



HAL
open science

Rôle de l'inactivation du gène Rps6ka3 dans la carcinogenèse hépatique

Samantha Schaeffer

► **To cite this version:**

Samantha Schaeffer. Rôle de l'inactivation du gène Rps6ka3 dans la carcinogenèse hépatique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03573399

HAL Id: hal-03573399

<https://ephe.hal.science/hal-03573399>

Submitted on 14 Feb 2022

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par
Samantha SCHAEFFER

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**TITRE : Rôle de l'inactivation du gène *Rps6ka3* dans la
carcinogenèse hépatique**

Soutenu le lundi 6 décembre 2021

devant le jury suivant :

Stéphanie PLENCHETTE-COLAS – Président
Sandra REBOUSSOU – Tuteur scientifique
Flore RENAUD-PAITRA – Tuteur pédagogique
Angélique GOUGELET – Rapporteur
Manon ALLAIRE – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Sandra REBOUSSOU

Intitulé de la structure d'accueil : Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM
UMRS1138, équipe 28 « Génomique Fonctionnelle des Tumeurs Solides », Paris

Directrice : Pr Jessica ZUCMAN-ROSSI

et de

Dr Flore RENAUD-PAITRA

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Institut Gustave Roussy, UMR 9019
« Intégrité du Génome et Cancers », Villejuif

Directrice : Dr Patricia Kannouche

EPHE Sciences de la Vie et de la Terre

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : « Génomes,
Cancers et Thérapies »

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les personnes ayant accepté de faire partie du jury, et pour le temps et l'intérêt accordés à mes travaux.

Mes remerciements les plus sincères vont à Sandra, qui est présente pour moi depuis mon arrivée dans l'équipe en 2017, et qui m'a laissé l'espace et l'autonomie nécessaire pour que je m'épanouisse dans mes travaux, tout en se montrant toujours disponible et bienveillante. J'ai énormément progressé durant ces quelques années, en acquérant chaque jour des connaissances scientifiques et techniques supplémentaires suite à nos discussions et nos essais, et je prends de plus en plus confiance en mes capacités et mon potentiel grâce à ton soutien. Merci d'être là, dans la science comme dans les tâches ingrates !

Milles merci également à Jessica, qui a accepté que je m'inscrive à l'EPHE en parallèle de mes activités de recherche au laboratoire, et qui me pousse à m'améliorer chaque jour dans mon travail et à donner le meilleur de moi-même. Merci pour la confiance que tu m'accorde au quotidien, et de laisser ma curiosité se satisfaire grâce aux formations et congrès que je peux suivre.

Je remercie également Flore Renaud, ma tutrice pédagogique durant ces deux années d'EPHE, qui auront été si particulières avec la crise sanitaire ! Merci pour votre aide et pour votre disponibilité, ainsi que votre rigueur qui m'aura permis de fournir le meilleur travail possible. Affaire à suivre en doctorat ?

Mes résultats ne seraient pas ce qu'ils sont sans l'aide de mes collègues, je remercie donc Anna-Line, avec qui j'ai réalisé en grande partie les expériences et l'élevage de nos souris, Barkha pour son aide précieuse en histologie et la lecture de nos lames, Julien qui a également contribué à la lecture des lames, Kevin et Floriane du CHIC pour leur aide dans la mise au point de nos manip d'immunohistochimie, et tous mes collègues de l'équipe 28 ainsi que du Centre de Recherche des Cordeliers.

Un petit clin d'œil particulier à Pierre et Manon, qui partagent mon bureau au quotidien mais aussi de nombreux cocktails autour de discussions plus ou moins sérieuses. Merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre bonne humeur jour après jour.

Enfin, une pensée toute particulière pour ma famille et mes amis, qui font partie intégrante de ma vie au même titre que mon travail. Merci à ma Maman sans qui je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui ; merci pour ton soutien indéfectible et ton amour inconditionnel, sans toi je serais perdue. Merci aussi à mon Papa, bien que tu ne sois plus là pour voir l'adulte que je suis devenue, merci pour l'amour que tu m'auras porté tout au long de ta vie et pour tous les souvenirs heureux que je garde. J'espère que tu es fier de moi là où tu es. Et merci à Marie-José, ma deuxième maman, d'être toujours là pour moi malgré son départ. Je vous aime énormément et votre aide m'est particulièrement précieuse.

Merci aussi à mes amis proches : Angie et Gaël, mes meilleurs amis de longue date restés sur Tours alors que je partais vivre à Paris, heureusement nous sommes toujours aussi proches et je vous en remercie ! Laure, Xavier, Rosanne, David et Phi, je suis tellement reconnaissante d'avoir fait votre connaissance dans cette nouvelle vie parisienne, et d'avoir la chance de partager votre amitié. Merci d'être là et merci d'être vous !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	11
I – Généralités sur le cancer du foie	11
1) Généralités et données épidémiologiques	11
2) Types de cancers du foie	12
a) Cancers primitifs	13
b) Cancers secondaires	13
3) Étiologies connues du CHC	14
a) Consommation excessive d'alcool	15
b) Hépatite B	15
c) Hépatite C	16
d) Stéatose hépatique non-alcoolique	16
e) Aflatoxine B1	17
f) Virus AAV2	17
g) Hémochromatose	17
II – Mécanismes de carcinogénèse hépatique	17
1) Structure normale du foie	17
a) Description anatomique	17
b) Types cellulaires et cancers associés	18
2) Développement du CHC sur foie sain	19
3) Développement du CHC sur foie cirrhotique	20
III – Perturbations génétiques oncogéniques ou oncosuppressives	22
1) Maintenance des télomères	23
2) Contrôle du cycle cellulaire	24
3) Régulateurs épigénétiques	25
4) Stress oxydatif	25
5) Voie Wnt/ β -caténine	26
a) β -caténine	26
b) AXIN1	27
6) Voie Ras/MAPK	27
a) RSK2	28
7) Voie PI3K/AKT/mTOR	32
IV – Classification des CHC	32
1) Classification clinique	32
2) Classification moléculaire	33
a) Classification de Boyault en 2007	33
b) Classification de Hoshida en 2009	34
V – Traitements du CHC	34
1) Techniques chirurgicales	35
a) Ablation partielle du foie	35
b) Transplantation hépatique	35
2) Destruction tumorale percutanée	36

3) Traitements par chimiothérapie	36
a) Chimioembolisation	36
b) Thérapies ciblées	37
VI – Objectifs de l'étude	38
MATERIELS ET METHODES	39
I – Modèles murins	39
1) Généralités	39
2) Fond génétique de base	39
3) Animaux transgéniques utilisés	40
a) Inactivation constitutive de RSK2	40
b) Inactivation conditionnelle de l' <i>Axin1</i>	41
c) Double inactivation	42
II – Techniques d'étude <i>in vivo</i>	42
1) Génotypage des animaux générés et vérification de l'expression des gènes d'intérêt	42
a) Génotypage par PCR classique	43
b) Migration électrophorétique	43
2) Protocoles de carcinogénèse	44
a) Carcinogénèse spontanée	44
b) Carcinogénèse chimiquement induite	45
3) Études fonctionnelles en contexte sain	47
4) Collecte et préparation des tissus hépatiques	48
a) Autopsie des animaux	48
b) Collecte des données	48
c) Analyses macroscopiques	48
d) Préparation des échantillons	48
III – Analyses microscopiques	48
1) Analyses histologiques	49
a) Génération de la banque de lames	49
b) Coloration HES	49
2) Analyses immunohistochimiques	50
a) Description du protocole de base	50
b) Détection de la Glutamine Synthétase	50
c) Détection de phospho-ERK	51
d) Détection de KI-67	51
e) Détection de la β -caténine	51
f) Détection de la cytokératine 7	51
IV – Analyses moléculaires	52
1) Extraction des acides nucléiques	52
a) Coupe de tissus congelés	52
b) Extraction à l'automate Maxwell	52
c) Extraction en kit AllPrep	52
d) Dosage des acides nucléiques	52
2) RT-Q-PCR	53
a) Reverse transcription	53
b) PCR quantitative	54

3) Extraction des protéines	55
a) Protocole d'extraction	55
b) Dosage par la méthode BCA	55
4) Western-Blot capillaire	56
V – Analyses statistiques	58
1) Logiciel d'analyse	58
2) Représentation graphique	58
RESULTATS	59
I – Modèle de dérégulation de la voie Ras/MAPK	62
1) Carcinogénèse chimique induite par le DEN	62
2) Étude de la coopération entre les mutations de <i>Rps6ka3</i> et B-raf	63
3) Interprétation des résultats	66
II – Modèle d'inactivation de RSK2 associé à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine	68
1) Coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'activation de la β -caténine	68
a) Carcinogénèse chimique induite par le DEN associé au phénobarbital	68
b) Étude de la coopération entre les mutations de <i>Rps6ka3</i> et de <i>Ctnnb1</i>	68
c) Interprétation des résultats	71
2) Coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'inactivation de l'AXIN1	73
a) Carcinogénèse spontanée en contexte de double inactivation	73
b) Étude de la coopération entre les mutations de <i>Rps6ka3</i> et de l' <i>Axin1</i>	73
c) Interprétation des résultats	77
III – Études fonctionnelles de la perte de RSK2 et/ou AXIN1	78
1) Conséquences histologiques et immunohistochimiques de la perte de RSK2 et/ou AXIN1	79
2) Conséquences sur l'expression de cibles protéiques	82
a) Phosphorylation de ERK	82
b) Régulation de P53	83
3) Conséquences sur l'expression des ARN messagers	85
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	91
I – Discussion des résultats obtenus	91
1) Modèles de carcinogénèse chimique	91
2) Modèle de carcinogénèse spontanée	94
3) Impact fonctionnel de la perte de RSK2/AXIN1 dans le foie	95
4) Conclusion globale	97
II – Perspectives pour la suite de l'étude	98
1) Analyses moléculaires haut débit	98
2) Développement d'un nouveau modèle murin préclinique.....	99
3) Identification de nouvelles cibles pharmacologiques	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102
ANNEXES	117
<u>Annexe 1</u> : Caractéristiques structurelles schématiques des membres de la famille des kinases S6 ribosomales (RSK1 à RSK4) chez l'homme	117

<u>Annexe 2</u> : Tableau récapitulatif des couples d'amorces utilisés pour réaliser le génotypage par PCR des animaux de nos lignées murines	118
<u>Annexe 3</u> : Composition du milieu réactionnel utilisé pour la Reverse Transcription des ARN totaux en ADN complémentaire	118
<u>Annexe 4</u> : Liste des sondes Taqman utilisées pour la Q-RT-PCR	119
<u>Annexe 5</u> : Tableau récapitulatif des conditions utilisées pour les anticorps testés en Western-Blot capillaire (automate Jess)	119
<u>Annexe 6</u> : Mise en évidence des mutations activatrices de B-raf dans les tumeurs induites par le DEN à deux semaines d'âge	120
<u>Annexe 7</u> : Vérification du génotype de l' <i>Axin1</i> dans le foie, par une technique de RT-Q-PCR (A) ou par Western-Blot (B)	120
<u>Annexe 8</u> : Recherche des protéines RSK2 (A) et AXIN1 (B) dans les lysats hépatiques des souris, analysés à 6 semaines d'âge en Western-Blot capillaire (automate Jess)	121

LISTE DES ABREVIATIONS

Les abréviations utilisées dans le texte sont ici listées par ordre alphabétique, et non par ordre d'apparition.

- **AAV2** : *Adeno Associated Virus 2*, virus adéno-associé de type 2
- **AAD** : Antiviraux à Action Directe
- **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- **AFB1** : Aflatoxine B1
- **AFP** : α -FoetoProtéine
- **AHC** : Adénome Hépatocellulaire
- **ARN** : Acide RiboNucléique
- **AXIN1** : *Axis Inhibition protein 1*
- **BCA** : *BiCinchoninic acid Assay*, méthode de dosage des protéines
- **BCLC** : *Barcelona Clinic Liver Cancer*, classification clinique de Barcelone du cancer du foie
- **BNF** : β -NaphtoFlavone
- **CAR** : *Constitutive Androstane Receptor*
- **CHC** : Carcinome Hépatocellulaire
- **CK/KRT** : CytoKératine
- **CLS** : *Coffin-Lowry Syndrome*, syndrome de Coffin-Lowry
- **DAB** : 3,3'-DiAminoBenzidine
- **DEN** : DiEthylNitrosamine
- **DM** : Double Muté
- **DTT** : DiThioThréitol
- **GS** : Glutamine Synthétase
- **HES** : coloration à l'Hémalum-Eosine-Safran
- **HRP** : *Horse Radish Peroxydase*
- **IHC** : ImmunoHistoChimie
- **IP** : injection Intra-Péritonéale
- **KO** : *Knock Out*, génotype des animaux délétés pour le gène d'intérêt
- **NASH** : *Non Alcoholic SteatoHepatitis*, stéatohépatite non alcoolique
- **MELD** : *Model for End stage Liver Disease*, score de classification du cancer du foie
- **NS** : différence Non-Significative
- **NT** : animaux Non-Traités
- **PCR** : *Polymerase Chain Reaction*, réaction de polymérisation en chaîne
- **PB** : PhénoBarbital
- **RT** : réaction de Réverse Transcription
- **RSK2** : *Ribosomal S6 Kinase 2*
- **SIFT** : *Sorting Intolerant From Tolerant*, outil de prediction bio-informatique
- **UA** : unité arbitraire
- **VHB** : Virus de l'Hépatite B
- **VHC** : Virus de l'Hépatite C
- **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- **WT** : *Wild Type*, génotype des animaux sauvages

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Les figures et tableaux présentés dans le texte sont ici listés par ordre d'apparition.

Figure 1 : Incidence mondiale du cancer du foie.

Figure 2 : Mécanisme d'échappement de cellules cancéreuses métastatiques.

Figure 3 : Structure anatomique et vasculaire du foie.

Figure 4 : Schéma structurel d'un lobule hépatique.

Figure 5 : Mécanisme de la carcinogénèse hépatique sur foie sain.

Figure 6 : Mécanisme de la carcinogénèse hépatique sur foie cirrhotique.

Figure 7 : Activation schématique de la voie Wnt/ β -caténine dans le CHC.

Figure 8 : Localisation chromosomique du gène *Rps6ka3* et structure simplifiée linéaire de la protéine RSK2.

Figure 9 : Activités et substrats de la protéine RSK2 au sein de la voie Ras/MAPK.

Figure 10 : Classification de Boyault des CHC.

Figure 11 : Inactivation ubiquitaire du gène *Rps6ka3* dans un modèle de souris C57Black/6J.

Figure 12 : Inactivation conditionnelle hépato-spécifique du gène *Axin1* dans un modèle de souris C57Black/6J, utilisant le système inductible Cre/Lox.

Figure 13 : Génotypage des animaux issus de nos colonies par PCR suivie d'une électrophorèse capillaire.

Figure 14 : Schéma expérimental de la procédure de carcinogénèse spontanée, utilisant le modèle de souris double-inactivées pour *Rps6ka3* et *Axin1*.

Figure 15 : Schémas expérimentaux des deux procédures réalisées dans le cadre d'une carcinogénèse hépatique chimiquement induite.

Figure 16 : Schéma simplifié de la réaction de réverse transcription à partir d'ARN.

Figure 17 : Principe de suivi de l'amplification des gènes cibles en Q-PCR (signal fluorescent), grâce à l'utilisation d'une sonde fluorogénique Taqman.

Figure 18 : Principe du Western Blot capillaire, réalisé grâce à l'automate JESS (ProteinSimple) de BioTechne.

Figure 19 : Profil mutationnel de la protéine RSK2, généré suite à l'analyse de séries de 1151 CHC provenant 4 séries de données génomiques publiées (TCGA, LICA-FR, LIRI-JP, KOREAN).

Figure 20 : Analyse des profils d'altérations génomiques pour les gènes *Rps6ka3*, *Axin1* et *Ctnnb1* dans les CHC humains.

Figure 21 : Fréquence d'apparition de tumeurs chez les animaux (en %) et nombre de nodules hépatiques dénombrés après traitement au DEN seul.

Figure 22 : Observations macroscopiques et microscopiques des foies prélevés à 6 mois après traitement au DEN seul.

Figure 23 : Analyses histologiques et immunohistochimiques réalisées sur les foies de souris RSK2 WT ou KO, prélevés à 6 mois après traitement au DEN seul.

Figure 24 : Fréquence d'apparition de tumeurs chez les animaux (en %) et nombre de nodules hépatiques dénombrés après traitement au DEN + PB.

Figure 25 : Observations macroscopiques et microscopiques des foies prélevés à 12 mois post-injection de DEN + PB.

Figure 26 : Analyses histologiques et immunohistochimiques réalisées sur les foies de souris RSK2 WT ou KO, prélevés à 12 mois après traitement au DEN + PB.

Figure 27 : Fréquence d'apparition de tumeurs chez les animaux (en %) et nombre de nodules hépatiques dénombrés (A) ; calcul du ratio du poids du foie sur le poids total de la souris (B).

Figure 28 : Observations macroscopiques et microscopiques des foies prélevés à 12 mois post-inactivation de l'*Axin1*.

Figure 29 : Analyses histologiques et immunohistochimiques réalisées sur les foies de souris RSK2 WT ou KO, prélevés à 12 mois post-inactivation de l'*Axin1*.

Figure 30 : Analyses histologiques structurelles des foies sains des animaux âgés de six semaines (génotype sauvage, délété pour RSK2, pour l'AXIN1, ou pour les deux protéines simultanément).

Figure 31 : Analyses immunohistochimiques réalisées sur les souris sauvages ou mutées pour un ou deux gènes d'intérêt à 6 semaines d'âge, dans du tissu hépatique sain.

Figure 32 : Analyses protéiques des formes totales et phosphorylées de ERK.

Figure 33 : Analyse protéique de p53 dans le tissu hépatique sain de souris âgées de 2 ou 6 semaines, avec ou sans traitement au BNF.

Figure 34 : Analyse par RT-Q-PCR des niveaux d'ARNm reflétant l'expression de gènes marqueurs de cellules progénitrices (A) ou impliqués dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire (B), dans le tissu hépatique sain de souris âgées de 6 semaines.

Figure 35 : Analyse par RT-Q-PCR des niveaux d'ARNm reflétant l'expression des gènes cibles de p53 *CDKN1A* (A) et *GADD45b* (B), dans le tissu hépatique de souris âgées de 2 semaines, en présence ou en absence de 24 heures d'exposition préalable au DEN.

Figure 36 : Détail du rôle de RSK2 au sein de la voie de signalisation Ras/MAPK.

Figure 37 : Interactions épistatiques majeures entre les gènes les plus souvent mutés au sein des CHC.

Figure 38 : Principe de l'injection hydrodynamique couplée au système CripsR/Cas9, pour la création de mutants hépatocytaires *in vivo* chez la souris.

Tableau 1 : Principales voies de signalisation altérées dans le CHC et leurs gènes associés.

Tableau 2 : Récapitulatif des molécules de thérapies ciblées utilisées dans le traitement du CHC.

Tableau 3 : Conditions d'utilisation des anticorps dans le cadre des analyses immunohistochimiques réalisées sur les coupes de tissus hépatiques inclus en paraffine.

Tableau 4 : Composition des tampons pouvant être utilisés pour l'extraction des protéines totales à partir de tissus hépatiques congelés.

INTRODUCTION

I- Généralités sur les cancers du foie :

1) Généralités et données épidémiologiques :

Les cancers du foie représentent un problème de santé publique majeur très inquiétant, du fait d'un mauvais pronostic et d'une incidence en constante augmentation ces dernières années. En 2019, les cancers du foie ont été classés au 6^{ème} rang des cancers les plus fréquents, et au 4^{ème} rang des cancers les plus mortels dans la population générale derrière le cancer du poumon, le cancer colorectal et le cancer de l'estomac (Bray *et al*, 2018 ; Villanueva, 2019). Aux États-Unis, ils sont même la seconde cause de mortalité par cancer, derrière le cancer du pancréas. Ils touchent en grande majorité les personnes de sexe masculin (environ 80% des cas), chez qui ils représentent le 5^{ème} type de cancer le plus fréquent (environ 6% de la totalité des cancers). On estime que les cancers du foie seraient responsables de 10% des décès par cancer chez l'homme.

L'incidence de ce type de cancers est de 16 cas pour 100 000 personnes en 2020 (Aracagy/InfoCancer, 2019) ce qui représente plus de 700 000 cas diagnostiqués chaque année. Les cancers du foie seraient donc responsables du décès de plus de 500 000 personnes par an. Dans les pays occidentaux, l'incidence est en augmentation constante depuis une vingtaine d'années, du fait des modifications des habitudes de vie (consommation croissante d'alcool et de produits gras et sucrés) et de l'augmentation des maladies chroniques du foie, ce qui en fait donc une pathologie particulièrement préoccupante. L'Organisation Mondiale de la Santé a estimé que d'ici 2030, le nombre de décès liés aux cancers du foie aurait dépassé le million de personnes chaque année (Villanueva, 2019), ce qui est particulièrement inquiétant.

En France, le taux d'incidence est de 12,5 pour 100 000 personnes chez l'homme, et de seulement 2,9 pour 100 000 personnes chez la femme. Les hommes sont donc bien plus souvent touchés par cette pathologie que les femmes. Les cancers du foie représentent 13% des cancers digestifs, et l'âge moyen de diagnostic de la maladie est de 62 ans, ce qui est relativement jeune. Cependant, ce diagnostic se fait très souvent de façon fortuite lors d'un examen de routine, car il est fréquent de n'avoir aucun symptôme particulier. La découverte de la pathologie se fait donc souvent à un stade déjà avancé de la maladie, entraînant un pronostic sévère en l'absence de greffe du foie. L'arsenal thérapeutique disponible actuellement est malheureusement limité, et dans la plupart des cas ne présente qu'un bénéfice modeste se traduisant par une survie allongée de quelques mois seulement.

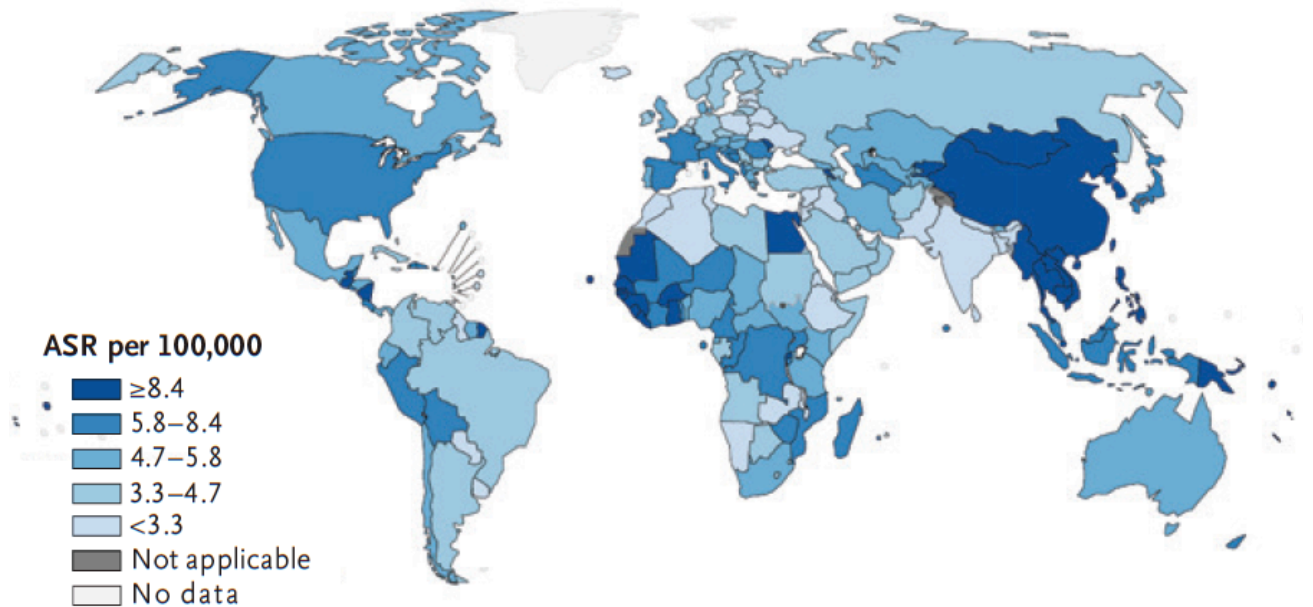


Figure 1 : Incidence mondiale du cancer du foie. Répartition de l'incidence du cancer du foie (tous types de cancers du foie) dans le monde pour 100 000 personnes (hommes et femmes confondus, normalisation sur l'âge) en 2018 (Villanueva, 2019).

Il existe néanmoins des tumeurs bénignes du foie, dont la forme la plus commune est l'angiome hépatique ou hémangiome. Il s'agit d'une tumeur vasculaire qui est plutôt fréquente puisqu'elle serait retrouvée chez 2 à 5% de la population globale. Contrairement aux tumeurs malignes, elle se développe majoritairement chez les femmes, notamment dans des cas de prise de contraception orale de façon prolongée ou d'hormonothérapie dans le cadre de la ménopause. Ces tumeurs sont asymptomatiques et donc découvertes par hasard, mais ne justifient ni traitement ni surveillance particulière car, bien qu'elles puissent être multiples, elles restent la plupart du temps de petite taille (moins de 4 cm) et ne gênent en rien la fonction hépatique.

D'autres types de tumeurs bénignes existent mais sont beaucoup plus rares : les adénomes hépatocellulaires, qui affectent également en majorité les femmes sous contraceptifs oraux et qui sont le plus souvent réséqués chirurgicalement car ils présentent un risque hémorragique ; et les hyperplasies nodales focales, qui touchent plus particulièrement les femmes âgées de 20 à 40 ans, sont asymptomatiques et ne nécessitent pas de surveillance particulière.

2) Types de cancers du foie :

Dans le cadre des tumeurs malignes hépatiques, qui sont pour la plupart de mauvais pronostic, on distingue les tumeurs primitives qui vont se développer directement de façon anormale à partir des cellules présentes dans le foie, et les tumeurs secondaires qui vont se développer à partir d'une tumeur située à distance dans un autre organe, qui va métastaser et venir former un foyer secondaire au niveau du foie.

a) Cancers primitifs : on distingue différents types de tumeurs primitives malignes dans le foie. Chez l'adulte, la forme primitive maligne la plus fréquente mais aussi une des plus agressives est le carcinome hépatocellulaire (CHC), qui va se développer directement à partir des hépatocytes (cellules hépatiques majoritaires) et représente à lui seul près de 90% des cancers primitifs du foie. Les CHC se caractérisent par une hypervascularisation artérielle, pouvant « bourgeonner » et envahir les gros vaisseaux hépatiques comme la veine porte ou même les canaux biliaires. Les caractéristiques cliniques et moléculaires de ce type de tumeur sont très hétérogènes, et il est donc difficile de généraliser. Les CHC se développent très souvent dans un contexte de maladie chronique où le foie est donc fortement endommagé, mais ce n'est pas systématique. Les processus menant au développement d'un CHC seront détaillés plus loin dans le manuscrit.

On distingue également le cholangiocarcinome (représente environ 10% des cancers hépatiques) qui est une tumeur épithéliale des canaux biliaires intra ou extra-hépatique, dont l'incidence et le taux de mortalité sont actuellement en augmentation notamment dans la région de l'Extrême Orient. Ce type de tumeur se développe fréquemment sur un foie sain, préférentiellement chez les hommes, à partir des cellules biliaires appelées « cholangiocytes ». Le pronostic peut être très différent selon la localisation et le stade de la tumeur (Lendvai *et al*, 2020).

D'autres tumeurs hépatiques primitives existent mais sont beaucoup plus rares. On peut citer dans cette catégorie le carcinome fibrolamellaire (touche les patients jeunes entre 20 et 40 ans, hépatocytes caractéristiques associés à du tissu lamellaire fibreux, pronostic plutôt favorable par rapport aux autres types de tumeurs) (Chun-Chieh et Yang, 2018), l'angiosarcome (tumeur endothéliale des vaisseaux sanguins très agressive, évolution rapide et forte dissémination métastatique), et le cystadénocarcinome (évolution maligne mais lente d'un cystadénome biliaire, comparable à une tumeur kystique hépatique) (Bioulac-Sage *et al*, 2008). L'ablation chirurgicale partielle du foie (hépatectomie) est préconisée en première intention lorsque l'étendue des lésions tumorales et la fonction hépatique du patient le permettent encore. Si l'hépatectomie partielle n'est pas possible, une hépatectomie totale suivie d'une transplantation du foie pourra être envisagée (en cas de cirrhose notamment, y compris d'origine virale). D'autres types de traitements peuvent être envisagés et proposés au patient au cas par cas, et peuvent parfois être couplés à l'hépatectomie. Les différents traitements disponibles actuellement seront détaillés un peu plus loin dans cette introduction.

Chez l'enfant en revanche, les tumeurs les plus fréquemment retrouvées sont les hépatoblastomes. Ce sont des tumeurs de type embryonnaire, présentant un taux élevé d'alpha-foetoprotéine (AFP) (Bondoc *et al*, 2018). Elles apparaissent le plus souvent avant l'âge de 5 ans, et doivent être obligatoirement réséquées chirurgicalement, avec ou sans chimiothérapie préopératoire. Ce type de tumeur présente un bon taux de survie (70 à 80% des patients à 5 ans), sauf en cas de rechute après le traitement de première intention. Des CHC pédiatriques existent également et sont, comme chez l'adulte, très agressifs, mais beaucoup plus rares que les hépatoblastomes.

b) Cancers secondaires : ce sont des tumeurs qui se développent suite à l'implantation de cellules métastatiques au niveau hépatique, en raison de l'échappement de ces cellules de leur foyer tumoral d'origine. Comme le foie possède une fonction de filtration du sang

provenant de l'organisme entier, il va facilement drainer les cellules métastatiques qui pourront éventuellement réussir à s'y implanter. Ces cellules cancéreuses vont ensuite se développer et former un foyer secondaire métastatique : ce sont les métastases hépatiques. Les cancers primitifs d'origine digestive, comme le cancer du côlon, de l'estomac ou du pancréas, métastasent de façon fréquente dans le foie, de par la proximité entre ces organes au sein du système digestif. Plus rarement, d'autres cancers tels que le cancer du sein ou du poumon, qui sont également connus pour métastaser facilement, peuvent s'étendre au foie. Il faut aussi noter qu'un cancer primitif du foie peut tout à fait métastaser dans le foie lui-même, par le biais des voies portales, et former des foyers secondaires. Ce processus explique bien souvent la présence de plusieurs sites tumoraux au sein même de l'organe. Des métastases peuvent également survenir dans le foie (ou dans d'autres organes) suite à une hépatectomie partielle, les cellules hépatiques tumorales ayant déjà migré dans la circulation sanguine ou lymphatique avant l'intervention en elle-même. Elles se réimplantent alors dans le foie pour y former de nouvelles tumeurs secondaires, différentes de la tumeur primitive qui aura été réséquée.

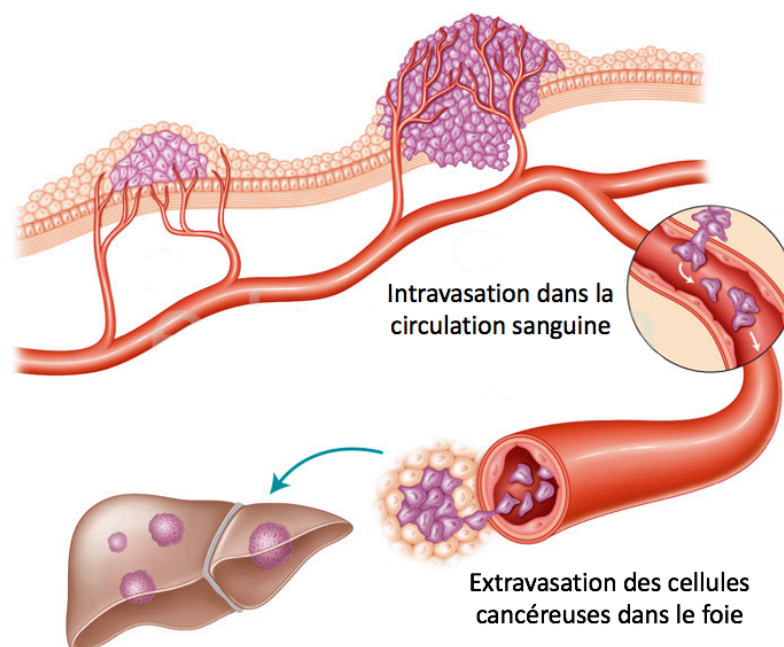


Figure 2 : Mécanisme d'échappement de cellules cancéreuses métastatiques. *Certaines cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur initiale, passer dans la circulation sanguine ou lymphatique par intravasation puis extravasation dans autre organe, formant ainsi des foyers tumoraux secondaires hépatiques.*

3) Étiologies connues du CHC :

Différentes étiologies sont rapportées, et varient énormément selon la région du monde considérée et les problèmes environnementaux qui y sont présents. Les CHC se développant principalement dans des contextes de maladie chronique du foie, les principaux facteurs de risque sont donc la consommation excessive d'alcool pouvant mener à l'apparition d'une cirrhose (étiologie majoritaire en France), les hépatites chroniques dues aux infections par les virus de l'hépatite B (Asie de l'Est et Afrique sub-saharienne) ou de l'hépatite C (Europe,

Japon et Amérique du Nord), la stéatose hépatique non-alcoolique (États-Unis principalement) ou d'autres étiologies plus anecdotiques telles que l'exposition répétée à l'aflatoxine B1, l'infection par le virus adéno-associé de type 2 (AAV2) ou l'hémochromatose. Les facteurs de risque principaux ne sont donc pas les mêmes entre les pays sous-développés ou en cours de développement et les pays industrialisés.

a) Consommation d'alcool : phénomène plutôt répandu dans les pays développés et notamment en Europe, une consommation excessive et régulière d'alcool mène à une inflammation chronique du foie et est la cause majeure d'apparition de la cirrhose hépatique. Lorsqu'un individu consomme de l'alcool, celui-ci est assimilé par le corps en passant en partie dans la circulation sanguine, se diffusant ainsi dans tous les organes. Son élimination se fait majoritairement dans le foie, grâce aux enzymes hépatiques qui métabolisent l'alcool en acétaldéhyde (*via* l'alcool déshydrogénase), puis en acétate (*via* l'acétaldéhyde déshydrogénase) et enfin en acétylcoenzyme A (coenzyme impliquée dans le cycle des nitrates, des acides gras et de la synthèse du cholestérol). L'acétaldéhyde est particulièrement toxique pour l'organisme, et peut provoquer de nombreux dégâts en attaquant les membranes des cellules et en inhibant la synthèse de certaines enzymes.

Lors d'une trop grande consommation, le taux d'alcool contenu dans le sang sera donc trop élevé pour que le foie puisse le métaboliser correctement, et l'acétaldéhyde produit en grande quantité et ne pouvant être éliminé suffisamment rapidement mènera à une perturbation de la fonction hépatique et à des dommages irréversibles aux hépatocytes, voir à leur destruction lorsque la surconsommation est répétée régulièrement. On peut voir alors apparaître des dépôts de graisses dans les hépatocytes (stéatose due à l'accumulation d'acides gras dans le foie) ainsi qu'une inflammation des tissus (hépatite alcoolique) suite à la réaction du système immunitaire et à la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules. Si l'inflammation persiste, elle peut mener à la mort des cellules par nécrose, et à l'apparition progressive de tissus cicatriciels dans le foie (fibrose) (Farazi et DePinho, 2006). C'est l'accumulation de ces différentes anomalies hépatiques qui conduit à la formation d'une cirrhose ; l'architecture hépatique est donc fortement dégradée et le foie ne peut alors plus assurer ses fonctions biologiques. En France, la consommation excessive d'alcool serait responsable de plus de 70% des CHC, selon une étude de l'observatoire national CHANGH en 2010. Cependant, les cirrhoses sont de mieux en mieux prises en charge, permettant une détection plus précoce de la pathologie. Le processus d'inflammation menant à l'hépatite peut aussi être provoqué par des facteurs autres que l'alcool ; on distingue donc hépatite alcoolique et hépatite virale, médicamenteuse ou encore auto-immune par exemple (contexte de prédisposition génétique aux maladies auto-immunes), qui peuvent elles aussi dégénérer en cirrhose.

b) Hépatite B : les hépatites virales, sont caractérisées par une inflammation du foie, suite à une infection par l'un des six virus de la famille des hépatites. Dans la plupart des cas, une hépatite aiguë se déclenche dans les 6 mois suivant l'infection par le Virus de l'Hépatite B (VHB), de façon symptomatique ou non, et 90% des personnes contaminées réussiront ensuite à se débarrasser du virus grâce aux défenses naturelles de leur organisme. Les personnes n'ayant pas réussi à éradiquer le virus resteront définitivement contaminées et développeront donc une hépatite B chronique.

Les infections chroniques à VHB sont le facteur de risque majoritaire des CHC (environ 40% des cas mondiaux), notamment en Asie de l'Est et en Afrique sub-saharienne (El-Serag, 2012). En effet, cette forme chronique de la maladie reste très souvent asymptomatique durant de nombreuses années, et peut évoluer en fibrose ou cirrhose puis en CHC lorsqu'elle n'est pas diagnostiquée à temps. De plus, le VHB étant un virus à ADN partiellement double brin (famille des Hepadnaviridae), son génome peut s'intégrer à celui des cellules infectées, et ainsi avoir un effet oncogénique direct sur le foie. Deux mécanismes distincts peuvent être mis en jeu : la mutagénèse insertionnelle, plus courante et qui va induire une instabilité chromosomique suite à l'intégration du virus près de gènes régulant la prolifération et la différenciation cellulaire (Sung *et al*, 2012 ; Ding *et al*, 2012) ; et l'expression des protéines virales telles que la protéine HBx qui serait capable d'activer des voies oncogéniques dans la cellule et d'inhiber certaines fonctions pro-suppresseur de tumeur (p53 ou voie apoptotique par exemple) (Amaddeo *et al*, 2015).

Heureusement, la vaccination obligatoire des enfants dans de nombreux pays a permis de réduire drastiquement le nombre d'infections à VHB (Chang *et al*, 2016), bien que de nombreuses régions du monde n'aient pas encore accès à la vaccination, en Asie et en Afrique notamment.

c) Hépatite C : il s'agit d'une hépatite virale au même titre que l'hépatite B, capable d'engendrer une atteinte chronique du foie avec des risques de graves complications. Là encore, une hépatite aiguë va se déclencher quelques semaines après l'infection, mais elle sera asymptomatique dans la plupart des cas et seulement 20% des personnes réussiront à éradiquer la maladie. Le virus s'installera alors définitivement dans les cellules du foie, engendrant une hépatite chronique, synonyme d'inflammation et bien souvent de développement d'une cirrhose par la suite (Yujin *et al*, 2014). On estime qu'un tiers des personnes contaminées ignorent qu'elles sont infectées. Les infections chroniques par le Virus de l'Hépatite C (VHC) sont le facteur de risque principal en Europe, en Amérique du Nord ainsi qu'au Japon (Akinyemiju *et al*, 2017), et la prévalence est d'environ 3% de la population mondiale. Il s'agit d'un virus à ARN de la famille des flaviviridae, qui peut agir dans le cytoplasme de sa cellule hôte au même titre qu'un ARN messager. Des traitements antiviraux à action directe (AAD) ont été développés récemment et permettent d'éradiquer le virus dans la majorité des cas, et donc de stopper le processus de dégradation de foie. Mais si ce dernier est déjà trop avancé (stade cirrhose ou CHC qui nécessitent une prise en charge spécifique), les AAD ne seront pas suffisants pour soigner le patient. C'est pourquoi il est important de promouvoir le dépistage et de débiter le traitement avant l'apparition de conséquences hépatiques. Cependant, le traitement de l'hépatite C par des AAD chez les malades chroniques semble réduire fortement le risque de développer un CHC par la suite (Fasiha *et al*, 2017).

d) Stéatose hépatique non-alcoolique : abrégée NASH pour « *Non Alcoholic Steato-Hepatitis* », c'est une des maladies chroniques du foie les plus répandues dans les pays occidentaux développés, et particulièrement aux Etats-Unis où elle concerne près de 30% de la population (Kulik et El-Serag, 2019). Elle est caractérisée par une accumulation excessive de graisses dans le foie, et donc par une stéatose non liée à la consommation d'alcool. La NASH est fortement associée à la présence d'un syndrome métabolique (obésité, hypertension artérielle, taux de glucose ou de lipides sanguins excessifs), le plus souvent engendré par une sédentarité et une alimentation particulièrement riche en sucre et en graisse. Elle peut aussi être parfois associée à un diabète de type II (Mazen et Rinella, 2015). La NASH peut à terme

progresser en fibrose voire en cirrhose, et mener à une insuffisance hépatique. Les patients atteints de NASH ont donc plus de chance de développer un CHC que la population globale (Siddarth *et al*, 2015).

e) Aflatoxine B1 : abrégée AFB1, il s'agit d'une mycotoxine retrouvée principalement dans les zones chaudes et humides, présentant un climat subtropical ou méditerranéen. Elle est produite par le champignon *Aspergillus Flavus*, et considérée comme l'une des substances naturelles les plus cancérogènes. Le champignon étant présent dans l'environnement, l'AFB1 va contaminer les champs, les élevages d'animaux et les zones de stockage des céréales (maïs, oléagineux et fruits à coque principalement), et être à terme ingéré par l'homme. Une fois métabolisée dans le foie, elle prend une forme active particulièrement mutagène, impliquée dans de nombreux processus de dommages à l'ADN. Une exposition alimentaire trop régulière à l'AFB1 peut donc provoquer des lésions hépatiques (Bressac *et al*, 1991) et l'apparition d'une hépatite dite toxique, menant à terme à l'apparition d'une fibrose voire d'une cirrhose.

f) Virus AAV2 : c'est un petit virus à ADN simple brin de la famille des virus adéno-associés, fréquemment retrouvé dans la population générale (35 à 80%), et considéré jusqu'à lors comme non-pathogène. Cependant, il a récemment été décrit par notre équipe comme étant associé au développement d'un type rare de CHC, survenant dans un contexte de foie sain et en l'absence d'autres facteurs de risque (Nault *et al*, 2015). Des insertions du génome du virus dans le génome humain, entraînant la surexpression d'oncogènes impliqués dans la carcinogénèse hépatique, ont été décrites dans environ 2% des cas de CHC (La Bella *et al*, 2020).

g) Hémochromatose : il s'agit d'une maladie génétique héréditaire, entraînant des lésions hépatiques pouvant dégénérer en cirrhose. Elle se caractérise par une absorption excessive du fer par l'intestin (due à la mutation du gène *HFE*), qui va alors s'accumuler et devenir toxique pour divers organes et notamment pour le foie (stress oxydant). Cette pathologie augmente fortement le risque de développer un CHC et doit donc donner lieu à une surveillance régulière (Fracanzani *et al*, 2001).

II- Mécanismes de carcinogénèse hépatique :

1) Structure normale du foie :

a) Description anatomique : le foie est le plus grand organe interne du corps, situé dans la cavité abdominale sous le diaphragme, et composé de 4 lobes divisés en segments et richement vascularisés. C'est un organe du système digestif qui est vital, et qui assure de nombreuses fonctions au sein de l'organisme telles que la production de la bile (qui participe au processus de digestion), la filtration du sang, le mécanisme de stockage du glucose, la production des protéines de la coagulation, et bien d'autres encore (Messina *et al*, 2020). Le foie est alimenté par la veine porte (sang provenant de l'œsophage, de l'estomac et des intestins) et l'artère hépatique (provenant du cœur), qui se séparent en deux branches pour irriguer l'ensemble des cellules hépatiques. Le sang est ensuite évacué par la veine hépatique, qui rejoindra la veine cave inférieure puis le cœur.

C'est un organe qui possède d'étonnantes capacités de régénération, puisqu'il est capable de fabriquer de nouvelles cellules et de régénérer un foie entier après l'excision de plus de la moitié du tissu hépatique (jusqu'à 2/3 du volume hépatique) (Michalopoulos et Bhushan, 2021). C'est le seul organe du corps humain à avoir cette capacité, ce qui permet d'envisager l'hépatectomie même lorsque la tumeur est déjà étendue, en respectant les contours anatomiques.

