrick DA, Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807:726-734.
180. Estan MC, Calvino E, Calvo S, Guillen-Guio B, Boyano-Adanez Mdel C, de Blas E, Rial E, et al. Apoptotic efficacy of etomoxir in human acute myeloid leukemia cells. Cooperation with arsenic trioxide and glycolytic inhibitors, and regulation by oxidative stress and protein kinase activities. *PLoS One* 2014;9:e115250.

181. Li J, Zhao S, Zhou X, Zhang T, Zhao L, Miao P, Song S, et al. Inhibition of lipolysis by mercaptoacetate and etomoxir specifically sensitize drug-resistant lung adenocarcinoma cell to paclitaxel. *PLoS One* 2013;8:e74623.
182. Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, et al. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 2010;9:3506-3514.
183. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* 2012;11:3964-3971.
184. Goodstein ML, Richtsmeier WJ, Sauer LA. The effect of an acute fast on human head and neck carcinoma xenograft. Growth effects on an 'isolated tumor vascular pedicle' in the nude rat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:897-902.
185. Huang, Li T, Wang L, Zhang L, Yan R, Li K, Xing S, et al. Hepatocellular carcinoma redirects to ketolysis for progression under nutrition deprivation stress. *Cell Res* 2016;26:1112-1130.
186. Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest* 2013;123:3678-3684.
187. Goto M, Miwa H, Shikami M, Tsunekawa-Imai N, Suganuma K, Mizuno S, Takahashi M, et al. Importance of glutamine metabolism in leukemia cells by energy production through TCA cycle and by redox homeostasis. *Cancer Invest* 2014;32:241-247.
188. Yuneva MO, Fan TW, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T, Mates JM, et al. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab* 2012;15:157-170.
189. Sohn BH, Park IY, Shin JH, Yim SY, Lee JS. Glutamine synthetase mediates sorafenib sensitivity in beta-catenin-active hepatocellular carcinoma cells. *Exp Mol Med* 2018;50:e421.
190. Rodrigues MF, Obre E, de Melo FH, Santos GC, Jr., Galina A, Jasiulionis MG, Rossignol R, et al. Enhanced OXPHOS, glutaminolysis and beta-oxidation constitute the metastatic phenotype of melanoma cells. *Biochem J* 2016;473:703-715.
191. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19345-19350.
192. Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:19611-19616.
193. Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J* 2002;364:309-315.
194. Abrantes AM, Tavares LC, Pires S, Casalta-Lopes J, Mendes C, Simoes M, Grazina MM, et al. Metabolic effects of hypoxia in colorectal cancer by ¹³C NMR isotopomer analysis. *Biomed Res Int* 2014;2014:759791.
195. Herst PM, Berridge MV. Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:170-177.
196. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* 2017;168:657-669.

197. Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol* 2016;7:52.
198. Vaupel P, Mayer A. Availability, not respiratory capacity governs oxygen consumption of solid tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1477-1481.
199. Vaupel P, Fortmeyer HP, Runkel S, Kallinowski F. Blood flow, oxygen consumption, and tissue oxygenation of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res* 1987;47:3496-3503.
200. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 2010;148:3-15.
201. Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Efficacy of catumaxomab in tumor spheroid killing is mediated by its trifunctional mode of action. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1675-1684.
202. Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des* 2012;18:1319-1330.
203. Nakajima EC, Van Houten B. Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol Carcinog* 2013;52:329-337.
204. Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3930-3942.
205. Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, Jang C, Teng X, Lu W, Esparza LA, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature* 2017;551:115-118.
206. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 2009;8:3984-4001.
207. Brown ZJ, Fu Q, Ma C, Kruhlak M, Zhang H, Luo J, Heinrich B, et al. Carnitine palmitoyltransferase gene upregulation by linoleic acid induces CD4(+) T cell apoptosis promoting HCC development. *Cell Death Dis* 2018;9:620.
208. Foster B, Bagci U, Mansoor A, Xu Z, Mollura DJ. A review on segmentation of positron emission tomography images. *Comput Biol Med* 2014;50:76-96.
209. Mochizuki T, Tsukamoto E, Kuge Y, Kanegae K, Zhao S, Hikosaka K, Hosokawa M, et al. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. *J Nucl Med* 2001;42:1551-1555.
210. Rossier C, Dunet V, Matzinger O, Prior JO. [PET/CT and radiotherapy: indications and potential applications]. *Cancer Radiother* 2012;16:152-163.
211. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* 2009;50 Suppl 1:122S-150S.
212. Necib H, Garcia C, Wagner A, Vanderlinden B, Emonts P, Hendlisz A, Flamen P, et al. Detection and characterization of tumor changes in 18F-FDG PET patient monitoring using parametric imaging. *J Nucl Med* 2011;52:354-361.
213. Weber WA, Ott K, Becker K, Dittler HJ, Helmberger H, Avril NE, Meisetschlager G, et al. Prediction of response to preoperative chemotherapy in adenocarcinomas of the esophagogastric junction by metabolic imaging. *J Clin Oncol* 2001;19:3058-3065.