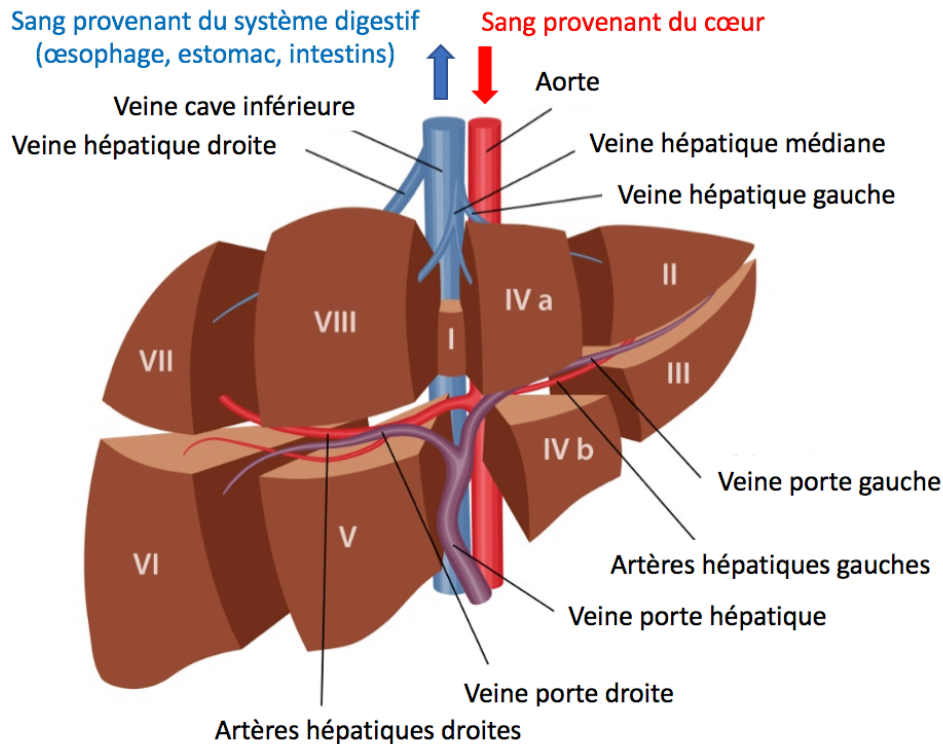


Figure 3 : Structure anatomique et vasculaire du foie. Représentation schématique des différents segments anatomiques hépatiques (8 segments distincts), ainsi que du sens de la circulation sanguine (rouge = sang chargé en oxygène dans les poumons, bleu = sang pauvre en oxygène après avoir alimenté les muscles et organes). Modifié d'après la source internet suivante : <https://centre.chl.lu/fr/dossier/chirurgie-du-foie>.

b) Types cellulaires et cancers associés : le foie se développe lors de la vie fœtale à partir de l'endoderme, en instaurant une organisation complexe qui met en jeu différents types de cellules hépatiques. Le type cellulaire majoritaire de cet organe est l'hépatocyte ; il s'agit d'une cellule de type épithéliale qui représente près de 80% du foie (Messina *et al*, 2020). C'est aussi dans ces cellules que les grandes fonctions métaboliques du foie sont assurées. Les hépatocytes s'organisent de manière bien spécifique en « travées » radiales, organisées en étoile autour d'une veine centrale, avec aux extrémités des branches les espaces portes qui englobent une veine porte, une artère hépatique et un canal biliaire. L'association de ces différents éléments constitue le lobule hépatique, qui est l'unité structurelle du foie (Lemaigre, 2012). A l'intérieur des lobules circulent les vaisseaux sanguins ainsi que les canaux qui drainent la bile. La présence de cellules progénitrices multipotentes (cellules « ovales »), qui sont des cellules embryonnaires précurseurs des hépatocytes et des

cholangiocytes et peuvent donc permettre la régénération du tissu hépatique, peut également subsister dans les structures différenciées.

La plupart des cancers primitifs se développent à partir des hépatocytes (hépatocarcinomes), puisque ce sont les cellules retrouvées en grande majorité dans le foie, mais des cancers plus rares peuvent se développer comme énoncé précédemment à partir des cholangiocytes qui tapissent les voies biliaires (cholangiocarcinomes) ou des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (angiocarcinomes, hémangioendothéliome épithélioïde).

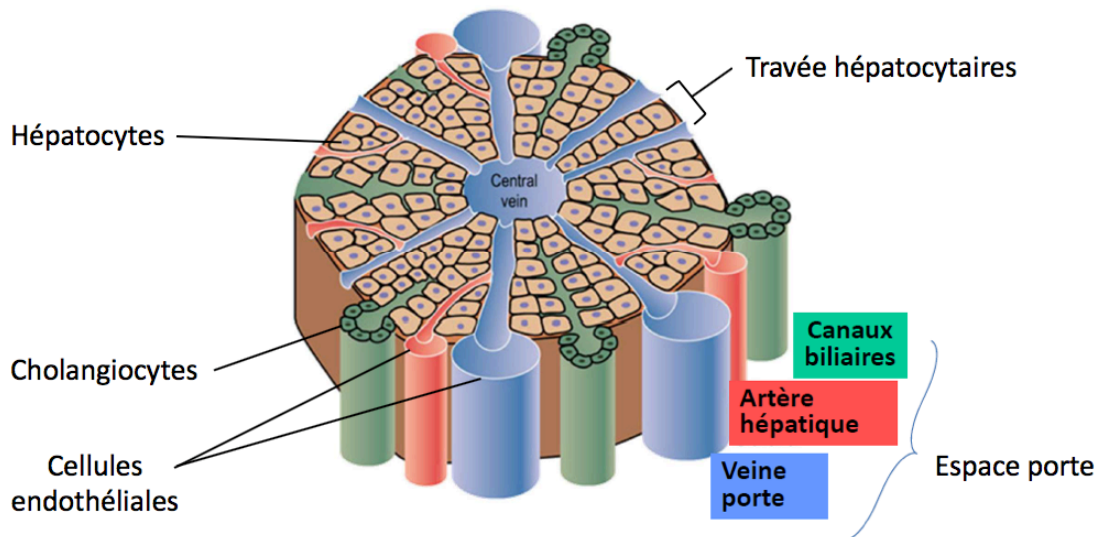


Figure 4 : Schéma structurel d'un lobule hépatique. *Le lobule hépatique, unité structurelle du foie, est constitué d'hépatocytes organisés en travées autour d'une veine centrale, de cholangiocytes tapissant les canaux biliaires, et de cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins. La structure triangulaire regroupant un canal biliaire, une artère hépatique et une veine porte est appelée « espace porte ».*

2) Développement du CHC sur foie sain :

Les cancers se développant sur un foie sain ne représente que 10 à 20% des CHC, et sont donc plus rares que ceux se développant sur cirrhose. La transformation maligne des cellules se fait en général suite aux infections virales chroniques par VHB, VHC ou encore AAV2, qui vont induire de forts dommages aux hépatocytes et peuvent s'insérer dans le génome des cellules en perturbant leur bon fonctionnement dans le cas des virus à ADN (réarrangements chromosomiques, insertions au niveau de sites préférentiels comme à proximité d'oncogènes qui vont être surexprimés et ainsi promouvoir la transformation tumorale). Certains sites d'insertions dans l'ADN des cellules sont communs à plusieurs virus (insertions à proximité des gènes *TERT*, *CCNA2*, *CCNE1* et *KMT2B* communes au VHB et à AAV2 par exemple (Péneau *et al*, 2021) ou plus spécifiques. Le VHC étant un virus à ARN, il n'est pas capable d'intégrer le génome de la cellule hôte, mais peut tout de même promouvoir la carcinogénèse par le biais d'altérations génétiques et épigénétiques médiées par la production de protéines virales oncogéniques (Lin, King, Chung, 2015).

Les adénomes hépatocellulaire (AHC), qui sont des tumeurs bénignes du foie dont le laboratoire a réalisé la classification moléculaire il y a quelques années (Nault *et al*, 2017), peuvent également dégénérer en CHC en l'absence de cirrhose. Les AHC sont des tumeurs assez rares, apparaissant principalement chez les jeunes femmes sous contraception orale (exposition hormonale récurrente), qui pourront évoluer de façon maligne dans environ 5% des cas (Bourne *et al*, 1979). L'exposition répétée aux œstrogènes ou aux androgènes contenus dans les contraceptifs oraux est donc un co-facteur de risque, de même que la consommation de tabac (Marrero *et al*, 2005) ou la co-infection avec le virus de Sida (VIH, virus d'immunodéficience humaine) (Ioannou *et al*, 2013), dans le cadre du développement d'un CHC sans passer par une étape de cirrhose, même si cela reste plus anecdotique.

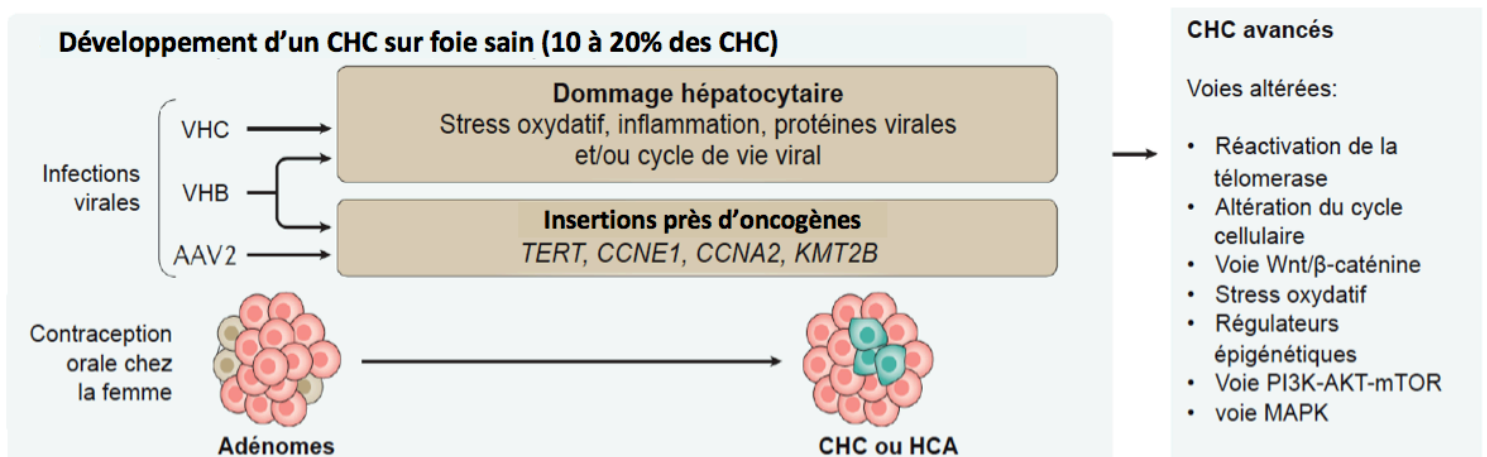


Figure 5 : Mécanisme de la carcinogénèse hépatique sur foie sain. Le CHC peut se développer sur un foie sain (c'est-à-dire non-cirrhotique) et concerne 10 à 20% des cas. Les infections virales au VHB, VHC ou AAV2 en sont majoritairement la cause suite à des dommages irréversibles aux hépatocytes ou à des insertions dans le génome des cellules près d'oncogènes. Les adénomes, tumeurs bénignes majoritairement due à la prise de contraceptifs oraux chez la femme, peuvent également dégénérer en CHC (Llovet *et al*, 2016).

3) Développement du CHC sur foie cirrhotique :

Près de 90% des CHC se développeront sur un foie présentant déjà un contexte de cirrhose, développé suite aux agressions répétées de l'organe engendrant des lésions hépatiques irréversibles dues à la présence récurrente d'inflammation (hépatites virales chroniques ou consommation excessive d'alcool dans la majorité des cas, NASH possible mais plus rarement). Les cellules endommagées vont alors proliférer de façon totalement anarchique et incontrôlée. Une nécrose des tissus peut également être constatée. L'infiltration de cellules immunitaires dans le tissu ainsi que la production de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules vont également participer à la formation d'un microenvironnement propice à la transformation maligne des cellules, les hépatocytes étant déjà fortement perturbés par les agressions, tant sur le plan structurel que métabolique.

Le développement d'un CHC dans ce contexte est un processus complexe qui nécessite plusieurs étapes, durant lesquelles les lésions tumorales vont se développer progressivement et gagner en malignité. L'apparition de nodules (lésions délimitées et sphériques au sein d'un

tissu, correspondant à une excroissance cellulaire bénigne ou maligne) cirrhotique précancéreux de bas grade (aussi appelés nodules dysplasiques de bas grade), évoluera ainsi en nodules dysplasiques de haut grade puis en CHC précoce, et à terme en CHC avancé (Llovet *et al*, 2016). Les nodules dysplasiques sont des lésions hépatiques d'au moins 1 mm de diamètre, retrouvés dans un foie cirrhotique. Un nodule de bas grade est considéré comme ayant une probabilité d'évolution en CHC incertaine (certains se résorbent d'ailleurs d'eux même), alors qu'un nodule de haut grade présente de fortes probabilités d'évolution en CHC. Les lésions tumorales sont histologiquement caractérisées par une invasion vasculaire et interstitielle plus ou moins avancée, ainsi que l'apparition d'anomalies cytonucléaires telles que la modification du rapport nucléaire/cytoplasmique (gros noyaux ou à l'inverse micronoyaux), la clarification du cytoplasme, la ballonnisation des cellules due à une modification de la perméabilité membranaire, ou l'augmentation du nombre de mitoses. Dans cette étude, les termes « nodules » ou « tumeurs » seront utilisés pour désigner les lésions constatées lors des analyses histologiques. En effet ce terme ne précise pas s'il s'agit d'une lésion bénigne ou maligne bien différenciée, la distinction étant très difficile à faire lors des analyses des modèles animaux.

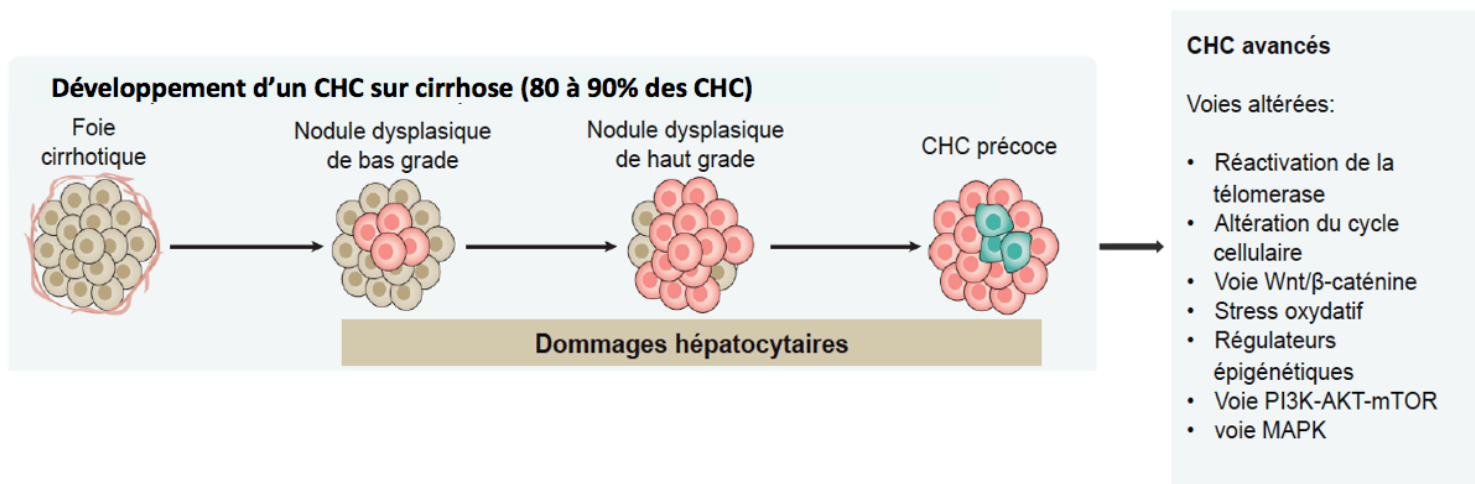


Figure 6 : Mécanisme de la carcinogénèse hépatique sur foie cirrhotique. *Le CHC se développe sur un foie cirrhotique et donc déjà fortement abimé dans 80 à 90% des cas. Une plage de cirrhose pourra progressivement se transformer en nodule dysplasique de bas grade puis de haut grade, formant à terme un CHC (Llovet *et al*, 2016).*

L'apparition d'un CHC résulte également, quel que soit le contexte du développement tumoral, de l'accumulation de mutations génétiques somatiques dans les cellules hépatiques, au niveau de gènes moteurs dans la carcinogénèse, dit gènes « driver ». L'émergence de mutations dans ces gènes va entraîner des conséquences fonctionnelles pouvant avoir un impact plus au moins prononcé sur le développement tumoral en fonction des gènes touchés. A l'inverse des gènes « driver », des mutations passagères peuvent aussi apparaître mais n'auront pas de conséquences directes sur le processus de carcinogénèse.

Les gènes « drivers » sont bien connus comme étant impliqués dans les mécanismes de carcinogénèse (Guichard *et al*, 2012 ; Schulze *et al*, 2015). Ces mutations vont promouvoir les processus de prolifération, invasion, survie cellulaire et échappement au système

immunitaire, voire même de dissémination de métastases et de résistance aux thérapies. On estime que chaque tumeur résulte en moyenne de l'accumulation d'une quarantaine d'évènements génétiques favorables au développement tumoral (surexpression d'oncogènes ou inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs), conférant ainsi aux différentes tumeurs des « cartes d'identité » qui leur sont propres. Ceci explique donc la complexité de ce type de tumeur, ainsi que la nécessité d'étudier le paysage génétique des CHC et de comprendre au mieux les conséquences de l'altération de voies de signalisation données. En effet plusieurs voies de signalisation cellulaire sont fréquemment mutées, et l'exploration génomique de différents panels de tumeurs ont permis d'établir une classification moléculaire des CHC, qui sera détaillée un peu plus loin. Les principales voies de signalisation dérégulées seront également présentées ci-après.

III- Perturbations génétiques oncogéniques ou oncosuppresseives :

Il est connu que les altérations génétiques ne s'accumulent pas au hasard, mais résultent de la coopération entre différentes voies de signalisation pour promouvoir le processus de carcinogénèse, bien que certaines de ces voies soient activées spécifiquement par l'un des facteurs de risque (Llovet *et al*, 2016). On retrouve donc des combinaisons d'altérations qui sont plus ou moins spécifiques d'un type particulier de CHC.

Les principales voies de signalisation qui vont être touchées sont au nombre de sept : les voies de maintenance des télomères, de contrôle du cycle cellulaire, des régulateurs épigénétiques, du stress oxydatif, ainsi que les voies Wnt/ β -caténine, Ras/MAPK et PI3K/AKT/mTOR (Schulze *et al*, 2015). Elles sont récapitulées, avec les gènes cibles principaux et les fréquences des mutations somatiques, dans le tableau 1. Les fréquences d'altérations des voies peuvent être parfois très hétérogènes, car elles dépendent des études considérées. Le pourcentage de mutation d'une voie est en effet très lié à l'étiologie des CHC étudiés, et varie donc selon l'origine géographique des études, ce qui explique les larges fourchettes de valeurs.

Tableau 1 : Principales voies de signalisation altérées dans le CHC et leurs gènes associés.

Ce tableau présente les sept voies de signalisation dans lesquelles on retrouve le plus fréquemment des mutations dans le cadre des CHC, ainsi que les principaux gènes associés et la fourchette de fréquence d'apparition de ces mutations somatiques (d'après Schulze et al, 2015).

Voies de signalisation	Gènes	Fréquences
Maintenance des télomères	Promoteur de <i>TERT</i> , <i>TERT</i>	30-60%
Contrôle du cycle cellulaire	<i>TP53</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>RB1</i> , <i>CCND1</i> , <i>CCNE1</i> , <i>ATM</i>	12-49%
Wnt/ β -caténine	<i>CTNNB1</i> , <i>AXIN1</i> , <i>ZNRF3</i> , <i>APC</i>	11-54%
Régulateurs épigénétiques	<i>ARID1A</i> , <i>ARID2</i> , Famille <i>MLL</i> (<i>KMT2A/B/C</i>)	4-32%
RAS-MAPK	<i>RPS6KA3</i> , <i>FGF19</i>	4-43%
PI3K-AKT-mTOR	<i>TSC1/2</i> , <i>PTEN</i>	3-51%
Stress oxydatif	<i>NFE2L2</i> , <i>KEAP1</i> , <i>CUL3</i>	3-12%

1) Maintenance des télomères :

Les télomères sont des structures nucléo-protéiques, présentent aux extrémités des chromosomes et jouant un rôle de protection, qui se raccourcissent en conditions physiologiques après chaque division cellulaire. Ce mécanisme permet ainsi de limiter la capacité de prolifération des cellules, grâce à l'arrêt du cycle cellulaire par sénescence répliquative lorsque les télomères deviennent trop courts. Mais certaines cellules échappent à ce mécanisme d'érosion naturelle des télomères grâce à une enzyme appelée télomérase, dont la sous-unité catalytique est codée par le gène *TERT*, capable de stabiliser voire même d'augmenter la taille des télomères. Cette enzyme, qui n'est plus active dans les cellules différenciées saines, peut se réactiver dans des conditions pathologiques. Ce mécanisme de maintenance des télomères est crucial et est très souvent perturbé dans le cadre du développement d'une tumeur, les cellules cancéreuses pouvant ainsi proliférer de façon non contrôlée suite à la perte de la régulation par la taille des télomères.

Dans le cadre du CHC mais aussi dans la majorité des cancers chez l'homme, c'est l'une des voies cellulaires les plus souvent altérées, avec des mutations retrouvées dans le promoteur du gène *TERT* jusqu'à 60% des cas de CHC (altération génétique la plus fréquente) (Zucman-Rossi *et al*, 2015). Ces mutations sont dues soit à des substitutions nucléotidiques au

niveau de « points chauds » (sites présentant une fréquence de mutations particulièrement élevée par rapport aux autres sites sur le gène considéré), qui induisent un changement de conformation de la région promotrice et modifient son activité, soit à des insertions virales directement dans le promoteur (hépatites (Zhao *et al*, 2016) ou AAV2 (Nault *et al*, 2015)). La méthylation du promoteur peut aussi jouer un rôle dans la régulation de l'expression de *TERT* (Devereux *et al*, 1999). Des amplifications ainsi que des translocations du gène *TERT* sont également décrites (Nault *et al*, 2019) dans environ 5% des cas de CHC. Ces différentes mutations induisent une surexpression de *TERT*, et de ce fait une réactivation de la télomérase, retrouvée dans 90% des CHC humain. Cela va grandement favoriser l'initiation de la carcinogénèse, en permettant le maintien de la taille des télomères et la prolifération incontrôlée des hépatocytes. C'est donc une voie qui est dérégulée de façon précoce dans le processus d'oncogenèse, et ce surtout sur un foie cirrhotique. Sur un foie sain, ce type de dérégulation est aussi fréquemment retrouvé mais apparait un peu plus tardivement au cours de la transformation maligne des cellules (Pilati *et al*, 2014). En conditions physiologiques, la télomérase n'est pas exprimée par les hépatocytes matures et sa réactivation entraine donc toujours un processus pathologique.

2) Contrôle du cycle cellulaire :

Les altérations du cycle cellulaire sont également très fréquentes dans les CHC, avec notamment des mutations dans les voies de signalisation p53 (gène *Tp53*) et du rétinoblastome (gène *Rb1*) (Nault *et al*, 2020).

La protéine p53 est considérée comme la « gardienne du génome » car elle est fortement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'induction de l'apoptose et dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Elle agit en effet à différents stades du cycle cellulaire au niveau des points de contrôle, afin d'assurer son bon déroulement. Elle possède une forte activité de suppresseur de tumeur en prévenant l'accumulation de mutations oncogéniques et en éliminant les cellules présentant des dommages à l'ADN, et des mutations inactivatrices au niveau de *Tp53* sont souvent retrouvées dans de nombreux cancers (Kasthuber, Lowe, 2017). En effet la perte de l'activité de la protéine p53 va avoir de nombreuses conséquences sur l'intégrité de la cellule, comme l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose et l'arrêt des mécanismes de réparation de l'ADN, ayant pour conséquence la prolifération de cellules « anormales », présentant un génome altéré et qui n'auraient donc pas pu se diviser dans des conditions physiologiques. Son rôle dans l'apoptose est largement décrit, mais p53 peut aussi induire les mécanismes de mort cellulaire par des voies non-apoptotiques telles que la sénescence, la nécrose ou la ferroptose dans certaines circonstances (Aubrey *et al*, 2018). P53 possède une activité de facteur de transcription pouvant initier la régulation de nombreux gènes cibles (environ 500 de manière directe et beaucoup plus de manière indirecte (Aubrey *et al*, 2018)), en se liant directement à l'ADN de façon séquence spécifique lorsqu'elle est sous forme tétramérique. Elle va donc favoriser par une interaction directe l'expression des gènes de contrôle de la prolifération et de réparation de l'ADN, en réponse à divers stimuli tels qu'un stress cellulaire, un stress répliatif ou oxydatif, ou encore des dommages génotoxiques. Des mutations du gène *Tp53* sont retrouvées dans près de 50% des tumeurs humaines tous types confondus, et dans autant des CHC (12 à 48% selon les études).

Le contrôle du cycle cellulaire peut aussi être dérégulé par d'autres moyens, comme des altérations du gène *Rb1* qui est lui aussi souvent muté (Ahn *et al*, 2014), le gène *CDKN2A*

codant plusieurs protéines impliquées dans le contrôle du cycle, ou encore les gènes codant pour les cyclines tels que *CCND1* ou *CCNE1* (Wang *et al*, 2013), qui sont également impliqués dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Le gène *CCNE1* est par exemple un des sites d'insertion récurrents du VHB (Allaire, Nault, 2017). On retrouve des mutations de *Rb1* dans 3 à 8% des CHC, et de *CDKN2A* dans 2 à 12 % des CHC. Les mutations de *Tp53* et de *Rb1* sont plutôt retrouvées dans les cas de CHC avancés et sont fréquemment mutés conjointement (Nault *et al*, 2020), confortant une forte implication de ces deux régulateurs clé du contrôle du cycle cellulaire dans le cadre des CHC. Les altérations de *Rb1* et *CDKN2A* sont associées à des tumeurs de mauvais pronostic, et sont associées à un phénotype agressif (Allaire, Nault, 2017).

3) Régulateurs épigénétiques :

L'épigénétique désigne toutes les modifications du génome, qui ne sont pas directement codées par la séquence ADN en elle-même : méthylation, condensation de la chromatine, etc. Elle permet donc une régulation réversible de l'activité des gènes, en facilitant ou au contraire en empêchant leur expression, selon le contexte considéré. Les régulateurs épigénétiques ainsi que les complexes de remodelage de la chromatine sont souvent altérés dans les CHC. Les principales mutations retrouvées dans les complexes de remodelage de la chromatine sont des mutations inactivatrices des gènes *ARID1A* et *ARID2* (gènes suppresseurs de tumeur) (Fujimoto *et al*, 2012), mais des mutations inactivatrices sont également décrites dans les gènes de la famille des MLL (pour « Mixed-Lineage Leukemia ») (Zuman-Rossi *et al*, 2015) qui codent pour des protéines impliquées dans la méthylation des histones. Bien que les dérégulations induites par ce type de mutations ne soient pas encore bien comprises, il existe un lien indéniable entre les altérations génétiques et les modifications épigénétiques dans les mécanismes de carcinogénèse hépatique, comme suggéré dans plusieurs articles de la littérature (Schulze *et al*, 2015 ; Zucman-Rossi *et al*, 2015 ; Fujimoto *et al*, 2012).

4) Stress oxydant :

Le stress oxydant, induit par divers polluants et toxiques environnementaux, correspond aux régulations cellulaires subséquentes au déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les capacités antioxydantes de la cellule. Les voies de signalisation impliquées dans la gestion de ce type d'agression cellulaire sont cruciales dans le développement des CHC puisqu'une exposition répétée au stress oxydant généré lors de l'inflammation hépatique (fibrose ou cirrhose alcoolique) va notamment favoriser la transformation maligne des hépatocytes. La voie de signalisation majoritairement altérée dans ce contexte est la voie NFR2/KEAP1 suite à des mutations activatrices de la protéine NFR2 (codée par le gène *NFE2L2*) (DeNicola *et al*, 2011), dont la surexpression est connue comme étant un évènement majeur de la progression tumorale dans le cadre des CHC. Des mutations inactivatrices de la protéine KEAP1 sont également rapportées, empêchant la dégradation de NFR2 par le protéasome, qui est induite en conditions physiologiques par le complexe d'ubiquitination KEAP1/CUL3. La voie NFR2/KEAP1 est connue comme étant impliquée dans la réponse des cellules au stress oxydatif en régulant les mécanismes antioxydants mis en jeu, et possède également des propriétés anti-tumorales. Une activation constitutive de cette voie, qui devient alors pro-tumorale, est fréquente dans le CHC mais

aussi dans de nombreux autres cancers, en promouvant la survie cellulaire malgré l'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène à l'intérieur des cellules. Lorsqu'elle est surexprimée, elle confère donc aux cellules une protection excessive au stress, évitant ainsi la mort cellulaire normalement programmée dans ces conditions (Guichard *et al*, 2012). Les mutations inactivatrices de p53 peuvent également avoir un effet oncogène dans ce contexte, en empêchant les mécanismes de mort cellulaire non-apoptotiques comme la ferroptose citée précédemment, ou en permettant la croissance des cellules en condition d'hypoxie suite à une diminution de la consommation en oxygène des cellules (Razungles *et al*, 2013 ; Albali, 2015).

5) Voie Wnt/ β -caténine :

C'est la voie de signalisation la plus souvent mutée dans le CHC derrière la voie de maintenance des télomères. Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques essentielles telles que la zonation métabolique du foie, le métabolisme des acides aminés, l'embryogenèse, la prolifération cellulaire ou encore les interactions entre cellules. Son activation aberrante peut avoir de nombreuses conséquences moléculaires.

Les deux principales altérations retrouvées dans cette voie sont des mutations activatrices du gène *Ctnnb1*, codant la protéine β -caténine, et des mutations inactivatrices du gène de l'*Axin1*, codant la protéine du même nom. Ces altérations majeures seront décrites de façon plus détaillée ci-dessous. Des mutations inactivatrices du gène *Apc* peuvent également être retrouvées dans cette voie mais sont beaucoup moins fréquentes (1 à 2% seulement). Les principaux acteurs de la voie sont présentés dans la figure 7 ci-dessous.

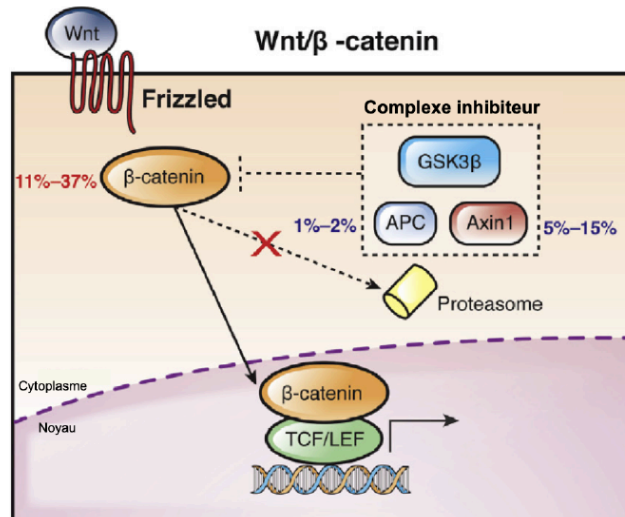


Figure 7 : Activation schématique de la voie Wnt/ β -caténine dans le CHC. Activation de la voie sous la stimulation du récepteur Frizzled par son ligand Wnt, ce qui entraîne l'arrêt de la dégradation de la β -caténine par le protéasome via l'inactivation du complexe inhibiteur, et permet la translocation nucléaire de la β -caténine où elle pourra interagir avec ses effecteurs (Zucman-Rossi, Villanuova, Nault, Llovet, 2015).

a) β -caténine : c'est la protéine clé de cette voie de signalisation. En l'absence de la stimulation du récepteur Frizzled par Wnt, lorsque la voie est inactive, la β -caténine est phosphorylée au sein du complexe protéique AXIN1/GSK3 β /APC, puis ubiquitinylée et

adressée au protéasome pour être dégradée (Hart, Polakis, 1998). En revanche, l'activation de la voie (physiologique ou pathologique) va bloquer la dégradation de la β -caténine, entraînant ainsi son accumulation dans le cytoplasme de la cellule, puis sa translocation au compartiment nucléaire où elle va pouvoir interagir avec différents facteurs de transcription. Elle pourra alors moduler leur activité et modifier l'expression de nombreux gènes cibles. Des mutations activatrices du gène *Cttnb1* sont retrouvées dans 11 à 37% (Zucman-Rossi *et al*, 2015) des CHC selon les séries, avec pour conséquence une activation constitutive de la β -caténine, et donc une surexpression des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine. Cette activation aberrante est retrouvée dans de nombreux cancers, et peut être visualisée histologiquement grâce à l'immunodétection de la Glutamine Synthétase (GS), qui est un bon marqueur de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans le foie. On peut également détecter l'activation de la β -caténine en s'intéressant aux niveaux d'expression des ARN messagers de certains de ses gènes cibles, comme *GLUL* (qui code pour la GS) ou *LGR5*. La GS est un marqueur particulièrement important car elle fait partie des caractéristiques majeures ayant permis la classification des CHC en sous-groupes selon leur profil transcriptomique.

b) AXIN1 : cette protéine, nommée AXIN1 pour « *Axis Inhibition protein 1* », a tout d'abord été découverte lors de travaux de caractérisation du locus murin *Fused*, impliqué dans les mécanismes de l'embryogénèse (Zeng *et al*, 1997). Elle fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine, avec les protéines APC et GSK3 β (Hart, Polakis, 1998). Son inactivation va, au même titre que celle d'APC, conduire à la perte du complexe de dégradation de la β -caténine, entraînant la stabilisation de cette dernière. C'est donc un fort régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine (Kikuchi, 1999). Le gène de *Axin1* est retrouvé muté dans environ 10% des CHC, de façon bi-allélique dans la majorité des cas (Abitbol *et al*, 2018). Cette protéine cytoplasmique possède un rôle de suppresseur de tumeur ; elle est impliquée dans la voie Wnt principalement, mais interagit aussi avec les acteurs d'autres voies de signalisation telles que la voie JNK impliquée elle aussi dans l'embryogénèse (Luo *et al*, 2003). L'AXIN1 régule donc plusieurs processus physiologiques parmi lesquels on peut citer les réarrangements du cytosquelette et le devenir des cellules dans l'embryogénèse, mais aussi la prolifération, l'invasion et la migration comme récemment démontré dans le CHC (Qin *et al*, 2020).

6) Voie Ras/MAPK :

La voie Ras/MAPK (pour « *Mitogen Activated Protein Kinase* ») est elle aussi fréquemment altérée dans le cadre du CHC. Elle régule la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, mais aussi la migration des cellules et l'angiogénèse. On la retrouve activée de façon aberrante dans de nombreux cancers (Schubbert *et al*, 2007). Elle est activée physiologiquement par le biais d'un récepteur membranaire sensible aux facteurs de croissance (EGFR par exemple) ou aux cytokines environnementales, et de façon pathologique par la survenue de mutations somatiques dans des oncogènes comme RAS ou RAF. Les récepteurs impliqués possèdent une activité enzymatique particulière, appelée « activité tyrosine kinase », qui leur permet de phosphoryler des résidus tyrosine. Ces récepteurs ont également la capacité de s'autophosphoryler, entraînant ainsi une cascade complexe de phosphorylation de protéines kinases cytoplasmiques, qui aboutit généralement à la modulation de divers facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription vont permettre l'expression de gènes cibles impliqués dans des processus clés de la carcinogénèse tels que la

prolifération, l'invasion, la survie, la migration cellulaire et l'angiogenèse. C'est une voie fréquemment activée dans le CHC, qui peut être dérégulée par de nombreux mécanismes (Delire, Starkel, 2015).

Dans le CHC, on retrouve dans 7 à 9% des cas des mutations du gène *Rps6ka3* (Guichard *et al*, 2012 ; Schulze *et al*, 2015), potentiel gène suppresseur de tumeur impliqué dans la voie Ras/MAPK et qui code la protéine RSK2. Son rôle dans la carcinogénèse hépatique est encore mal connu, mais il s'agit d'une cible intéressante. Ces caractéristiques sont détaillées ci-après, de façon à introduire notre intérêt pour cette protéine dans l'étude.

RSK2 : le gène *Rps6ka3*, localisé sur le chromosome X en position p22.12, code pour une sérine/thréonine kinase de 90 kDa (744 acides aminés) nommée RSK2 pour « Ribosomal S6 Kinase 2 », qui comporte 2 domaines kinase indépendants possédant tous deux une activité distincte et leur propre site de liaison à l'ATP, séparés par une région liante hydrophobe d'une centaine d'acides aminés (Nguyen *et al*, 2006) (localisation chromosomique du gène et structure linéaire de la protéine schématisés dans la figure 8). Le domaine kinase C-terminal régule l'activité du domaine N-terminal par le biais de la phosphorylation de la région liante hydrophobe lors du repli de la protéine fonctionnelle. L'activation initiale du domaine C-terminal se fait suite à l'interaction avec ERK1/2 suite à l'activation de la voie Ras/MAPK, entraînant à son tour une phosphorylation du domaine N-terminal (Nguyen *et al*, 2006). D'autres substrats tels que PDK1, une kinase intervenant dans la voie de signalisation PI3K/Akt/mTor présentée plus loin dans le mémoire, peuvent également phosphoryler le domaine kinase N-terminal de RSK2 (Frödin *et al*, 2000).

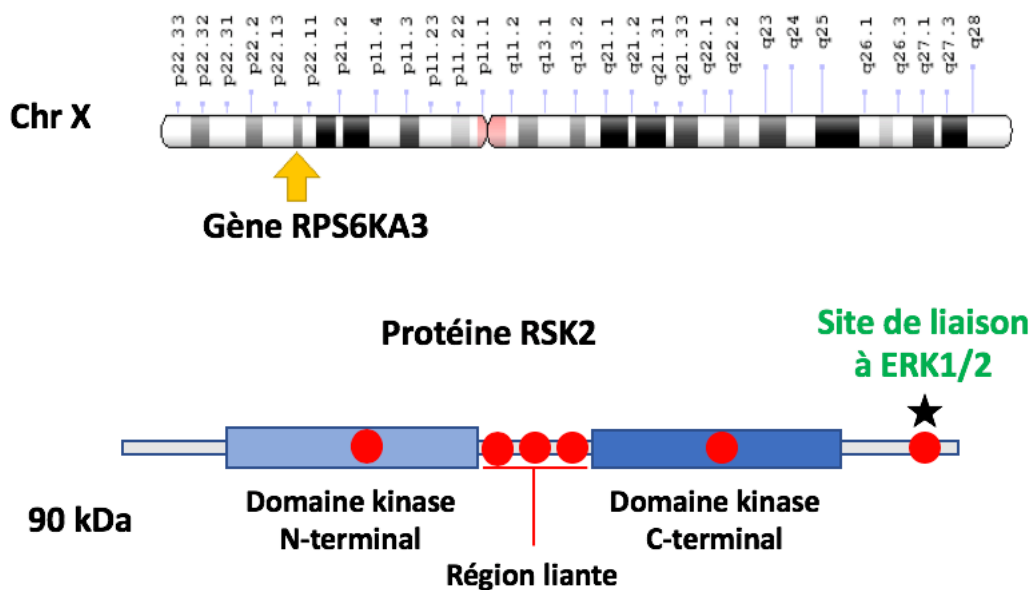


Figure 8 : Localisation chromosomique du gène *Rps6ka3* et structure simplifiée linéaire de la protéine RSK2. Le gène *Rps6ka3* se situe en position p22.12 sur le chromosome X, et code pour la protéine RSK2 de 90 kDa. Elle possède deux domaines kinase distincts (N- et C-terminaux), une région liante entre les deux, et un site de liaison à ERK1/2 en position C-terminale. Les sites de phosphorylation de la protéine sont schématisés par des points rouges, en position S221, T365, S369, S386, T577 et S737.

La protéine RSK2 fait partie de la famille des kinases S6 ribosomales (famille comportant 4 membres nommés RSK1 à RSK4, codés par des gènes indépendants et possédant des fonctions physiologiques distinctes (Schneider *et al*, 2011)), et se situe en aval de la voie Ras/MAPK, où elle peut être activée par phosphorylation par ERK1/2 en réponse à la présence de facteurs de croissance ou à des neurotransmetteurs (Roux *et al*, 2003). L'insuline notamment peut activer la cascade de phosphorylation et activer RSK2 (Sturgill *et al*, 1988 ; Marette *et al*, 2013). Sa forme active peut alors à son tour phosphoryler de multiples substrats dans le cytoplasme ou dans le noyau (voir figure 9 ci-après), participant ainsi à la régulation de nombreuses fonctions (prolifération, différenciation, mort ou survie cellulaire). La protéine RSK2 exerce notamment un contrôle sur certaines des voies de signalisation fréquemment impliquées dans les processus oncogéniques, telles que la voie impliquant p53 (Cho *et al*, 2005 ; Lim *et al*, 2013) et la voie PI3K/AKT/mTOR (Carriere *et al*, 2008), en plus de la voie Ras/MAPK dans laquelle elle est directement impliquée. Plusieurs études ont démontré que RSK2 pouvait inhiber la voie Ras/MAPK par le biais d'un rétrocontrôle négatif de la protéine SOS (Douville, Downward, 1997 ; Schneider *et al*, 2011), et que sa perte de fonction conduisait donc à une activation constitutive de cette voie. De précédents résultats obtenus au laboratoire ont d'ailleurs démontré que l'inactivation du gène *Rps6ka3* dans des cellules hépatiques par le biais de petits ARN interférents, conduisait à l'augmentation de la phosphorylation de ERK (Schulze *et al*, 2015).

Les premières mutations inactivatrices germinales du gène *Rps6ka3*, entraînant la perte de fonction de la protéine le plus souvent dû à un arrêt prématuré de la traduction du gène (mutations tronquantes dans 62% des cas), ont été décrites dans le syndrome de Coffin-Lowry (CLS), une pathologie caractérisée par un retard mental, des anomalies de croissance et des malformations au niveau du squelette (Trivier *et al*, 1996 ; Pereira *et al*, 2010). Il s'agit d'une maladie mentale rare, touchant principalement les hommes, et entraînant un sévère retard psychomoteur. Il arrive que des femmes soient touchées mais elles sont moins affectées, rendant le diagnostic de la pathologie plus compliqué. Les mutations du gène *Rps6ka3* retrouvées dans le cadre du CLS sont hétérogènes, mais conduisent le plus souvent à des formes tronquées de la protéine RSK2 (Delaunoy *et al*, 2001). Dans tous les cas de mutation, une diminution de l'activité du domaine kinase traduit a été constaté. Dans le CHC, des mutations inactivatrices somatiques du gène ont été mises en évidence pour la première fois par notre équipe en 2012 (concernent 9,6% des cas analysés), et sont également décrites comme tronquantes ou situées à proximité des sites de phosphorylation de la protéine (Guichard *et al*, 2012), entraînant dans les deux cas la production d'une protéine RSK2 inactivée.

Les autres membres de la famille des kinases S6 ribosomales possèdent des structures très similaires à celle de RSK2 (73% d'homologie, Carriere *et al*, 2008) (structures linéaires présentées en annexe 1), mais présentent chacun des caractéristiques fonctionnelles propres. Leur expression semble être ubiquitaire excepté pour RSK4 (localisation cytoplasmique mais aussi nucléaire pour RSK1 à 3, cytoplasmique uniquement pour RSK4). RSK1, dont l'inactivation est également impliquée dans le syndrome de Coffin-Lowry, régule les mêmes processus que RSK2 et semble également être impliqué dans les mécanismes de carcinogénèse. RSK3 et RSK4 pourraient également jouer un rôle mais possèdent des fonctions biologiques plus éloignées de celles de RSK2 (Houles, Roux, 2018). RSK3 est retrouvé comme étant impliqué dans certaines pathologies cardiaques (Martinez *et al*, 2015), alors que

RSK4 est plutôt impliqué dans les mécanismes du développement embryonnaire (Romeo, Zhang, Roux, 2012). La régulation le concernant semble cependant moins bien connue que pour les autres membres de la famille. Tous semblent cependant jouer un rôle dans le développement de certains types de cancers.

Le rôle de RSK2 dans la carcinogénèse hépatique a été peu étudié jusqu'à maintenant, il est donc mal connu mais semble jouer un rôle, que nous essayerons de déterminer dans cette étude, dans le développement de certains CHC. Quoiqu'il en soit, cette protéine possède de multiples rôles dans le développement des cancers chez l'homme, puisqu'elle est capable de phosphoryler de nombreuses cibles impliquées dans divers processus. Dans le cytoplasme de la cellule, on peut notamment citer parmi ces substrats les protéines de l'apoptose telles que GSK3 β (Lee *et al*, 2013), caspase-8 (Peng *et al*, 2011) et BAD (She *et al*, 2002) qui sont inactivées par RSK2, et certaines protéines de la réponse inflammatoire comme NF κ B et (Stevenson *et al*, 1999). Sous sa forme active, RSK2 est capable de se transloquer dans le noyau, où elle pourra cibler des protéines nucléaires telles que les histones H3, H2B et H2AX, impliquées dans le remodelage chromatinien *via* l'activation de p53 (Cho *et al*, 2005), ou encore des facteurs de transcription comme ATF1/ATF4, CREB et c-FOS qui sont impliqués dans les voies de survie et de contrôle du cycle cellulaire.

Ces diverses activités, récapitulées de manière schématique dans la figure 9, décrivent RSK2 plutôt comme un oncogène de manière générale, mais dans le CHC, de façon surprenante, les mutations inactivatrices mises en évidence suggèrent plutôt un rôle de suppresseur de tumeurs.

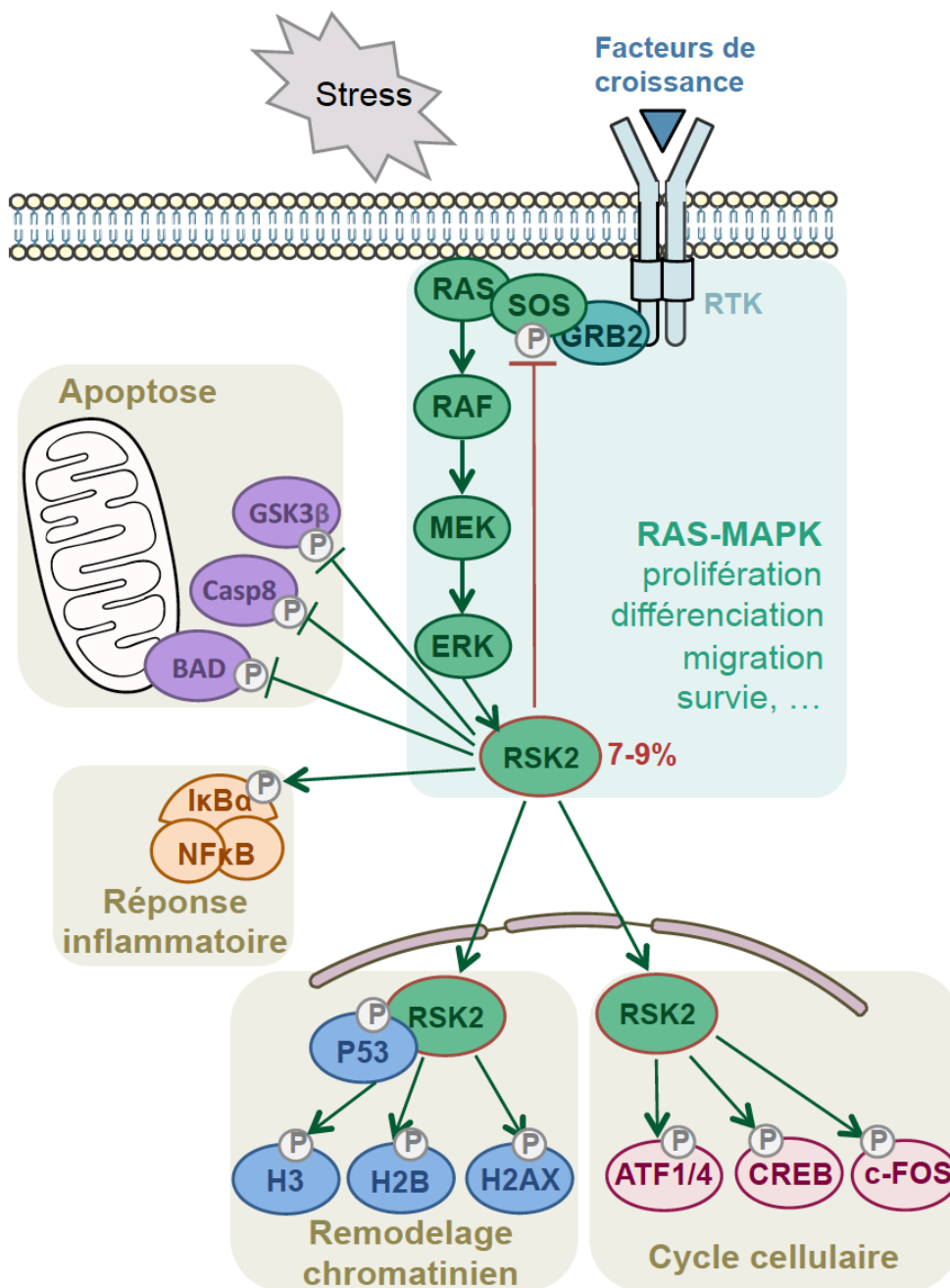


Figure 9 : Activités et substrats de la protéine RSK2 au sein de la voie Ras/MAPK. Sous l'effet de la stimulation du récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) par un stress ou un facteur de croissance, la cascade de signalisation de la voie Ras/MAPK se déclenche et active RSK2 grâce à sa phosphorylation par ERK1/2, entraînant ainsi la régulation de divers substrats impliqués dans les mécanismes de l'apoptose, de la réponse inflammatoire, du remodelage chromatinien et du cycle cellulaire (d'après Romeo et al, 2012).

7) Voie PI3K/AKT/mTOR :

C'est une voie de signalisation intracellulaire mettant en jeu plusieurs kinases qui pourront être activées en cascade, de façon similaire à la voie Ras/MAPK. Elle est impliquée dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire, mais aussi dans les processus du métabolisme et de l'angiogenèse. Elle est activée par la fixation de ligands spécifiques sur les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, ce qui va permettre l'activation en cascade des différents effecteurs de la voie, jusqu'à la transduction du signal dans le noyau. Elle est, avec la voie Ras/MAPK, l'une des voies de signalisation les mieux connues et les mieux décrites à l'heure actuelle, mais son rôle précis dans la carcinogénèse hépatique n'est pas encore bien connu.

Des dérégulations de protéines impliquées dans cette voie ont été mises en évidence dans de nombreux cancers. Dans le CHC, on retrouve en particulier des altérations inactivatrices des gènes *PTEN* et *TSC1* ou *TSC2* (Totoki *et al*, 2014), bien que cela reste assez rare. Ces mutations vont entraîner l'inhibition du contrôle de la voie par le complexe mTOR (mTOR est une protéine cruciale pour le maintien de l'homéostasie et l'angiogénèse) (Villanueva *et al*, 2008), entraînant ainsi une surexpression de la voie et une dérégulation de l'équilibre entre survie et mort cellulaire.

IV- Classification des CHC :

1) Classification clinique :

Il existe plusieurs classifications cliniques des CHC, dont la classification BCLC pour « Barcelona Clinic Liver Cancer » qui est l'une des plus utilisées. Dans cette classification, on distingue 5 stades qui répartissent les CHC selon leurs caractéristiques en stade 0, A (CHC très précoces et précoces), B, C et D (CHC intermédiaires, avancés puis très avancés) (Llovet *et al*, 1999). Le stade 0 (très précoce) concerne un nodule unique, présentant une taille inférieure à 2 cm. Le stade A (précoce) peut concerner une tumeur unique de moins de 5 cm, ou jusqu'à 3 tumeurs mais toutes de taille inférieure à 3 cm. Le stade B (intermédiaire) est considéré lorsque plus de 3 nodules ont été développés dans le foie, ou si l'un des nodules mesure plus de 5 cm. Ces différents stades sont asymptomatiques. Le stade C (stade avancé), se caractérise par une invasion vasculaire du foie, ce qui n'était pas le cas dans les stades précédents, ainsi que l'apparition de symptômes chez le patient (tels qu'une perte de poids et d'appétit importantes, des nausées et des douleurs abdominales) et l'échappement possible mais pas systématique de métastases hors de l'organe initial. Enfin, le stade D correspond au stade terminal, lorsque le cancer a totalement envahi les gros vaisseaux sanguins du foie et s'est également propagé à d'autres organes.

D'autres classifications cliniques existent, comme le score de Child-Pugh qui évalue la sévérité de l'atteinte hépatique en étudiant 5 paramètres spécifiques, le score de MELD (abréviation de « Model for End stage Liver Disease », score pronostic calculé par une transformation logarithmique à partir de trois paramètres biochimiques) ou encore le score AFP (abréviation de « Alpha-Foetoprotéine », score tenant du nombre et de la taille de nodules couplé au taux d'AFP dans le sang du patient), mais ces derniers ne seront pas détaillés ici. Le grade de différenciation de la tumeur est également un bon indicateur de

sévérité, les CHC les moins différenciés étant les plus agressifs. Tous ces indicateurs seront utilisés par le clinicien afin de déterminer quelle stratégie thérapeutique pourra être proposée au patient, en fonction de son profil pathologique.

2) Classification moléculaire :

La première classification moléculaire des CHC remonte à 2004, avec l'identification de deux groupes distincts : le groupe A qui correspond aux CHC prolifératifs et de mauvais pronostic ; et le groupe B qui correspond aux CHC non-prolifératifs (Lee *et al*, 2004). Plusieurs classifications moléculaires plus détaillées ont ensuite été proposées quelques années plus tard, grâce au développement de la génomique et des analyses transcriptomiques. Les deux classifications les plus utilisées sont détaillées ci-dessous. Une revue récente publiée par notre équipe fait la synthèse des différentes classifications disponibles, avec les caractéristiques pathologiques, immunohistochimiques, génétiques, épigénétiques et immunologiques associées (Rebouissou, Nault, 2020).

a) Classification de Boyault en 2007 : cette classification, réalisée par notre laboratoire, est la référence en termes de classification des CHC à l'international. Elle répartie les tumeurs en 6 sous-groupes notés G1 à G6, en fonction de caractéristiques moléculaires et transcriptomiques bien définies (Boyault *et al*, 2007). Des critères tels que l'instabilité génomique de la tumeur, une infection virale sous-jacente, le taux de production d'AFP, les mutations de régulateurs clés (protéines p53, AXIN1, β -caténine) ou de voies de signalisation particulières (voies Wnt, AKT, PI3K) sont pris en compte, de façon à créer un « profil-type » pour chacun des groupes. Ainsi, l'analyse moléculaire d'un CHC nouvellement découvert chez un patient, peut permettre de classer la tumeur et de prédire sa réponse aux traitements ainsi que le pronostic de survie. Les différentes classifications décrites dans la littérature sont complémentaires ; ainsi, le groupe A prolifératif correspond aux groupes G1, G2 et G3 de notre classification, et le groupe B non-prolifératif aux groupes G4, G5 et G6. Notre classification a ensuite été étoffée en 2017 suite à d'autres travaux de l'équipe, par l'ajout de caractéristiques histologiques et immunohistochimiques spécifiques à un ou plusieurs des sous-groupes (Calderaro *et al*, 2017), présentés dans la figure 10.

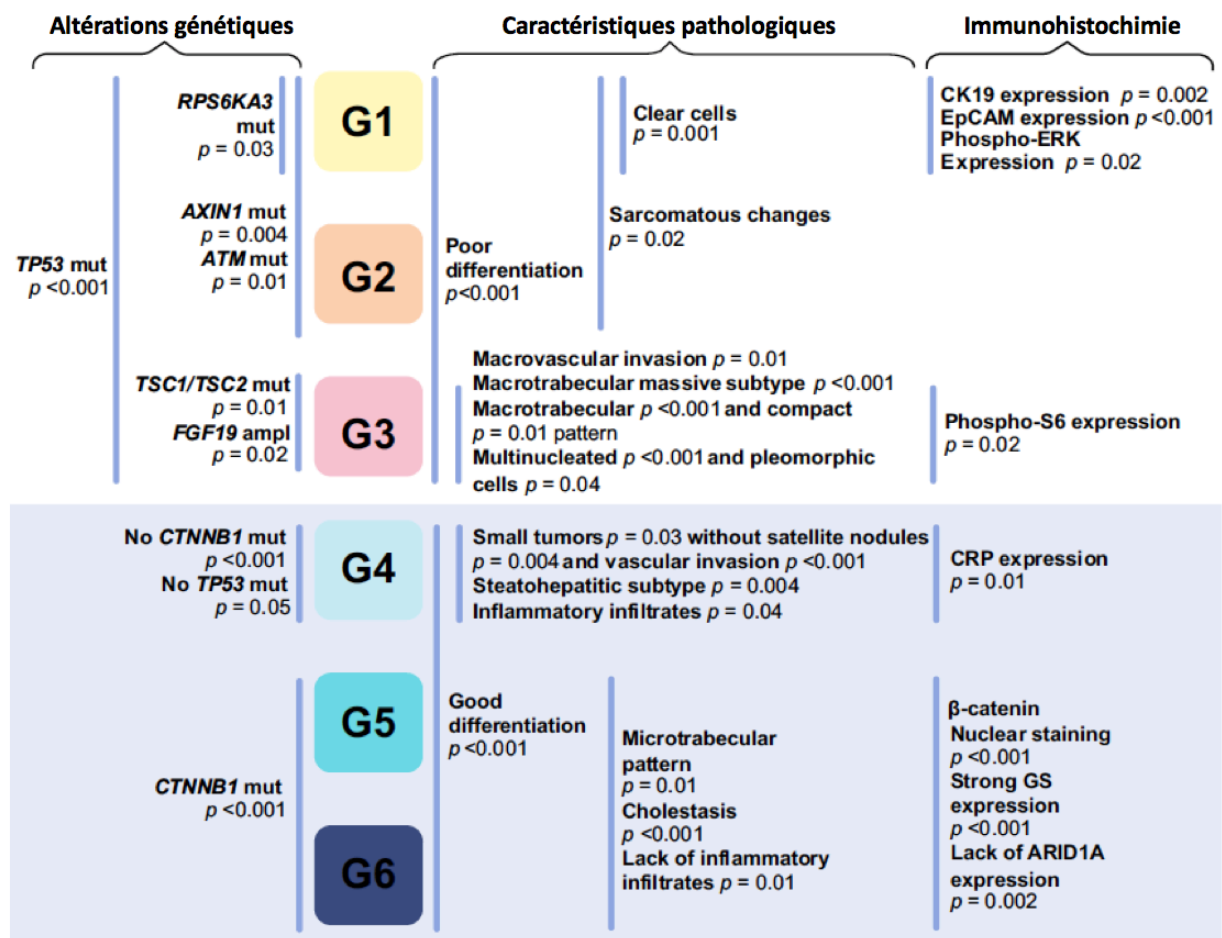


Figure 10 : Classification de Boyault des CHC. Selon cette étude, les CHC peuvent être classés en 6 groupes en fonction des altérations génétiques retrouvées et des observations histopathologiques et immunohistochimiques réalisées. Les p-value présentées ont été obtenues en réalisant le test exact de Fisher, basé sur la variable génétique ou clinique à analyser. La corrélation est significative si $p < 0,05$ (Boyault et al, 2007).

b) Classification de Hoshida en 2009 : cette seconde classification sépare les CHC en trois groupes notés S1 à S3, en fonction de caractéristiques cliniques et moléculaires (Hoshida et al, 2009). Ainsi, la taille des tumeurs par exemple, ainsi que les observations histologiques comme le taux de différenciation cellulaire ou le phénotype invasif sont prises en compte, en parallèle des observations moléculaire. Au niveau moléculaire, on retrouve à nouveau la dérégulation de voies de signalisation majeures comme précédemment (voies Wnt, voie AKT), des mutations activatrices de la β -caténine, le dosage de l'AFP... ces caractéristiques similaires à plusieurs classifications montrent bien leur importance dans le développement du CHC et le phénotype qui en découle.

V- Traitements du CHC :

Il existe différents traitements possibles, qui seront proposés au patient en fonction du stade de la maladie et de l'étendue des lésions hépatiques. Les principaux facteurs qui seront pris en compte sont l'extension tumorale, qui regroupe le nombre ainsi que la taille des

nodules hépatiques, la conservation ou non de la fonction hépatique, et le stade de la tumeur grâce à la classification BCLC précédemment décrite, qui est largement utilisée et associée à chaque stade un traitement recommandé.

1) Techniques chirurgicales :

Ce sont des techniques invasives, réalisées sous anesthésie générale et qui nécessitent plusieurs jours d'hospitalisation du patient, ainsi qu'une surveillance post-opératoire accrue en service de soins intensifs. En effet les risques de complications sont nombreux, et un contrôle attentif est donc nécessaire dans les jours suivant l'opération.

a) Ablation partielle du foie : l'ablation partielle hépatique, aussi appelée hépatectomie ou résection hépatique, concerne les patients au stade 0 ou A (donc CHC précoce voir très précoce, une seule lésion peu étendue, pas d'atteinte de la fonction hépatique). Elle consiste en l'ablation d'un ou plusieurs segments définis du foie dans la majorité des cas, mais peut aussi ne pas suivre les segments anatomiques si la lésion chevauche plusieurs segments et nécessite une résection dite « atypique ». Il s'agit également du traitement de référence des tumeurs bénignes et des métastases hépatiques (si métastase unique). Dans le cadre de l'ablation d'un CHC précoce, le taux de survie suite à cette intervention invasive est plutôt bon puisqu'il est de plus de 60% à 5 ans, mais de forts risques de récurrence sont à prendre en compte (50 à 70% toujours à 5 ans) (Mehrabi *et al*, 2019).

b) Transplantation hépatique : la greffe de foie ou transplantation hépatique, sera précédée d'une ablation totale de l'organe, et concerne les patients stade A (faible charge tumorale, mais impossibilité de réséquer correctement le ou les nodules). Il s'agit du traitement de première ligne pour les CHC peu étendus non-opérables (critères de Milan : un seul nodule de moins de 5 cm de diamètre, ou jusqu'à 3 nodules de diamètre inférieur à 3 cm), surtout si le foie présente une pathologie sous-jacente comme une cirrhose. En effet cette technique présente l'avantage de traiter la tumeur mais également la pathologie chronique associée. Elle est en revanche contre-indiquée en cas d'invasion veineuse ou de diffusion extra-hépatique de la tumeur, du fait d'un risque de récurrence particulièrement élevé. Les critères de Milan précédemment cités, qui sont plutôt restrictifs, peuvent être élargis à d'autres caractéristiques spécifiques si le patient présente de bonnes chances de survie sans récurrence (évaluation au cas par cas par le clinicien). Le nombre de greffons disponibles chaque année étant limité, les critères d'attribution sont donc spécifiques. La durée d'attente pour un greffon hépatique en France est de 15 mois en moyenne. Pendant la phase d'attente, un traitement du CHC peut être proposé au patient mais dépendra de plusieurs critères comme la localisation et nombre de tumeurs, l'atteinte de la fonction hépatique en cas de cirrhose et son degré de sévérité, et l'éventuelle hypertension portale sous-jacente. La transplantation est en générale associée à une bonne survie, bien qu'elle nécessite la prise de médicaments antirejet à vie (exemples : cortisone, ciclosporine, acide mycophénolique...) afin d'empêcher le corps de rejeter le greffon qui est considéré comme un corps étranger. On estime à 70% la survie à 5 ans des personnes ayant reçu une transplantation hépatique, avec un taux de récurrence inférieur à 10% (Clavien *et al*, 2012).

2) Destruction tumorale percutanée :

La technique de destruction tumorale percutanée, aussi appelée ablation par radiofréquence, est recommandée pour les patients au stade 0 ou A qui ne sont pas candidats à la chirurgie, et peut également être proposée dans certains cas aux patients en attente de transplantation hépatique. Il s'agit d'une alternative à la chirurgie relativement simple et plutôt bien tolérée par les patients, moins invasive et qui présente peu de complications post-opératoires. Une anesthésie générale est nécessaire et implique de passer une nuit de surveillance en clinique, mais aucune hospitalisation supplémentaire n'est obligatoire suite à l'intervention et le patient peut rentrer chez lui dès le lendemain. La technique de radiofréquence est réalisée directement à travers la peau, et donc sans nécessité d'ouverture chirurgicale de l'abdomen. Elle sera guidée tout au long de l'intervention par l'imagerie médicale (échographie généralement), et a pour principe la destruction de la tumeur par la chaleur. Un courant électrique alternatif va en effet être généré *via* l'insertion d'une sonde au niveau du foie, et induire une température intra-tumorale suffisamment élevée pour engendrer la destruction des cellules tumorales par nécrose, dans un périmètre de quelques centimètres de diamètre seulement (Cucchetti *et al*, 2013). Ainsi, les cellules hépatiques saines situées en dehors de ce périmètre seront épargnées.

Cette méthode a montré de nombreux bénéfices similaires à ceux d'une résection, mais est beaucoup moins lourde qu'une chirurgie, même si plusieurs séances sont parfois nécessaires pour nécroser la totalité de la tumeur. On obtient 96% de survie sur 2 ans sans récurrence, dans le cas de lésions inférieures à 3 cm (Cioni *et al*, 2001). C'est donc devenu un traitement incontournable dans la prise en charge des CHC mais aussi des métastases hépatiques, qui peut être considéré seul, en complément de la chirurgie, ou en association avec la chimiothérapie, selon la taille des lésions et le contexte de la maladie.

3) Traitements par chimiothérapie :

Les CHC diagnostiqués aux stades intermédiaires et avancés (BCLC B et C) sont obligatoirement traités par l'administration de molécules cytotoxiques, suivie ou non d'une embolisation de la tumeur. Selon le stade et la réponse de la tumeur, différents médicaments ciblant des mécanismes spécifiques peuvent être utilisés. Les CHC sont relativement résistants aux chimiothérapies traditionnelles telles que le cisplatine ou le fluorouracile, avec lesquelles on obtient un bénéfice très modeste, et sont bien souvent diagnostiqués à des stades avancés. C'est pourquoi les traitements curatifs chirurgicaux tels que la résection ne peuvent pas toujours être proposés. De plus, il arrive que les patients ayant subi une résection et/ou une ablation par radiofréquence, finissent par récidiver ; les traitements chimiques sont alors la seule option pour combattre la maladie. Dans le cas d'un CHC détecté au stade terminal D, avec une fonction hépatique fortement dégradée et un envahissement des organes voisins, seuls des soins palliatifs pourront être envisagés pour tenter de soulager le patient, avec un temps de survie estimé à moins de 3 mois.

a) Chimioembolisation : la chimioembolisation trans-artérielle est destinée aux patients au stade B, ce qui correspond au stade intermédiaire soit multinodulaire (> 3 nodules), en l'absence de métastases et avec une fonction hépatique non-dégradée. Elle

permet un ralentissement de la progression tumorale, mais n'éradique pas le CHC. Elle est parfois mise en place chez les patients en attente d'une greffe hépatique.

La chimioembolisation consiste en l'administration d'un agent cytotoxique par voie intra-artérielle, suivi d'une embolisation qui consiste à « bloquer » les vaisseaux irriguant la tumeur. Cette technique requiert quelques jours d'hospitalisation du patient, et est réalisée sous anesthésie locale. Elle ne nécessite pas d'intervention chirurgicale mais doit être couplée à l'imagerie médicale. Après avoir pratiqué une incision au niveau du pli de l'aîne, un cathéter est inséré jusque dans le foie au plus près de la tumeur (*via* l'artère fémorale, puis l'aorte, et enfin l'artère hépatique). Une fois le cathéter bien positionné, les molécules de chimiothérapie sont délivrées, couplées aux « emboles » qui sont de petites billes de corps gras qui vont obstruer les vaisseaux à proximité de la tumeur et ainsi la priver d'alimentation et d'oxygène (Burrel *et al*, 2012). Les emboles vont également éviter la diffusion de la chimiothérapie dans l'organisme, limitant ainsi les effets indésirables. Cependant, les effets indésirables classiques aux chimiothérapies sont très souvent constatés : fatigue, fièvre, nausées, douleurs abdominales et diarrhées, et parfois même chute temporaire des cheveux (alopécie). La médiane de survie sans rechute des patients est de 50% à 4 ans.

b) Thérapies ciblées : il s'agit du traitement mis en place dans les cas de CHC avancés (stade C), lorsque la tumeur a commencé à envahir les structures vasculaires du foie voire se disséminer aux organes environnants. C'est aussi le stade auquel le patient commence à présenter des symptômes. Les molécules de thérapies ciblées peuvent également être utilisées dans le cadre d'un CHC de stade B n'ayant pas régressé suite à une chimioembolisation. La première molécule mise sur le marché dans le cadre du traitement du CHC est le sorafénib, inhibiteur multikinase jouant sur plusieurs voies de signalisation cellulaire, qui possède des effets antiprolifératifs et antiangiogéniques. Ce médicament, administré de façon systémique sous forme de comprimés à avaler, va donc limiter la croissance des cellules tumorales et empêcher le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à proximité de la tumeur. Le sorafénib est resté pendant près de 10 ans la seule molécule disponible en première ligne sur le marché, avec un bénéfice modeste puisque la médiane de survie n'est augmentée que de trois mois seulement (Llovet *et al*, 2008). De plus, des effets indésirables sont également rapportés, bien qu'un peu moins sévères qu'avec les chimiothérapies classiques. Une deuxième molécule, le lenvatinib (qui est aussi un inhibiteur multikinase), peut être prescrite en traitement de première ligne depuis 2018. Elle présente un bénéfice similaire à celui du sorafénib, avec des effets secondaires légèrement atténués (57% pour le lenvatinib versus 49% pour le sorafénib) (Kudo *et al*, 2018). Depuis 2020, le sorafénib a été remplacé par une nouvelle thérapie de première ligne combinant l'atezolizumab (une immunothérapie anti-PD-L1) au bevacizumab (un anti-VEGF bien connu et très utilisé) qui s'avère supérieure en termes de survie globale (Finn *et al*, 2020).

On trouve en traitement de seconde ligne 3 molécules récentes : le régorafénib (inhibiteur multikinase), le cabozantinib (inhibiteur multikinase également) et le ramucirumab (anti-VEGF2), qui sont utilisées lorsque l'administration des traitements de première ligne a été un échec (Galle *et al*, 2018). Les différentes molécules disponibles ainsi que leurs cibles cellulaires sont récapitulées dans le tableau 2 ci-dessous.

Les options disponibles pour traiter le CHC au stade avancé sont donc limitées (malgré les molécules découvertes ces dernières années), et présentent surtout des bénéfices et une

survie globale particulièrement faible. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours, laissant espérer une meilleure prise en charge du CHC dans les années à venir.

Tableau 2 : Récapitulatif des molécules de thérapies ciblées utilisées dans le traitement du CHC. *Le sorafénib, le lenvatinib, le régorafénib et le cabozantinib sont des inhibiteurs de différentes kinases cellulaires, alors que l'atezolizumab, le bévacizumab et le ramucirumab sont des anticorps monoclonaux dirigés contre une cible en particulier.*

Molécule	Type	Cibles cellulaires
Sorafénib	Inhibiteur multikinase	BRAF, KDR, FLT4, PDGFRB, KIT, FLT3, RET
Lenvatinib	Inhibiteur multikinase	VEGFR2, VEGFR3, VEGFR1, PDGFR, FGFR1
Régorafénib	Inhibiteur multikinase	VEGFR1/2/3, PDGFRB, KIT, RET, RAF1
Cabozantinib	Inhibiteur multikinase	VEGFR2, c-MET
Atezolizumab	Anticorps monoclonal	PD-L1
Bevacizumab	Anticorps monoclonal	VEGF
Ramucirumab	Anticorps monoclonal	VEGF-2

VI- Objectifs de l'étude :

Des mutations inactivatrices de RSK2 ayant été mises en évidence dans le CHC pour la première fois par des travaux de l'équipe en 2012 (Guichard *et al*, 2012), et le rôle de cette protéine étant peu connu dans la carcinogénèse hépatique, le but de ce projet de recherche est dans un premier temps de mettre en évidence l'implication de RSK2 dans le CHC dans un modèle animal, ainsi que son rôle supposé de gène suppresseur de tumeurs. D'autres travaux réalisés au laboratoire en 2015 ont confirmé les mutations de RSK2 dans le CHC, et ont mis en lumière une association fréquente avec l'inactivation de l'*Axin1* (Schulze *et al*, 2015), suggérant ainsi une coopération entre l'inactivation de *Rps6ka3* et l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans la carcinogénèse. Cette coopération sera donc dans un second temps explorée dans cette étude, de façon à confirmer ou non l'hypothèse. Pour cela, différents modèles murins de carcinogénèse ont été développés, de façon à tester différents modèles de coopération oncogénique, reflétant ou non les mécanismes pouvant être retrouvés chez l'homme. Enfin, les conséquences fonctionnelles, sur animaux sains, de la perte de RSK2 seule ou couplée à la perte de l'AXIN1, seront analysées.

Le but de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes de carcinogénèse hépatique mis en jeu dans les tumeurs inactivées pour le gène *Rps6ka3*, que l'on sait impliqué dans le développement de cancers chez l'homme de différentes manières (inactivation de RSK2 spécifique du cancer du foie, plutôt décrit comme ayant un effet oncogénique suite à son activation dans les mélanomes, cancers du sein et de la prostate) (Cho, 2017), et à terme d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques spécifiques des CHC inactivés pour RSK2. Il a d'ailleurs été récemment démontré que le CHC est le cancer dans lequel les mutations de RSK2 sont le plus souvent prédites pour être inactivatrices (Schulze *et al*, 2015 ; Chan *et al*, 2021), renforçant l'hypothèse selon laquelle il s'agit d'un acteur important dans le processus de carcinogénèse hépatique. Une publication scientifique portant sur les résultats de l'étude présentée dans ce mémoire est actuellement en cours de rédaction.

I- Modèles murins :

1) Généralités :

En recherche fondamentale, l'utilisation de modèles murins est un outil indispensable, qui permet de se rapprocher au mieux du contexte tumoral pouvant être observé chez l'humain, en reproduisant les mécanismes moléculaires, cellulaires et environnementaux. De nombreux modèles murins mimant diverses pathologies et types de cancers sont actuellement disponibles, et permettent le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans le cas du CHC, qui survient dans la majorité des cas suite à une maladie hépatique chronique, il est assez difficile de concevoir des modèles murins fidèles et efficaces car les modèles de génération spontanée de la carcinogénèse hépatique sont rares et la maladie hépatique sous-jacente est difficile à reproduire chez l'animal.

Des animaux transgéniques, dans lesquels un oncogène a été surexprimé ou un gène suppresseur de tumeur inactivé, sont très souvent utilisés. On peut par exemple citer le modèle de souris surexprimant MET (Fan *et al*, 2017), un récepteur à activité tyrosine kinase connu comme étant impliqué dans la carcinogénèse, chez lequel une apparition spontanée de tumeurs hépatiques est observée à partir de 40 semaines de protocole (un peu plus de 9 mois). La surexpression de protéines virales des virus VHB ou VHC peut également être citée. Cependant, des modèles de carcinogénèse chimiquement induite par diverses molécules sont très souvent utilisés afin d'amplifier les mécanismes menant à l'apparition de cellules cancéreuses (Wu *et al*, 2009). Des modèles de fibrose hépatique ou de NASH existent également. Enfin, des modèles d'injections de cellules tumorales ou de greffes de tissus cancéreux, implantés par voie sous-cutanée ou directement dans le foie dans le cadre de cellules, peuvent être utilisés.

2) Fond génétique de base :

Le fond génétique des lignées utilisées ici est un fond C57Black/6J, une lignée consanguine pure à plus de 99%, et très utilisée en recherche. Cependant, c'est une lignée connue pour être relativement résistante au développement de tumeurs hépatiques. Seuls les mâles obtenus de nos croisements ont été utilisés dans les protocoles, car ils ont comme chez l'humain une fréquence d'apparition des tumeurs plus élevée que chez les femelles. L'obtention des souris mutées est aussi plus rapide puisque le gène se situe sur le chromosome X présent en une seule copie chez les mâles (50% de chances d'obtenir une progéniture mutée lors des accouplements). De plus, l'homme et la souris partagent 99% de gènes homologues, on peut donc grandement supposer que les résultats obtenus chez la souris seront transposables à l'humain.

Cependant certaines lignées murines sont plus susceptibles de développer des tumeurs hépatiques que d'autres ; c'est le cas par exemple des fonds CBA ou des C3H, contrairement aux fonds C57Black/6 ou BALB/c (Frith, Wiley, 1982). Dans notre étude, nous avons utilisé un modèle murin déjà existant, mais lors de prochains protocoles il n'est pas exclu que nous

choisissons d'utiliser des animaux de type CBA ou C3H afin de minimiser les délais d'apparition des tumeurs.

3) Animaux transgéniques utilisés :

a) Inactivation constitutive de RSK2 : le modèle d'inactivation de RSK2 dans une lignée de souris C57Black/6J a été obtenu d'une précédente collaboration avec l'équipe d'André Hanauer de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg, qui a développé un modèle murin inactivé pour le gène *Rps6ka3* de façon ubiquitaire (génotype RSK2^{-/-} pour les femelles, et RSK2^{-/y} pour les mâles délétés, le gène d'intérêt étant situé sur le chromosome X chez la souris comme chez l'homme, noté « RSK2 KO » (pour *Knock Out*, inactivation du gène) pour plus de clarté dans la suite de l'étude), afin d'étudier son rôle dans le développement du syndrome de Coffin-Lowry (Yang *et al*, 2004 ; Schneider *et al*, 2011). Ces animaux ont été générés grâce à l'utilisation d'un vecteur contenant un gène de résistance à un antibiotique, la néomycine (flanquée de sites LoxP afin de permettre son excision) et de 3 codons stop correspondants aux différents cadres de lecture à la fin de la séquence codante de l'exon 2 du gène *Rps6ka3* (figure 11), terminant ainsi la synthèse de la protéine de façon prématurée dès l'exon 2 (KO constitutif puisque perte de l'expression de la protéine fonctionnelle dans toutes les cellules). Cette construction a été incorporée à des cellules souches embryonnaires, la résistance à la néomycine permettant la sélection des cellules d'intérêt, et ces cellules ont ensuite pu être injectées directement dans les blastocystes de souris C57Black/6J et ainsi générer des embryons délétés pour le gène cible (Yang *et al*, 2004). L'altération de la protéine RSK2 n'affecte pas la production des autres isoformes de RSK.

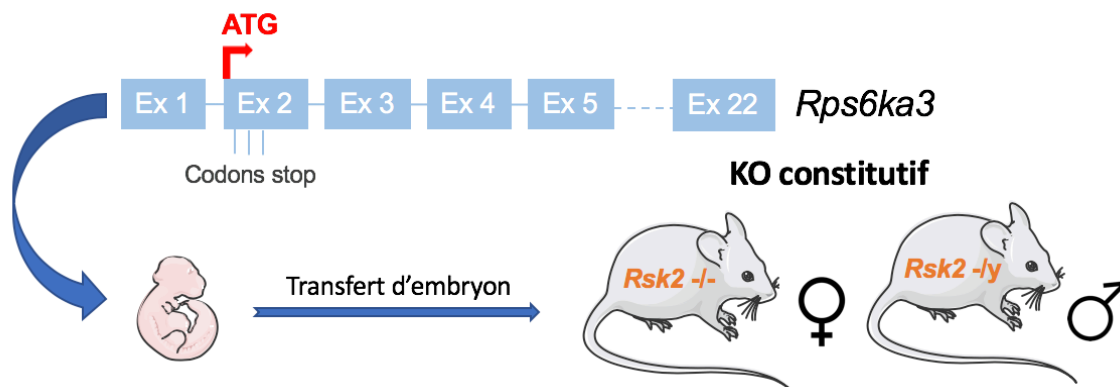


Figure 11 : Inactivation ubiquitaire du gène *Rps6ka3* dans un modèle de souris C57Black/6J. Les animaux RSK2 KO sont obtenus par transfert d'embryon contenant le gène *Rps6ka3* muté (addition de 3 codons stop correspondants aux cadres ouverts de lecture) afin de terminer la synthèse de la protéine dès l'exon 2. L'inactivation du gène est donc ubiquitaire.

Les animaux de cette lignée présentent une durée de vie normale, et aucune dysfonction des organes internes ou des fonctions métaboliques n'a été mise en évidence. On constate en revanche une forte activation de la voie Ras/MAPK dans le cerveau et notamment dans l'hippocampe, où la protéine RSK2 est normalement très exprimée. Les animaux peuvent cependant présenter quelques difficultés de coordination, ainsi qu'un retard des fonctions cognitives et d'apprentissage, et des anomalies de la différenciation des ostéoblastes sont constatées. Ce phénotype particulier mime donc les particularités associées au syndrome de Coffin-Lowry, mais l'expression du phénotype reste assez léger et ne gêne en aucune façon

notre protocole de carcinogénèse. La lignée a été élevée dans l'animalerie de notre laboratoire, et les mâles ont ensuite pu être utilisés lors de nos expériences.

b) Inactivation conditionnelle de l'*Axin1* : le second modèle de souris utilisé, présentant une inactivation conditionnelle inducible du gène *Axin1* dans le foie (souris *Axin1* fl/fl et Cre+, gène de l'*Axin1* floxé de part en part et expression de la Cre recombinase, simplifiées dans la suite de l'étude par « AXIN1 KO »), nous a également été transmis grâce à une collaboration avec l'équipe de Trevor Dale (Feng *et al*, 2012) de l'université de Cardiff au Royaume-Uni. En effet, contrairement au gène *Rps6ka3*, l'inactivation ubiquitaire du gène de l'*Axin1* est délétère et entraîne systématiquement la mort des embryons à 8 à 10 jours de gestation (Zeng *et al*, 1997). L'unique façon de contourner cet obstacle a donc été l'utilisation du système Cre/Lox pour réaliser une inactivation conditionnelle du gène cible, sous couvert du promoteur *Cyp1a1* qui est spécifique du foie. Les animaux ont été générés par recombinaison homologue d'un allèle du gène de l'*Axin1*, dont l'exon 2 est flanqué par deux sites LoxP, dans des cellules souches embryonnaires. Les animaux obtenus ont ensuite été croisés avec des souris AhCre, exprimant l'enzyme Cre (une recombinaison permettant d'effectuer des recombinaisons spécifiques entre 2 sites LoxP) dans le foie, pour laquelle l'activation est sous contrôle du promoteur *Cyp1A1* spécifique des hépatocytes. Les animaux issus de ce croisement présentent donc l'exon 2 du gène de l'*Axin1* flanqué de sites LoxP, ainsi que l'enzyme inducible Cre qui permettra la recombinaison de ces sites et donc l'excision de l'exon 2 du gène *Axin1* situé entre les deux et aboutira à un décalage du cadre de lecture et à la perte de production de la protéine fonctionnelle (figure 12). La contrainte de ce modèle est donc d'induire expérimentalement l'inactivation du gène d'intérêt, grâce à l'induction transitoire de l'enzyme Cre active. Cette induction est réalisée chez les souris à 6 semaines d'âge, par le biais de l'injection de β -naphtoflavone (BNF) en intrapéritonéale (IP), pendant 4 jours consécutifs et à une dose de 80 mg/kg. Le BNF active le promoteur *Cyp1A1*, entraînant l'expression de la Cre recombinase qui reconnaît puis recombine deux sites LoxP à proximité, entraînant ainsi la délétion du gène *Axin1* (dont l'exon 2 est flanqué de ces sites) spécifiquement dans le foie.

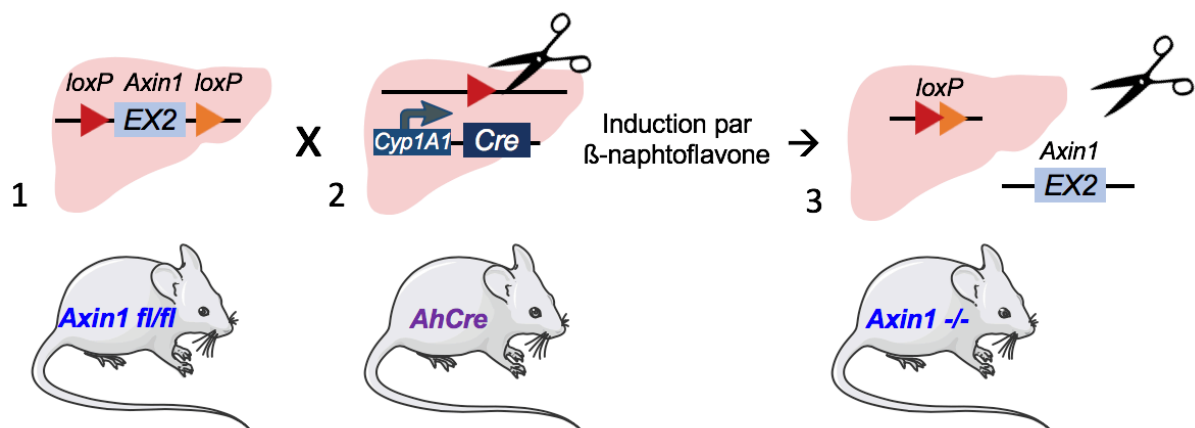


Figure 12 : Inactivation conditionnelle hépato-spécifique du gène *Axin1* dans un modèle de souris C57Black/6J, utilisant le système inducible Cre/Lox. Des souris floxées au niveau de l'exon 2 du gène *Axin1* sont croisées avec des souris AhCre porteuse du gène codant pour la Cre recombinase, sous couvert du promoteur *Cyp1A1* spécifique du foie. L'injection de β -naphtoflavone aux souris issues de ce croisement permettra la recombinaison des sites LoxP et l'excision de l'exon 2 du gène *Axin1*, menant à une inactivation dans les hépatocytes uniquement (souris *Axin1*^{-/-} notées AXIN1 KO dans le texte).

Les souris délétées de cette façon pour l'*Axin1* présentent une surexpression des gènes du cycle cellulaire et de la prolifération, ainsi qu'un volume hépatocytaire augmenté (hépatomégalie) (Feng *et al*, 2012). Elles ne présentent cependant pas d'activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine (surexpression transitoire de seulement quelques gènes de la voie), contrairement au modèle d'inactivation d'APC, qui fait au même titre que l'AXIN1 partie du complexe de dégradation de la β -caténine, dans lequel une forte activation de la voie a été constatée (Colnot *et al*, 2004).

c) Double inactivation : enfin, une troisième lignée de souris doublement inactivée pour RSK2 et pour l'AXIN1 a été générée dans notre laboratoire, grâce au croisement de souris RSK2 KO avec des souris *Axin1* fl/fl et Cre+ (gène *Axin1* floxé de part en part, animaux exprimant la Cre recombinase). Nous avons ainsi obtenu une lignée de souris double-mutée, de façon constitutive pour le gène *Rps6ka3* et de façon inductible conditionnelle pour celui de l'*Axin1*, permettant d'étudier la coopération entre ces deux gènes d'intérêt grâce à différentes combinaisons de profils génétiques. En effet, 6 groupes d'animaux ont pu être générés selon leurs génotypes pour les 2 gènes d'intérêt : des animaux sauvages (RSK2 *Wild Type* = WT et AXIN1 WT), des animaux inactivés pour RSK2 seulement (RSK2 KO et AXIN1 WT), pour l'AXIN1 seulement (RSK2 WT et AXIN1 KO) ou pour ces deux gènes en simultanés (RSK2 KO et AXIN1 KO), ainsi que des animaux hétérozygotes pour la délétion de l'*Axin1* en contexte sauvage (RSK2 WT et *Axin1* fl/wt) ou RSK2 KO (RSK2 KO et *Axin1* fl/wt). Ces derniers ont été inclus dans le protocole comme contrôle, mais les animaux présentent le même phénotype que les animaux non-mutés pour l'*Axin1*. La délétion sur un seul des deux allèles n'est donc pas suffisante pour observer les effets de la perte de ce gène, et sa délétion doit être obligatoirement homozygote et donc sur les 2 allèles. Tous les groupes générés, présentant ou non le gène de l'*Axin1* flanqué de sites LoxP, ont été traités avec du BNF en IP sur 4 jours, de façon à administrer le même traitement à tous les animaux et ainsi effacer un potentiel effet dû à l'injection de cette substance.

II- Techniques d'étude *in vivo* :

1) **Génotypage des animaux générés et vérification de l'expression des gènes d'intérêt :**

Lors du sevrage des souriceaux âgés de 3 à 4 semaines, un petit morceau de tissu caudal est prélevé (2 mm environ) et sera digéré grâce au kit « Kapa Mouse Genotyping Kit », commercialisé par Kapa Biosystems (référence KK7302) et qui permet de récupérer rapidement et facilement suffisamment d'ADN génomique pour réaliser une réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (pour *Polymerase Chain Reaction* en anglais), et détecter les modifications des gènes d'intérêt. Cet ADN n'est cependant pas purifié et est considéré « sale » puisque toutes les structures cellulaires sont encore présentes dans le lysat, et ces échantillons seront donc utilisés exclusivement pour réaliser le génotypage.