214. Weber WA, Petersen V, Schmidt B, Tyndale-Hines L, Link T, Peschel C, Schwaiger M. Positron emission tomography in non-small-cell lung cancer: prediction of response to chemotherapy by quantitative assessment of glucose use. *J Clin Oncol* 2003;21:2651-2657.
215. Schelling M, Avril N, Nahrig J, Kuhn W, Romer W, Sattler D, Werner M, et al. Positron emission tomography using [(18)F]Fluorodeoxyglucose for monitoring primary chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:1689-1695.
216. Cassim S, Raymond VA, Dehbidi-Assadzadeh L, Lapierre P, Bilodeau M. Metabolic reprogramming enables hepatocarcinoma cells to efficiently adapt and survive to a nutrient-restricted microenvironment. *Cell Cycle* 2018;1-40.
217. Gharib AM, Thomasson D, Li KC. Molecular imaging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S153-158.
218. Lee Z, Luo G. Issues pertaining to PET imaging of liver cancer. *J Fasting Health* 2014;2:62-64.
219. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Denizeau F, Bilodeau M. Resistance to Fas-induced apoptosis in hepatocytes: role of GSH depletion by cell isolation and culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G709-718.
220. Tuschl G, Lauer B, Mueller SO. Primary hepatocytes as a model to analyze species-specific toxicity and drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4:855-870.
221. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 2010;640:1-40.
222. Hu C, Li L. In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration. *Protein Cell* 2015;6:562-574.
223. Frank SA, Nowak MA. Problems of somatic mutation and cancer. *Bioessays* 2004;26:291-299.
224. Orr HA. The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat Rev Genet* 2005;6:119-127.
225. Ostrow SL, Barshir R, DeGregori J, Yeger-Lotem E, Hershberg R. Cancer evolution is associated with pervasive positive selection on globally expressed genes. *PLoS Genet* 2014;10:e1004239.
226. Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, Ellis P, Van Loo P, McLaren S, Wedge DC, et al. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 2015;348:880-886.
227. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;36:320-328.
228. Avril N. GLUT1 expression in tissue and (18)F-FDG uptake. *J Nucl Med* 2004;45:930-932.
229. Wang ZG, Yu MM, Han Y, Wu FY, Yang GJ, Li DC, Liu SM. Correlation of Glut-1 and Glut-3 expression with F-18 FDG uptake in pulmonary inflammatory lesions. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e5462.
230. de Alteriis E, Carteni F, Parascandola P, Serpa J, Mazzoleni S. Revisiting the Crabtree/Warburg effect in a dynamic perspective: a fitness advantage against sugar-induced cell death. *Cell Cycle* 2018;17:688-701.
231. Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1996;12:1607-1633.
232. Diaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S, Devin A, Rigoulet M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:252-265.

233. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807:568-576.
234. Chen Y, Choi SS, Michelotti GA, Chan IS, Swiderska-Syn M, Karaca GF, Xie G, et al. Hedgehog controls hepatic stellate cell fate by regulating metabolism. *Gastroenterology* 2012;143:1319-1329 e1311-1311.
235. Cohen RB. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity in Hyperplastic and Neoplastic Lesions of the Breast. A Histochemical Study. *Cancer* 1964;17:1067-1072.
236. Weber G, Cantero A. Glucose-6-phosphate utilization in hepatoma, regenerating and newborn rat liver, and in the liver of fed and fasted normal rats. *Cancer Res* 1957;17:995-1005.
237. Weber G, Morris HP. Comparative Biochemistry of Hepatomas. Iii. Carbohydrate Enzymes in Liver Tumors of Different Growth Rates. *Cancer Res* 1963;23:987-994.
238. Dessi S, Batetta B, Cherchi R, Onnis R, Pisano M, Pani P. Hexose monophosphate shunt enzymes in lung tumors from normal and glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient subjects. *Oncology* 1988;45:287-291.
239. Van Driel BE, De Goeij AF, Song JY, De Bruine AP, Van Noorden CJ. Development of oxygen insensitivity of the quantitative histochemical assay of G6PDH activity during colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1997;182:398-403.
240. Kuo W, Lin J, Tang TK. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Int J Cancer* 2000;85:857-864.
241. Vizan P, Alcarraz-Vizan G, Diaz-Moralli S, Solovjeva ON, Frederiks WM, Cascante M. Modulation of pentose phosphate pathway during cell cycle progression in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Int J Cancer* 2009;124:2789-2796.
242. Lin CJ, Ho HY, Cheng ML, You TH, Yu JS, Chiu DT. Impaired dephosphorylation renders G6PD-knockdown HepG2 cells more susceptible to H₂O₂-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;49:361-373.
243. Fang Z, Jiang C, Feng Y, Chen R, Lin X, Zhang Z, Han L, et al. Effects of G6PD activity inhibition on the viability, ROS generation and mechanical properties of cervical cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:2245-2254.
244. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 2004;5:489-500.
245. Samland AK, Sprenger GA. Transaldolase: from biochemistry to human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1482-1494.
246. Xu IM, Lai RK, Lin SH, Tse AP, Chiu DK, Koh HY, Law CT, et al. Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E725-734.
247. Hong X, Song R, Song H, Zheng T, Wang J, Liang Y, Qi S, et al. PTEN antagonises Tc1/hnRNP-mediated G6PD pre-mRNA splicing which contributes to hepatocarcinogenesis. *Gut* 2014;63:1635-1647.
248. Ma R, Zhang W, Tang K, Zhang H, Zhang Y, Li D, Li Y, et al. Switch of glycolysis to gluconeogenesis by dexamethasone for treatment of hepatocarcinoma. *Nat Commun* 2013;4:2508.
249. Wang B, Hsu SH, Frankel W, Ghoshal K, Jacob ST. Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating

glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. *Hepatology* 2012;56:186-197.

250. Goldstein I, Yizhak K, Madar S, Goldfinger N, Ruppin E, Rotter V. p53 promotes the expression of gluconeogenesis-related genes and enhances hepatic glucose production. *Cancer Metab* 2013;1:9.

251. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.

252. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010;44:479-496.

253. Naughton R, Quiney C, Turner SD, Cotter TG. Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia* 2009;23:1432-1440.

254. Wang P, Zhu CF, Ma MZ, Chen G, Song M, Zeng ZL, Lu WH, et al. Micro-RNA-155 is induced by K-Ras oncogenic signal and promotes ROS stress in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2015;6:21148-21158.

255. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 2002;9:1031-1044.

256. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, Bazhin AV. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol* 2016;231:2570-2581.

257. Linehan WM, Rouault TA. Molecular pathways: Fumarate hydratase-deficient kidney cancer--targeting the Warburg effect in cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:3345-3352.

258. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:894-899.

259. Brigelius-Flohe R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:1555-1568.

260. Hecht F, Cazarin JM, Lima CE, Faria CC, Leitao AA, Ferreira AC, Carvalho DP, et al. Redox homeostasis of breast cancer lineages contributes to differential cell death response to exogenous hydrogen peroxide. *Life Sci* 2016;158:7-13.

261. DeBerardinis RJ. Good neighbours in the tumour stroma reduce oxidative stress. *Nat Cell Biol* 2012;14:235-236.

262. Wang YY, Attane C, Milhas D, Dirat B, Dauvillier S, Guerard A, Gilhodes J, et al. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight* 2017;2:e87489.

263. Attane C, Milhas D, Hoy AJ, Muller C. Metabolic remodeling induced by adipocytes: a new Achilles' heel in invasive breast cancer? *Curr Med Chem* 2018.

264. Schieber MS, Chandel NS. ROS links glucose metabolism to breast cancer stem cell and EMT phenotype. *Cancer Cell* 2013;23:265-267.

265. Hiraga R, Kato M, Miyagawa S, Kamata T. Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2013;33:4431-4438.

266. Cichon MA, Radisky DC. ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF-kB-dependent activation of Snail. *Oncotarget* 2014;5:2827-2838.