Une fois les animaux adultes sacrifiés et les tissus hépatiques récupérés, un second génotypage sera réalisé afin de vérifier que le génotype des animaux est bien celui considéré à la base. Pour cela, les acides nucléiques récupérés à partir des tissus hépatiques seront utilisés pour détecter d'une part l'inactivation constitutive du gène *Rps6ka3*, et d'autre part la perte de l'expression du gène *Axin1* dans le foie. Les techniques d'extraction et d'analyse des acides nucléiques sont détaillées ci-après.

a) Génotypage par PCR classique : les lysats de tissus caudaux sont utilisés pour réaliser une PCR en présence de couples d'amorces amplifiant de façon spécifique les régions modifiées des gènes *Rps6ka3* et *Axin1*, et détectant la présence du gène codant la Cre recombinase (séquences des amorces et taille des amplicons données dans l'annexe 2), à des concentrations de 5 μ M pour environ 40 ng d'ADN (la quantité d'ADN est approximative car les lysats ne sont pas dosés au préalable). Les 3 gènes étant amplifiés en même temps dans la plaque (préparation de trois mix différents, contenant chacun le couple d'amorces d'intérêt), les températures d'hybridation sont comprises entre 55 et 60°C à raison de 2 cycles d'amplification par degrés (PCR « touch-down »). Une amplification du gène *Rps6ka3* directement dans le foie sera également réalisée après les autopsies, une fois les ADN extraits des tissus hépatiques prélevés, afin de vérifier que le génotype des animaux est bien celui attendu. La recherche de l'expression de l'*Axin1* dans le foie après les autopsies sera quant à elle réalisée en RT-Q-PCR (dont la technique est décrite plus loin dans le texte), car l'*Axin1* est peu exprimée dans les cellules autres que les hépatocytes et donc l'effet de « contamination » constaté lors d'une PCR classique qui amplifie le génome de toutes les cellules hépatiques est plus dilué. De plus le couple d'amorces choisi pour la RT-Q-PCR est spécifique de l'exon 2 qui est perdu en cas d'inactivation, et ne permet donc aucune amplification dans les hépatocytes AXIN1 KO. La Cre n'est pas recherchée dans cette seconde étape de génotypage, puisque son activation transitoire permet l'inactivation de l'*Axin1* ; la présence d'animaux inactivés confirme donc en elle-même le bon fonctionnement de la recombinaison des sites LoxP par l'enzyme. La production de la protéine AXIN1 dans les tissus hépatiques pourrait également être réalisée, mais la réalisation d'une RT-Q-PCR est plus simple à mettre en œuvre et plus rapide qu'un Western-Blot.

b) Migration électrophorétique : les produits d'amplification obtenus suite à la réaction de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire grâce à l'automate Qiaxcel de chez Qiagen, qui permet une migration en capillaire en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire grâce à un champ électrique, et la visualisation des profils de migration générés. Cette technique est similaire à une migration en gel classique mais permet de s'affranchir de la manipulation d'agents intercalants mutagènes (tels que le bromure d'éthidium qui est le plus couramment utilisé). Selon la taille, en paires de bases, du fragment amplifié (déterminée par comparaison avec le marqueur de taille, dont les fragments sont de taille connue), on peut déterminer quel est le génotype de l'animal considéré. En effet, les régions amplifiées présentant soit la cassette d'inactivation pour le gène *Rps6ka3*, soit les sites LoxP ajoutés pour le gène *Axin1*, auront une taille supérieure aux fragments amplifiés en conditions sauvages. Si le gène codant la Cre recombinase est présent, un fragment sera amplifié par le couple d'amorce (Cre+), alors que si l'enzyme n'est pas exprimée, aucun fragment ne sera détecté (Cre-). Les résultats obtenus pour les différents génotypes sont présentés dans la figure 13.

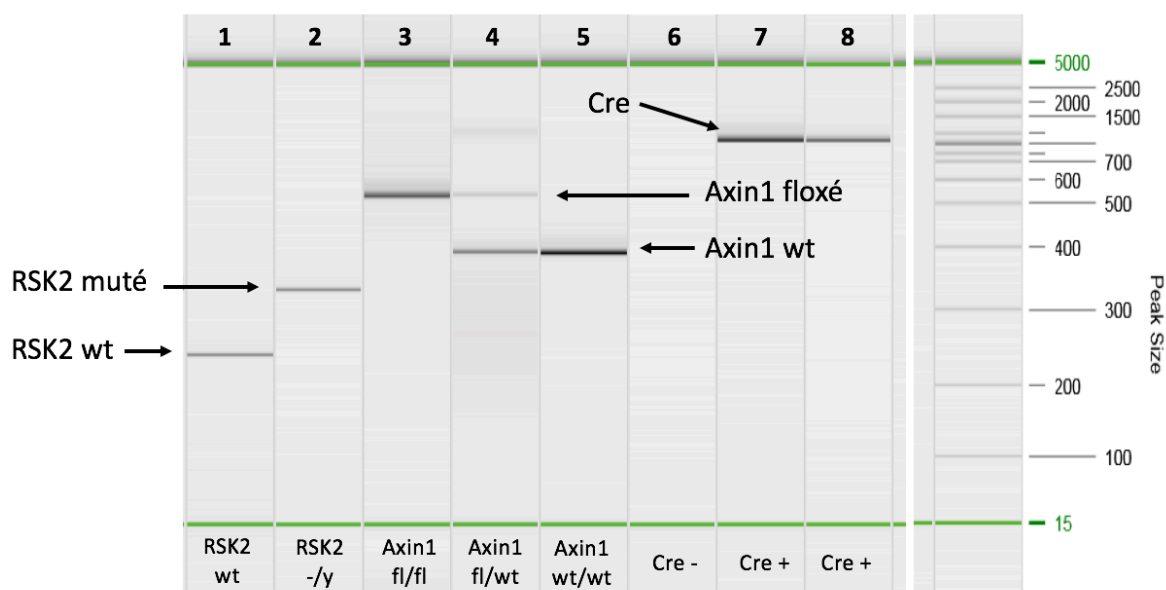


Figure 13 : Génotypage des animaux issus de nos colonies par PCR suivie d'une électrophorèse capillaire. Les produits d'amplification obtenus suite à la réaction de PCR sur de l'ADN issu de tissu caudal sont analysés par une migration en électrophorèse capillaire, de façon à analyser la taille des fragments amplifiés et déterminer le génotype des animaux pour les trois gènes d'intérêt *Rps6ka3* (simplifié par *RSK2*), *Axin1* et *Cre*.
 Taille des fragments en fonction des génotypes : *RSK2* WT = 230 pb, *RSK2* KO = 320 pb, *AXIN1* WT = 390 pb, *AXIN1* floxé = 520 pb, *Cre*+ = 1100 pb.

2) Protocoles de carcinogénèse :

a) Carcinogénèse spontanée : les modèles de souris génétiquement modifiés sont souvent utilisés pour démontrer l'implication d'un gène ou d'une association de gènes dans le processus multi-étapes de la carcinogénèse. Dans le cas d'une association de gènes, cela permet d'altérer en même temps plusieurs voies de signalisation, et de mettre en évidence une éventuelle coopération. C'est ce que nous avons cherché à faire en étudiant spécifiquement la coopération entre la perte de fonction de *RSK2* et de l'*AXIN1* dans le développement du CHC, puisqu'une fréquente cooccurrence entre l'inactivation de ces deux gènes a été au préalable mise en évidence au laboratoire (Schulze *et al*, 2015). De plus, les deux voies de signalisation concernées sont très fréquemment altérées dans le CHC, et nous espérons donc refléter de la manière la plus fidèle possible des coopérations pouvant avoir lieu chez l'homme, et contribuant au processus de carcinogénèse hépatique.

Dans ce protocole, la modélisation de la carcinogénèse hépatique se fait de manière totalement spontanée puisque les animaux transgéniques ne subissent aucun traitement chimique (excepté les injections transitoires de BNF pour l'inactivation de l'*Axin1*, que l'on considère comme sans incidence sur la carcinogénèse). Nous avons cherché à savoir si l'inactivation d'un ou des deux gènes d'intérêt suffirait ou non à observer la génération spontanée de tumeurs hépatiques.

Des animaux sauvages (non mutés), mutés pour un seul des deux gènes ou pour les deux à la fois ont donc été utilisés, et sacrifiés à 9 et 12 mois post-inactivation de l'Axin1 (soit 10,5 et 13,5 mois d'âge puisque l'inactivation est induite à 6 semaines) de façon à pouvoir observer une éventuelle cinétique (figure 14). Un seul des deux temps sera cependant présenté. Les animaux mutés pour l'Axin1 de façon mono-allélique qui ont également été générés comme contrôle ne seront pas intégrés aux résultats car ils se comportent de la même façon que des animaux non-mutés pour l'Axin1.

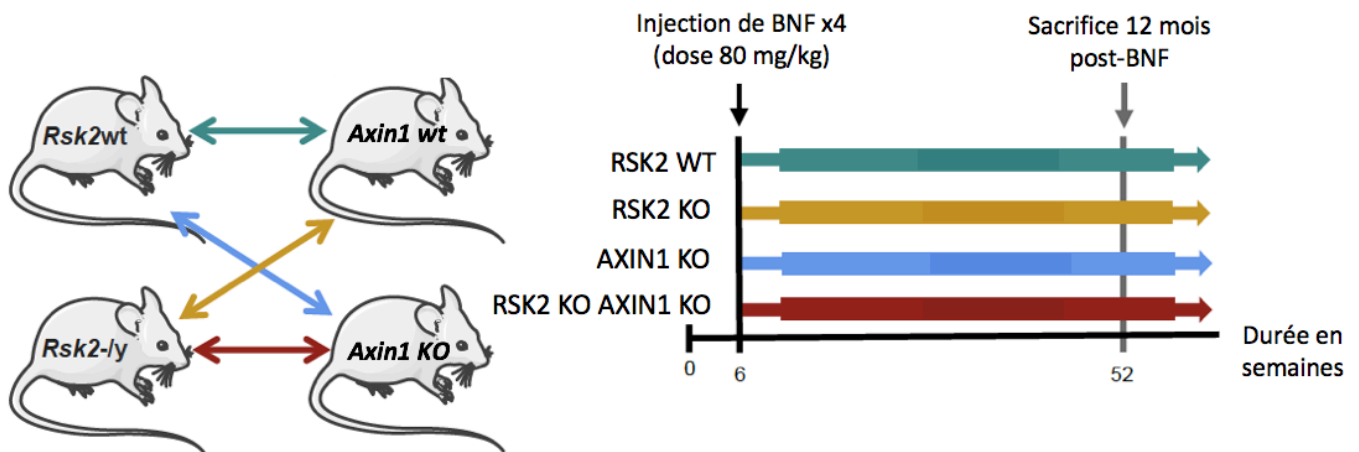


Figure 14 : Schéma expérimental de la procédure de carcinogénèse spontanée, utilisant le modèle de souris double-inactivées pour *Rps6ka3* et *Axin1*. Les animaux issus de nos croisements entre les colonies *RSK2 KO* et les colonies *AXIN1 KO* sont traités au BNF en intrapéritonéal durant 4 jours consécutifs (à une dose de 80 mg/kg) à l'âge de 6 semaines, afin d'induire l'inactivation conditionnelle de l'AXIN1. Les souris sont ensuite sacrifiées à 12 mois post-injection, soit à l'âge de 52 semaines.

b) Carcinogénèse chimiquement induite : le diéthylnitrosamine (DEN) est un puissant carcinogène chimique utilisé pour induire des tumeurs spécifiques du foie chez la souris et le rat. Il fait partie des molécules les plus fréquemment utilisées dans les modèles murins de carcinogénèse chimique (Bakiri, Wagner, 2013), qui sont très courants dans l'étude du CHC chez les rongeurs. Les tumeurs obtenues grâce à ce type de procédure reflètent cependant moins bien le paysage pouvant être retrouvé dans le cadre de CHC humain par rapport aux modèles de carcinogénèse spontanée, puisque les événements oncogéniques induits dans ces modèles sont assez différents de ceux habituellement retrouvés dans les tumeurs humaines et sont donc plus artificiels. Le DEN est métabolisé dans le foie par les enzymes hépatocytaires et plus précisément par le cytochrome P450, où il est transformé en agents alkylants pouvant induire des mutations de l'ADN. Le DEN est donc génotoxique, mais il est aussi hépatotoxique et peut provoquer la mort des cellules par un processus de nécrose. En effet ce type de composé est connu pour induire des altérations histologiques prononcées dans les tissus, avec une inflammation due à la présence d'infiltrats de neutrophiles, une prolifération des canaux biliaires, et une nécrose parfois hémorragique (Tolba *et al*, 2015). L'introduction de ce type de dommages dans le foie de jeunes souris, présentant donc des hépatocytes proliférant activement, entraîne l'apparition de lésions dysplasiques qui peuvent évoluer en CHC. Mais l'efficacité de ce type de protocole dépend de la dose de DEN administrée ainsi que l'âge, le sexe et le fond génétique des souris utilisées (Tolba *et al*, 2015). Le DEN est susceptible de

promouvoir le développement de différents types de cancers chez les rongeurs (tumeurs pulmonaires par exemple), mais l'administration de la substance en IP et les fonds génétiques murins les plus utilisés au laboratoire sont en faveur de l'apparition de tumeurs du foie.

Deux protocoles expérimentaux utilisant le DEN ont été développés au laboratoire. Le premier consiste en une injection unique de DEN seul (injection en IP à une dose de 90 mg/kg) à des souris âgées de 14 jours (hépatocytes non-matures fortement prolifératifs), et le second en injectant du DEN (par la même voie et à la même dose) à des souris âgées de 6 semaines (hépatocytes matures donc moins prolifératifs) suivi de la mise en place d'un régime contenant du phénobarbital dans l'eau de boisson (eau stérile additionnée de 0,05% de phénobarbital, et changée 2 fois par semaine). Ce second protocole est connu pour promouvoir l'apparition des tumeurs hépatiques présentant des mutations activatrices de la β -caténine (Aydinlik *et al*, 2001), contrairement au modèle DEN seul, ce qui nous permettra de tester spécifiquement la coopération entre l'inactivation de RSK2 et la voie Wnt/ β -caténine. En effet, le phénobarbital est une molécule antiépileptique non-mutagène qui potentialise l'effet hépatotoxique de carcinogènes initiateurs tels que le DEN, en promouvant l'expansion clonale des cellules transformées lors de l'initiation de la tumorigénèse. Une sélection positive des clones porteurs d'une mutation de la β -caténine (en parallèle de la sélection négative des clones porteurs d'autres mutations) pourrait expliquer le profil particulier des tumeurs hépatiques obtenues dans ce modèle (Aydinlik *et al*, 2001), et semble être médié par le récepteur CAR (pour « *Constitutive Androstane Receptor* ») activé par le phénobarbital et qui permet une réponse proliférative transitoire des hépatocytes porteurs de la mutation sur l'exon 3 du gène *Cttnb1* codant la β -caténine (Braeuning, Pavék, 2020). Le récepteur CAR et la β -caténine semble d'ailleurs coopérer dans l'induction de la prolifération et de la tumorigénèse, même si le mécanisme exact n'est pas encore bien connu. La sénescence induite par l'activation de la β -caténine semble également être empêchée par l'activation de CAR (Dong *et al*, 2015).

Dans l'étude initiale datant de 2001, environ 80% des tumeurs hépatiques générées grâce à ce protocole d'administration de DEN + PB présentait des mutations de la β -caténine (37 tumeurs sur les 46 analysées), contre aucune dans le protocole utilisant le DEN seul. Une instabilité génétique et des remaniements chromosomiques (gain ou perte de chromosomes entiers sur le caryotype des cellules), ont également été constatés dans la littérature (Aleksic *et al*, 2011). Les tumeurs induites par ce modèle semblent donc plus agressives que celles induites par le DEN seul, et plus similaires aux tumeurs humaines dont la majorité présentent des instabilités chromosomiques.

Ces deux procédures ont été réalisées en parallèle chez des souris sauvages (notées RSK2 WT dans la suite de l'étude) et chez des souris inactivées pour RSK2 (notées RSK2 KO dans la suite de l'étude), de façon à pouvoir mettre en évidence une plus grande susceptibilité à développer des tumeurs hépatiques dans un contexte de délétion du gène *Rps6ka3*. Les animaux ont été sacrifiés à 6 et 9 mois après l'injection de DEN seul (soit 6,5 et 9,5 mois d'âge), et à 9 et 12 mois après l'injection de DEN suivi du régime phénobarbital (soit 10,5 et 13,5 mois d'âge), dans le but de suivre la cinétique d'apparition des tumeurs et de pouvoir comparer différents temps dans nos analyses (figure 15).

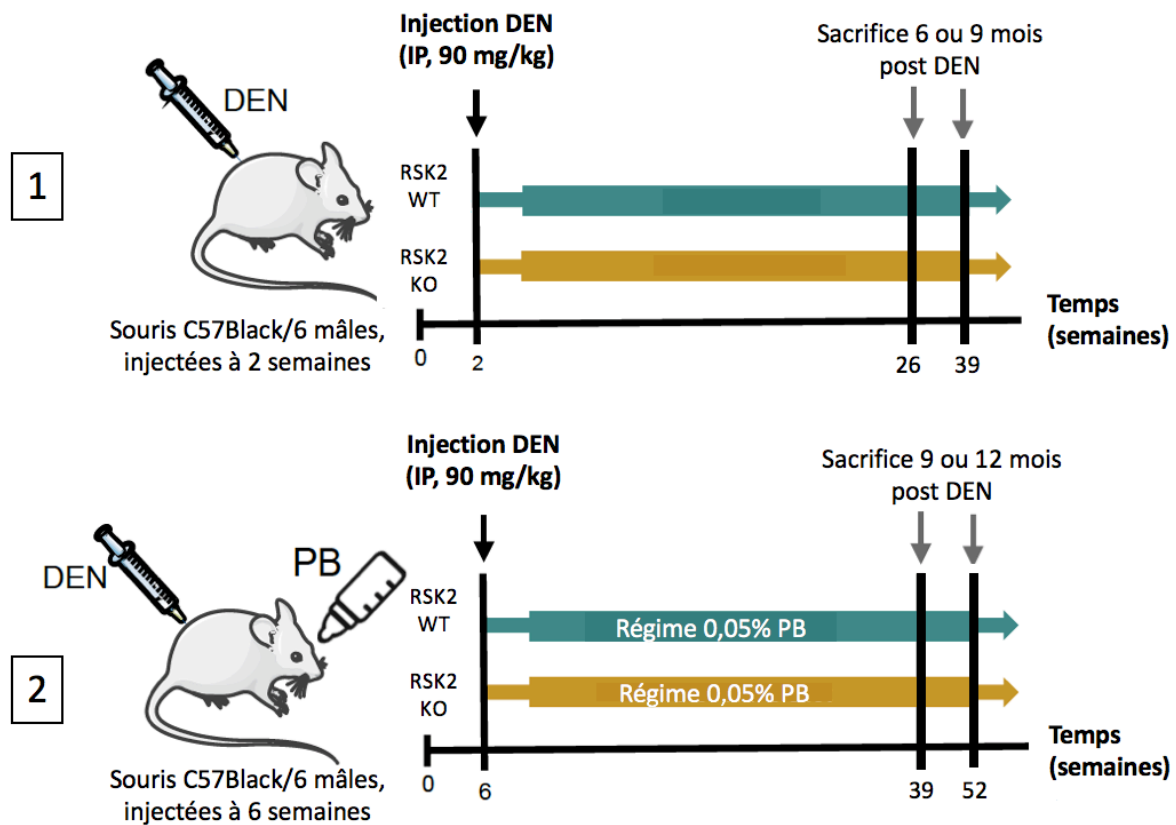


Figure 15 : Schémas expérimentaux des deux procédures réalisées dans le cadre d'une carcinogénèse hépatique chimiquement induite. Les animaux RSK2 WT ou RSK2 KO sont traités par une injection unique en intrapéritonéal de DEN seul (dose 90 mg/kg) à l'âge de 2 semaines (1) ou à 6 semaines suivi d'un régime à 0,05% phénobarbital dans l'eau de boisson (2). Les souris sont ensuite sacrifiées à 6, 9 ou 12 mois post-injection (soit 26, 39 ou 52 semaines), selon le protocole considéré.

3) Études fonctionnelles en contexte sain :

Des animaux non-traités ont également été utilisés afin de réaliser une exploration fonctionnelle des conséquences de la perte de RSK2 et/ou AXIN1 sur le tissu hépatique sain. Pour cela de jeunes animaux âgés de 2 ou 6 semaines ont été utilisés. La perte de l'AXIN1 n'a pu être modélisée qu'à 6 semaines, son inactivation nécessitant une injection quotidienne de β -naphtoflavone (BNF) sur 4 jours consécutifs. Ce type de traitement est trop difficile à supporter pour des souriceaux âgés de 2 semaines seulement, pour ce temps nous n'avons donc utilisé que des animaux sauvages ou inactivés pour la protéine RSK2. A 6 semaines en revanche, les génotypes inactivés pour l'AXIN1 seule et pour RSK2 et l'AXIN1 conjointement ont pu être ajoutés. Afin de gommer un éventuel biais dû à l'injection du BNF pour induire l'inactivation de l'AXIN1, les quatre groupes d'animaux ont été injectés à une dose quotidienne de 80 mg/kg, en intrapéritonéal (IP), durant 4 jours (début des injections réalisées à cinq semaines, l'autopsie ayant lieu à six). Un stress hépatique aigu a aussi été modélisé chez les souris sauvages ou RSK2 KO âgées de 2 semaines, en réalisant une injection unique de DEN en IP, 24 heures avant l'autopsie de façon à explorer les mécanismes précoces se mettant en place en présence ou en absence de RSK2.

Les résultats obtenus chez les animaux RSK2 WT ou KO seront tout de même comparés entre eux, bien que les animaux âgés de 2 semaines n'aient pas été traités au BNF, car on considère que l'impact de cette molécule sur la physiologie de l'animal est négligeable.

4) Collecte et préparation des tissus hépatiques :

a) Autopsie des animaux : les animaux sont sacrifiés, en fin de protocole (à 6, 9 ou 12 mois selon le protocole considéré, ou à 2 et 6 semaines dans le cadre de l'exploration fonctionnelle), par la technique de l'élongation cervicale, qui permet une mise à mort rapide et éthique puisque sans douleur pour l'animal, et sans modifier les paramètres physiologiques contrairement à l'euthanasie gazeuse ou par surdose de sédatifs. Plusieurs étapes ont ensuite lieu jusqu'à la collecte et au stockage des échantillons d'intérêt.

b) Collecte des données : les animaux sont pesés tout de suite après l'euthanasie et le poids total est noté, puis le foie une fois isolé et extrait de l'animal sera également pesé et la mesure relevée. Ces premières données permettront de calculer le rapport correspondant au poids du foie sur le poids total de l'animal, afin de mettre en évidence une éventuelle hépatomégalie. Toute observation particulière notée lors de l'autopsie de l'animal sera annotée dans les documents de travail.

c) Analyses macroscopiques : après avoir sorti et pesé le foie, celui-ci est nettoyé sommairement dans un peu d'eau physiologique pour évacuer le sang éventuellement présent qui pourrait gêner les analyses, puis scrupuleusement observé à l'œil nu. Si la présence de nodules est observée, ces derniers sont dénombrés, les endroits présentant une morphologie suspecte sont également notés, et lorsque des tumeurs suffisamment grosses sont apparues, celles-ci sont photographiées afin d'illustrer l'apparition de CHC dans nos souris. Chaque nodule est également mesuré de façon aussi précise que possible, même dans le cas où la taille ne dépasse pas quelques millimètres.

d) Préparation des échantillons : pour chacune des souris autopsiées, présentant ou non des nodules visibles à l'œil nu, une partie de chaque lobe hépatique est réservée dans une solution de fixateur histologique tamponné (AntigenFix), ainsi que les zones « suspectes » ou présentant des nodules (ceux-ci sont isolés et numérotés lorsqu'ils sont multiples). Le reste du tissu hépatique est immédiatement détaillé en petits morceaux et congelé, de façon rapide grâce à l'immersion des cryotubes en azote liquide, ainsi qu'une partie de chacune des tumeurs isolées lorsque leur taille est suffisamment conséquente pour le permettre (impossible pour les nodules de seulement quelques millimètres). Ce type de congélation permet d'éviter une éventuelle dégradation des acides nucléiques, car la bonne conservation des tissus à l'air libre est très limitée dans le temps. C'est pourquoi ces différentes manipulations doivent être réalisées le plus rapidement possible. Les tissus collectés sont ensuite conservés à -80°C afin de limiter au maximum leur dégradation dans le temps.

III- Analyses microscopiques :

Plusieurs types d'analyses microscopiques ont été réalisées, avec l'aide des techniciens de la plate-forme d'histologie et d'imagerie du Centre de Recherche des Cordeliers, et de deux médecins anatomo-pathologistes affiliés à notre laboratoire.

1) Analyses histologiques :

a) Génération de la banque de lames : les morceaux de tissus hépatiques collectés lors des autopsies sont incubés environ 48h en fixateur histologique, de façon à immobiliser définitivement les structures cellulaires et tissulaires dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. Pour cela les tissus ne doivent pas avoir été endommagés lors du prélèvement (écrasement ou déchirement par les pinces par exemple), et le sang éventuellement présent rincé de façon à ne pas ralentir la fixation ou interférer avec les futures analyses (protéines de la coagulation par exemple). Les tissus ne doivent pas rester trop longtemps dans le fixateur car cela peut aussi altérer la fixation, et ne pas coller aux parois ; une agitation délicate est donc conseillée. Le volume de fixateur utilisé est généralement 10 fois supérieur à celui de l'échantillon. Aucune coupe de tissus n'a été réalisée au cryostat, les tissus congelés ayant été conservés pour les analyses moléculaires en priorité (parfois très peu de tissus disponibles).

Une fois les tissus correctement fixés, ils doivent être déshydratés et inclus en paraffine de façon à pouvoir réaliser des coupes propres et obtenir une image fidèle du tissu d'origine. La déshydratation, réalisée à l'aide de l'automate Leica ASP300S, permet de remplacer l'eau contenue dans les échantillons par de la paraffine, grâce à des bains d'alcools de degrés croissants puis de xylène, afin de terminer par une imprégnation dans de la paraffine chauffée. Les pièces obtenues sont ensuite incluses en paraffine grâce à la station d'enrobage Leica Histocore Arcadia, de façon à obtenir des blocs pouvant être gardés indéfiniment (conservation à 4°C préconisée). Ces blocs permettent la réalisation au microtome de coupes fines et régulières (5 µm d'épaisseur), qui sont ensuite recueillies sur des lames de verre et mises à sécher. Les lames blanches (tissus non-colorée) et non-traités obtenues de cette manière ont pu être utilisées pour la réalisation de différentes analyses histologiques. La totalité des lames blanches produites a été répertoriée et stockée dans des boîtes à l'abri de la lumière, de façon à constituer une banque de lames disponibles immédiatement pour réaliser les analyses nécessaires. Seuls certains marquages très sensibles à la dégradation doivent être réalisés sur des coupes fraîches (β-caténine par exemple).

b) Coloration HES : une coloration classique des tissus à l'Hémalun-Eosine-Safran (coloration HES) est tout d'abord réalisée sur les coupes de tissus réalisées : il s'agit d'une coloration trichromique nucléaire et cytoplasmique (hémalun et éosine), additionnée d'une coloration du collagène du tissu conjonctif (safran). Elle est fréquemment réalisée en histologie, et permet l'analyse microscopique des tissus ainsi qu'une première discrimination entre cellules saines et pathologiques. On détermine alors si les tumeurs développées chez l'animal sont bien des CHC, et cette première lecture permet parfois de mettre en évidence des nodules dans des tissus qui paraissaient sains à l'oeil nu.

Les lames, une fois déparaffinées, colorées par différents bains d'hématoxyline, d'éosine et de safran, et enfin déshydratées par des bains successifs d'alcool et de xylène, sont montées définitivement puis observées par deux spécialistes en anatomopathologie, de façon à pouvoir confronter les résultats et ainsi les confirmer. La présence éventuelle d'atypies cellulaires, de stéatose ou d'inflammation dans les tissus est relevée lors de cette première

analyse histologique, et le nombre de nodules tumoraux observés est également noté, avec leurs particularités s'il y en a.

2) Analyses immunohistochimiques :

a) Description du protocole de base : différents marquages immunohistochimiques (immunohistochimie abrégée IHC) ont ensuite été réalisés pour mettre en évidence divers antigènes d'intérêt selon la condition testée. Un protocole de base a pu être mis au point avec l'aide des techniciens de la plate-forme d'histologie et d'un médecin anatomopathologiste, en utilisant l'automate de marquage Dako ASL48. Afin de réaliser les marquages, les lames sont déparaffinées et les antigènes démasqués grâce à l'association température/pression (TintoRetriever BioSB, 15min à 110°C) à pH6 ou pH9, puis les anticorps primaires et secondaires (dirigés contre l'espèce de production de l'anticorps primaire : souris ou lapin) incubés sur les tissus. Le système de révélation utilisé est le système DAB/HRP (DAB pour 3,3'-Diaminobenzidine, HRP pour HorseRadish Peroxydase) : les anticorps secondaires sont couplés à l'HRP, une oxydoréductase qui va catalyser la DAB en substrat coloré, en présence de peroxyde d'hydrogène. Le marquage de la cible est donc visible grâce au dépôt marron qui résulte de la réaction. Les tissus sont ensuite contre-colorés à l'hématoxyline puis déshydratés et fixés par des bains successifs d'alcool et de xylène, et enfin les lames montées de façon permanente. Elles seront également numérisées grâce à l'AxioScan, de façon à pouvoir les observer facilement depuis un poste informatique. Les paramètres d'utilisation des différents anticorps sont détaillés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Conditions d'utilisation des anticorps dans le cadre des analyses immunohistochimiques réalisées sur les coupes de tissus hépatiques inclus en paraffine.

Cinq anticorps ont été utilisés afin de détecter la Glutamine Synthétase (GS), la forme phosphorylée de ERK1/2 (p-ERK), le KI-67, la B-caténine et la cytokératine 7 (CK-7).

Cible anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution	PH de démasquage	Système de visualisation
GS	BD Biosciences	610517	1/1000	6	PolyMouseHRP
p-ERK	Cell Signaling	4376S	1/100	9	PolyRabbitHRP
KI-67	Cell Signaling	12202S	1/200	6	PolyRabbitHRP
B-cat	BD Biosciences	610153	1/50	9	PolyMouseHRP
CK-7	Abcam	AB181598	1/8000	9	PolyRabbitHRP

b) Détection de la Glutamine Synthétase : la GS est un marqueur d'activation de la voie Wnt/ β -caténine puisqu'il s'agit de l'une des cibles de la β -caténine (marqueur indirect de l'expression nucléaire de la β -caténine), et est fréquemment altérée dans les tumeurs hépatiques. La localisation de la GS dans la cellule est cytoplasmique, et un marquage normal des tissus peut être constaté. Ce marquage permet de visualiser les nodules tumoraux dans les coupes de tissus hépatiques lorsqu'ils surexpriment la GS (coloration marron très marquée), y compris les petits nodules qui auraient pu ne pas être vus en coloration HES. La tumeur est considérée comme exprimant la GS (marquage positif noté GS+) lorsque plus de 90% des cellules tumorales présentent un marquage franc. Il se peut que l'expression de la GS ne soit pas homogène au sein de la tumeur (marquage considéré comme intermédiaire si exprimé par 50 à 90% des cellules), et les tumeurs peuvent également être GS négatives (si le

marquage est présent dans moins de 50% des cellules, noté GS-) puisque toutes les tumeurs hépatiques ne surexpriment pas cette cible. Le marquage permet cependant, lorsqu'il est positif, de bien identifier la bordure des nodules qui doivent être bien délimités, et aide donc dans ce cas au dénombrement. Les tumeurs présentant un marquage intermédiaire seront considérées comme GS négatives lors de nos analyses.

c) Détection de phospho-ERK : le marquage nucléaire de la forme phosphorylée de ERK témoigne de l'activation de la protéine ERK par sa phosphorylation, et donc par extension de l'activation de la voie Ras/MAPK dans laquelle il est impliqué. Il s'agit d'un marquage nucléaire, dont on note la présence ou l'absence dans les cellules tumorales. Le marquage peut également être cytoplasmique, mais ne sera pas utilisé pour le calcul du pourcentage des cellules présentant le marquage. Le H-score associé au marquage, qui représente le pourcentage de cellules positives multiplié par l'intensité du marquage évalué de 0 à 3 (la valeur du H-score varie donc de 0 à 300), sera également calculé lors de nos analyses.

d) Détection de KI-67 : il s'agit d'un marqueur de la prolifération cellulaire, retrouvé dans les noyaux des cellules en division. Ce marquage nucléaire est également exprimé en pourcentage de cellules positives au sein de chaque nodule. On peut alors utiliser cet index de prolifération pour distinguer les tumeurs fortement ou faiblement prolifératives (utilisation de la valeur médiane si plusieurs nodules sont dénombrés dans le foie d'un même animal). Il peut également être calculé dans les tissus normaux afin de quantifier la prolifération physiologique des hépatocytes.

e) Détection de la β -caténine : le marquage de la β -caténine peut être observé avec une localisation cytoplasmique et membranaire en conditions physiologiques, alors qu'un marquage nucléaire est anormal et témoigne de sa translocation et de son accumulation dans le noyau, et de ce fait de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Comme expliqué précédemment, sa détection est bien souvent corrélée avec le marquage de la GS, puisqu'ils témoignent tous deux de l'activation de la même voie de signalisation. On considère que le marquage est positif dans une tumeur s'il est observé dans plus de 5% des cellules tumorales, et le pourcentage de positivité est estimé pour chacun des nodules.

f) Détection de la cytokératine 7 : elle est recherchée uniquement dans les tissus normaux des jeunes souris utilisées pour explorer les conséquences fonctionnelles de la perte de l'un ou de nos deux gènes d'intérêt. Il s'agit d'un marquage membranaire grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre les cytokératines 7 (abrégiées CK7), qui sont des protéines des filaments intermédiaires du cytosquelette et des marqueurs de différenciation exprimés à la surface des cellules épithéliales (épithélium glandulaires et canaux). Dans le foie, elles sont notamment exprimées dans les cellules ovals (qui sont des cellules progénitrices précurseurs des hépatocytes et des cholangiocytes) et dans les cholangiocytes. Le nombre de ces cellules ovals dans les espaces portes est d'ailleurs déterminé afin de compléter les informations obtenues, de même que le nombre d'espaces porte représentés dans la coupe de foie analysée.

IV- Analyses moléculaires :

1) **Extraction des acides nucléiques** :

a) Coupe de tissus congelés : c'est l'étape préalable à chacune des extractions. Elle consiste à découper au scalpel un morceau congelé du tissu à analyser, selon le protocole utilisé et la molécule à extraire. Pour l'ADN et les protéines, 25 à 50 mg de tissu sont nécessaires, ce qui correspond approximativement à un morceau de 3 x 3 mm de côté. Une quantité légèrement supérieure ne posera pas de problème. En revanche, pour l'ARN, qui nécessite 20 à 35 mg de tissu, il est impératif de ne pas dépasser les dimensions préconisées qui sont de 2 x 2 mm de côté. Le tissu, afin de conserver son intégrité, ne doit à aucun moment être décongelé, la coupe a donc lieu sur un fond d'azote liquide.

b) Extractions à l'automate Maxwell : les tissus sont ensuite broyés mécaniquement en utilisant le Tissue Lyser de chez Qiaxcel et en présence du tampon de lyse adéquat. Les kits utilisés sont associés à l'automate d'extraction Maxwell de Promega : kit « SEV Tissue DNA » pour l'ADN et « LEV Simply RNA Tissue » pour l'ARN. Les réactifs sont présentés dans des cartouches pré-remplies, dans lesquelles il suffit de déposer le broyat de tissu, puis de récupérer les acides nucléiques purifiés en fin de cycle. Les extraits obtenus seront conservés à -20°C. Les ADN seront utilisés pour la vérification secondaires des génotypes (RSK2), et les ARN pour la vérification du génotype pour l'*Axin1* mais aussi pour rechercher l'expression de différentes cibles transcriptomiques par RT-Q-PCR.

c) Extractions en kits AllPrep : pour certains tissus, récoltés en faible quantité (tumeurs notamment), les extractions d'ADN et d'ARN sont réalisées en simultané grâce à l'utilisation du kit AllPrep commercialisé par Qiagen. Un seul morceau de tissu de 2 mm de côté (30 mg maximum) sera donc consommé, économisant ainsi les ressources disponibles. Le volume d'acides nucléiques récupéré sera moindre par rapport aux extractions réalisées au Maxwell, mais le rendement est similaire. Lorsque suffisamment de tissus est récolté lors des autopsies (au moins 3-4 morceaux de quelques millimètres de côtés, pour extraire l'ADN, l'ARN et les protéines séparément en gardant si possible un morceau supplémentaire à utiliser si besoin), l'extraction à l'automate Maxwell est privilégié.

d) Dosage des acides nucléiques : les solutions d'acides nucléiques obtenus suite aux protocoles précédemment décrits sont ensuite dosées à l'aide du NanoDrop, un spectrophotomètre micro-volume (à partir de 1 µL de dépôt seulement) qui va mesurer l'absorbance à différentes longueurs d'onde et calculer des ratios représentatifs de la pureté de l'échantillon. L'absorbance à 260 nm est proportionnelle à la quantité d'acides nucléiques contenue dans la solution, et la concentration de l'échantillon sera donc calculée directement par l'appareil. Il est également important de regarder le profil d'absorbance ainsi que les ratios qui peuvent témoigner d'une contamination par des protéines par exemple, ou divers composés organiques utilisés dans les solutions de travail des kits commerciaux.

Les ADN peuvent également être quantifiés de manière un peu plus précise en utilisant le kit « Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit » de chez Invitrogen avec le fluoromètre associé ; cette technique utilise la technologie des sondes fluorophores commerciales, qui vont se lier spécifiquement à l'ADN et émettre alors un signal fluorescent détectable par l'appareil. Cela

permet un dosage plus sensible, en s'affranchissant des éventuels contaminants. Cependant, si l'ADN a été extrait correctement, les résultats obtenus seront les mêmes qu'en utilisant le NanoDrop.

2) RT-Q-PCR :

a) Reverse transcription : le principe de la transcription inverse (abrégé RT pour Reverse Transcription) est de transformer les ARN contenus dans l'échantillon en brins d'ADN complémentaire (ADNc). Cette réaction est possible grâce à l'utilisation d'une enzyme appelée « Reverse Transcriptase », qui possède une activité ADN-polymérase ARN-dépendante couplée à une activité ADN-polymérase ADN-dépendante. Cela permet la synthèse d'un ADN simple brin complémentaire des ARN totaux présents dans l'échantillon (utilisation d'amorces aléatoires commerciales) grâce à l'activité ADN-polymérase ARN-dépendante de l'enzyme, puis d'un ADN double brin grâce à l'ADN-polymérase ADN-dépendante (figure 16). Cet ADNc synthétisé *in vitro* correspond donc à la séquence complémentaire du brin d'ARN matrice, et sera utilisé pour explorer l'expression de gènes d'intérêt. L'ADNc est utilisé pour ce type d'analyse car il est plus simple à utiliser que l'ARN, et surtout beaucoup plus stable (les ARN se dégradent facilement).

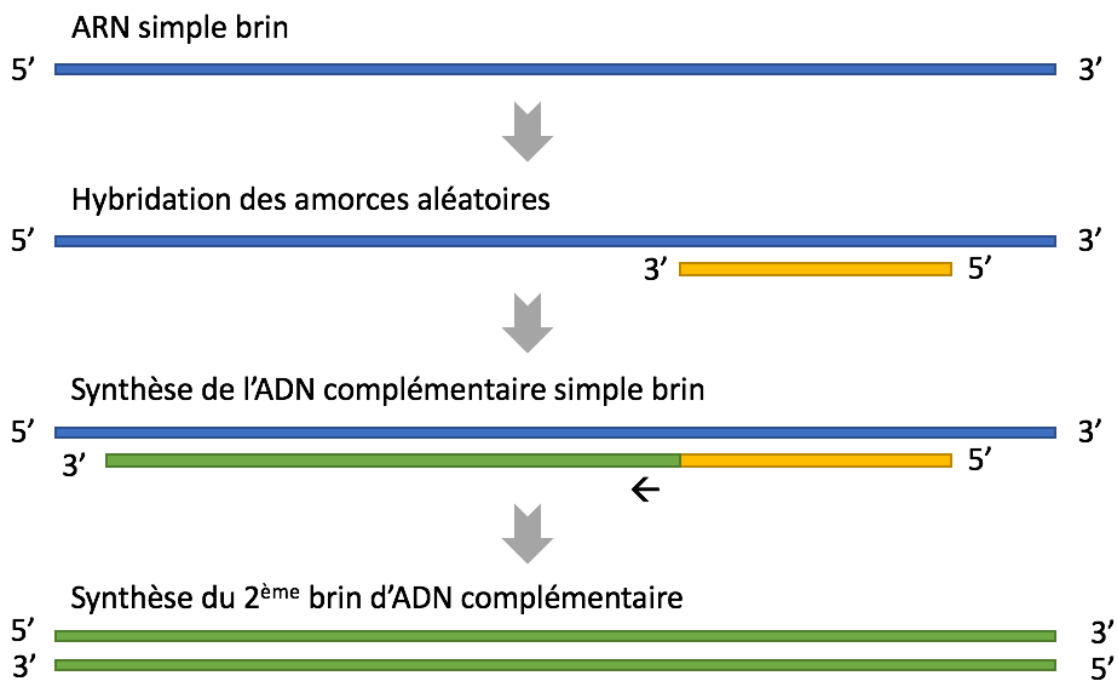


Figure 16 : Schéma simplifié de la réaction de réverse transcription à partir d'ARN. Les ARN totaux extraits des échantillons sont réverse-transcrits en ADN complémentaire simple brin, puis en ADN complémentaire double brin grâce à l'utilisation de l'enzyme Reverse Transcriptase et d'amorces aléatoires commerciales.

La synthèse d'ADNc dans le milieu réactionnel est possible grâce à la présence des amorces aléatoires (utilisées au 1X) et de dNTP (mélange des quatre désoxyribonucléotides, utilisés à 1X soit 4 mM), qui vont permettre la synthèse du brin complémentaire en s'hybridant aux bases de l'ARN matrice. Le détail du mix utilisé est détaillé en annexe 3.

Le kit utilisé au laboratoire pour réaliser cette réaction est le kit « High Capacity cDNA Transcription Kit » de chez ThermoFischer Scientifics, couplé à des inhibiteurs de la ribonucléase RNasin (utilisés à 1 U/ μ L) de chez Promega. Une quantité de 500ng d'ARN est reverse-transcrite à 37° pendant 2 heures (réaction en plaque, incubée dans un thermocycleur programmé pour 1 cycle de 10 minutes à 25°C, suivi d'un cycle de 2 heures à 37°C, puis d'un dernier cycle de 5 minutes à 85°C pour inactiver l'enzyme et terminer la réaction).

b) PCR quantitative : la Q-PCR, ou PCR quantitative en temps réel, est une technique de biologie moléculaire permettant de mesurer la quantité d'ARN messagers (reflétant l'expression des gènes d'intérêt) dans les échantillons. Elle est dans notre cas réalisée sur 10ng d'ADNc obtenu précédemment à partir des ARN présents dans les tissus analysés, grâce au kit « Taqman Universal MasterMix, No AmprErase UNG » de chez Applied Biosystems et en présence de sondes spécifiques du gène à tester (synthèse sur mesure en fonction du gène d'intérêt). Comme lors d'une PCR classique, l'ADNc va être dupliqué de manière exponentielle, mais la synthèse des fragments amplifiés pourra être suivie en temps réel grâce à la technologie Taqman, schématisée en figure 17, qui consiste en l'émission d'un signal fluorescent proportionnel au nombre de copies générées (fluorophore couplé à la sonde et relargué dans le milieu réactionnel lors de l'élongation du brin complémentaire (Navarro *et al*, 2015)). Un gène de référence, exprimé de façon stable quel que soit la condition, devra être analysé en parallèle de nos gènes d'intérêt, de façon à pouvoir normaliser les résultats obtenus. Nous avons au laboratoire testé la normalisation sur 2 gènes : celui de l'actine B (*ACTB*) et celui de la sous-unité 18S de l'ARN ribosomique, et ce dernier semble être le plus stable. Les sondes utilisées étant des sondes commerciales, les séquences exactes ne sont pas communiquées. La liste des références utilisées est disponible en annexe 4. La réaction est initiée par un premier cycle unique de 10 minutes à 95°C (activation de l'enzyme), suivi de quarante cycles de PCR (dénaturation 15 secondes à 95°C puis hybridation/élongation 1 minute à 60°C). La réaction est suivie en temps réel par le thermocycleur grâce à la détection de la fluorescence.