267. Zhang Z, Zi Z, Lee EE, Zhao J, Contreras DC, South AP, Abel ED, et al. Differential glucose requirement in skin homeostasis and injury identifies a therapeutic target for psoriasis. *Nat Med* 2018;24:617-627.
268. Park Y, Reyna-Neyra A, Philippe L, Thoreen CC. mTORC1 Balances Cellular Amino Acid Supply with Demand for Protein Synthesis through Post-transcriptional Control of ATF4. *Cell Rep* 2017;19:1083-1090.
269. Yu X, Long YC. Crosstalk between cystine and glutathione is critical for the regulation of amino acid signaling pathways and ferroptosis. *Sci Rep* 2016;6:30033.
270. Dillon BJ, Prieto VG, Curley SA, Ensor CM, Holtsberg FW, Bomalaski JS, Clark MA. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer* 2004;100:826-833.
271. Kobayashi E, Masuda M, Nakayama R, Ichikawa H, Satow R, Shitashige M, Honda K, et al. Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* 2010;9:535-544.
272. Allen MD, Luong P, Hudson C, Leyton J, Delage B, Ghazaly E, Cutts R, et al. Prognostic and therapeutic impact of argininosuccinate synthetase 1 control in bladder cancer as monitored longitudinally by PET imaging. *Cancer Res* 2014;74:896-907.
273. Szlosarek PW, Klabatsa A, Pallaska A, Sheaff M, Smith P, Crook T, Grimshaw MJ, et al. In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion. *Clin Cancer Res* 2006;12:7126-7131.
274. Izzo F, Marra P, Beneduce G, Castello G, Vallone P, De Rosa V, Cremona F, et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J Clin Oncol* 2004;22:1815-1822.
275. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today* 1999;20:469-473.
276. Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res* 2011;17:6985-6991.
277. Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, Nawa A, et al. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:2310-2317.
278. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003;9:1269-1274.
279. Snell K. Enzymes of serine metabolism in normal and neoplastic rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1985;843:276-281.
280. Snell K, Weber G. Enzymic imbalance in serine metabolism in rat hepatomas. *Biochem J* 1986;233:617-620.
281. Amelio I, Cutruzzola F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci* 2014;39:191-198.
282. DeBerardinis RJ. Serine metabolism: some tumors take the road less traveled. *Cell Metab* 2011;14:285-286.

283. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet* 2011;43:869-874.
284. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 2011;476:346-350.
285. Nikiforov MA, Chandriani S, O'Connell B, Petrenko O, Kotenko I, Beavis A, Sedivy JM, et al. A functional screen for Myc-responsive genes reveals serine hydroxymethyltransferase, a major source of the one-carbon unit for cell metabolism. *Mol Cell Biol* 2002;22:5793-5800.
286. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell* 2012;149:22-35.
287. Cellarier E, Durando X, Vasson MP, Farges MC, Demiden A, Maurizis JC, Madelmont JC, et al. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2003;29:489-499.
288. Lu S, Epner DE. Molecular mechanisms of cell cycle block by methionine restriction in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 2000;38:123-130.
289. Poirson-Bichat F, Goncalves RA, Miccoli L, Dutrillaux B, Poupon MF. Methionine depletion enhances the antitumoral efficacy of cytotoxic agents in drug-resistant human tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2000;6:643-653.
290. Komninou D, Leutzinger Y, Reddy BS, Richie JP, Jr. Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 2006;54:202-208.
291. Stern PH, Hoffman RM. Elevated overall rates of transmethylation in cell lines from diverse human tumors. *In Vitro* 1984;20:663-670.
292. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997;18:869-882.
293. Pavlova NN, Hui S, Ghergurovich JM, Fan J, Intlekofer AM, White RM, Rabinowitz JD, et al. As Extracellular Glutamine Levels Decline, Asparagine Becomes an Essential Amino Acid. *Cell Metab* 2018;27:428-438 e425.
294. Knott SRV, Wagenblast E, Khan S, Kim SY, Soto M, Wagner M, Turgeon MO, et al. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. *Nature* 2018;554:378-381.
295. Luo M, Brooks M, Wicha MS. Asparagine and Glutamine: Co-conspirators Fueling Metastasis. *Cell Metab* 2018;27:947-949.
296. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med* 1948;238:787-793.
297. Walling J. From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest New Drugs* 2006;24:37-77.
298. Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, Colvin R, et al. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2012;11:1672-1682.
299. Shibuya K, Okada M, Suzuki S, Seino M, Seino S, Takeda H, Kitanaka C. Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* 2015;6:651-661.
300. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006;25:4633-4646.