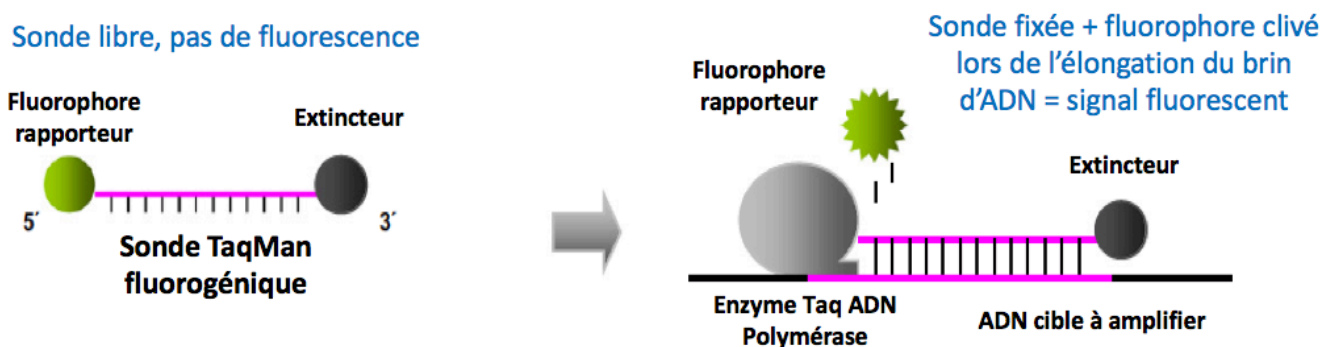


Figure 17 : Principe de suivi de l'amplification des gènes cibles en Q-PCR (signal fluorescent), grâce à l'utilisation d'une sonde fluorogénique Taqman. Lors de l'élongation du brin néo-formé, le fluorophore sera libéré dans le milieu réactionnel, permettant un suivi de la fluorescence produite tout au long de la réaction de PCR en temps réel, qui sera proportionnelle à la quantité d'ARN présent dans l'échantillon initial (reflet de l'expression du gène d'intérêt).

3) Extraction des protéines :

a) Protocole d'extraction : de la même façon que pour l'extraction des acides nucléiques, le tissu congelé de départ doit être coupé en un morceau de 3 à 4 mm de côté, correspondant environ à 50 mg de tissu. Le morceau obtenu est également lysé de façon mécanique grâce au Tissue Lyser dans du tampon Laemmli 1X, puis bouilli à 100°C afin de terminer la destruction des structures cellulaires et ainsi libérer même les protéines les moins « accessibles » (protéines nucléaires ou transmembranaires par exemple). L'extraction se fait en conditions réductrices grâce à la présence de dithiothréitol (DTT) dans le tampon de lyse, un fort agent réducteur qui va casser les ponts disulfures et ainsi dénaturer la structure tertiaire des protéines. L'extraction des protéines peut aussi être réalisée dans du tampon RIPA 1X qui est moins stringent (composition des tampons Laemmli et RIPA dans le tableau 4 présenté ci-après).

Tableau 4 : Composition des tampons pouvant être utilisés pour l'extraction des protéines totales à partir de tissus hépatiques congelés. Exemples pour la préparation de 5 mL de tampon Laemmli 1X ou de tampon RIPA 1X. C'est le tampon Laemmli qui a été utilisé préférentiellement pour l'extraction des protéines dans le cadre de nos expériences (conditions réductrices grâce à la présence de dithiothréitol (DTT)).

Tampon Laemmli 1X	Tampon RIPA 1X
50 mM Tris pH=6.8	50 mM Tris HCl
2% SDS	0,1% SDS
5% glycerol	150 mM NaCl
2 mM DTT	1% NP-40
2,5 mM EDTA	1 mM EDTA
2,5 mM EGTA	0,5% Sodium Deoxycholate
	0,01% Sodium Azide
Inhibiteurs phosphatases/proteases	Inhibiteurs phosphatases/proteases
4 mM Orthovanadate de sodium	10 mM Orthovanadate de sodium
20 mM Sodium Fluoride	20 mM PMSF
H ₂ O qsp 5mL	

b) Dosage par la méthode BCA : les protéines sont quantifiées grâce à un dosage colorimétrique, réalisé par la méthode BCA (pour *BiCinchoninic acid Assay*). Le principe de cette méthode repose sur la réduction d'ions cuivriques par les protéines en milieu alcalin, générant ainsi des ions cuivreux formant un complexe stable et coloré avec l'acide bicinchoninique contenu dans le réactif de travail. Ce complexe absorbe à une longueur d'onde donnée (562 nm), permettant ainsi de quantifier les protéines contenues dans l'échantillon, en parallèle d'une gamme étalon de concentration connue. L'absorbance étant proportionnelle à la concentration de protéines, il est facile de déterminer la quantité de protéines en réalisant une droite d'étalonnage. Le kit utilisé au laboratoire est le « Pierce™ BCA Protein Assay Kit » de chez Thermo Scientific.

4) Western-Blot capillaire :

Le laboratoire a récemment fait l'acquisition d'un appareil de Western-Blot Jess, commercialisé par la société BioTechne – Protein Simple. Il s'agit d'un système d'électrophorèse capillaire entièrement automatisé, réalisant de manière autonome l'ensemble des étapes de séparation et d'immunodétection des protéines de la technique traditionnelle. Cela permet d'éliminer les étapes sujettes aux erreurs, et fournit des résultats fiables et reproductibles en moins de 3 heures. Les différentes phases réalisées par l'automate après son chargement sont présentées dans la figure 18 ci-après. Le principe de cette méthode repose sur une électrophorèse réalisée en capillaires avec une séparation des protéines de l'échantillon en fonction de leur poids moléculaire, suivi d'une immobilisation des protéines par UV directement dans le capillaire. L'anticorps primaire sera ensuite aspiré dans le capillaire et ira alors se lier spécifiquement avec la protéine d'intérêt, pour être ensuite reconnu par un anticorps secondaire couplé au système HRP précédemment décrit. L'enzyme va dégrader les substrats, le luminol et le peroxyde présents dans le capillaire, et ainsi émettre un signal de chemiluminescence qui sera proportionnel à la quantité de protéine présente dans le capillaire (Mishra *et al*, 2017) ; le principe de la réaction est décrit dans la figure 18 ci-après. Le signal pourra également être normalisé par rapport à la quantité de protéines totales contenues dans le capillaire, grâce à l'utilisation d'un bloc de capillaires spécifiques pour la migration ainsi que les réactifs associés dont les compositions ne sont pas divulguées (la quantité de protéines totales est déterminée grâce à une lecture en fluorescence). Différents kits contenant tous les réactifs et consommables nécessaires sont commercialisés par la société, en fonction des conditions souhaitées.

Une étape de mise au point du protocole a cependant été nécessaire ; en effet les anticorps doivent être utilisés à saturation pour pouvoir réaliser une quantification précise (réalisation d'une courbe d'étalonnage représentant le signal de chemiluminescence en fonction de la concentration d'anticorps utilisé, la saturation est atteinte lorsque la courbe approche du plateau), et les lysats protéiques analysés doivent être utilisés à une concentration permettant la linéarité du signal (vérifiée elle aussi en traçant une courbe d'étalonnage). Différentes concentrations de protéines et de dilutions d'anticorps ont donc été testées afin d'optimiser les conditions de l'expérience, en parallèle de contrôles négatifs afin de vérifier la spécificité du signal (un contrôle sans échantillon protéique et un contrôle sans anticorps). Une fois ces conditions déterminées pour chacune de nos cibles (récapitulées en annexe 5), les lysats protéiques ont été analysés en utilisant le module de séparation « Protein Normalization Assay », pour des protéines comprises entre 12 et 230 kDa, couplé au module de détection par chemiluminescence (détection possible aussi en fluorescence). Le logiciel utilisé pour la manipulation des résultats, fourni avec l'automate de migration, est le logiciel « Compass for Simple Western » version 5.0.1.



Figure 18 : Principe du Western Blot capillaire, réalisé grâce à l'automate JESS (ProteinSimple) de BioTechne. Les protéines sont aspirées dans le capillaire rempli de matrice et séparées en fonction de leur masse moléculaire sous l'effet d'un champ électrique. Elles sont ensuite immobilisées dans le capillaire grâce à un traitement aux rayons ultraviolets (UV), puis incubées en présence d'anticorps primaire dirigés contre la protéine à détecter, et enfin d'un anticorps secondaire couplé au système HRP, de façon à pouvoir cliver un substrat chemiluminescent dont l'intensité du signal sera dosée directement par l'appareil et correspond au taux d'expression de la protéine d'intérêt.

V- Analyses statistiques :

1) Logiciel d'analyse :

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism (version 6), en sélectionnant l'analyse en colonne. Les groupes sont comparés deux à deux, en utilisant soit le t-test de Student pour les échantillons non-appariés si les variances des groupes à comparer sont égales (test paramétrique, distribution des données selon la loi normale), soit le test de Mann-Whitney si les variances des groupes sont différentes (test non-paramétrique). L'égalité des variances est testée directement par le logiciel grâce au test F de comparaison de variances, réalisé en même temps que le t-test de Student. Les tests paramétriques sont plus sensibles et plus puissants, mais les non-paramétriques s'appliquent à plus de situations et sont moins sensibles aux valeurs aberrantes. Quel que soit le test utilisé, les résultats sont considérés comme significativement différents lorsque la « *p-value* » calculée est inférieure à 0,05. Lors de la comparaison de proportions (pourcentage de cellules exprimant un marqueur par exemple), une table de contingence est réalisée. Les tests utilisés sont alors le test de Fischer ou les Chi-Square (si plus de deux groupes sont comparés à la fois). Les effectifs des groupes analysés ne sont pas toujours homogènes et varient de 6 à 12 souris. Les nombre d'animaux (notés « $n = x$ ») sont spécifiés directement sur les figures représentant graphiquement les résultats. Le nombre de souris de l'effectif mais aussi de nodules analysés est parfois précisé sous la figure.

2) Représentation graphique :

Les représentations graphiques des résultats sont également réalisées avec le même logiciel. Les résultats sont mis en forme en colonnes ou en nuages de points le plus souvent, et l'écart-type est représenté sur la figure ainsi que la moyenne. Dans certains cas, c'est la médiane qui sera représentée lorsque cette information est plus pertinente que la moyenne (précisé dans les figures lorsque c'est le cas). Si les résultats obtenus sont significativement différents, cette différence est quantifiée graphiquement par l'attribution d'un nombre défini d'étoiles, selon le seuil de significativité considéré (* si *p-value* < 0,05, ** si *p-value* < 0,005, *** si *p-value* < 0,0005, **** si *p-value* < 0,0001).

RESULTATS

L'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence le rôle putatif de suppresseur de tumeur de la protéine RSK2 dans le foie et sa potentielle coopération avec d'autres altérations récurrentes du CHC (mutations activatrices de β -caténine et inactivatrices de l'AXIN1 notamment), mais aussi d'étudier les conséquences fonctionnelles de son inactivation. La perte de RSK2 a été initialement décrite dans le cadre du syndrome neurologique de Coffin-Lowry, ayant de graves conséquences dans le développement mental et osseux, mais son implication dans la carcinogénèse est actuellement très mal connue.

Pour rappel, des mutations inactivatrices du gène *Rps6ka3*, localisé sur le chromosome X et codant la protéine sérine/thréonine kinase RSK2 impliquée dans la transduction des signaux cellulaires médiés par la voie Ras/MAPK, ont été identifiées pour la première fois au laboratoire dans 6 à 9% des CHC (Guichard *et al*, 2012) puis par d'autres études génomiques (mutations menant à un codon stop prématuré et entraînant la production d'une protéine tronquée, ou substitutions nucléotidiques délétères au niveau des sites de phosphorylation empêchant son activation). Une cooccurrence significative a ensuite été mise en évidence entre les mutations inactivatrices du gène *Rps6ka3* et l'apparition de mutations du gène de l'*Axin1* (Schulze *et al*, 2015), impliqué dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Cela suggère donc une coopération entre ces deux altérations génétiques dans le développement du CHC. Le rôle de RSK2 dans la carcinogénèse hépatique étant de plus en plus étudié, il était pertinent d'explorer les conséquences de sa perte, seule ou couplée à d'autres événements oncogéniques fréquemment observés.

Lors d'études préliminaires bio-informatiques au laboratoire, l'analyse du spectre de mutation de *Rps6ka3* dans différentes séries de profils génétiques de CHC (hommes et femmes confondus) a permis de mettre en évidence un profil de prédiction d'une inactivation complète systématique de RSK2 dans les cas de CHC mutés (figure 19), quel que soit le sexe des patients considérés (chez un sujet féminin, l'inactivation du gène *Rps6ka3* concerne toujours le chromosome X activé). Les mutations, retrouvées tout au long de la séquence protéique, sont prédites comme tronquantes pour la protéine traduite dans 60% des cas (au niveau du domaine tyrosine kinase C terminal dans la plupart des cas, qui est indispensable à l'activation de RSK2), et prédites comme étant délétères pour la fonction de la protéine dans 95% des cas (formes tronquées de la protéine ou substitutions nucléotidiques faux-sens délétères, aboutissant à la production d'une protéine inactive). Les mutations dites faux-sens « tolérées », correspondant à des substitutions nucléotidiques entraînant un changement d'acide aminé mais dont l'impact sur la protéine est prédit comme non délétère, ne concernent que 5% des cas. Cela conforte donc l'hypothèse selon laquelle RSK2 posséderait des propriétés de suppresseur de tumeur dans le foie. Les prédictions sont faites par un outil bio-informatique de prédiction *in silico* nommé SIFT (pour « *Sorting Intolerant From Tolerant* »), qui prend en compte différents paramètres : disparition, modification de la structure tridimensionnelle, modification de la fonction (conservation inter-espèces de l'acide aminé, site actif, interaction protéine/protéine).

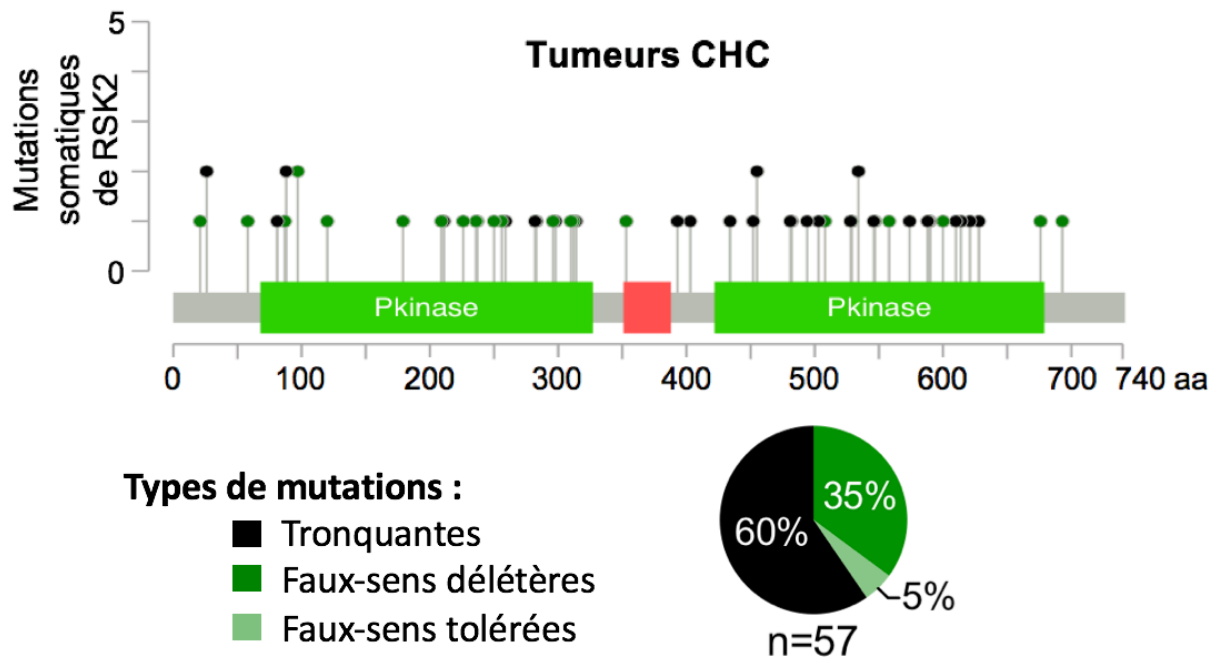


Figure 19 : Profil mutationnel de la protéine RSK2, généré suite à l'analyse de séries de 1151 CHC provenant 4 séries de données génomiques publiées (TCGA, LICA-FR, LIRI-JP, KOREAN). Les mutations du gène *Rps6ka3*, retrouvées dans 57 des 1151 CHC analysés soit 5% des cas, sont prédites comme étant inactivatrices de la protéine traduite dans 95% des cas → mutations tronquantes ou faux-sens délétères). L'impact fonctionnel des mutations faux-sens a été prédit *in silico* par l'algorithme SIFT (« Sorting Intolerant From Tolerant »).

L'étude des évènements génétiques retrouvés dans un contexte de CHC présentant une inactivation de RSK2 a confirmé une forte cooccurrence avec l'apparition de mutations de l'*Axin1* (production d'une protéine tronquée inactive dans la majorité des cas), comme précédemment décrit, mais aussi avec l'apparition conjointes de mutations du gène *Ctnnb1* qui code la protéine β -caténine (figure 20). Les mutations de *Ctnnb1* sont le plus souvent des mutations faux-sens, c'est-à-dire des substitutions nucléotidiques entraînant le changement d'un des acides aminés de la séquence protéique traduite, et plus rarement des délétions en phase. Ces mutations sont localisées au niveau du domaine de phosphorylation de la β -caténine, ce qui aboutit à la production d'une protéine anormale qui ne sera plus dégradée et aura donc une activité systématique non-régulée (activation constitutive de la Wnt dans les cellules mutées). Une coopération entre les voies Ras/MAPK et Wnt/ β -caténine semble donc être mise en jeu dans le développement de certains CHC, et sera explorée de façon plus poussée lors de cette étude. Les mutations de l'*Axin1* et de *Ctnnb1* présentent en revanche une exclusivité mutuelle et ne sont jamais retrouvées simultanément dans le génome des tumeurs analysées.

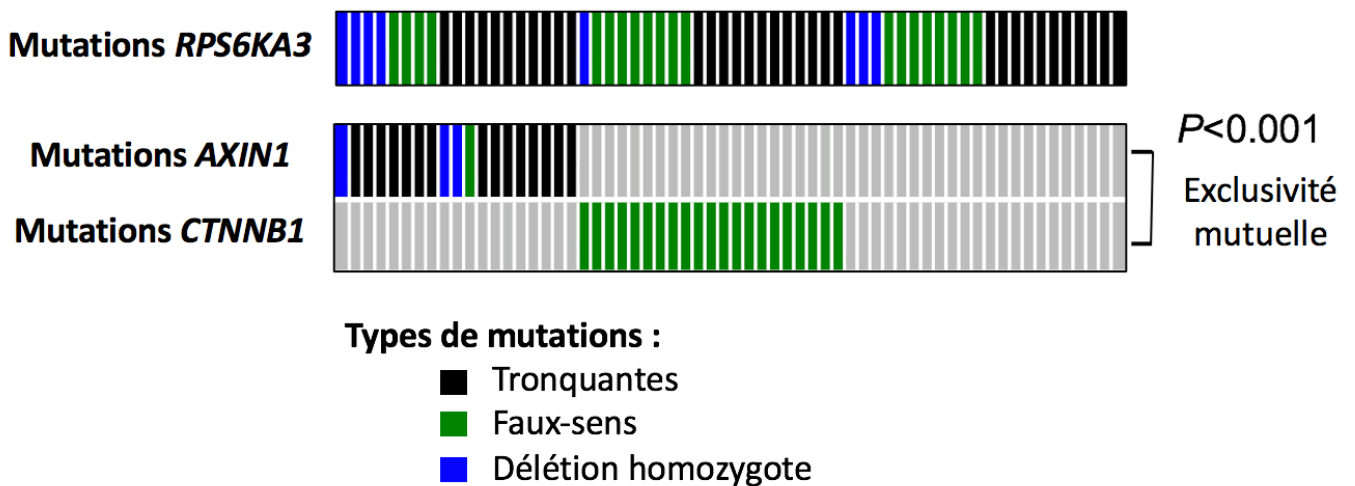


Figure 20 : Analyse des profils d'altérations génomiques pour les gènes *RPS6KA3*, *AXIN1* et *CTNNB1* dans les CHC humains. Les mutations de *RPS6KA3* sont retrouvées seules ou simultanément à celles des gènes *AXIN1* et *CTNNB1*, mais ces deux derniers présentent une exclusivité mutuelle et ne sont donc jamais retrouvés mutés conjointement (test exact de Fischer). L'analyse a été réalisée sur 4 séries de données regroupant 1151 CHC (TCGA, LICA-FR, LIRI-JP, KOREAN).

Une première étude *in vivo*, réalisée sur un modèle de souris C57black/6J avant mon arrivée au laboratoire, a démontré que les mutations inactivatrices du gène *Rps6ka3* seules n'était pas suffisantes pour induire le développement de tumeurs hépatiques chez les souris. En effet dans un groupe de 15 souris délétées de façon constitutive pour la protéine RSK2, seule une avait développé une petite tumeur au niveau du foie, mais l'organe ne présentait pas d'anomalies histologiques. Les souris inactivées pour RSK2 ne développent donc pas spontanément de tumeurs hépatiques ; c'est pourquoi différents modèles de coopérations oncogéniques ont été développés afin de promouvoir la carcinogénèse hépatique.

L'étude présentée dans ce rapport s'articule donc autour de plusieurs objectifs, dont le premier est d'améliorer la compréhension des mécanismes oncogéniques impliquant la perte de la protéine fonctionnelle RSK2, et l'activation aberrante de la voie Ras/MAPK dans le foie. Le second est de mettre en évidence l'éventuel impact de la perte de RSK2 sur d'autres voies de signalisation cellulaire, et enfin le dernier objectif est d'explorer les interactions entre l'inactivation de RSK2 et d'autres contextes génétiques (en particulier l'inactivation de l'*AXIN1* ou l'activation de la β -caténine, retrouvés dans les cas de CHC humains), ainsi que les conséquences sur la signalisation intracellulaire et le développement tumoral. Différents modèles murins de coopérations oncogéniques ont donc été générés, reflétant lorsque c'est possible les contextes mutationnels mis en évidence chez l'homme, afin de tenter de répondre à ces objectifs. L'identification des mécanismes précis mis en jeu dans les CHC mutés pour RSK2 pourrait permettre à terme de développer de nouvelles molécules thérapeutiques spécifiques. Les résultats obtenus dans les différents systèmes murins modélisés sont détaillés ci-après, en séparant les différents contextes génétiques considérés. Une dernière partie présente l'étude des conséquences fonctionnelles de la perte de RSK2 dans les foies non-tumoraux chez de jeunes souris.

I- Modèle de dérégulation de la voie Ras/MAPK :

1) **Modèle murin de carcinogénèse chimique induite par le DEN :**

Le premier modèle murin détaillé ici est celui mettant en jeu une carcinogénèse hépatique chimiquement induite *via* l'injection de DEN seul. Comme expliqué précédemment, l'administration de DEN chez le rongeur est une procédure fréquemment utilisée pour modéliser l'apparition de tumeurs hépatiques. Le DEN va cibler les hépatocytes qui prolifèrent encore activement étant donné le jeune âge des animaux utilisés (2 semaines, animaux non adultes en plein développement postnatal), et introduire divers événements oncogéniques et dommages à l'ADN, qui aboutiront au développement souvent précoce d'un CHC. La cinétique d'apparition de la tumeur dépend de plusieurs facteurs tels que le sexe et l'âge des animaux, la dose administrée, la souche de souris utilisée (Tolba *et al*, 2015).

Les tumeurs induites dans ce contexte ont cependant un profil génétique particulier. De récentes études génomiques et transcriptomiques ont comparé les profils génétiques de CHC obtenus dans des modèles murins induits au DEN aux profils de CHC humains. Les caractéristiques histologiques des tumeurs « chimiques » induites chez les souris sont très semblables à celui des tumeurs humaines, mais leur profil mutationnel est très différent puisque les mécanismes d'oncogénèse mis en jeu ne sont pas du tout les mêmes. On retrouve en effet dans les tumeurs chimiquement induites un profil qui reflète les dommages induits par la molécule génotoxique, et une signature mutationnelle spécifique de ce type de traitement a pu être identifiée. En effet quatre gènes sont fréquemment retrouvés comme étant altérés dans ce modèle : *Hras*, *Braf*, *Egfr* et *Apc* (Connor *et al*, 2018), alors que des mutations de ces gènes ne sont que rarement retrouvées dans les CHC humains. De plus, aucun des gènes clés de la carcinogénèse hépatique humaine (comme *Cttnb1* ou *Tp53* par exemple) ne sont retrouvés mutés dans ce modèle de CHC. Cela montre donc que les modèles murins de carcinogénèse chimiquement induite, et notamment le modèle DEN seul, présentent des mécanismes de carcinogénèse modifiés qu'il sera difficile de comparer avec les mécanismes observés chez l'homme. La comparaison entre ces différents modèles doit donc être réalisée avec beaucoup de précaution. Les CHC obtenus par carcinogénèse chimique au DEN présentent plutôt un profil d'expression génique similaire aux sous-classes de CHC associé à un mauvais pronostic (Lee *et al*, 2004), alors que les CHC développés dans des contextes de carcinogénèse spontanée présentent plutôt un profil proche des CHC humains associés à un bon pronostic, selon les altérations génétiques introduites.

Parmi les mutations fréquemment retrouvées dans les CHC générés grâce au modèle DEN, la plus souvent représentée est la mutation activatrice de la protéine oncogène B-raf (Dow *et al*, 2018). Cette mutation est retrouvée de façon quasi systématique dans les tumeurs générées dans des souris de fond génétique C57Black/6 (Connor *et al*, 2018) mais très rarement dans les CHC humains. La protéine B-raf est impliquée dans la voie de signalisation Ras/MAPK, tout comme RSK2. C'est un oncogène retrouvé dans certaines tumeurs humaines et notamment dans les mélanomes et les cancers thyroïdiens, dans lesquels la mutation du gène va entraîner une activation aberrante de la signalisation médiée par la voie Ras/MAPK. Dans certains types de cancers tels que les mélanomes, RSK2 et B-raf semblent être intrinsèquement liées dans les mécanismes de régulation de la voie de signalisation des Ras/MAPK (Romeo *et al*, 2013), et sont donc de potentielles cibles de choix dans le

développement de futurs traitements. Tout en gardant à l'esprit l'aspect « artificiel » de ce modèle de carcinogénèse hépatique (puisque les mutations inactivatrices de RSK2 et activatrices de B-raf ne sont jamais retrouvées simultanément chez l'homme), il semble tout de même intéressant d'explorer dans un premier temps la coopération possible de ces deux altérations dans le développement des tumeurs hépatiques.

2) Étude de la coopération entre les mutations de *Rps6ka3* et B-raf :

Ce premier modèle de carcinogénèse chimiquement induite nous permet donc de tester une potentielle coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'activation de B-raf, au sein de la voie Ras/MAPK. Les souris sauvages et inactivées pour RSK2 ont subi une injection unique de DEN (dose de 90 mg/kg en intrapéritonéal) à 2 semaines d'âge, et la charge tumorale dans les tissus hépatiques a été déterminée à 6 et 9 mois post-injection (pourcentage d'animaux ayant développé au moins une tumeur et nombre de nodules associés présentés dans la figure 21). L'inactivation de RSK2 a été vérifiée au préalable, comme pour chacun des modèles, grâce à une PCR de génotypage. Les animaux, ainsi que leur foie, ont également été pesés lors des autopsies, mais aucune différence significative du rapport entre le poids du foie des souris et leur poids total n'a pu être mise en évidence (résultats non présentés).

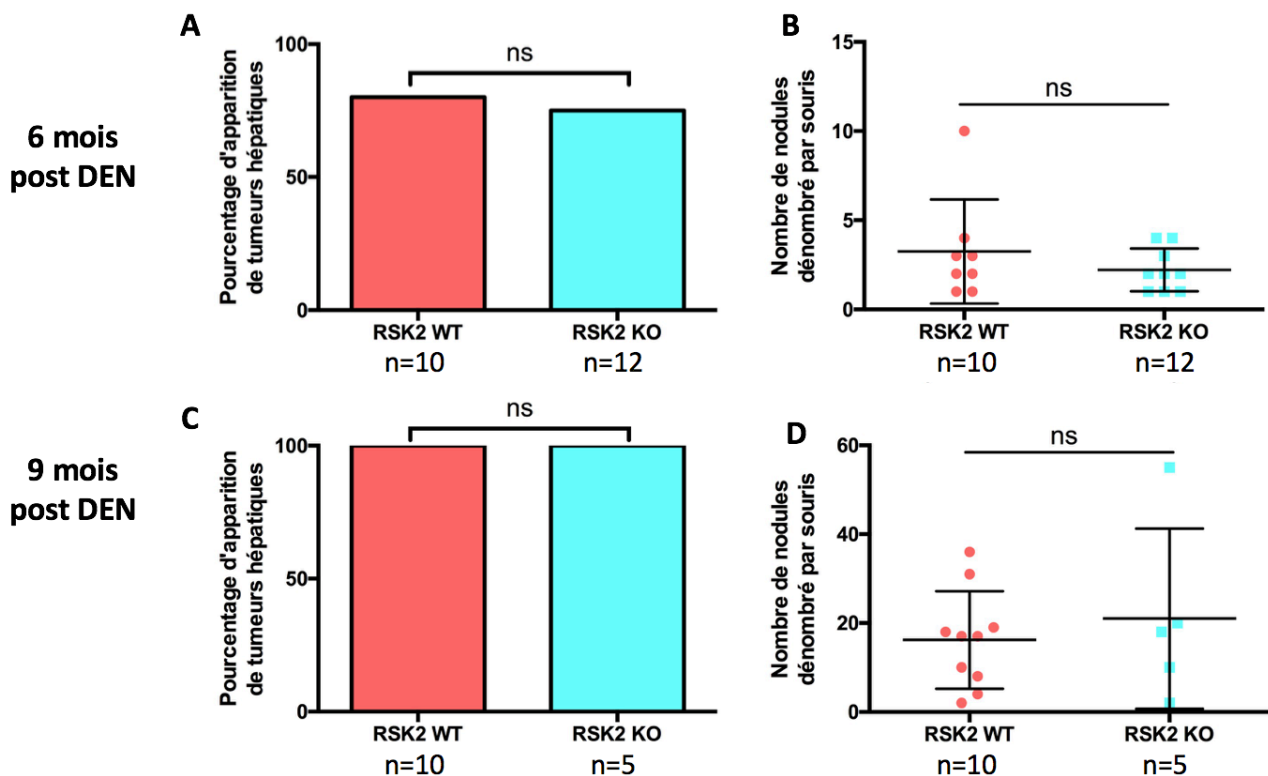


Figure 21 : Fréquence d'apparition de tumeurs chez les animaux (en %) et nombre de nodules hépatiques dénombrés après traitement au DEN seul. Les animaux ont subi une injection unique de DEN en intrapéritonéal à 14 jours d'âge, et ont été sacrifiés afin d'analyser les tissus hépatiques à 6 et 9 mois post-injection. Les résultats sont présentés en pourcentage d'animaux ayant développé au moins une tumeur (A et C), et en nombre de nodules dénombrés dans chacun des foies (B et D). Test exact de Fischer pour A et C, t-test de Student pour B et de Mann-Whitney pour D, moyenne +/- écart-type représentés pour C et D. Ns = différence entre les groupes non-significative.

On constate en premier lieu que la fréquence d'apparition de tumeurs hépatiques est identique entre les animaux sauvages et les animaux inactivés pour RSK2, à 6 ou à 9 mois, bien que le nombre de nodules hépatiques dénombré soit plus élevé à 9 mois.

A 9 mois, on observe des tumeurs visibles même à l'œil nu dans 100% des souris des deux groupes, ce qui signifie que cet intervalle de temps est trop avancé pour permettre la mise en évidence d'une éventuelle différence entre les deux génotypes. De multiples nodules sont observés dans le foie (16,2 nodules en moyenne pour les souris sauvage contre 21 pour les souris RSK2 KO, avec un écart-type très dispersé pour les animaux du groupe RSK2 KO) et le mécanisme de carcinogénèse semble donc déjà bien avancé. De ce fait, les résultats obtenus pour cette durée expérimentale n'ont pas été exploités en priorité. La présence de tumeurs hépatiques dans 100% des cas montre en effet que les tumeurs ont eu suffisamment de temps pour se développer et former de multiples foyers, masquant potentiellement une différence entre les génotypes. Les résultats obtenus à 9 mois ne seront donc pas présentés dans la suite du rapport.

A 6 mois, seul quelques petits nodules ou zones suspectes sont visibles à l'œil. On détecte cependant après coloration HES et visualisation au microscope optique, des tumeurs hépatiques dans 80% des souris RSK2 WT (n=10) et dans 75% des souris RSK2 KO (n=12), sans différence significative entre les groupes. La présence ou non d'au moins une tumeur dans le foie étant une donnée qualitative, aucun écart-type n'a été calculé. Le nombre de tumeurs dénombrées dans le foie de chacune des souris n'est pas non plus significativement différent entre les deux groupes, bien que bien moins élevé qu'à 9 mois (3,1 tumeurs en moyenne pour les souris RSK2 WT contre 2,2 pour les souris RSK2 KO, avec des écart-types plus resserrés qu'à 9 mois). L'analyse microscopique plus poussée (figure 22) montre des résultats similaires entre les groupes quel que soit le génotype considéré : 35 à 40% d'atypies cellulaires dans le tissu hépatique sain, présence de stéatose hépatique à hauteur de 40-45%. En revanche, la présence d'infiltrats inflammatoires dans les tissus est plus prononcée chez les souris RSK2 KO mais la différence entre les groupes est non-significative (environ 10% chez les souris RSK2 WT contre 30% chez les souris RSK2 KO, soit un facteur 3 de différence). Il est possible que les effectifs ne soient pas suffisamment grands pour mettre en évidence une différence significative concernant cette donnée, d'autant plus que les variances entre les deux groupes n'est pas égale. Le test de Mann-Whitney utilisé pour l'analyse est donc moins puissant que le t-test de Student utilisé dans le cas de variance équivalentes et suivant la distribution de la loi normale. Les résultats seraient donc plus robustes avec davantage d'animaux. Excepté la présence d'inflammation dans les tissus, les caractéristiques histologiques des foies des souris sont donc très similaires quel que soit le génotype de RSK2.

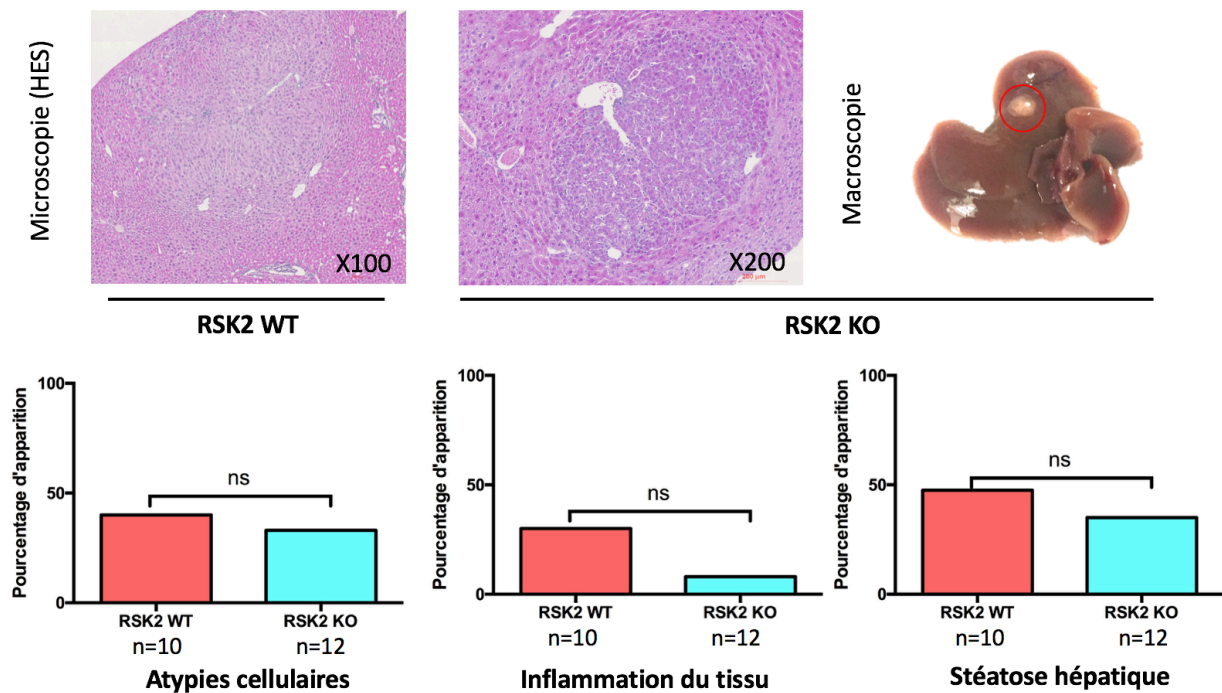


Figure 22 : Observations macroscopiques et microscopiques des foies prélevés à 6 mois après traitement au DEN seul. La présence d'atypies cellulaires, d'inflammation et de stéatose, est recherchée dans les coupes de tissus hépatiques après coloration au HES et exprimée en pourcentage d'apparition pour chaque groupe. Les statistiques ont été réalisées grâce au test exact de Fischer. N = nombre de souris par groupe, ns = différence entre les groupes non-significative.

Ces premières analyses microscopiques, réalisées sur les lames colorées en HES, ont été complétées par la réalisation de marquages immunohistochimiques en utilisant des anticorps dirigés contre les différentes cibles détaillées dans la partie « matériels et méthodes » du rapport : la Glutamine Synthétase (GS), la forme phosphorylée de ERK (p-ERK), le marqueur de prolifération KI-67 et la β -caténine nucléaire. Les résultats obtenus sont présentés en figure 23. Des photos ont été prises pour chaque marquage afin d'illustrer l'analyse et sont montrées à titre indicatif car elles ne reflètent pas forcément le groupe dans son ensemble (l'intensité peut être variable en fonction du réglage de la luminosité et de la contre-coloration à l'hématoxyline par exemple). L'analyse a été réalisée dans un premier temps en calculant le pourcentage de tumeurs exprimant la protéine d'intérêt pour chaque génotype. Lorsque l'intensité du marquage dans les tumeurs a été quantifié (cas de KI-67 notamment), les pourcentages d'expression pour chacun des nodules sont présentés. Le H-score calculé pour chaque tumeur dans le cadre de l'analyse de la forme phosphorylée de ERK est également montré (correspond au pourcentage de cellules positives multiplié par l'intensité de la coloration, estimée entre 1 et 3 par le médecin anatomopathologiste analysant les lames). On peut voir que les tumeurs obtenues dans le cadre de ce modèle de carcinogénèse expriment très peu la GS et la β -caténine, et l'expression de la GS est même nulle pour le groupe de souris RSK2 WT. Il n'y a donc a priori pas d'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans ce contexte de carcinogénèse. Les tumeurs présentent en revanche un marquage de la forme phosphorylée de ERK à hauteur de 80% des tumeurs dans le groupe RSK2 KO et de 50% des tumeurs dans le groupe sauvage. Ces résultats sont significativement différents, de même que ceux obtenus en comparant les H-score calculés pour chacun des

nodules, confirmant que les tumeurs développées en contexte d'inactivation de RSK2 présentent une augmentation de la phosphorylation de ERK, et ce qui suggère une augmentation de l'activation de la voie Ras/MAPK. Les tumeurs générées dans ce protocole montrent, de façon intéressante, un fort marquage du KI-67 dans les deux groupes (différence non-significative, 85-90% de tumeurs présentant un marquage positif avec une moyenne de 20% de cellules tumorales marquées par l'anticorps). Les cellules tumorales semblent donc relativement prolifératives dans ce contexte par rapport aux cellules non-tumorales environnantes, ce qui pourrait s'expliquer par une activation aberrante de la voie Ras/MAPK qui régule entre autres les mécanismes de prolifération et survie cellulaire. Cela corrèle aussi avec l'apparition de tumeurs dans la majorité des animaux autopsiés, ainsi que les nodules multiples constatés dans le foie des animaux.

3) Interprétation des résultats :

Dans ce premier modèle de carcinogénèse chimique induit par le DEN seul, les souris inactivées pour RSK2 ne développent pas plus de tumeurs que les souris sauvages, quel que soit le temps considéré. La perte de RSK2 n'augmente donc pas le potentiel carcinogène du DEN, puisque des résultats similaires sont observés entre les deux groupes, et ne semble pas coopérer avec les mutations activatrices de B-raf dans le développement des tumeurs hépatiques. Ces mutations ont été recherchées et ont bien été mises en évidence dans plusieurs de nos tumeurs (données transcriptomiques de séquençage des ARN messagers non présentées dans cette étude) afin de s'assurer de la validité de notre modèle (annexe 6). Le séquençage n'a pas pu être réalisé sur la totalité des tumeurs, car elles étaient parfois trop petites pour pouvoir congeler un morceau sans contamination par du tissu normal. Seules les tumeurs suffisamment grosses ont donc pu être analysées par cette technique.

B-raf est une protéine directement impliquée dans l'activation de la voie Ras/MAPK tout comme RSK2, mais la présence simultanée de mutations de RSK2 et de B-raf n'a jamais été mise en évidence dans les CHC humains et ce contexte mutationnel est donc totalement artificiel. Cela suggère une éventuelle redondance fonctionnelle entre ces deux mutations ; il est effectivement fréquent dans les tumeurs humaines que l'altération de deux gènes appartenant à une même voie de signalisation soient exclusives, et donc uniquement retrouvées dans des tumeurs différentes. Cette redondance fonctionnelle pourrait être liée à la capacité de ces deux mutations à activer de façon anormale la voie Ras/MAPK, qui joue un rôle majeur dans l'oncogénèse. La présence de deux niveaux de dérégulation dans cette même voie ne semble pas pour autant amplifier le développement tumoral, bien qu'elle semble davantage activée en l'absence de RSK2 (expression de la forme phosphorylée de ERK augmentée dans ce génotype par rapport aux animaux sauvages).

Il n'y a donc à priori pas d'effet coopératif entre l'inactivation de RSK2 et l'activation de B-raf dans le développement des tumeurs hépatiques. Il semblerait que le développement tumoral lié à l'inactivation de RSK2 soit dépendant de contextes de coopération oncogéniques spécifiques impliquant des voies de signalisation différentes, comme l'inactivation de l'AXIN1 ou l'activation de la β -caténine, dérégulant tous deux la voie Wnt/ β -caténine et qui seront explorés dans les modèles suivants présentés ci-dessous.

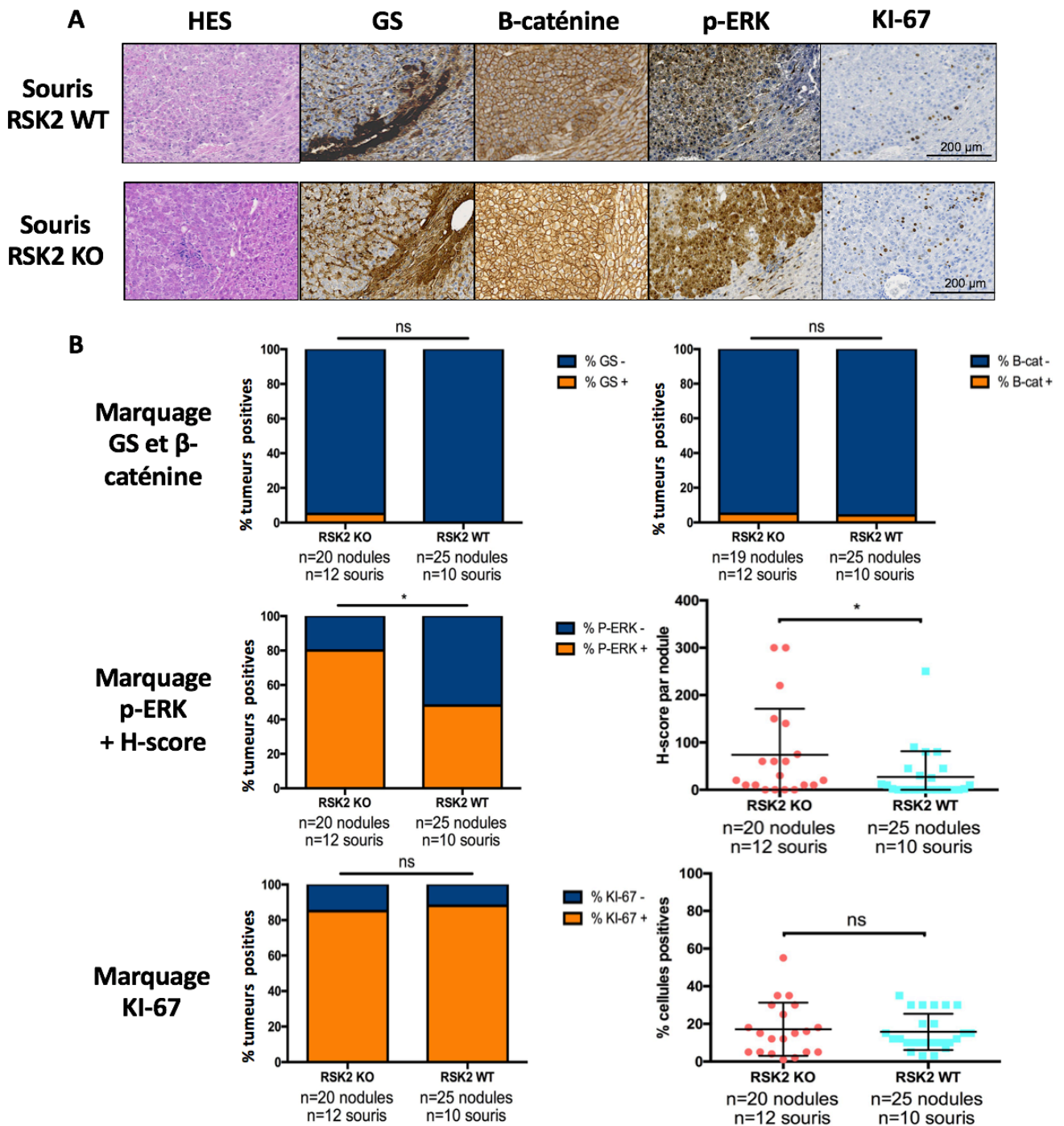


Figure 23 : Analyses histologiques et immunohistochimiques réalisées sur les foies de souris RSK2 WT ou KO, prélevés à 6 mois après traitement au DEN seul. A) Observation des lames colorées en HES ou IHC (détection de la Glutamine Synthétase, de la β -caténine, de la forme phosphorylée de ERK et du marqueur de prolifération KI-6. B) Pourcentage de tumeurs positives au marquage considéré, additionné du H-score calculé par nodule (pourcentage de cellules positives x intensité du marquage) pour le marquage p-Erk, et du pourcentage de cellules exprimant KI-67 au sein de chacune des tumeurs. Les effectifs des groupes et du nombre de tumeurs sont précisés. Test exact de Fisher sauf pour le H-score : test de Mann-Whitney, et le pourcentage de cellules exprimant KI-67 : t-test de Student. Moyenne +/- écart-type représentés pour les tests de Mann-Whitney et de Student. Ns = différence non-significative entre les groupes, * = différence significative ($p < 0,05$).

II- Modèle d'inactivation de RSK2 associé à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine :

1) **Coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'activation de la β -caténine** :

a) Carcinogénèse chimique induite par le DEN associé au phénobarbital :

Nous avons vérifié précédemment le fort potentiel oncogénique de l'administration de DEN à de jeunes souris âgées de 2 semaines. Cependant, lorsque le DEN est administré à des souris plus âgées, il est connu qu'un stimulus supplémentaire est nécessaire pour obtenir des tumeurs hépatiques. On peut citer parmi ces stimulus les promoteurs de tumeurs comme phénobarbital et le tétrachlorure de carbone, ou encore une alimentation riche en aliments gras. C'est le phénobarbital qui sera associé au DEN dans le second modèle de carcinogénèse chimiquement induite développé au laboratoire.

Le phénobarbital est un médicament barbiturique utilisé dans le traitement des personnes épileptiques. Il possède des propriétés anti-convulsivantes, sédatives et hypnotiques, mais est connu pour promouvoir la carcinogénèse hépatique dans les modèles murins lorsqu'il est administré à la suite d'un carcinogène initiateur tel que le DEN (Aydinlik *et al*, 2001). Le phénobarbital agit alors comme un promoteur de tumeurs, c'est à dire comme un agent chimique initialement non mutagène, qui va augmenter la probabilité de développer un CHC en accélérant l'expansion clonale des cellules transformées au cours de l'initiation de la tumeur. Dans ce modèle plus agressif, une forte instabilité chromosomique est rapportée (Aleksic *et al*, 2011 ; Connor *et al*, 2018), ainsi que la présence récurrente de mutations activatrices du gène *Cttnb1*, codant la protéine β -caténine (retrouvées dans environ 80% des CHC) (Aleksic *et al*, 2011). Bien que l'agent carcinogène initiateur soit le DEN comme dans le modèle précédent, il est démontré que les tumeurs générées de cette façon ne présentent pas du tout le même profil génétique. L'utilisation de phénobarbital semble engendrer une sélection positive des clones portant des mutations du gène codant la β -caténine au sein des CHC (au détriment des clones présentant des mutations du gène codant B-raf dans le contexte de DEN utilisé seul), durant la phase de promotion de la tumeur (Aleksic *et al*, 2011).

Ce second modèle va donc nous permettre d'explorer la coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, qui ont déjà été mises en évidence simultanément dans des CHC humains. Il s'agit donc d'un modèle murin qui se rapproche beaucoup plus du contexte pouvant être retrouvé naturellement dans le développement des CHC humains. De plus, les dérégulations des voies de signalisation concernées sont connues comme étant souvent impliquées dans la progression tumorale des CHC, et renforce donc la pertinence de ce modèle.

b) Étude de la coopération entre les mutations de *Rps6ka3* et de *Cttnb1* :

Dans les tumeurs murines hépatiques induites par le DEN additionné de phénobarbital, des mutations activatrices du gène *Cttnb1* ont été décrites dans la littérature et semblent impliquées dans la progression tumorale. Nous avons donc utilisé ce type de modèle de carcinogénèse pour explorer une potentielle coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'activation de la β -caténine, qui sont fréquemment retrouvées simultanément dans tumeurs humaines. Des souris sauvages et inactivées pour RSK2 ont pour cela reçu une dose unique de DEN (90 mg/kg en IP) à 6 semaines d'âge, suivi d'un régime continu de phénobarbital à 0,05%

dans l'eau de boisson quotidienne jusqu'à la fin du protocole. Les animaux furent sacrifiés à 9 et 12 mois post-injection, et la charge tumorale dans les tissus hépatiques déterminée (figure 22). Les résultats obtenus ont été analysés de façon indépendante mais sont similaires pour les deux temps, et seuls les chiffres obtenus pour l'analyse à 12 mois seront présentés ici. L'inactivation de RSK2 a été vérifiée au préalable dans les deux groupes grâce à une PCR de génotypage, comme précédemment. Les animaux ont également été pesés, ainsi que leur foie, lors des autopsies, mais aucune différence significative du rapport entre le poids des souris et le poids du foie n'a pu être mise en évidence (résultats non présentés).

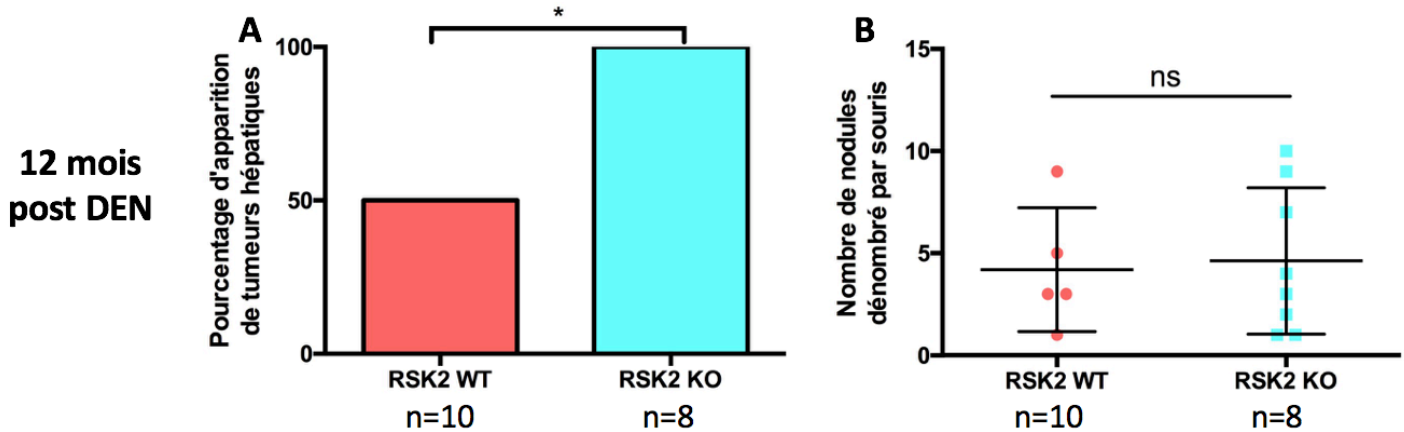


Figure 24 : Fréquence d'apparition de tumeurs chez les animaux (en %) et nombre de nodules hépatiques dénombrés après traitement au DEN + PB. Les animaux ont subi une injection unique de DEN en intrapéritonéal à 6 semaines suivi d'un régime au phénobarbital, et ont été sacrifiés afin d'analyser les tissus hépatiques à 12 mois post-injection. Les résultats sont présentés en pourcentage d'animaux ayant développé au moins une tumeur (A, test exact de Fischer), et en nombre de nodules dénombrés dans chacun des foies (B, t-test de Student, moyenne +/- écart-type représentés). Ns = différence entre les groupes non-significative, * = différence significative ($p < 0,05$).

A 12 mois, les souris RSK2 KO ont développé des tumeurs du foie dans 100% des cas, contre seulement 50% dans le groupe de souris sauvages. Il s'agit d'une différence significative ; les souris délétées pour RSK2 semblent donc être plus susceptibles de développer des CHC dans ce modèle, bien que le nombre de tumeurs dénombrées par souris soit similaire entre les deux groupes et est plutôt hétérogène selon les souris. Cependant, on a constaté chez deux souris du groupe sauvages (sur un effectif total de 10 souris) de très grosses tumeurs hémorragiques avec des plages de nécrose dans le foie, ce qui n'a pas été observé chez les souris RSK2 KO qui présentaient des tissus moins dégradés. On retrouve dans les deux groupes de très nombreuses atypies cellulaires dans le tissu hépatique sain (figure 25), un peu d'inflammation ainsi que de la stéatose hépatique (légèrement plus prononcée chez les souris sauvages, mais différence non significative).

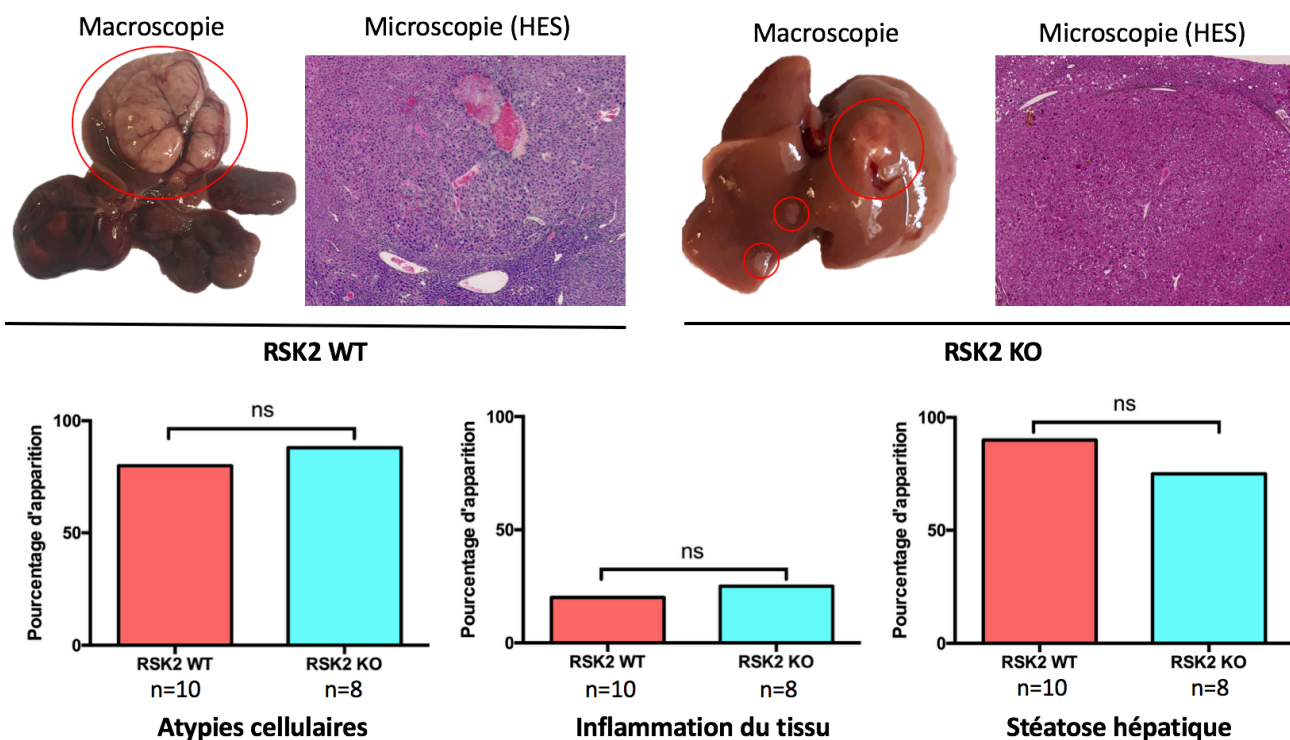


Figure 25 : Observations macroscopiques et microscopiques des foies prélevés à 12 mois post-injection de DEN + PB. La présence d'atypies cellulaires, d'inflammation et de stéatose, sont recherchées dans les coupes de tissus hépatiques après coloration au HES (données exprimées en pourcentage d'apparition, test exact de Fischer). N = nombre de souris par groupe, ns = différence entre les groupes non-significative.

Lors des analyses microscopiques et immunohistochimiques, réalisées de la même façon que précédemment décrit, on constate qu'une majorité des tumeurs tous génotypes confondus montrent une coloration GS positive (coloration homogène sur plus de 90% des cellules), reflétant l'activation de la voie Wnt/ β -caténine comme attendu dans ce modèle (figure 26). Ceci est également confirmé par la détection nucléaire de la β -caténine, qui est également retrouvée dans la majorité des tumeurs du groupe RSK2 KO (marquage considéré comme positif si détecté dans plus de 5% des cellules tumorales), de façon significativement plus élevée par rapport au groupe de souris sauvages (dans 75% des tumeurs développées chez les souris RSK2 KO contre 45% chez les souris WT). Par ailleurs, un nombre légèrement plus élevé de souris RSK2 KO présente une coloration tumorale pour la forme phosphorylée de ERK positive par rapport aux souris sauvages, mais la différence n'est pas significative. On retrouve cependant deux nodules présentant un marquage très important de la phosphorylation de ERK dans le groupe sauvage (H-score = 170) alors que les autres nodules présentent un marquage faible ou nul. Ces deux nodules se sont développés chez l'une des deux souris présentant des tumeurs nécrosées et hémorragiques. Cet animal présente donc un phénotype particulier, avec certains nodules fortement marqués pour la forme phosphorylée de ERK, mais présentant aussi à l'analyse microscopique un contingent de petites cellules ainsi que des cavités kystiques. Les tumeurs des deux groupes présentent une forte détection du KI-67 (concerne environ 90% des tumeurs), de façon similaire au protocole précédent. Cependant, le pourcentage de cellules tumorales positives au marquage du KI-67 est significativement diminué chez les souris RSK2 KO, de façon étonnante, avec une moyenne

d'environ 15% de cellules tumorales positives dans le groupe RSK2 KO contre une moyenne de 30% dans le groupe des animaux sauvages). Les tumeurs obtenues dans ce contexte semblent donc prolifératives, en accord avec la présence de multiples nodules tumoraux observés dans le foie des souris.

c) Interprétation des résultats :

Dans ce second modèle de coopération, les souris inactivées pour RSK2 ont montré un nombre de tumeurs significativement supérieure à celui des souris sauvages (figure 24). Les résultats obtenus dans ce modèle de carcinogénèse chimique, favorisant l'apparition de mutations du gène *Cttnb1* codant la β -caténine grâce au phénobarbital administré suite au DEN, suggèrent donc une coopération oncogénique entre l'inactivation de RSK2 et la voie Wnt/ β -caténine. L'activation de la voie Wnt/ β -caténine a d'ailleurs été très bien mise en évidence, conformément aux études similaires publiées dans la littérature (Loeppen *et al*, 2002 ; Stahl *et al*, 2005), puisque les tumeurs obtenues grâce à ce protocole expriment la GS et montrent une translocation nucléaire de la β -caténine, quel que soit le génotype des animaux. Il semblerait cependant que l'inactivation de RSK2 augmente la translocation nucléaire de la β -caténine par rapport aux animaux non-mutés.

Cette coopération pourrait également impliquer l'activation de la voie Ras/MAPK, puisqu'environ 30% des tumeurs développées dans les souris inactivées pour RSK2 présentent un immunomarquage positif pour la forme phosphorylée de ERK (contre 20% dans les souris sauvages). Bien que les différences obtenues entre les deux groupes ne soient pas significatives, le résultat est à nuancer puisque les seuls nodules obtenus dans le groupe sauvage qui présentent un fort marquage de la forme phosphorylée de ERK sont ceux ayant un profil particulier (tumeurs nécrotiques et hémorragiques issus d'une seule et même souris). Cela questionne donc sur la légitimité de l'interprétation du marquage pour ces cas particuliers. On sait que l'inactivation de RSK2 dans des lignées cellulaires tumorales hépatiques humaines entraîne une augmentation de la phosphorylation de ERK, et mène à une activation anormale de la voie Ras/MAPK qui est fréquemment activée dans les CHC, ce qui semble conforter une activation de cette voie dans les souris RSK2 KO. Cependant, peu de cellules tumorales ont démontré un marquage de la forme phosphorylée de ERK, même dans le groupe RSK2 KO.

Les modèles de carcinogénèse impliquant du DEN favorisent l'apparition de tumeurs fortement prolifératives, comme le montre le nombre élevé de tumeurs exprimant le marqueur de prolifération KI-67, mais l'ajout de phénobarbital entraîne un changement radical de contexte génétique. En effet dans notre premier protocole, ni la GS ni la β -caténine n'étaient retrouvées dans les tumeurs, contrairement au deuxième protocole où ces deux cibles sont très exprimées, en accord avec la littérature décrivant l'effet du phénobarbital dans notre fond génétique murin (Stahl *et al*, 2005). Dans les deux modèles, la carcinogénèse hépatique semble associée à l'activation de la voie Ras/MAPK, supposément activée de façon aberrante par la perte de la protéine RSK2, bien que cela soit moins évident dans le second modèle impliquant le DEN associé au phénobarbital. Ces résultats démontrent donc une coopération entre l'activation des voies Ras/MAPK et Wnt/ β -caténine dans la carcinogénèse hépatique, par le biais de l'inactivation de RSK2 associée à l'activation conjointe de la β -caténine. Ce contexte reflétant un de ceux pouvant être retrouvé dans certains CHC humains, il s'agit d'un résultat particulièrement intéressant à exploiter.

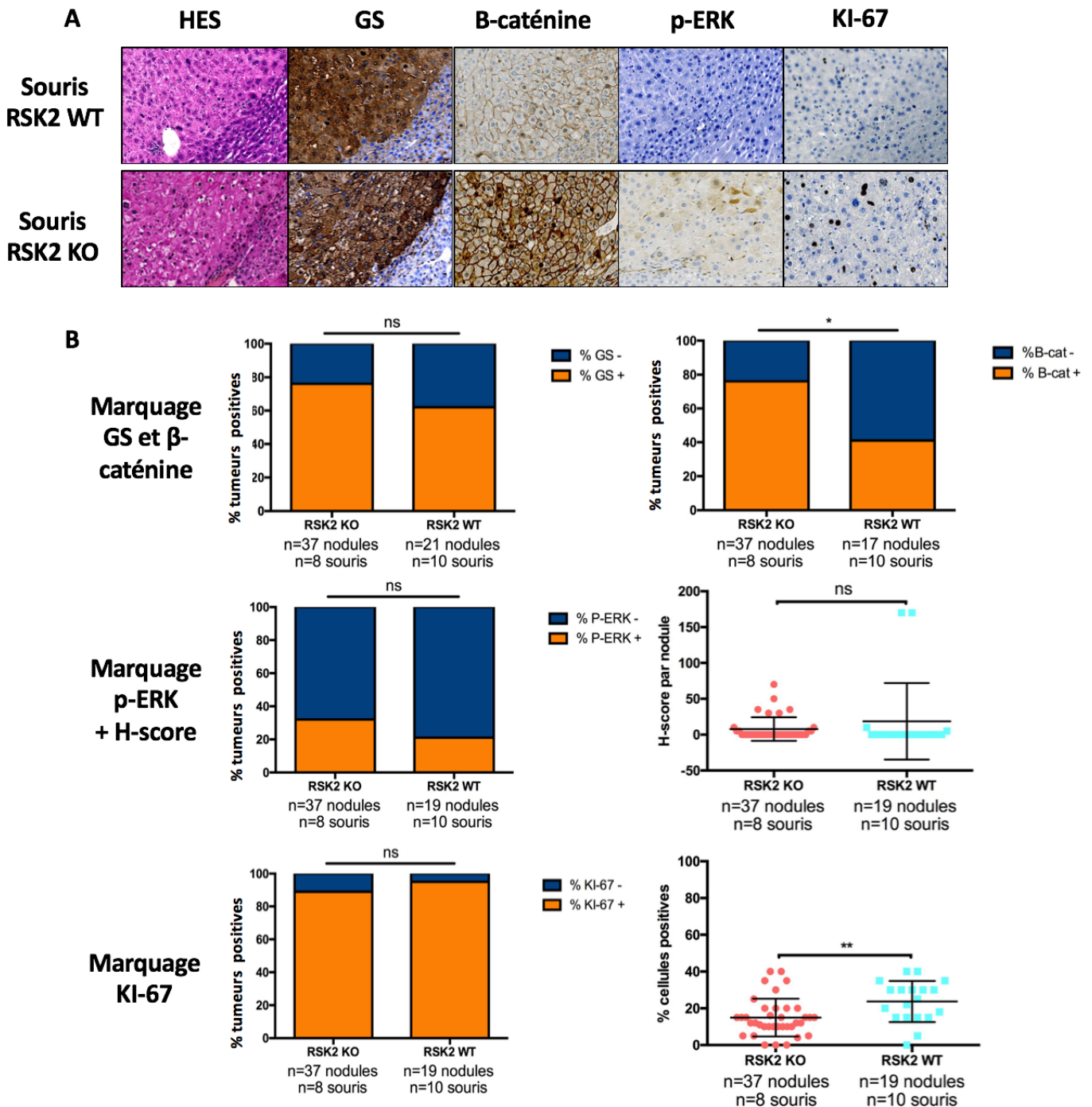


Figure 26 : Analyses histologiques et immunohistochimiques réalisées sur les foies de souris RSK2 WT ou KO, prélevés à 12 mois après traitement au DEN + PB. A) Observation des lames colorées en HES ou IHC (détection de la Glutamine Synthétase, de la β -caténine, de la forme phosphorylée de ERK et du marqueur de prolifération KI-6. B) Pourcentage de tumeurs positives au marquage considéré, additionné du H-score calculé par nodule (pourcentage de cellules positives x intensité du marquage) pour le marquage p-Erk, et du pourcentage de cellules exprimant KI-67 au sein de chacune des tumeurs. Les effectifs des groupes et du nombre de tumeurs sont précisés. Test exact de Fisher sauf pour le H-score : t-test de Student, et le pourcentage de cellules exprimant KI-67 : test de Mann-Whitney. Moyenne +/- écart-type représentés pour les tests de Mann-Whitney et de Student. Ns = différence non-significative entre les groupes, ** = différence significative ($p < 0,005$).

2) Coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'inactivation de l'AXIN1 :

a) Carcinogénèse spontanée en contexte de double inactivation :

Les modèles basés sur le développement spontané de tumeurs reflètent plus fidèlement les processus pouvant être observés dans les CHC humains, puisqu'aucune molécule chimique n'est impliquée dans l'initiation du processus de carcinogénèse. Pour analyser les conséquences de l'inactivation simultanée de RSK2 et de l'AXIN1, comme observé dans les CHC humains, nous avons donc généré un modèle de souris double-mutées grâce au croisement des deux lignées disponibles au laboratoire suite à des collaborations. Dans une étude précédente, des souris inactivées pour l'*Axin1* ont développé dans plus de 50% des cas des tumeurs hépatiques présentant des caractéristiques histologiques similaires à celles des CHC au bout de 12 mois (Feng *et al*, 2012), soutenant le rôle suppresseur de tumeurs de cette protéine. Le gène RSK2 étant lui aussi un potentiel suppresseur de tumeur, la perte simultanée de ces deux gènes devrait promouvoir l'apparition de tumeurs hépatiques.

Ce modèle de carcinogénèse spontanée est donc particulièrement intéressant. La protéine AXIN1 étant un régulateur négatif de la voie Wnt/ β -caténine, l'inactivation du gène devrait donc entraîner une activation de cette voie, au même titre que les mutations activatrices de la β -caténine modélisées dans le protocole précédent. On sait cependant que l'inactivation conditionnelle de l'AXIN1 dans le foie humain n'entraîne qu'une surexpression transitoire de certaines cibles transcriptionnelles de cette voie de signalisation, et participeraient seulement temporairement au processus d'initiation de la tumorigénèse (Abitbol *et al*, 2018). Les mutations inactivatrices de l'AXIN1 et activatrices de la β -caténine étant exclusives chez l'homme, il s'agit d'un autre moyen pour explorer la coopération entre la dérégulation de la voie Ras/MAPK induite par la perte de RSK2, et la voie Wnt/ β -caténine. Ce modèle de coopération est donc complémentaire de celui présenté précédemment.

b) Étude de la coopération entre les mutations de *Rps6ka3* et de l'*Axin1* :

Un modèle de souris doublement inactivé pour les protéines RSK2 et AXIN1 a été généré au laboratoire par croisement de deux lignées murines génétiquement modifiées, de façon à tester la coopération entre les mutations inactivatrices de *Rps6ka3* et de l'*Axin1*. Les génotypes suivants ont été utilisés dans notre protocole : sauvage noté RSK2 WT AXIN1 WT ; inactivé pour RSK2 seul noté RSK2 KO AXIN1 WT ; inactivé pour l'AXIN1 seule noté RSK2 WT AXIN1 KO ; inactivé simultanément pour RSK2 et l'AXIN1 noté RSK2 KO AXIN1KO. L'inactivation conditionnelle du gène de l'*Axin1* a été induite à 6 semaines d'âge grâce à l'injection de β -naphtoflavone (abrégé « BNF », à une dose de 80 mg/kg en IP) sur 4 jours consécutifs chez tous les animaux, qui entraîne l'expression transitoire de la Cre recombinase. Les animaux sont sacrifiés à 9 et 12 mois post-inactivation, puis la charge tumorale hépatique déterminée comme précédemment (figure 27). Les résultats obtenus sont plus pertinents pour la durée de 12 mois, la carcinogénèse spontanée nécessitant un temps de développement tumoral plus long. Les résultats obtenus à 9 mois ne seront donc pas présentés dans le rapport. L'inactivation conditionnelle de l'*Axin1* a été vérifiée par RT-Q-PCR et entraîne une forte diminution du niveau des ARNm correspondants retrouvés dans le foie chez les animaux délétés (plus de 90% par rapport au foie des souris sauvages), ainsi que par Western-Blot pour contrôler la diminution du taux de protéine dans les échantillons (annexe 7).

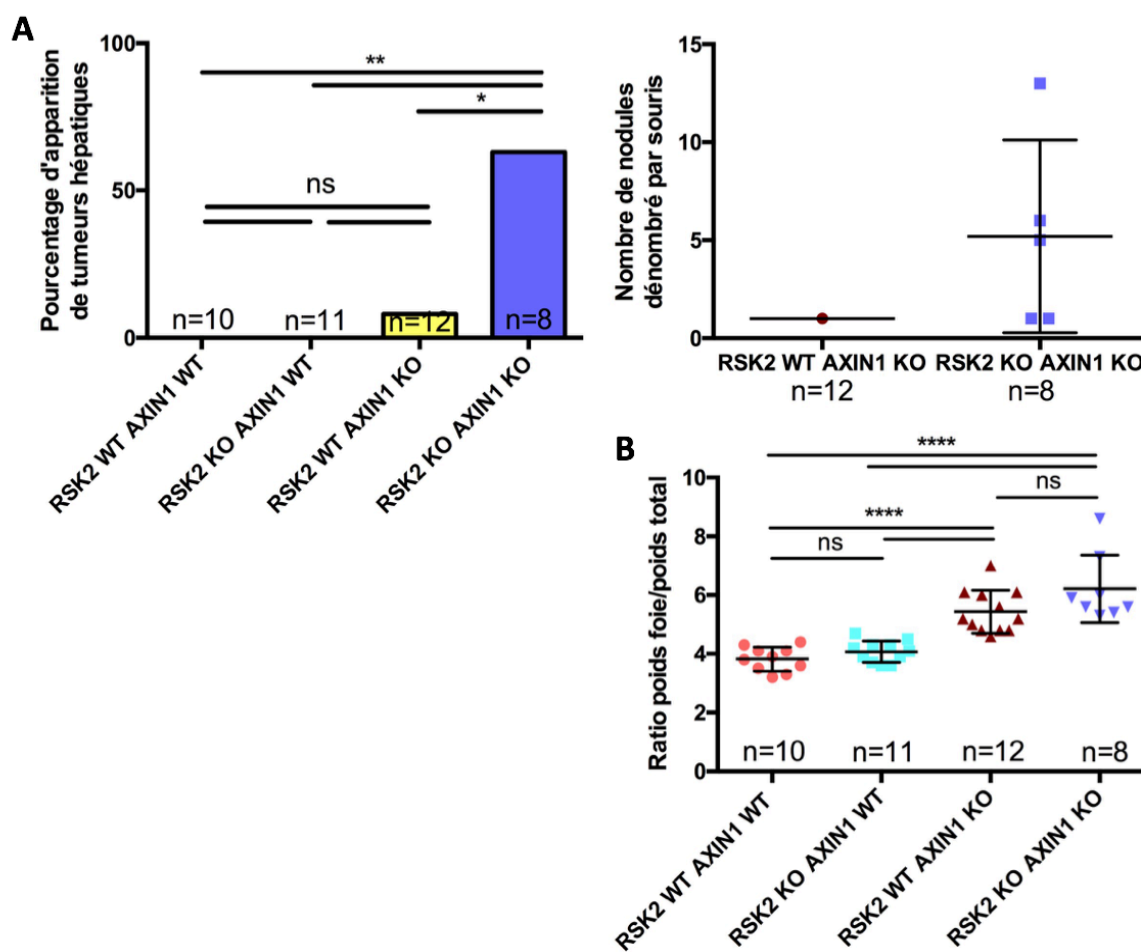


Figure 27 : Fréquence d'apparition de tumeurs chez les animaux (en %) et nombre de nodules hépatiques dénombrés (A) ; calcul du ratio du poids du foie sur le poids total de la souris (B). Les animaux ont été sacrifiés afin d'analyser les tissus hépatiques à 12 mois post-inactivation de l'*Axin1*. Les résultats sont présentés en pourcentage d'animaux ayant développé au moins une tumeur (test exact de Fischer), et en nombre de nodules dénombrés dans chacun des foies (pas de test statistique puisque groupe à une seule valeur, moyenne +/- écart-type). Les ratio poids du foie sur poids total de la souris ont été comparés deux à deux en utilisant les tests de Student ou de Mann-Whitney selon le cas (distribution des échantillons suivant la loi normale ou non, moyenne +/- écart-type représentés). Ns = différence entre les groupes non-significative, * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$), **** = différence significative ($p < 0,0001$).

Les animaux présentant les génotypes sauvages ou mutés pour RSK2 seul n'ont pas développé de tumeurs spontanées après 12 mois de protocole. En revanche, des tumeurs ont été détectées macroscopiquement pour les autres génotypes, et l'analyse microscopique a confirmé la présence de tumeurs pour un animal muté pour l'*Axin1* seule (soit 8% de l'effectif, n=12 animaux) et chez 5 animaux sur le groupe de 8 pour le génotype double muté (soit 63% de l'effectif). On obtient donc un nombre significativement plus élevé de tumeurs hépatiques chez les animaux mutés pour les deux gènes d'intérêt. Lors des autopsies, les animaux ainsi que les foies prélevés ont été pesés, et les animaux mutés pour l'*Axin1* seul ou pour RSK2 et l'*Axin1* présentent des ratios poids du foie sur poids total significativement augmentés (figure

27B). Cela correspond à l'hépatomégalie déjà observée dans de précédentes études en contexte de délétion de l'*Axin1* (Feng *et al*, 2012), suggérant une prolifération accrue des hépatocytes consécutive à sa perte de fonction.

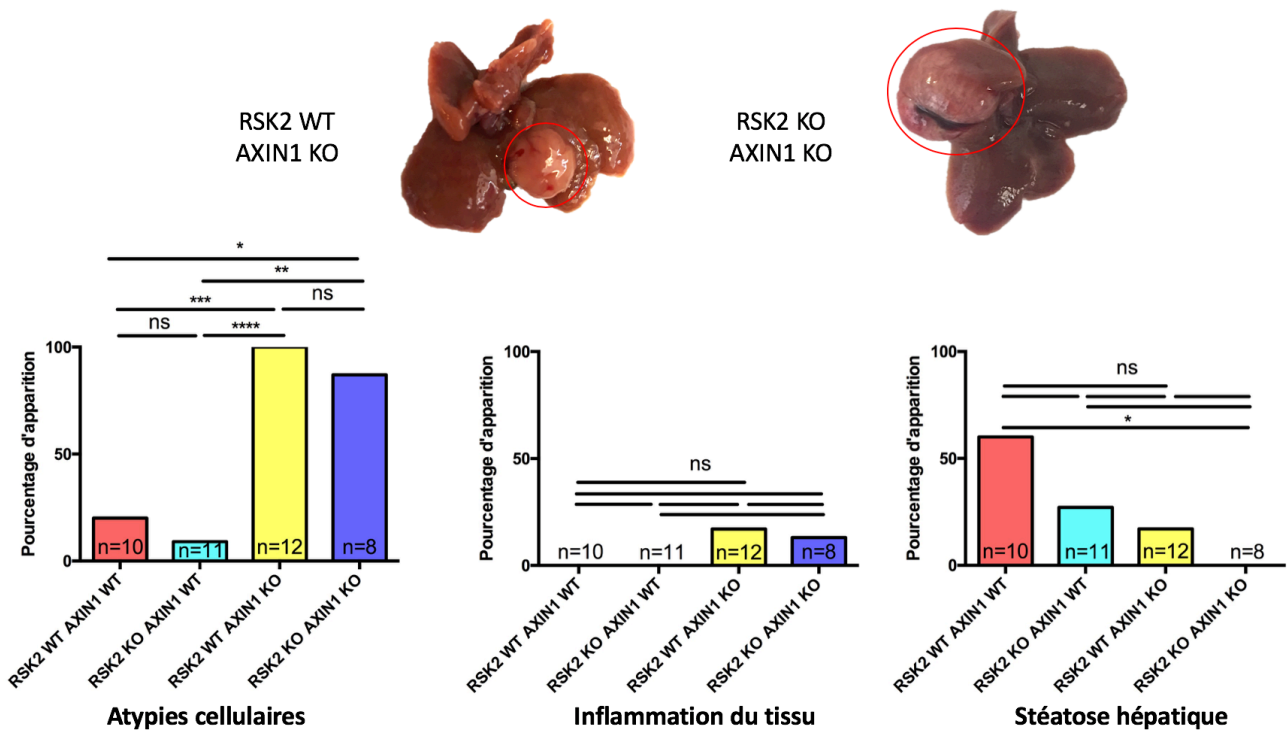


Figure 28 : Observations macroscopiques et microscopiques des foies prélevés à 12 mois post-inactivation de l'*Axin1*. La présence d'atypies cellulaires, d'inflammation et de stéatose, sont recherchées dans les coupes de tissus hépatiques après coloration au HES (données exprimées en pourcentage d'apparition, test exact de Fischer). N = nombre de souris par groupe, ns = différence entre les groupes non-significative, * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$), *** = différence significative ($p < 0,0005$), **** = différence significative ($p < 0,0001$).

Les colorations HES réalisées sur les coupes de tissus hépatiques révèlent de nombreuses atypies cellulaires chez les souris délétées pour l'*Axin1* (figure 28), de façon indépendante du génotype pour RSK2. On observe des atypies cellulaires dans 100% des tissus non tumoraux pour les souris *Axin1* KO, et dans 90% des cas pour les souris double mutées. La présence d'inflammation, bien qu'assez faible (environ 10%) n'est notée que dans les souris délétées pour l'*Axin1* seule ou pour les deux gènes, mais cette différence n'est pas significative. De la stéatose est observée dans plus de la moitié des foies des animaux sauvages, dans quelques animaux mutés pour un seul gène, mais pas pour les animaux double mutés. Ce résultat est significativement différent entre les groupes sauvages et doublement inactivés, suggérant un potentiel effet protecteur de la perte conjointe de l'*Axin1* et de RSK2 par rapport à l'accumulation de dépôts lipidiques dans le foie. En effet, dans les modèles précédents, les animaux présentaient de la stéatose dans de plus grandes proportions, et ce même à seulement 6 mois de protocole, mais ont reçus un traitement avec une ou plusieurs molécules chimiques (DEN seul ou associé au phénobarbital) ce qui n'est pas le cas dans ce modèle.

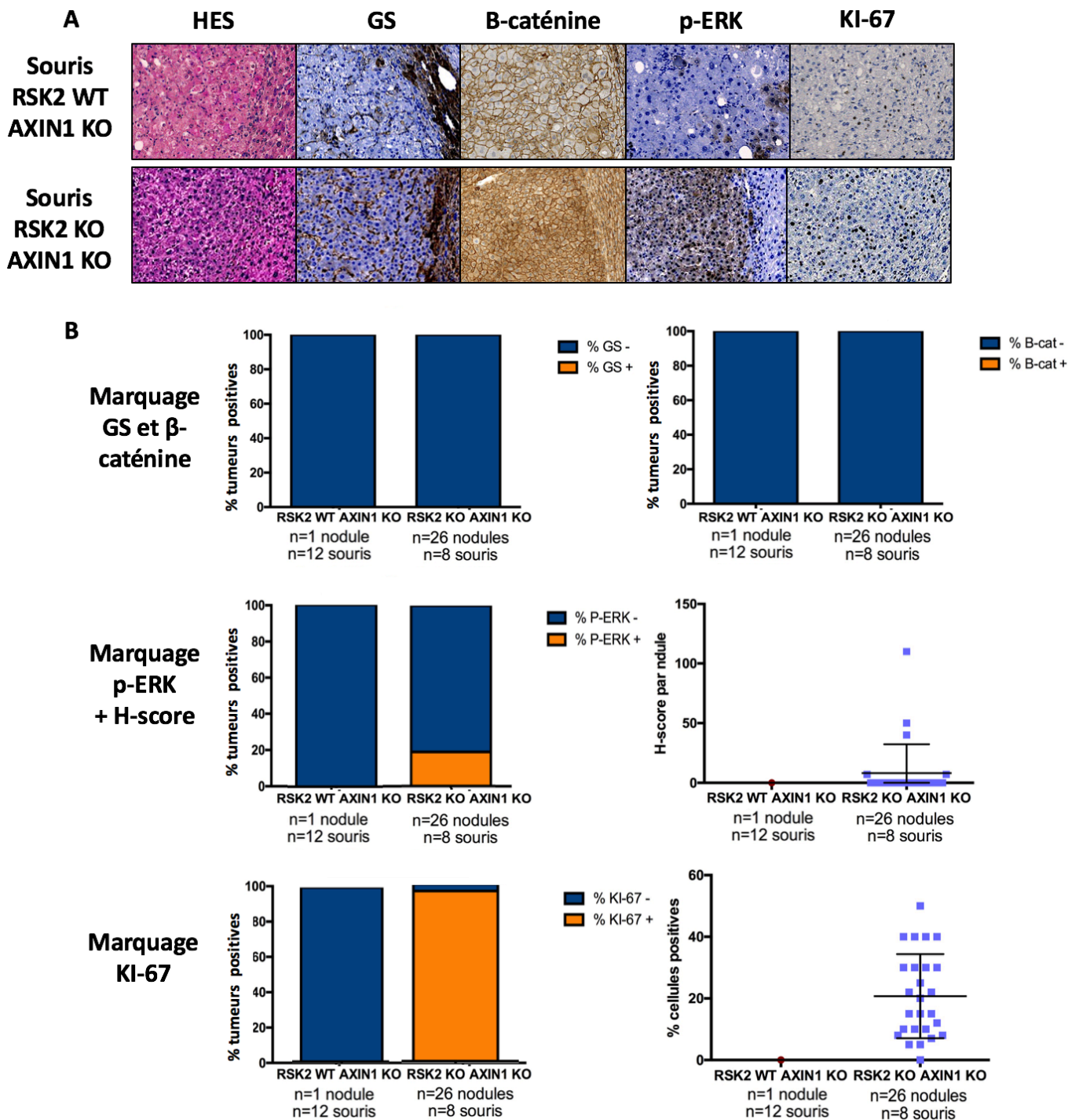


Figure 29 : Analyses histologiques et immunohistochimiques réalisées sur les foies de souris RSK2 WT ou KO, prélevés à 12 mois post-inactivation de l'Axin1. A) Observation des lames colorées en HES ou IHC (détection de la Glutamine Synthétase, de la β -caténine, de la forme phosphorylée de ERK et du marqueur de prolifération KI-6. B) Pourcentage de tumeurs positives au marquage considéré, additionné du H-score calculé par nodule (pourcentage de cellules positives x intensité du marquage) pour le marquage p-Erk, et du pourcentage de cellules exprimant KI-67 au sein de chacune des tumeurs. Les effectifs des groupes et du nombre de tumeurs sont précisés. Aucun test statistique n'a pu être réalisé puisque l'un des groupes ne dispose que d'une seule valeur (un seul nodule pour le groupe RSK2 WT AXIN1 KO). La moyenne et les écart-types sont présentés lorsque c'est possible.

De façon intéressante, toutes les tumeurs obtenues dans ce troisième modèle présentent un marquage GS et β -caténine nucléaire négatif (figure 29), suggérant qu'il n'y a à priori pas d'activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine et ce même en l'absence de l'AXIN1. Étant donné le rôle de régulateur négatif l'AXIN1 dans cette voie, une activation aberrante aurait été plutôt attendue. La plupart des souris inactivées pour les deux gènes d'intérêt présentent au moins une tumeur positive à la détection de la forme phosphorylée de ERK (ce qui représente 20% des tumeurs obtenues pour ce génotype), et la quasi-totalité des nodules présentent un fort marquage KI-67 positif (95% des tumeurs, avec une moyenne de 20% de cellules tumorales présentant un immunomarquage positif), ce qui n'est pas le cas pour le génotype muté pour l'*Axin1* seul. Cependant, une seule tumeur s'est développée dans notre modèle pour ce génotype, on ne peut donc rien conclure. De plus, du fait du manque de puissance des résultats, aucune différence immunohistochimique significative n'a été mise en évidence entre les souris double mutées et les souris mutées seulement pour l'*Axin1*. Les analyses statistiques n'ont d'ailleurs pas pu être réalisées dans certains cas puisqu'il est impossible de comparer avec une valeur unique. Ces résultats sont donc à interpréter prudemment, car il n'est pas exclu qu'ils aient pu être différents si l'on avait obtenu plus de tumeurs pour le génotype *Axin1* KO.