301. Chapiro J, Sur S, Savic LJ, Ganapathy-Kanniappan S, Reyes J, Duran R, Thiruganasambandam SC, et al. Systemic delivery of microencapsulated 3-bromopyruvate for the therapy of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:6406-6417.
302. Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, Miller L, Wang Z, Wheaton W, Chandel N, et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* 2013;24:213-228.
303. Keri G, Erchegyi J, Horvath A, Mezo I, Idei M, Vantus T, Balogh A, et al. A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12513-12518.
304. Tejeda M, Gaal D, Hullan L, Schwab R, Szokoloczi O, Keri G. Antitumor activity of the somatostatin structural derivative (TT-232), against mouse and human melanoma tumor models. *Anticancer Res* 2007;27:4015-4019.
305. Tejeda M, Gaal D, Hullan L, Csuka O, Schwab R, Szokoloczi O, Keri GY. Continuous administration of the somatostatin structural derivative /TT-232/ by subcutaneously implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of antitumor therapy in different mouse and human tumor models. *Anticancer Res* 2008;28:2769-2774.
306. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:2037-2042.
307. Bagstrom MQ, Qi Y, Koczywas M, Argiris A, Johnson EA, Millward MJ, Murphy SC, et al. A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011;6:1757-1760.
308. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 2007;11:37-51.
309. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 2013;13:227-232.
310. Camarda R, Zhou AY, Kohnz RA, Balakrishnan S, Mahieu C, Anderton B, Eyob H, et al. Inhibition of fatty acid oxidation as a therapy for MYC-overexpressing triple-negative breast cancer. *Nat Med* 2016;22:427-432.
311. Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC, Yung KY, et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell* 2015;27:211-222.
312. Lien EC, Lyssiotis CA, Juvekar A, Hu H, Asara JM, Cantley LC, Toker A. Glutathione biosynthesis is a metabolic vulnerability in PI(3)K/Akt-driven breast cancer. *Nat Cell Biol* 2016;18:572-578.
313. Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science* 2015;350:1391-1396.
314. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 2003;278:8516-8525.
315. Deng YT, Huang HC, Lin JK. Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling. *Mol Carcinog* 2010;49:141-151.

316. Cormerais Y, Massard PA, Vucetic M, Giuliano S, Tambutte E, Durivault J, Vial V, et al. The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). *J Biol Chem* 2018;293:2877-2887.
317. Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, Janes JR, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2014;13:890-901.
318. Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, et al. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget* 2015;6:4569-4584.
319. Lamb R, Fiorillo M, Chadwick A, Ozsvari B, Reeves KJ, Smith DL, Clarke RB, et al. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells: Implications for more effective radiation therapy. *Oncotarget* 2015;6:14005-14025.
320. Le Bourgeois T, Strauss L, Aksoylar HI, Daneshmandi S, Seth P, Patsoukis N, Boussiotis VA. Targeting T Cell Metabolism for Improvement of Cancer Immunotherapy. *Front Oncol* 2018;8:237.
321. Kishton RJ, Sukumar M, Restifo NP. Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell Metab* 2017;26:94-109.
322. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, Huang SC, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 2013;153:1239-1251.
323. Swamy M, Pathak S, Grzes KM, Damerow S, Sinclair LV, van Aalten DM, Cantrell DA. Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nat Immunol* 2016;17:712-720.
324. Zeng H, Chi H. mTOR signaling and transcriptional regulation in T lymphocytes. *Transcription* 2014;5:e28263.
325. Carr EL, Kelman A, Wu GS, Gopaul R, Senkevitch E, Aghvanyan A, Turay AM, et al. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol* 2010;185:1037-1044.
326. Berod L, Friedrich C, Nandan A, Freitag J, Hagemann S, Harmrolfs K, Sandouk A, et al. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat Med* 2014;20:1327-1333.
327. Patsoukis N, Weaver JD, Strauss L, Herbel C, Seth P, Boussiotis VA. Immunometabolic Regulations Mediated by Coinhibitory Receptors and Their Impact on T Cell Immune Responses. *Front Immunol* 2017;8:330.
328. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2013;31:259-283.
329. Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A, Keren G, George J. Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Immunol* 2008;38:2412-2418.
330. Herbel C, Patsoukis N, Bardhan K, Seth P, Weaver JD, Boussiotis VA. Clinical significance of T cell metabolic reprogramming in cancer. *Clin Transl Med* 2016;5:29.
331. Siska PJ, Beckermann KE, Mason FM, Andrejeva G, Greenplate AR, Sendor AB, Chiang YJ, et al. Mitochondrial dysregulation and glycolytic insufficiency functionally impair CD8 T cells infiltrating human renal cell carcinoma. *JCI Insight* 2017;2.

332. Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, Coleman N, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005;41:722-730.
333. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2012;1:1223-1225.
334. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, Karoly ED, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* 2015;6:6692.
335. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 2015;162:1229-1241.
336. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 2008;111:3635-3643.
337. Ma C, Kesarwala AH, Eggert T, Medina-Echeverz J, Kleiner DE, Jin P, Stroncek DF, et al. NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* 2016;531:253-257.
338. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, Kim TY, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet* 2017;389:2492-2502.
339. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell* 2018;173:822-837.