L'implication de la perte simultanée de RSK2 et de l'AXIN1 dans la carcinogénèse hépatique est cependant indéniable puisque c'est le seul génotype pour lequel nous avons obtenu de multiples tumeurs. Les résultats obtenus suggèrent une forte coopération oncogénique entre l'inactivation de RSK2 et de l'*Axin1*, en accord avec les observations réalisées dans les CHC humains. Cette coopération pourrait impliquer l'activation de la voie Ras/MAPK mais, de façon plus surprenante, n'implique pas une activation évidente de la voie Wnt/ β -caténine puisque les tumeurs développées sont GS et β -caténine négatives en immunohistochimie, bien que certaines présentent un marquage positif pour la forme phosphorylée de ERK (20% des tumeurs murines analysées soit 1 CHC sur 5).

c) Interprétation des résultats :

Les résultats obtenus pour ce troisième et dernier modèle de coopération, en contexte de carcinogénèse spontanée, montrent clairement une coopération oncogénique entre l'inactivation de RSK2 et l'inactivation de l'AXIN1, qui promeuvent ensemble un développement tumoral dans le foie plus important. Néanmoins, dans l'étude originale du Dr Dale, une incidence tumorale de 55% avait été observée à un an dans le modèle d'inactivation de l'AXIN1 seule (Feng *et al*, 2012), alors que dans notre étude l'incidence tumorale au même temps et dans le même modèle n'est que de 8%. Cette différence peut être expliquée par les variabilités relatives aux conditions d'élevage (régime, hébergement) et d'exécution technique, qui diffèrent d'un laboratoire à un autre et peuvent impacter considérablement les résultats obtenus (Servick, 2016 ; Stappenbeck, Virgin, 2016 ; Franklin, Ericsson, 2017). En revanche, l'hépatomégalie traduite par un ratio du poids du foie sur le poids total des souris plus élevé a bien été retrouvée chez les souris inactivées pour l'AXIN1, quel que soit leur génotype pour RSK2, en accord avec la littérature précédemment citée (Feng *et al*, 2012). Dans cette étude, de nombreux gènes de prolifération associés au cycle cellulaire ont été décrits comme surexprimés dans les foies sains des souris présentant une inactivation du gène *Axin1*, suggérant une prolifération accrue des hépatocytes qui pourrait expliquer l'hépatomégalie constatée. Cette hypothèse est cohérente avec l'expression du marqueur de prolifération KI-67 dans les tumeurs retrouvées chez les souris double mutées (bien que le

marqueur n'ait pas été retrouvé dans l'unique tumeur obtenue en contexte *Axin1* KO), une prolifération accrue des hépatocytes pouvant être le point de départ d'une initiation tumorale.

De façon surprenante, aucune des tumeurs développées dans nos souris inactivées pour l'*Axin1* ne présentent d'immunomarquage positif ni à la GS ni à la β -caténine, suggérant que la voie Wnt/ β -caténine n'est pas activée dans ces tumeurs. Ces résultats sont étonnants car l'AXIN1 fait partie du complexe de dégradation de la β -caténine et il était donc plutôt attendu que sa perte de fonction dans le foie conduise à l'activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine, de la même façon que dans les modèles murins d'inactivation d'APC (qui fait également partie du complexe de dégradation de la β -caténine) qui activent fortement cette voie (Colnot *et al*, 2004). Cependant, des résultats similaires ont déjà été décrits dans plusieurs articles de la littérature (Feng *et al*, 2012 ; Abitbol *et al*, 2018), et dans les CHC humains, les tumeurs inactivées pour l'AXIN1 n'expriment que faiblement les marqueurs d'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Sato *et al*, 2000 ; Zucman-Rossi *et al*, 2007). Nous avons exploré l'implication de cette voie, en coopération avec la perte de RSK2, de deux façons différentes, mais il a été démontré que la perte de fonction de l'AXIN1 n'était pas égale au gain de fonction de la β -caténine au sein de la cascade de signalisation (Zucman-Rossi *et al*, 2007). Les deux types de mutations ont donc des effets qui leur sont propres, ce qui explique les profils différents que nous avons obtenus en fonction du modèle considéré.

Concernant la voie Ras/MAPK, certaines souris inactivées à la fois pour le gène *Rps6ka3* et pour le gène de l'*Axin1* présentent un immunomarquage plus important de la forme phosphorylée de ERK dans les tumeurs comparé au foie non-tumoral environnant, mais ce n'est pas systématique. Cela concerne en effet plutôt les très grosses tumeurs visibles à l'œil nu, suggérant qu'un évènement supplémentaire indépendant de la perte de RSK2 pourrait promouvoir le développement tumoral et la phosphorylation de ERK. On peut donc supposer que la voie Ras/MAPK peut jouer un rôle important dans la carcinogenèse chez les animaux doublement inactivés, mais seulement dans un contexte spécifique qui n'est pas encore déterminé. Les animaux double mutés présentent des tumeurs avec une fréquence plus importante que ceux inactivés pour l'AXIN1 uniquement, et aucune tumeur n'a été identifiée chez les animaux sauvages ou inactivés pour RSK2 seul ; cela suggère une coopération oncogénique entre les inactivations des gènes *Rps6ka3* et de l'*Axin1* dans la promotion tumorale hépatique. De façon intéressante, dans ce modèle de double inactivation, une activation de la voie Ras/MAPK pourrait être impliquée dans certains cas mais aucune tumeur ne montre en revanche d'activation évidente de la voie Wnt/ β -caténine.

III- Études fonctionnelles de la perte de RSK2 et/ou AXIN1 :

De jeunes animaux non-traités (donc tissu hépatique sain) issus de notre propre élevage ont été utilisés afin de mettre en évidence les conséquences de la perte de RSK2, de l'AXIN1 ou des deux simultanément, dans le foie à différents stades de maturation du foie (2 ou 6 semaines). L'exploration des conséquences fonctionnelles dues à l'inactivation de RSK2 dans notre modèle murin, ainsi que les dérégulations induites par l'inactivation simultanée de *Rps6ka3* et de l'*Axin1*, ont été réalisées grâce à des techniques d'immunohistochimie, de Western Blot capillaire, et de RT-Q-PCR afin d'étudier les profils histologiques, protéiques et transcriptomiques des différents génotypes d'animaux.

Les groupes d'animaux sacrifiés à 6 semaines sont les mêmes que pour le protocole de carcinogénèse spontanée : souris WT, RSK2 KO seul, AXIN1 KO seul ou RSK2 et AXIN1 KO. Afin d'inactiver le gène de l'*Axin1*, grâce à l'induction de l'enzyme Cre, tous les animaux ont été injectés avec du BNF (en IP, 4 jours consécutifs à la même dose que précédemment) à 5 semaines. L'autopsie ayant lieu 7 jours après le début de ce traitement, nous devrions observer les conséquences précoces dues à la perte de l'AXIN1, contrairement à la perte de la protéine RSK2 qui est ubiquitaire. Tous les groupes ayant reçu du BNF, un potentiel effet biologique de cette substance devrait être gommé. Les groupes à 6 semaines sont constitués de six individus pour chaque génotype.

Des animaux encore plus jeunes ont été utilisés à 2 semaines d'âge, mais seul deux génotypes pourront être comparés (souris sauvages ou RSK2 KO) puisque le jeune âge des souriceaux ne permet pas de leur administrer le traitement entraînant l'inactivation conditionnelle de l'*Axin1* (injections répétées réalisées sur 4 jours consécutifs et donc trop éprouvant pour de si petits animaux). L'effet de la perte de RSK2 dans des conditions de stress cellulaire a également été exploré grâce à l'administration de DEN (dose de 90 mg/kg en intrapéritonéal) suivi du sacrifice des animaux 24 heures après l'injection (groupes de 5 à 6 souris). Un groupe d'animaux sans traitement au DEN a été utilisé comme contrôle.

1) Conséquences histologiques et immunohistochimiques de la perte de RSK2 et/ou AXIN1 :

Dans un premier temps, la structure histologique des tissus hépatiques des animaux a été vérifiée, afin de confirmer qu'ils présentent tous une architecture normale, quel que soit le génotype et/ou le protocole considéré. Ceci a bien été validé et aucune anomalie cellulaire ou tissulaire n'a été constatée. Pour les animaux âgés de 6 semaines (on considère le foie mature), les espaces portes sont dénombrés ainsi que les canaux biliaires, et la taille (diamètre en μm) de ces derniers estimée. Les structures hépatiques sont présentes en quantités similaires entre les différents génotypes (figure 30) puisque le nombre moyen d'espaces portes hépatiques et de canaux biliaires sont équivalents quel que soit le groupe considéré, en revanche des différences significatives sont mises en évidence lors de la mesure du diamètre des canaux biliaires. En effet les animaux délétés pour l'*Axin1* semblent présenter de plus gros canaux que les animaux sauvages ou RSK2 KO. Les animaux double mutés suivent la même tendance (les diamètres moyens des canaux sont très proches) mais celle-ci semble un peu moins prononcée.

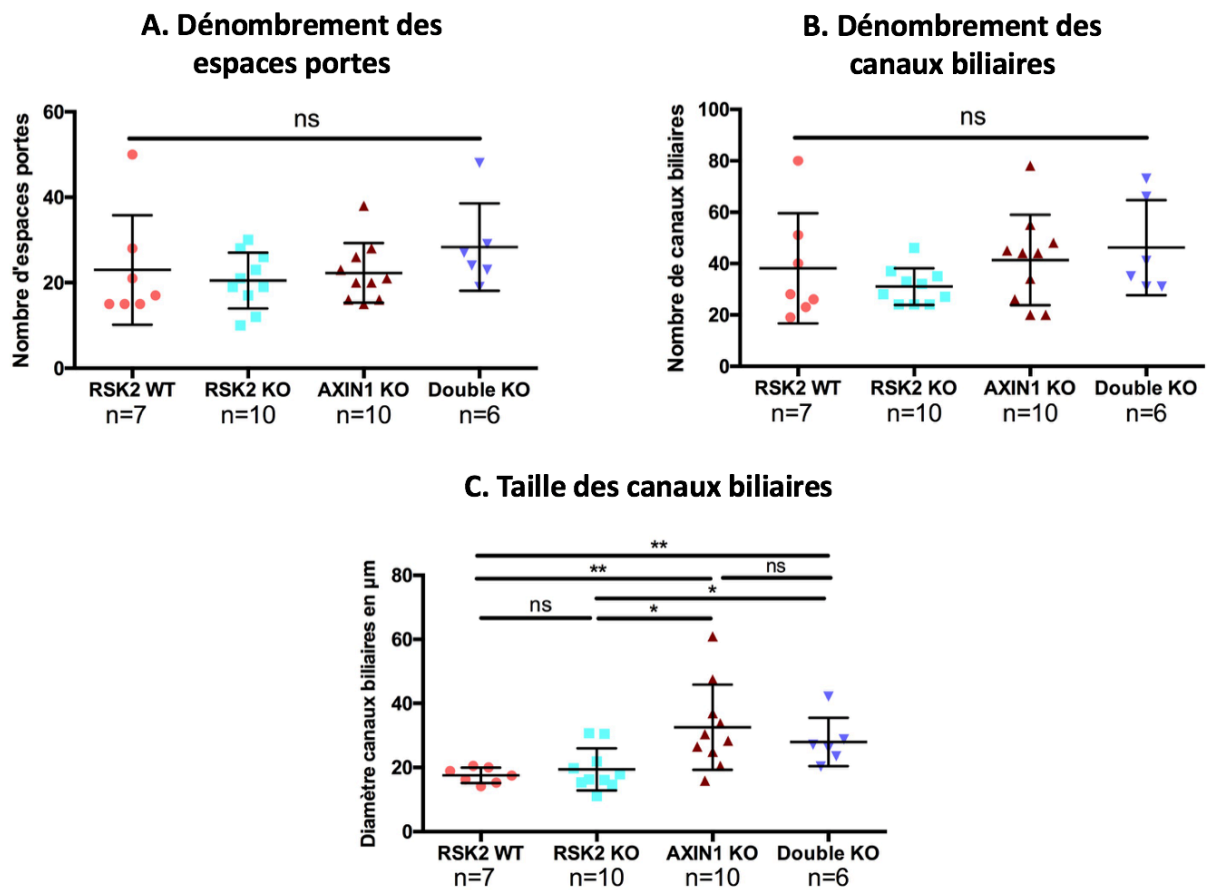


Figure 30 : Analyses histologiques structurales des foies sains des animaux âgés de six semaines (génotype sauvage, délété pour RSK2, pour l'AXIN1, ou pour les deux protéines simultanément). Numération des espaces porte (A) et des canaux biliaires (B) dans le tissu hépatique, estimation du diamètre des canaux biliaires en μm (C). Les groupes sont comparés deux à deux, en utilisant les tests de Student ou de Mann-Whitney selon les cas (distribution des échantillons suivant la loi normale ou non), moyenne + écart-type représentés. Ns = différence entre les groupes non-significative, * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$).

Des analyses immunohistochimiques sont ensuite réalisées, toujours sur les animaux âgés de 6 semaines, avec la recherche du marqueur de prolifération KI-67 et du marqueur de différenciation cellulaire cytokératine 7 (CK7), afin de tenter de mettre en évidence d'éventuelles modifications des caractéristiques de renouvellement du foie en contexte muté pour RSK2 et/ou Axin1 (figure 31). Les cellules progénitrices hépatiques sont généralement situées dans des niches proches des canaux biliaires et portent le marqueur CK7 à leur surface (les cytokératines sont des protéines des filaments intermédiaires du cytosquelette, spécifiques des cellules épithéliales). Elles sont capables de se différencier en hépatocytes ou cholangiocytes (cellules des canaux biliaires), perdant alors ce marqueur qui est spécifique des cellules ovales (principales cellules progénitrices retrouvées dans le foie). La CK7 est retrouvée dans les épithéliums glandulaires et canaux, et peut être détectée dans certains cancers. Dans le foie, on retrouve une stimulation des cellules progénitrices présentant la CK-7 dans le cadre d'agressions sévères des tissus (cirrhose, stéatohépatite) afin de renouveler le tissu hépatique endommagé. Le marqueur KI-67 sera quant à lui retrouvé dans les cellules en cours de division, et reflète donc l'activité proliférative des cellules du tissu hépatique. A l'état

basal, les hépatocytes prolifèrent peu car leur durée de vie est très longue (jusqu'à 500 jours) et le marqueur KI-67 est donc peu retrouvé dans les tissus. En revanche en cas d'agression ou d'hépatectomie, 75% du foie total peut être renouvelé en seulement quelques mois chez l'homme.

Les animaux sauvages et délétés pour RSK2 présentent un taux de cellules marquées par l'anticorps dirigé contre KI-67 très faible, alors que le taux moyen de cellules marquées est de 20% pour les animaux délétés pour l'*Axin1*, et approche les 40% pour les des animaux double mutés. Ces différences sont significatives et confirment que la perte d'expression de l'AXIN1 est suivie par une augmentation de la prolifération cellulaire dans un foie censé être mature, expliquant notamment l'hépatomégalie constatée dans ce génotype à différents âges. La perte conjointe de RSK2 et AXIN1 semble accentuer ce phénotype, bien que la perte constitutive de RSK2 seul n'entraîne pas de prolifération excessive des hépatocytes. Le nombre de cellules progénitrices ovales, identifiées grâce à l'expression de la CK7, semble significativement plus élevé dans les espaces portes des tissus prélevés chez les souris délétés pour RSK2 ou double mutées, à l'inverse des observations précédentes.

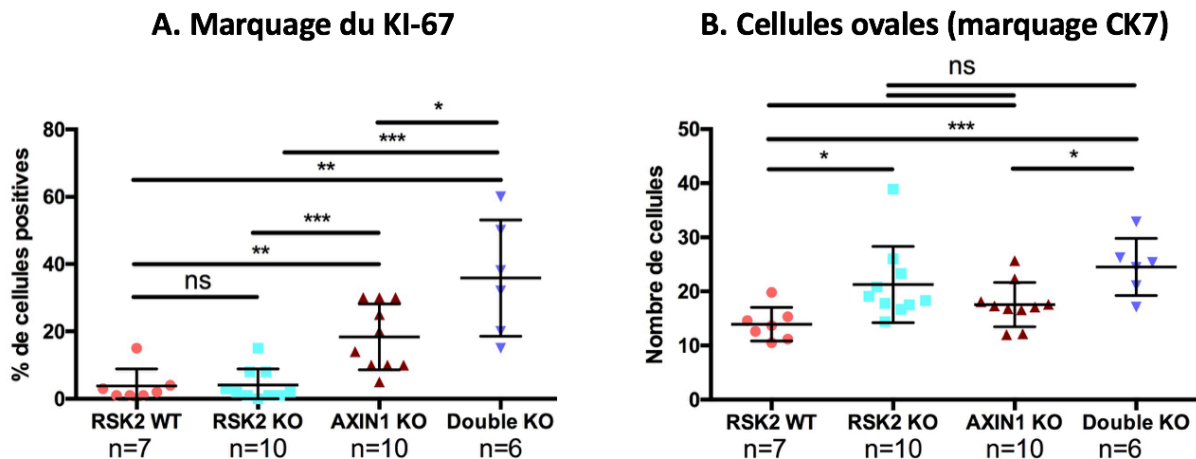


Figure 31 : Analyses immunohistochimiques réalisées sur les souris sauvages ou mutées pour un ou deux gènes d'intérêt à 6 semaines d'âge, dans du tissu hépatique sain.

Marquage du KI-67 exprimé en pourcentage de cellules positives (A), numération des cellules ovales en utilisant le marquage de la cytokératine 7 (CK7) (B). Les groupes sont comparés deux à deux, en utilisant les tests de Student ou de Mann-Whitney selon les cas (distribution des échantillons suivant la loi normale ou non), moyenne + écart-type représentés. Ns = différence entre les groupes non-significative, * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$), *** = différence significative ($p < 0,0005$).

Les animaux double mutés à la fois pour RSK2 et pour l'*Axin1* semblent donc présenter une prolifération cellulaire accrue, couplée à un élargissement des canaux biliaires et une augmentation de la proportion de cellules ovales (progéniteurs hépatiques bipotents) dans le foie, en accord avec les observations réalisées à 12 mois post-inactivation de l'*Axin1* dans le protocole de carcinogénèse spontanée. En effet ce phénotype est en faveur de l'apparition de tumeurs, observées majoritairement dans ce groupe, puisqu'une prolifération excessive peut empêcher les mécanismes de réparation de l'ADN de fonctionner de façon optimale, favorisant ainsi le processus d'initiation tumorale. De plus, les cellules progénitrices telles que

les cellules ovales sont impliquées dans le développement de certains types CHC issus de cellules souches hépatiques (Fang *et al*, 2004 ; Wang, Sun, 2018), renforçant cette hypothèse. L'expression de la protéine p53, fortement impliquée dans les processus de réparation, de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, a été par la suite analysée de façon à explorer l'hypothèse déjà décrite dans la littérature qui suggère un lien entre l'activation de p53 et RSK2 (Lim *et al*, 2013).

2) Conséquences sur l'expression de cibles protéiques :

Afin de vérifier la perte d'expression de nos protéines d'intérêt, RSK2 et AXIN1 sont recherchés par Western Blot capillaire (automate Jess) dans les lysats protéiques issus des prélèvements hépatiques réalisés sur nos quatre groupes d'animaux sacrifiés à 6 semaines (génotypage de RSK2 réalisé en PCR classique pour les animaux sacrifiés à deux semaines). La perte de l'expression des protéines est effectivement constatée dans les groupes concernés, validant ainsi les génotypes attendus (résultats présentés en annexe 8). Les formes totales et phosphorylées de la protéine ERK, ainsi que la protéine p53, sont également recherchées, et les résultats montrés ci-après. Les conditions utilisées ainsi que les références des anticorps sont listées en annexe 5, et les résultats normalisés par rapport à la quantité totale de protéines dans les échantillons (déterminée grâce à l'utilisation d'un kit spécifique).

a) Phosphorylation de ERK : La présence des formes totales et phosphorylées de la protéine ERK, impliquées dans la voie Ras/MAPK et connues pour être un des effecteurs de RSK2, est analysée dans les tissus hépatiques de nos souris, et des différences significatives ont été mises en évidence entre les différents génotypes (figure 32). Pour la forme totale de ERK, son expression est significativement diminuée dans les souris inactivées pour RSK2, par rapport aux animaux sauvages ou inactivées pour l'AXIN1 seule. En revanche, la différence observée n'est pas significative si l'on compare avec les résultats obtenus avec le groupe double muté, probablement à cause de la dispersion assez importante des résultats et du manque de puissance de l'effectif (seulement 5 valeurs pour ce groupe, l'analyse n'ayant pas fonctionné pour une des souris) car ils semblent tout de même plus élevés. En ce qui concerne la forme phosphorylée de ERK, elle semble augmentée pour le groupe délété pour RSK2 ; la différence observée est significative entre les souris RSK2 KO et les souris AXIN1 KO ou double mutées, mais pas avec les souris sauvages. Le résultat obtenu pour ces dernières est également significativement différent par rapport aux deux derniers génotypes. La perte de l'AXIN1, seule ou conjointe à celle de RSK2, semble donc diminuer la phosphorylation de ERK, alors qu'elle semble à l'inverse être augmentée dans le cas de la perte de RSK2 (bien que le résultat ne diffère pas significativement de celui obtenu pour le génotype sauvage).

Enfin, le ratio réalisé entre la forme phosphorylée et la forme totale de ERK permet de quantifier le niveau d'activation de ERK. Cette analyse met en évidence une réelle augmentation du ratio pour le groupe de souris délétées pour RSK2 par rapport aux trois autres génotypes, de façon fortement significative. Les résultats obtenus pour les autres groupes ne sont pas significativement différents entre eux. La perte de RSK2 entraîne donc bien une dérégulation de la voie Ras/MAPK, qui se traduit par une augmentation de la phosphorylation de ERK et donc de l'activation de la voie. Néanmoins cette observation n'est étonnamment pas retrouvée lorsque la perte de RSK2 est associée à celle de l'AXIN1. L'analyse étant réalisée peu de temps après l'inactivation de cette dernière (quatre jours seulement),

on peut supposer que cela entraîne divers effets biologiques pour le moment non identifiés, qui masqueraient transitoirement les effets de la perte constitutive de RSK2. Pour confirmer cette hypothèse, une analyse à un âge plus avancé (temps plus éloigné de l'inactivation de l'*Axin1*) aurait été nécessaire, mais nous ne disposons pas de ces échantillons. Seuls les animaux inclus dans le protocole de carcinogénèse spontanée et âgés de 10,5 mois pourraient être utilisés pour tester cette hypothèse. Un temps intermédiaire de 6 ou 7 mois aurait par exemple mieux complété l'analyse.

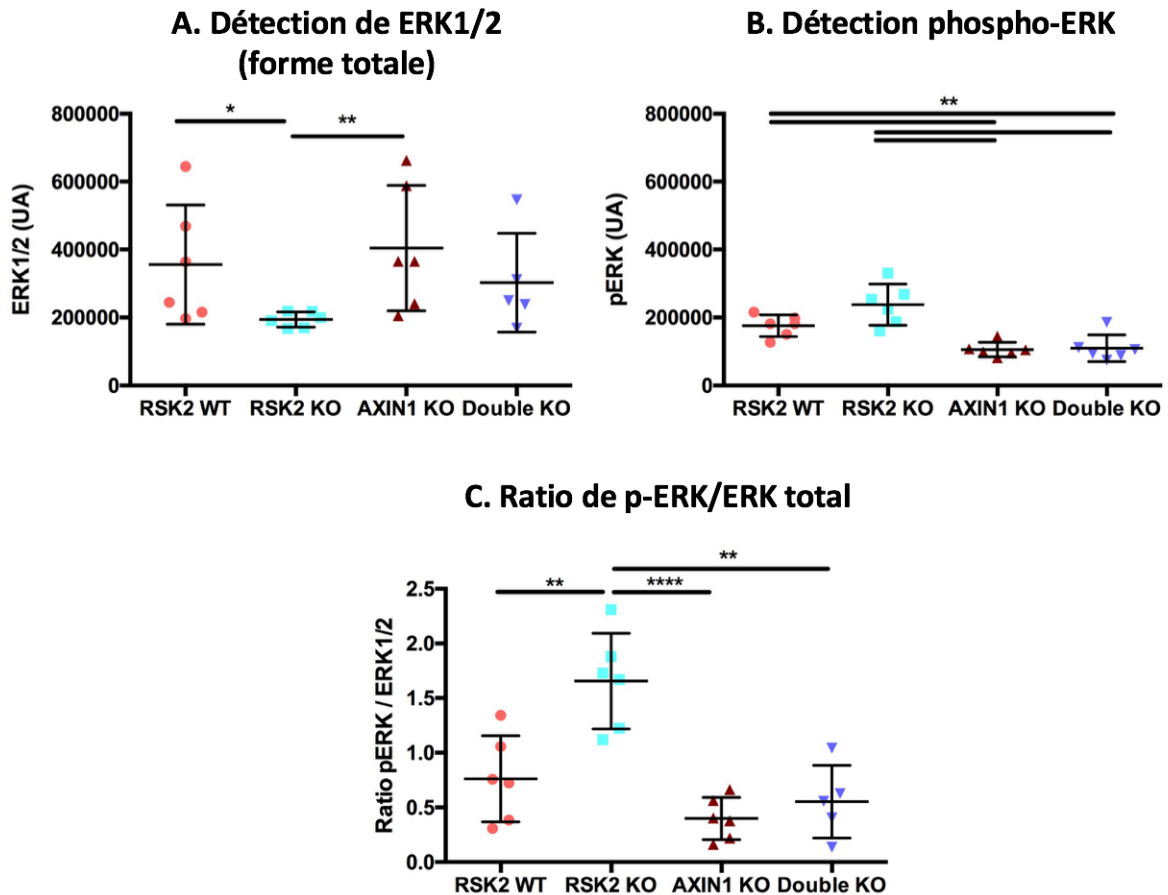


Figure 32 : Analyses protéiques des formes totales et phosphorylées de ERK. Détection des protéines ERK1/2 (A) et phospho-ERK (B) en Western-Blot capillaire, additionnées du calcul du ratio de la quantité des deux formes (C) dans le tissu hépatique sain de souris âgées de 6 semaines. Unité arbitraire (UA) calculé par le logiciel d'analyse de l'automate = aire sous le pic de détection de la protéine. Les groupes sont comparés deux à deux, en utilisant les tests de Student ou de Mann-Whitney selon les cas (distribution des échantillons suivant la loi normale ou non), moyenne + écart-type représentés. * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$), **** = différence significative ($p < 0,0001$).

b) Régulation de p53 : La détection de l'expression protéique de p53 est réalisée dans un premier temps chez les groupes de souris âgées de 6 semaines, puis chez les souris de deux semaines en présence ou en absence de DEN (24 heures d'exposition avant le sacrifice) (figure 33). L'exposition au DEN nous permet d'analyser l'effet de la perte de RSK2 sur la régulation de p53, dans une situation de stress génotoxique lorsque p53 est activée, nous permettant ainsi de démasquer un effet qui ne serait pas visible dans des conditions basales où p53 est

très peu active. A six semaines, la seule différence significative mise en évidence est entre les groupes de souris RSK2 KO et AXIN1 KO. Bien que non significative avec les autres groupes, une baisse de l'expression de p53 semble tout de même être observée dans les tissus des animaux délétés pour RSK2. En effet, toutes les moyennes des résultats pour les autres groupes sont plus élevées, bien que les résultats soient particulièrement hétérogènes pour les souris double mutées. Il est donc difficile de conclure quant à la régulation de p53 par la perte de RSK2 et/ou AXIN1 avec cette technique.

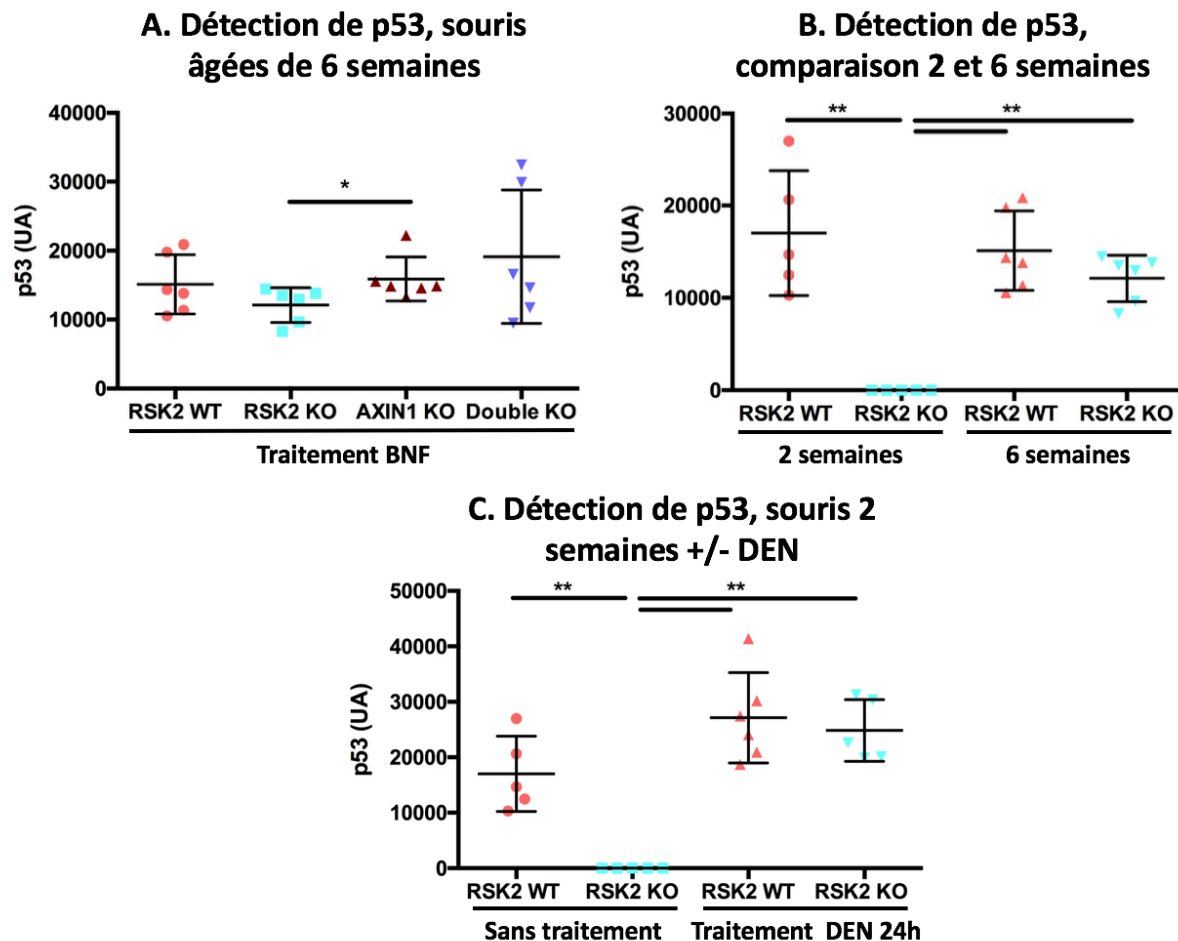


Figure 33 : Analyse protéique de p53 dans le tissu hépatique sain de souris âgées de 2 ou 6 semaines, avec ou sans traitement au BNF. Détection de la protéine p53 en Western-Blot capillaire, chez les souris âgées de 6 (A et B) ou 2 semaines (B et C), en présence ou en absence de DEN injecté 24 heures avant le sacrifice (C). Unité arbitraire (UA) calculé par le logiciel d'analyse de l'automate = aire sous le pic de détection de la protéine. Les groupes sont comparés deux à deux, en utilisant les tests de Student ou de Mann-Whitney selon les cas (distribution des échantillons suivant la loi normale ou non), moyenne + écart-type représentés. * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$).

A deux semaines d'âge et en présence de DEN, on observe des résultats similaires dans les deux groupes, exprimant ou non RSK2. En revanche, en contexte physiologique, la perte de RSK2 entraîne une extinction totale de l'expression de p53. L'administration de DEN, en contexte sauvage, semble augmenter l'expression de p53 bien que la différence ne soit pas significative. La perte de RSK2, en l'absence de stress génotoxique, induit une diminution du

niveau de p53 qui pourrait être due à une augmentation de la dégradation de p53 par le protéasome, en accord avec la littérature qui démontre que RSK2 est capable de phosphoryler (en position Ser15), d'activer et de stabiliser p53 (Cho *et al*, 2005). Cependant, la perte de RSK2 n'affecte pas le niveau de p53 en présence de DEN dans notre modèle, ce qui est inattendu et contraire aux observations réalisées *in vitro* dans une précédente étude en présence d'un stress génotoxique induit par un traitement à la doxorubicine (Lim *et al*, 2013). Il semble donc que la perte de RSK2, au sein d'un organisme entier et en présence d'un stress génotoxique, soit compensé par d'autres mécanismes biologiques afin d'activer p53 et tenter de maintenir l'intégrité du tissu hépatique. Cette hypothèse pourrait également expliquer en partie les résultats peu différents obtenus chez les souris âgées de 6 semaines (foie mature ayant « compensé » la perte de RSK2 par des voies alternatives). Il est également envisageable que l'effet du DEN soit plus fort que celui dû à l'inactivation de RSK2, et masque les différences éventuelles. De plus, le foie des souris âgées de 6 semaines étant plus mature et donc moins proliférant, on pourrait penser que le taux d'expression basale de p53 serait plus faible qu'à 2 semaines, où les hépatocytes prolifèrent activement et ont besoin de maintenir l'intégrité de leur génome, mais aucune différence significative n'a été mise en évidence chez les souris sauvages. Seules les souris RSK2 KO âgées de 2 semaines et sans traitement génotoxique présentent un taux de p53 significativement diminué (figure 33).

3) Conséquences sur l'expression des ARN messagers :

L'expression de dix gènes d'intérêt, choisis suite à des analyses préliminaires réalisées sur des données de transcriptomique (résultats non présentés) ont été dosés par RT-Q-PCR grâce à la technologie Taqman, à partir des ARN extraits des tissus hépatiques des souris âgées de 6 semaines (figure 34). Nous nous sommes particulièrement intéressés au reflet de l'expression de deux catégories de gènes : les marqueurs des cellules progénitrices (*CK7* et *CK19* codant les cytokératines correspondantes, *PROM1* qui est un marqueur de cellules souches pro-tumorales (Wu *et al*, 2020), *THY1* aussi appelé *CD90*, et *CD34* qui sont tous deux des marqueurs bien connus de cellules souches hématopoïétiques), et les gènes impliqués dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire (*Mki67* comme marqueur de prolifération, *GPC3* qui est très exprimé dans les CHC et régule la voie Wnt (Gao et Ho, 2011), *AURKA* et *CDC20* qui sont très impliqués dans la division cellulaire et peuvent avoir un effet oncogénique (Wang *et al*, 2013 ; Du *et al*, 2021), et *CDKN1A* qui code la protéine P21 dont l'expression est induite par p53), en accord avec les cibles recherchées grâce aux autres techniques développées en amont. Il s'agit de gènes souvent étudiés dans les tissus hépatiques (sains ou tumoraux), de façon à analyser les capacités de différenciation et la prolifération des foies obtenus de nos différents groupes d'animaux. Les niveaux des ARNm ont été normalisés sur celui d'un gène de ménage : l'ARN 18S qui est connu pour avoir une expression relativement constante et varie peu dans les cellules. Nous avons également essayé de normaliser les résultats sur ceux obtenus pour le gène de ménage de l'actine B (*ACTB*), mais le niveau des ARNm pour ce gène varie énormément dans les hépatocytes contrairement à celui de l'ARN 18S.

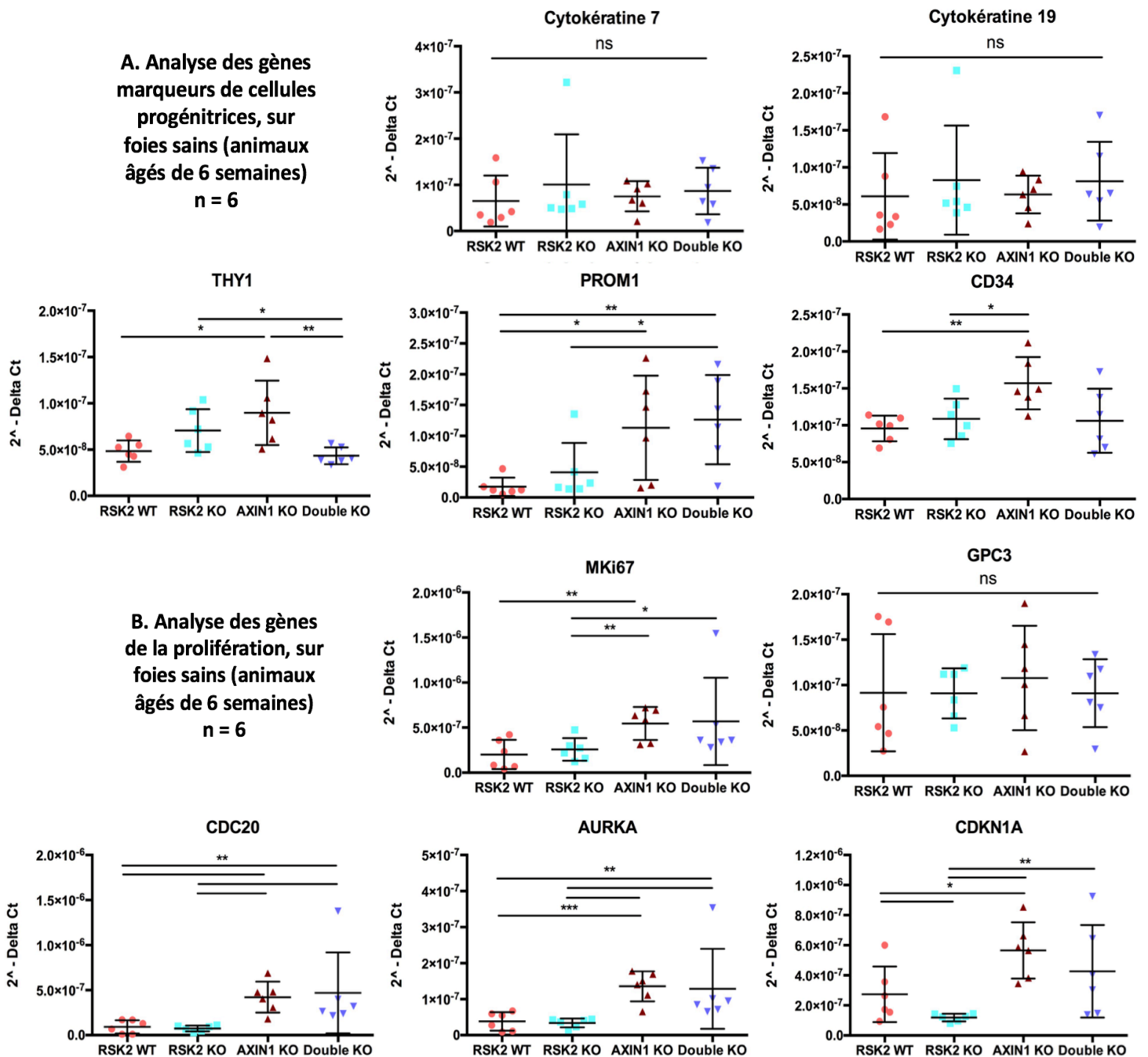


Figure 34 : Analyse par RT-Q-PCR des niveaux d'ARNm reflétant l'expression de gènes marqueurs de cellules progénitrices (A) ou impliqués dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire (B), dans le tissu hépatique sain de souris âgées de 6 semaines. Gènes marqueurs de cellules progénitrices : cytokératine 7 (CK7) et 19 (CK19), THY1, PROM1 et CD34 ; gènes de la prolifération : Mki67, GPC3, CDC20, AURKA, CDKN1A. Les groupes sont comparés deux à deux, en utilisant les tests de Student ou de Mann-Whitney selon les cas (distribution des échantillons suivant la loi normale ou non), moyenne + écart-type représentés. Ns = différence entre les groupes non-significative, * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$), * = différence significative ($p < 0,0005$).**

Le dosage du niveau des ARNm reflétant l'expression des cytokératines *CK7* et *CK19* n'a mis en évidence aucune différence significative entre les différents groupes, alors qu'en IHC le marquage protéique de la *CK7* (utilisé pour dénombrer les cellules ovales) était augmenté dans le groupe *RSK2 KO* et le groupe double muté. Ce résultat, bien qu'allant à l'encontre de celui obtenu en IHC, n'est pas forcément incohérent puisque les mécanismes de régulation des gènes et des protéines ne sont pas les mêmes. Ainsi, même si le niveau des ARNm, reflétant l'expression des gènes, reste similaire entre les différents groupes, des mécanismes plus complexes peuvent intervenir au niveau protéique et provoquer des disparités dans certains groupes (modifications traductionnelles ou post-traductionnelles, phosphorylation des protéines, etc...). Cette hypothèse pourrait donc expliquer en partie la détection de la protéine *CK7* augmentée chez les animaux inactivés pour *RSK2*, seul ou conjointement à *AXIN1*, bien qu'elle ne soit pas retrouvée au niveau moléculaire.

En revanche pour les trois autres marqueurs des cellules progénitrices, le niveau d'expression est augmenté dans les souris délétées pour *Axin1*, seule pour *THY1* et *CD34*, mais aussi conjointement à la perte de *RSK2* pour *PROM1*. Les souris *RSK2 KO* semblent exprimer légèrement plus ces marqueurs par rapport aux souris sauvages, mais la différence n'est pas significative. La hausse de la détection des marqueurs *THY1*, *PROM1* et *CD34* pourrait traduire la présence d'un plus grand nombre de cellules progénitrices dans le foie (telles que les cellules ovales évoquées lors des analyses immunohistochimiques précédentes), notamment dans les souris inactivées pour *Axin1*, voire un plus fort potentiel de différenciation de ces cellules souches pour reconstituer les différents types cellulaires du tissu hépatique en cas d'agression. Cela est toujours cohérent avec l'hépatomégalie mise en évidence chez ce génotype de souris dans le protocole de carcinogénèse spontanée, mais ne concorde pas avec les résultats observés en IHC. L'interprétation de ces résultats est donc délicate, et des régulations différentes ont probablement lieu au niveau protéique. De plus, certains effets de la perte de *AXIN1* semblent être annulés lors de l'inactivation conjointe avec *RSK2*.

Concernant les marqueurs de prolifération, des observations similaires sont mises en évidence pour les gènes *Mki67*, *AURKA* et *CDC20* : leur niveau d'expression est significativement augmenté chez les animaux inactivés pour *AXIN1* ou double mutés, ce qui semble cohérent avec les résultats précédents. Aucune différence n'a pu être mise en évidence pour l'expression du gène *GPC3*. En revanche dans le cas du gène *CDKN1A*, qui code la protéine p21 (régulateur clé du cycle cellulaire et gène cible régulé positivement par p53), l'expression est significativement diminuée chez les souris délétées pour *RSK2*, ce qui pourrait être compatible avec une inactivation fonctionnelle de p53. Cependant, les expériences de Western-Blot ne montrent qu'une légère diminution non significative de l'expression de p53 chez les souris délétées pour *RSK2*. Le lien entre l'inactivation de *RSK2* et l'inactivation de p53 dans notre modèle reste donc à confirmer. P21 étant fortement impliquée dans l'inhibition du cycle cellulaire en cas d'agression, et régulée en partie par l'activation de p53 (Jabbur *et al*, 2000), on aurait pu penser que la perte de *RSK2* inhiberait à la fois p53 et p21, qui est l'une de ces cibles transcriptionnelles. Cependant, *RSK2* régulant de nombreux facteurs de transcription, il est possible que sa perte entraîne un effet sur l'expression de *CDKN1A* de façon indépendante de la protéine p53, qui elle n'est pas diminuée dans ce contexte génétique par rapport au contexte sauvage. Il est en effet connu que p21 puisse être régulé par p53 mais aussi par d'autres mécanismes p53-indépendants (Macleod *et al*, 1995). La perte

de l'AXIN1 semble en revanche augmenter l'expression de *CDKN1A*. La protéine p21 pouvant aussi être régulée de façon post-traductionnelle par phosphorylation ou ubiquitination (Cazzalini *et al*, 2010), on peut également supposer qu'une régulation particulière intervient à ce niveau, bien qu'elle reste à déterminer. Nos résultats ne nous permettent donc pas de conclure sur les mécanismes exacts mis en jeu suite à la perte de RSK2 et/ou l'AXIN1. Chez les souris inactivées pour RSK2 et présentant une transcription diminuée du gène *CDKN1A*, il sera à priori plus difficile en présence d'un stress cellulaire de stopper la progression dans le cycle cellulaire, entraînant ainsi une prolifération accrue des cellules *via* différentes voies de signalisation. Pour rappel, les analyses présentées dans cette partie sont réalisées en conditions physiologiques sur les foies d'animaux sains, mais les observations sont totalement cohérentes avec celles mises en évidence dans les différents protocoles de carcinogénèse décrits précédemment dans le rapport.

Chaque groupe de souris semble posséder un phénotype prolifératif qui lui est propre : dans les cas des animaux délétés pour l'*Axin1* la prolifération semble fortement médiée par les cellules progénitrices (bien que les mécanismes induisant leur activation et leur prolifération soient encore mal connus), alors que pour les animaux délétés pour RSK2 cela semble davantage être lié à des dérégulations des voies contrôlant les mécanismes de prolifération cellulaire. Des analyses complémentaires seraient cependant nécessaires pour confirmer cette dernière hypothèse. Les animaux délétés pour les deux cibles d'intérêt s'avèrent présenter un profil intermédiaire ; cette double perturbation de la prolifération cellulaire est cohérente avec le fait que ces souris développent plus facilement des tumeurs hépatiques par rapport aux autres génotypes.

Des analyses ont également été réalisées sur les foies des souris âgées de 2 semaines (avec ou sans traitement préalable au DEN), avec la recherche de l'expression de *CDKN1A* comme à 6 semaines, mais aussi de *GADD45b* (figure 35) qui est une autre cible transcriptionnelle de p53, et est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN (blocage du cycle en G2) mais aussi dans les processus oncogéniques (Tamura *et al*, 2012). Une différence significative d'expression est mise en évidence pour *CDKN1A* entre les animaux traités au DEN et ceux n'ayant reçu aucun traitement, mais aucune différence significative ne ressort entre les deux génotypes testés, quel que soit le groupe considéré. Concernant l'expression de *GADD45b*, aucune différence significative n'a été mise en évidence. Les résultats obtenus pour le groupe RSK2 KO sans traitement semblent pourtant augmentés, mais la différence n'est pas significative probablement à cause de la très grande dispersion des échantillons.

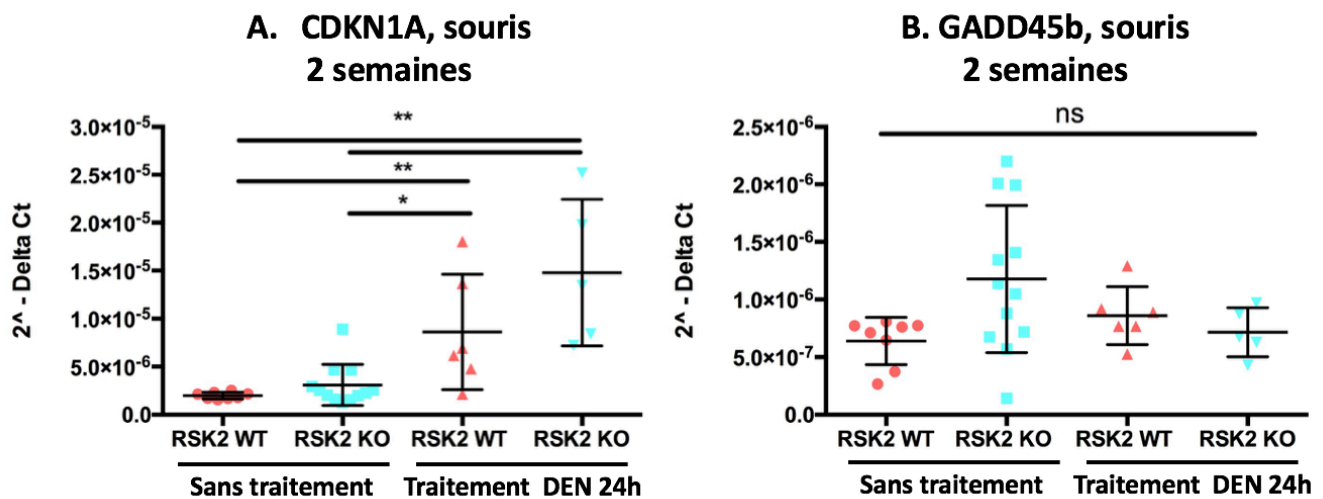


Figure 35 : Analyse par RT-Q-PCR des niveaux d'ARNm reflétant l'expression des gènes cibles de p53 *CDKN1A* (A) et *GADD45b* (B), dans le tissu hépatique de souris âgées de 2 semaines, en présence ou en absence de 24 heures d'exposition préalable au DEN. Les groupes sont comparés deux à deux, en utilisant les tests de Student ou de Mann-Whitney selon les cas (distribution des échantillons suivant la loi normale ou non), moyenne + écart-type représentés. Ns = différence entre les groupes non-significative, * = différence significative ($p < 0,05$), ** = différence significative ($p < 0,005$).

L'injection de DEN semble donc augmenter la transcription du gène *CDKN1A* par p53, en accord avec les observations réalisées lors des analyses protéiques, bien qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en évidence lors de la recherche de p53 excepté pour les animaux RSK2 KO en l'absence de traitement au DEN. En revanche, la transcription du gène *CDKN1A* semble indépendante du génotype car aucune différence significative n'est mise en évidence entre les animaux sauvages et les animaux inactivés pour RSK2, avec ou sans traitement. Sans stress génotoxique, son expression est relativement faible, puisque p53 est en condition physiologique dégradée par le protéasome et ne va donc pas activer ses cibles transcriptionnelles. En condition de stress génotoxique, p53 est phosphorylée et active alors l'expression de plusieurs de ces gènes cible, dont *CDKN1A* (Jabbur *et al*, 2000). Nos résultats semblent donc cohérents avec la littérature, bien que l'expression de *CDKN1A* puisse également être modulée de façon p53-indépendante. Cela pourrait expliquer la présence d'un transcrit chez les animaux RSK2 KO en absence de DEN, chez qui la détection de la protéine p53 est nulle. De plus, une activation de la voie Ras-MAPK, attendue en contexte inactivé pour RSK2, peut également réguler positivement l'expression de *CDKN1A* (Karimian *et al*, 2016), en accord avec nos observations. La voie PI3K/AKT peut également être impliquée dans sa régulation (Karimian *et al*, 2016), et est aussi une des voies potentiellement affectées par la perte de RSK2. Ces analyses devront donc être approfondies afin de mieux comprendre les liens entre l'inactivation de RSK2 et la régulation de la protéine p21, de façon dépendante mais aussi indépendante de p53. La recherche directe de la protéine p21 pourrait également venir compléter ces analyses, puisque les mécanismes de régulation de l'ARN et de protéines ne sont pas les mêmes.

Il est en revanche difficile de conclure quant à l'expression de *GADD45b*, qui ne semble ni modulé par le stress génotoxique induit par l'administration de DEN, ni par la perte de RSK2

chez de jeunes souris. Une augmentation de la transcription était attendue puisque le gène *GADD45b* (ainsi que les autres gènes de la famille *GADD45*) est régulé en condition de stress génotoxique (Tamura *et al*, 2012). Les valeurs obtenues pour les souris non-traitées et inactivées pour RSK2 semblent augmentées par rapport aux souris des autres groupes, bien que la différence soit non-significative. Mais l'expression des gènes cibles de p53 peut varier d'un type cellulaire à l'autre et d'un stress à l'autre, ce qui laisse supposer que les conditions testées ici en sont pas favorables à l'expression de *GADD45b* puisque l'expression de ce gène n'est pas activée dans tous les types cellulaires. Nous avons constaté chez les souris non traitées et inactivées pour RSK2 une perte totale de l'expression protéique de p53, suggérant soit une stimulation de sa dégradation par le protéasome, soit un temps trop précoce dans le développement des animaux pour la détection de p53. Ces résultats sont donc délicats à interpréter et nécessitent des analyses plus poussées. L'expression de *GADD45b* peut cependant être modulée par divers facteurs de transcription, tels que NF- κ B, qui se fixe au niveau du promoteur du gène (Jin *et al*, 2002), ou encore NFY, SP1 et Egr1 (Zumbrun *et al*, 2009), ce qui pourrait expliquer en partie ces résultats. Une régulation des autres membres de la famille (*GADD45a*, *GADD45g*) peut également être envisagée et devrait être explorée, puisque les mécanismes de régulation de ces gènes peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre.

D'autres gènes cibles de p53 pourraient donc être testés afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, ainsi que d'autres facteurs de transcription intervenant sur la régulation de *CDKN1A* et *GADD45b* qui sont très impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. L'expression des autres membres de la famille des gènes *GADD45* pourraient également être analysée.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les mutations inactivatrices du gène *Rps6ka3* seul ne sont pas suffisantes pour entraîner l'apparition de tumeurs hépatiques spontanées, dans notre modèle de souris C57Black/6J, comme démontré lors des études préliminaires. Il semble donc que RSK2 possède un rôle suppresseur de tumeur plutôt modéré dans le foie, et son inactivation doit être associée à un évènement oncogénique supplémentaire ou à l'apparition conjointe de mutations bien spécifiques afin de promouvoir l'apparition de tumeurs hépatiques. Deux modèles de carcinogénèse, induite de façon chimique et donc artificielle ou bien spontanée, ont donc été explorés afin de mettre en évidence *in vivo* les coopérations entre l'inactivation de RSK2 et certaines altérations fréquemment retrouvées dans le CHC.

I- Discussion des résultats obtenus :

1) Modèles de carcinogénèse chimique :

Deux types de modèles différents, mettant en jeu l'apparition de tumeurs hépatiques induite par l'administration de molécules chimiques, ont été mis en place puis analysés. Dans un premier temps, le processus de carcinogénèse a été initié par une substance hépatotoxique et génotoxique bien connue, le DEN, administré seul par une injection unique à des jeunes animaux afin de promouvoir l'apparition de mutations, en particulier dans la protéine B-raf (Connor *et al*, 2018 ; Dow *et al*, 2018) qui est impliquée dans la voie Ras/MAPK. De nombreuses tumeurs hépatiques, bien souvent multiples au sein du foie d'un même animal, ont été constatées suite aux autopsies, dans des proportions équivalentes en contexte génétique sauvage ou délété pour le gène *Rps6ka3* (75-80%). Ce premier résultat est intéressant mais inattendu car notre hypothèse initiale était que les mutations de B-raf, induites par le traitement, iraient amplifier la dérégulation de la voie Ras/MAPK initiée par l'inactivation de la protéine RSK2 dans le groupe de souris RSK2 KO, et augmenterait donc la fréquence d'apparition des CHC chez ces souris. Ça semble être le cas d'après les résultats obtenus en immunohistochimie, mais ce n'est pas suffisant pour augmenter la fréquence d'apparition des tumeurs. Cela semble confirmer que le contexte mutationnel joue un rôle très important dans l'effet oncogénique lié à la perte de fonction de RSK2, et que l'apparition de mutations bien précises est nécessaire pour initier le processus de carcinogénèse. Comme cela a déjà été précisé lors de l'introduction, le contexte de mutation de ce premier modèle est totalement artificiel puisque des mutations conjointes de *Rps6ka3* et B-raf n'ont jamais été mises en évidence dans les cas de CHC humains. On peut aussi supposer que si ces 2 évènements ne sont jamais rencontrés dans les tumeurs, c'est parce qu'ils ne confèrent pas d'avantage sélectif lorsqu'ils sont associés, ce qui pourrait s'expliquer par une redondance fonctionnelle entre l'activation de B-raf et l'inactivation de RSK2. Les tumeurs induites de cette manière expriment le marqueur de prolifération KI-67 de façon très importante, dans environ 80% des nodules quel que soit le génotype considéré, à hauteur de 20% des cellules tumorales. La carcinogénèse ayant été initiée chez des animaux âgés de deux semaines seulement, en pleine croissance et donc possédant des hépatocytes particulièrement prolifératifs afin de former l'organe mature, on peut supposer que l'effet mutagène du DEN est augmenté à cet âge et favorise l'apparition de mutations stables qui seront transmises aux cellules filles, promouvant ainsi le développement de tumeurs lorsque les mutations confèrent un avantage prolifératif sélectif. La voie Ras/MAPK est activée dans la majorité des

tumeurs obtenues pour les deux génotypes, mais de façon significativement plus importante chez les animaux n'exprimant pas RSK2. Les marqueurs d'activation de la voie Wnt/ β -caténine (immunomarquage de la GS et de la β -caténine) sont en revanche très peu détectés au sein des tumeurs, cette voie de signalisation ne semble donc pas particulièrement impliquée dans ce modèle.

En condition de stress hépatique induit par le DEN, la voie Ras/MAPK semble donc particulièrement impliquée dans le développement tumoral, de manière indépendante de la perte de RSK2, bien que l'inactivation de RSK2 dans ce modèle semble potentialiser l'activation de cette voie. Ceci peut être expliqué par le fait que l'inactivation de RSK2 conduit à l'activation de la voie Ras/MAPK suite à la perte du rétrocontrôle négatif qu'il exerce sur la protéine SOS, comme décrit dans plusieurs études (Douville, Downward, 1997 ; Schneider *et al*, 2011 ; Saha *et al*, 2012), alors que B-raf intervient un peu plus en aval dans la cascade de signalisation (à l'intérieur de la boucle) comme présenté dans la figure 36. Ainsi, les mutations activatrices de B-raf pourraient être suffisantes pour maintenir une activation aberrante de la voie de façon constitutive, indépendamment de la perte de RSK2. RSK2 phosphoryle pourtant de nombreux substrats cytosoliques et nucléaires au sein de la voie Ras/MAPK, menant à leur activation ou à leur inhibition et modulant les mécanismes de croissance, de survie et de prolifération cellulaire. Les mutations de *Rps6ka3* et de B-raf ne semblent donc pas coopérer dans la promotion de la carcinogénèse au sein de notre modèle, et les résultats obtenus renforcent davantage le rôle crucial de la surexpression de la voie Ras/MAPK dans l'oncogénèse hépatique initiée par la perte de fonction de RSK2.

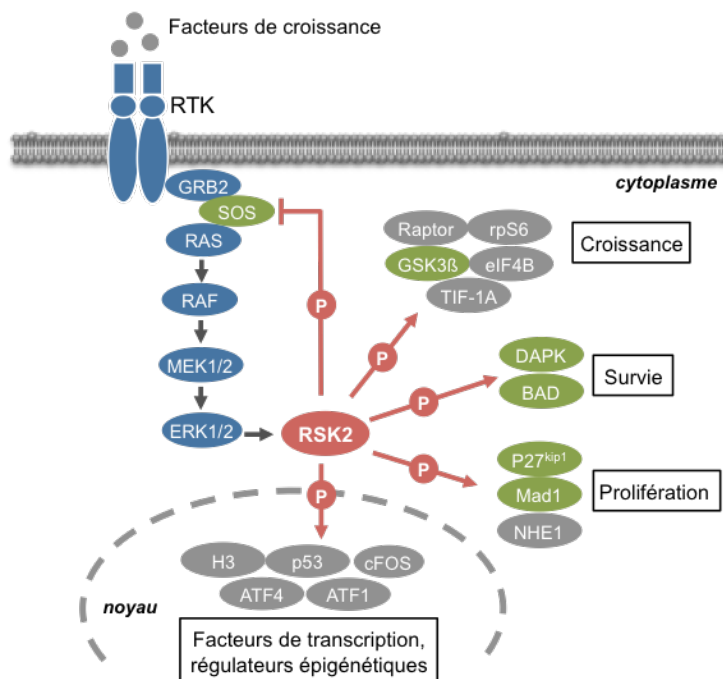


Figure 36 : Détail du rôle de RSK2 au sein de la voie de signalisation Ras/MAPK. Les effecteurs activés par RSK2 sont présentés en gris, et ceux inhibés en vert (figure modifiée d'après Romeo *et al*, 2012).

Dans un second temps, le processus de carcinogénèse induit par le DEN a été potentialisé grâce à l'ajout de phénobarbital dans le protocole, administré *via* l'eau de boisson

tout de suite après l'injection unique de DEN. Les animaux sont utilisés cette fois à l'âge adulte, contrairement à la première modélisation mise en place. Cette combinaison est connue pour favoriser l'apparition de tumeurs présentant des mutations activatrices du gène *Ctnnb1* codant pour la β -caténine (Aydinlik *et al*, 2011 ; Aleksic *et al*, 2011), modélisant ainsi l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les tumeurs et permettant d'explorer la coopération entre l'inactivation de RSK2 et l'activation de la β -caténine. Ce contexte, bien qu'artificiel puisque chimiquement induit, se rapproche beaucoup plus du profil génomique pouvant être retrouvé dans les CHC humains, des mutations conjointes des gènes codant RSK2 et la β -caténine ayant été précédemment mises en évidence lors des études préliminaires. En utilisant ce modèle, une charge tumorale hépatique significativement supérieure a été mise en évidence chez les souris délétées pour RSK2, par rapport aux animaux sauvages (100% vs 50%). Les nodules sont également multiples dans le foie de la plupart des animaux, et comme dans le protocole précédent, une proportion élevée de tumeurs montre un immunomarquage du KI-67 positif (environ 90% pour les deux groupes), traduisant une capacité de prolifération élevée. Cependant, les animaux sauvages présentent un taux moyen de cellules tumorales positives au KI-67 significativement plus élevé (environ 30% contre 15% des cellules pour le génotype RSK2 muté). Dans ce modèle en revanche, de nombreuses anomalies cellulaires sont constatées dans le tissu non-tumoral, ainsi qu'une présence importante de stéatose, sans différence significative entre les deux groupes. On sait que le DEN, administré dans nos deux modèles de carcinogénèse, va induire suite à sa métabolisation des mutations génétiques qui vont être sélectionnées lorsqu'elles confèrent un avantage sélectif aux cellules, ce qui va conduire à la réactivation de mécanismes pro-prolifératifs et au développement tumoral. Or le phénobarbital, ajouté dans le second modèle uniquement, pourrait être à l'origine des atypies cellulaires plus fréquemment observées que dans le modèle DEN seul, et de la stéatose hépatique constatés dans le tissu sain de plus de 75% des animaux, sans distinction évidente du génotype, qui n'avait pas été mis en évidence chez les animaux injectés au DEN seul. Les nombreuses atypies observées dans le tissu sain peuvent d'ailleurs témoigner d'un état précancéreux des cellules.

Concernant l'immunodétection des marqueurs des voies de signalisation, on constate qu'au moins un nodule de chaque souris ayant développé des tumeurs présente un marquage de la forme phosphorylée de ERK augmenté, bien que le pourcentage global d'expression ne soit que de 20 à 30% des tumeurs totales. Cela suggère tout de même une activation de la voie Ras/MAPK dans ce modèle de carcinogénèse, potentiellement augmentée dans les souris RSK2 KO mais de manière non-significative. Les marqueurs d'activation de la voie Wnt/ β -caténine sont en revanche fortement détectés, en accord avec la description initiale du modèle, et encore plus pour les animaux délétés pour RSK2 bien que la différence entre les deux groupes ne soit significative que pour la β -caténine. La perte de RSK2 semble promouvoir l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans ce contexte de mutation du gène *Ctnnb1*, mais des études complémentaires sont nécessaires. Nos résultats suggèrent une coopération entre la perte d'expression de RSK2 et l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans la carcinogénèse hépatique, en accord avec nos hypothèses. Ces résultats sont cependant obtenus dans un contexte artificiel bien qu'*in vivo*, et la transposition avec les CHC humains doit être faite avec précaution. De plus, certaines tumeurs présentent des profils particuliers (expression plus élevée de la forme phosphorylée de ERK en IHC), probablement liés à un autre événement pour le moment indéterminé qui doit suractiver la voie Ras/MAPK.

2) Modèle de carcinogénèse spontanée :

Ce dernier modèle, développé chez des souris transgéniques doublement inactivées pour les gènes *Rsp6ka3* et *Axin1* grâce au croisement de nos différentes lignées, est celui qui se rapproche le plus du contexte de coopération mutationnel déjà mis en évidence par de précédents travaux de l'équipe (Schulze *et al*, 2015) dans la carcinogénèse hépatique chez l'humain. Les tumeurs obtenues dans ce modèle sont apparues naturellement, sans ajout de substances chimiques susceptibles d'entraîner l'apparition de nombreuses altérations cellulaires, et l'apparition de mutations génétiques non contrôlées est donc ainsi limitée. Dans les animaux inactivés à la fois pour RSK2 et AXIN1, plus de la moitié de l'effectif a développé au moins une tumeur dans le foie (5 animaux sur 8, soit environ 60%), alors qu'une seule tumeur a été observée dans le groupe d'animaux délété pour l'AXIN1 seule (sur 12 animaux, soit moins de 10% de l'effectif) et aucune dans les autres génotypes (groupes contrôles). L'inactivation simultanée des deux gènes a donc augmenté de façon significative la fréquence d'apparition de tumeurs hépatiques spontanées, démontrant clairement la coopération entre l'inactivation RSK2 et l'inactivation de l'*Axin1 in vivo* dans le développement tumoral hépatique, mais une incidence plus élevée était attendue pour le groupe de souris AXIN1 KO. En effet, dans l'étude initiale du groupe du Dr Dale (Feng *et al*, 2012) qui nous a fourni les animaux délétés de façon conditionnelle pour l'*Axin1* (desquels notre colonie est issue), 55% des animaux ont développé une tumeur sur une durée équivalente (12 mois post-inactivation de l'*Axin1*). Notre étude montre un pourcentage de développement de tumeurs beaucoup plus faible chez ces souris. Certaines études, et notamment *in vivo*, sont difficilement reproductibles pour plusieurs raisons. La différence entre ces résultats peut s'expliquer en partie de par les variations environnementales et techniques évoquées plus tôt dans le manuscrit (régime alimentaire, conditions d'hébergement, bien-être...) (Servick, 2016 ; Stappenbeck, Virgin, 2016 ; Franklin, Ericsson, 2017), mais également de par l'évolution génétique constante des animaux. En effet, lors de l'établissement de notre lignée de souris double mutées, de nombreux croisements sur plusieurs générations de souris ont été réalisés, entraînant inévitablement des dérives génétiques pouvant se répercuter sur le phénotype observé (Dobrowolski *et al*, 2018). Le ratio « poids du foie/poids total de la souris » augmenté, traduisant l'hépatomégalie rapportée dans l'étude initiale (Feng *et al*, 2012), a cependant bien été mise en évidence dans notre propre étude, de façon significative pour les souris inactivées pour l'*Axin1* seule ou pour les deux gènes d'intérêt.

De nombreux gènes de la prolifération ayant de plus été décrits comme dérégulés dans le foie des souris inactivées pour le gène de l'*Axin1* (Feng *et al*, 2012), on peut supposer que l'hépatomégalie observée est consécutive à cette prolifération excessive et mal contrôlée des hépatocytes. Cette hépatomégalie ainsi que les nombreuses atypies cellulaires observées dans le tissu non tumoral peuvent être considérées comme des événements pré-cancéreux, directement liés à la perte de l'AXIN1. L'immunodétection du KI-67, rapportée dans près de la totalité des tumeurs obtenues en contexte double muté et à hauteur de 30% des cellules tumorales, semble confirmer cette hypothèse. L'unique tumeur obtenue pour le génotype *Axin1* KO est cependant négative à la recherche du KI-67, mais il est impossible de conclure sur une seule valeur. Une hépatomégalie a également été observée dans un modèle murin inactivé pour APC (Colnot *et al*, 2004), une autre protéine du complexe de dégradation de la β -caténine, ainsi que dans un modèle de surexpression d'une forme oncogénique de la β -caténine (Cadoret *et al*, 2001). La dérégulation de certains acteurs de la voie Wnt/ β -caténine

semble donc avoir de fortes répercussions sur la prolifération cellulaire, entre autres. Lors des analyses histologiques de nos souris inactivées pour l'AXIN1 seul ou pour RSK2 couplé à l'AXIN1, un pourcentage très élevé d'atypies cellulaires a été constaté (80 à 100%) contrairement aux autres génotypes testés, renforçant l'hypothèse de fortes dérégulations des mécanismes de maintien de l'intégrité cellulaire et génétique consécutives aux perturbations de la voie Wnt/ β -caténine. Une absence de stéatose hépatique est également observée chez les souris double inactivées, résultat significativement différent par rapport aux souris sauvages qui présentent environ 60% de foies stéatosés. Cette observation va donc à l'encontre d'une précédente étude, qui démontre que la perte de RSK2 entraîne une surexpression des gènes du métabolisme du cholestérol (Chan *et al*, 2021) et donc une accumulation accrue de dépôts lipidiques dans le foie. Il est possible que la perte conjointe de l'AXIN1 puisse contrebalancer ce phénotype par un mécanisme encore inconnu.

Aucune des tumeurs développées dans nos modèles d'animaux mutés pour l'*Axin1*, quel que soit le génotype pour *Rps6ka3* associé, n'expriment un marquage positif à la GS ou à la β -caténine, supposant que la voie Wnt/ β -caténine n'est pas activée dans ce modèle de carcinogénèse. La perte de l'AXIN1 n'est en effet pas toujours associée à une activation de cette voie, comme démontré dans la littérature (Feng *et al*, 2012 ; Abitbol *et al*, 2018), et les gènes cibles de la voie ne sont pas activés dans ces études, ni la β -caténine transloquée dans le compartiment nucléaire (correspond à un immunomarquage négatif). Certaines études ont suggéré que l'*Axin1* serait impliqué dans des voies de signalisation alternatives telles que les voies NOTCH et YAP (Abitbol *et al*, 2018), la voie p53 (Rui *et al*, 2004), la voie du TGF- β (Guo *et al*, 2008) ou encore une coopération avec l'activation de l'oncogène c-Met au sein de la voie Wnt/ β -caténine (Qiao *et al*, 2019), qui sont toutes impliquées dans la carcinogénèse hépatique. L'étude démontrant que la perte de l'*Axin1* coopère avec c-Met pour induire l'apparition de CHC chez la souris, de manière dépendante de la signalisation médiée par β -caténine (Qiao *et al*, 2019), est particulièrement intéressante ; une partie de l'effet oncogénique lié à la perte de l'*Axin1* pourrait donc tout de même passer par l'activation de la β -caténine, mais sans doute à un niveau plus modéré.

Une augmentation de la détection de la forme phosphorylée de ERK est observée dans 20% des tumeurs obtenues en contexte double inactivé, démontrant une activation modérée de la voie Ras/MAPK ; la différence avec la tumeur obtenue en contexte AXIN1 KO n'est pas significative, mais comme précédemment pour KI-67, il est impossible de conclure en comparant à une seule valeur. L'ensemble des résultats obtenus suggèrent donc une forte coopération oncogénique entre l'inactivation des gènes *Rps6ka3* et de l'*Axin1*, en accord avec les observations réalisées dans les CHC humains. Cette coopération pourrait impliquer l'activation de la voie Ras/MAPK mais n'implique apparemment pas d'activation évidente de la voie Wnt/ β -caténine.

3) Impact fonctionnel de la perte de RSK2/AXIN1 dans le foie :

La dernière partie de cette étude concerne l'analyse des conséquences fonctionnelles de la perte de RSK2 et/ou AXIN1 dans le foie de jeunes souris (6 et/ou 2 semaines), afin de tenter d'identifier d'éventuelles variations survenant avant le développement tumoral, contrairement aux modèles précédents où l'on s'intéressait à l'impact de la perte des cibles dans un contexte tumoral. Pour rappel, RSK2 est inactivé chez les animaux de manière

constitutive, alors que l'inactivation de l'AXIN1 dans le foie doit être induite expérimentalement à 5 semaines par des injections de β -naphtoflavone. L'étude de la perte seule ou simultanée des gènes *Rps6ka3* et *Axin1* ne peut donc être modélisée que sur des animaux de 6 semaines minimum (soit 4 génotypes analysés), et seuls les génotypes sauvages et RSK2 KO ont été étudiés à 2 semaines d'âge.

Dans un premier temps, aucune atypie histologique n'a été détectée dans le tissu hépatique des animaux, quel que soit leur âge et leur génotype. Des changements structurels ont tout de même été mis en évidence dans des souris âgées de 6 semaines (quatre jours post-inactivation de l'*Axin1*) puisque la taille des canaux biliaires est significativement augmentée dans les souris AXIN1 KO et double mutées. Les immunomarquages montrent une expression du KI-67 significativement augmentée dans ces mêmes souris, et un nombre de cellules ovales (détectée grâce à l'expression de CK7) plutôt augmentée chez les animaux mutés pour *Rps6ka3* ou double mutés. L'inactivation conjointe de RSK2 et de l'AXIN1 semble donc « mixer » les observations qui sont parfois contradictoires, entraînant une hausse de la prolifération des hépatocytes ainsi qu'une augmentation des cellules progénitrices au sein des tissus. Ces aspects ont été aussi explorés au niveau transcriptomique : les marqueurs de progéniteurs semblent en effet être particulièrement augmentés suite à l'inactivation de l'AXIN1, mais cela n'est pas toujours retrouvé en l'absence simultanée de RSK2, alors que l'augmentation des marqueurs de prolifération est plus homogène entre les souris AXIN1 KO ou double inactivées. La perte de l'AXIN1 semble donc engendrer de nombreuses modifications cellulaires et moléculaires au sein du tissu hépatique, alors que les effets de la perte constitutive de RSK2 sont plus silencieux. On détecte tout de même la dérégulation de la voie Ras/MAPK chez les souris RSK2 KO, mais cette expression aberrante semble être atténuée chez les souris double mutées. L'activation de p53 est aussi impactée suite à la perte de RSK2, notamment chez les très jeunes souris de 2 semaines chez qui on ne détecte plus du tout la protéine dans le foie. A 6 semaines en conditions basales, le taux de la protéine est légèrement diminué chez les souris RSK2 KO, mais de façon beaucoup moins importante que dans les foies des souris âgées de 2 semaines. Au niveau transcriptomique, chez les souris âgées de 2 semaines, on observe aucune différence concernant l'expression du gène *CDKN1A* codant pour la protéine p21 (qui est un gène impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, dont l'expression peut être induite par p53), entre les souris sauvages et les souris inactivées pour RSK2 en conditions physiologiques. Cela renforce l'hypothèse selon laquelle des voies alternatives à celle de la voie classique médiée par p53 se mettent en place chez les souris inactivées pour RSK2 afin de contourner la perte de p53, bien que les mécanismes exacts restent à caractériser. En revanche en conditions de stress génotoxique (induit par l'injection de DEN 24 heures avant l'autopsie) dans le foie, l'expression de *CDKN1A* est augmentée par rapport à son expression basale mais de façon similaire entre les génotypes, voire légèrement augmenté pour les animaux RSK2 KO (différence non-significative). RSK2 étant impliqué dans l'activation de la protéine p53 en réponse à un stress génotoxique (Lim *et al*, 2013), on peut supposer que l'activation transcriptionnelle de *CDKN1A* passe également par des mécanismes indépendants de p53 en l'absence de RSK2. La réponse à un stress génotoxique dans ces conditions pourrait donc être exacerbée puisque passant par des voies alternatives, mais cela devra être confirmé par l'étude d'autres cibles transcriptionnelles. *GADD45b*, un autre des gènes cible de p53, a été testé mais aucune différence significative n'est ressortie de l'analyse, suggérant que cette cible n'est pas impliquée dans notre modèle.

La perte de l'AXIN1 semble particulièrement stimuler la prolifération cellulaire, mais pas les progéniteurs tels que les cellules ovales, puisque le nombre de ces dernières n'est augmenté que dans les souris RSK2 KO ; cependant les souris inactivées pour l'AXIN1 présentent des canaux biliaires plus larges, ce qui pourrait être compatible avec une hyperprolifération des cholangiocytes. L'inactivation du gène *Rps6ka3* induit une activation anormale de la voie Ras/MAPK et une inactivation fonctionnelle de la protéine p53, qui joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité du génome. Les animaux double inactivés semblent parfois présenter un profil intermédiaire, mais dans certains cas cumulent également les caractéristiques observées chez les souris RSK2 KO et AXIN1 KO. La perte de l'une ou l'autre de nos cibles peut donc à priori masquer certains effets biologiques, probablement suite à la mise en place de mécanismes alternatifs. Les voies de signalisation cellulaires étant très complexes et très intriquées entre elles, il n'est pas étonnant que des liens inexplicables soient constatés. Lors de certaines analyses, une forte variabilité inter-individus est constatée, rendant certains résultats hétérogènes au sein du même groupe et masquant peut-être des différences significatives. Il est en effet difficile de contrôler tous les paramètres liés à l'animal, qui est un organisme complexe et en évolution permanente. Les résultats parfois inattendus sont potentiellement liés à des réponses cellulaires variables, à la fois au cours du temps et en fonction du contexte de différenciation ; des études plus approfondies sont donc nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de la perte de RSK2 et de l'AXIN1 dans le développement tumoral. Les études pourraient tout d'abord être répétées en incluant un nombre plus conséquent d'animaux, et des cibles supplémentaires pourraient être testées en immunohistochimie dans les tissus, en transcriptomique et en protéomique afin de couvrir les différents aspects de la régulation, qui s'effectue à différents niveaux biologiques.

4) Conclusion globale :

Les premiers résultats de cette vaste étude confirment le potentiel de gène suppresseur de tumeur de RSK2, et suggèrent que son inactivation ne coopère que dans un contexte d'inactivation de l'AXIN1 d'une part, ou d'activation de la β -caténine d'autre part, pour favoriser l'apparition de tumeurs hépatiques. En effet, aucune coopération n'a pu être mise en évidence dans un contexte d'activation de B-raf. Une redondance de l'activation conjointe de la voie Ras/MAPK et de la voie Wnt/ β -caténine semble donc ressortir de ces résultats, suggérant une forte coopération de ces deux voies dans la carcinogénèse hépatique. D'un point de vue fonctionnel, la perte de RSK2 semble diminuer l'activité de la protéine clé p53, souvent considérée comme gardienne de génome, et activer la voie Ras/MAPK ainsi que des mécanismes alternatifs pour tenter de conserver l'intégrité des cellules. Dans le CHC humain, les mutations de *Rps6ka3* sont très souvent associées à celles de *Axin1* et sont retrouvées au sein du même groupe d'interactions épistatiques (figure 37), et les tumeurs présentant ce type de mutations appartiennent à une sous-classe bien particulière de CHC fortement prolifératifs (Rebouissou, Nault, 2020) définie par la surexpression de marqueurs progéniteurs hépatiques, de marqueurs de prolifération et d'hyperphosphorylation de la protéine ERK. Ces caractéristiques sont en accord avec celles observées lors de cette étude, confirmant l'intérêt d'approfondir davantage nos résultats.

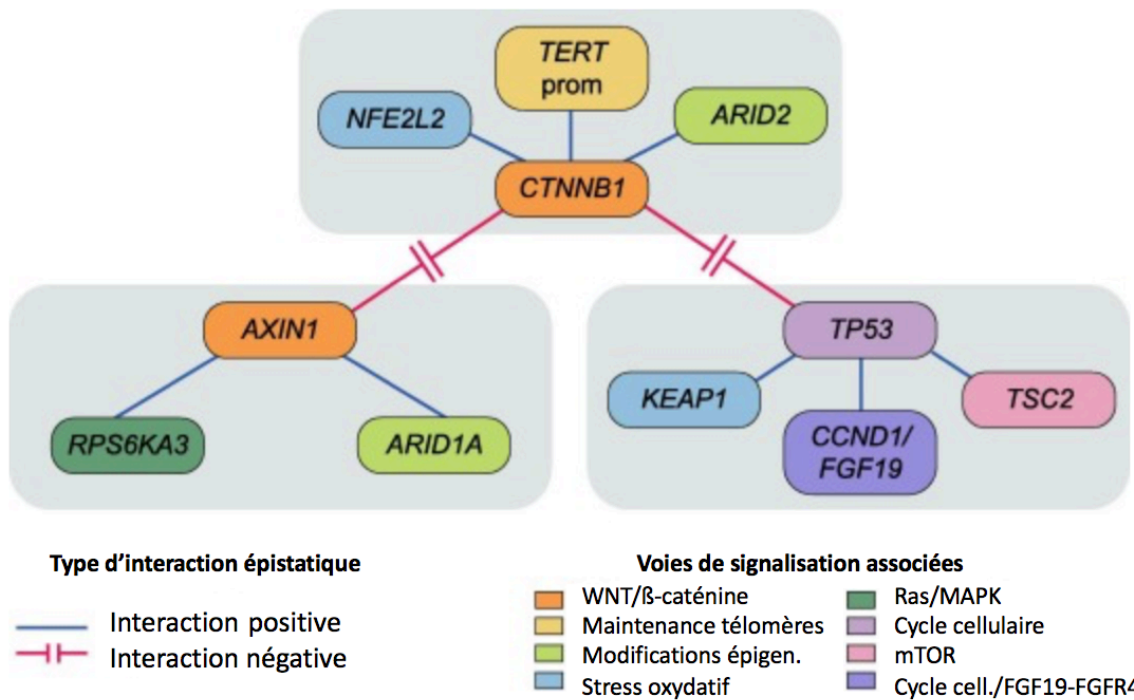


Figure 37 : Interactions épistatiques majeures entre les gènes les plus souvent mutés au sein des CHC. L'interaction positive indique une coopération entre les gènes, alors qu'une interaction négative dénote d'une exclusivité mutuelle. Les gènes RPS6KA3 et AXIN1 sont retrouvés dans le même groupe d'interactions et sont souvent mutés conjointement. Les gènes Axin1 et Ctnnb1 (tous deux impliqués dans la voie Wnt/ β -caténine) présentent en revanche une exclusivité mutuelle (Rebouissou, Nault, 2020).

II- Perspectives pour la suite de l'étude :

1) Analyses moléculaires haut débit :

Des analyses haut débit de l'exome et du transcriptome de certaines tumeurs, ainsi que de quelques échantillons de tissus sains issus des groupes d'animaux analysés à 6 semaines, ont été réalisées pour compléter les analyses présentées dans ce rapport. Les échantillons ont été transmis en plusieurs envois à l'entreprise réalisant la prestation, et nous sommes pour l'instant dans l'attente du retour des résultats concernant le dernier envoi. Les analyses ne pouvant être initiées sans la totalité des résultats (processus de normalisation unique), elles sont pour le moment en suspend mais devraient pouvoir ouvrir de nouvelles pistes à explorer, et conforter les analyses déjà réalisées.

Ces nouvelles technologies, qui ont révolutionné le domaine de la génomique en quelques années, permettent en effet une analyse moléculaire approfondie, en s'intéressant d'une part à l'exome et donc à l'ensemble des gènes codants (séquences codantes de l'ADN, appelées exons), et d'autre part en s'intéressant au transcriptome qui concerne les ARN transcrits à partir des gènes activés (analyse de l'expression différentielle des gènes, en fonction des conditions testées). Ces analyses haut débit permettent donc d'obtenir une vue d'ensemble des gènes surexprimés ou sous-exprimés pour chaque échantillon, traduisant les caractéristiques génétiques de l'échantillon (Huang *et al*, 2018). La comparaison des

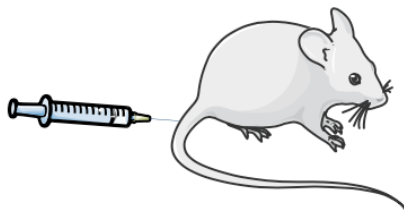
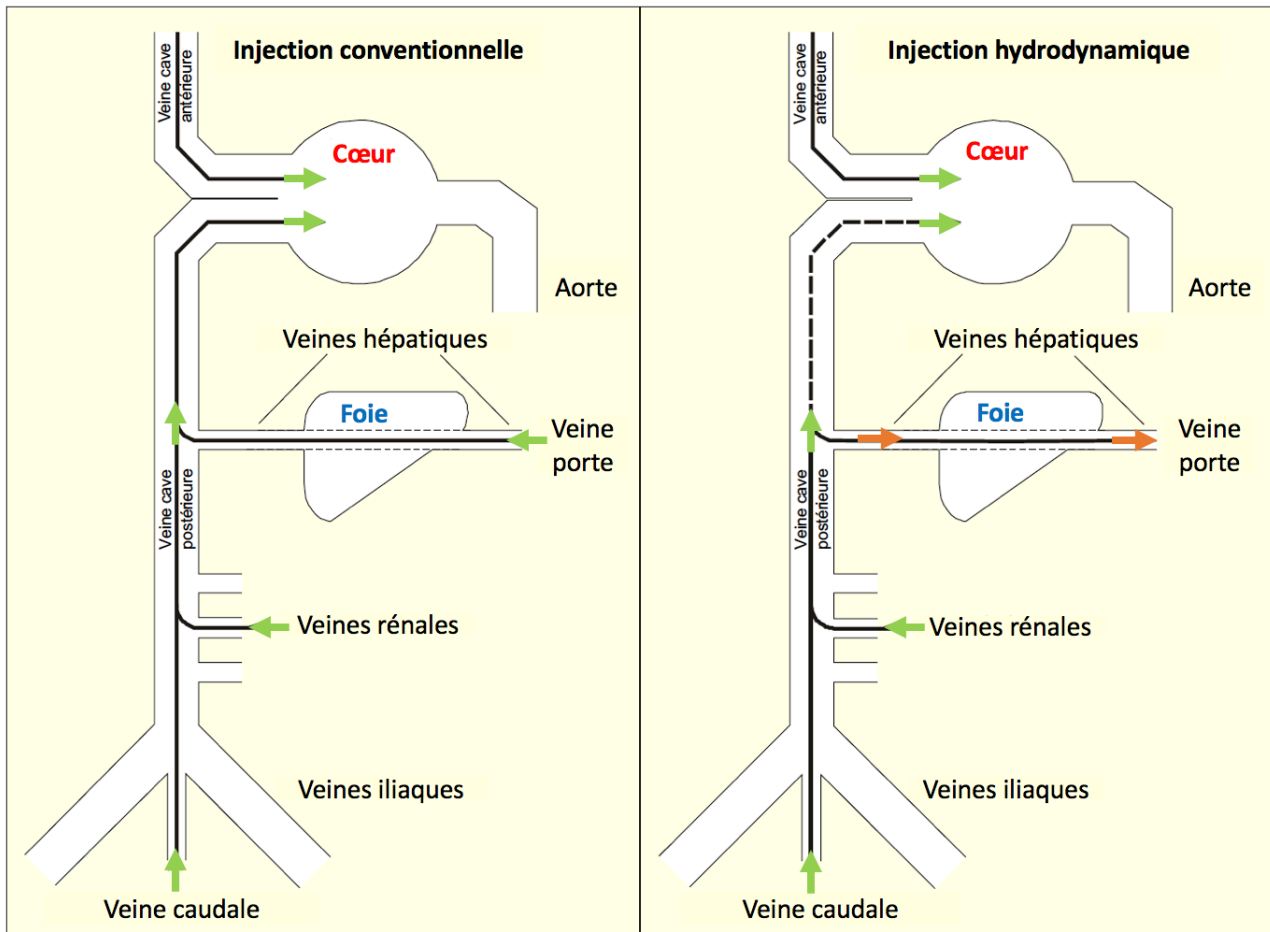
différentes conditions de l'étude devrait nous permettre de mieux identifier les mécanismes moléculaires qui découlent de l'inactivation de RSK2 dans les différents contextes testés, mais également d'explorer les conséquences fonctionnelles de son inactivation, seule ou associée à celle de l'AXIN1. Ces méthodes présentent tout de même des limites, et notamment les problèmes de contamination, puisque l'échantillon analysé doit être suffisamment pur et homogène pour que l'on puisse obtenir un résultat représentatif de la condition testée. C'est en effet un problème que nous avons rencontré dans le cas de très petites tumeurs, dont les acides nucléiques étaient contaminés par ceux du tissu sain environnant, et dont il est difficile de s'affranchir.

Une comparaison transcriptomique inter-espèce entre l'homme et la souris sera également réalisée à partir des résultats de séquençage des ARNm, de façon à confronter les données moléculaires obtenues dans les tumeurs développées dans les différents contextes génétiques avec celles des tumeurs humaines. Cela nous permettra de confirmer ou non la pertinence de l'utilisation des modèles murins développés pour ce projet dans de futures études précliniques.

2) Développement d'un nouveau modèle murin préclinique :

Les travaux effectués dans le modèle murin C57Black/6J et présentés dans ce rapport nous ont permis de montrer le rôle suppresseur de tumeur de RSK2 dans le foie, en coopération avec d'autres événements génétiques. Cependant, dans les modèles précliniques présentés le développement tumoral est relativement tardif (plus d'un an), ce qui ne nous permet pas de les utiliser facilement pour évaluer de nouvelles approches thérapeutiques. Nous allons donc chercher à perfectionner ces modèles, afin d'obtenir un développement de tumeurs hépatiques plus rapide et plus efficace. Pour cela, nous allons utiliser le fond génétique de souris C3H/HeJ, qui est connu pour être plus sensible à la carcinogenèse hépatique que les souris C57Black/6 (qui est un fond génétique plutôt résistant), et nous allons introduire des modifications génétiques ciblant nos gènes d'intérêt directement *in vivo* dans le foie de souris sauvages et inactivées pour RSK2, grâce au système de ciseaux moléculaires CrispR/Cas9, couplé à la technique de l'injection hydrodynamique (injection rapide d'un grand volume d'acides nucléiques par la veine caudale de l'animal, qui entraîne un reflux de la circulation sanguine directement dans le foie à l'inverse du sens physiologique *via* la veine porte ; principe présenté de façon schématisée dans la figure 38). Cette technique de transfection *in vivo* permet l'obtention facile et rapide de mutations ciblées dans le foie et est de plus en plus utilisée dans le cadre de l'étude des tumeurs solides (Takayama *et al*, 2016). De plus, de récentes publications ont proposé des résultats particulièrement intéressants, en utilisant cette méthode pour étudier les mécanismes de coopération génétiques au sein des CHC (Molina-Sánchez *et al*, 2020), confortant notre choix. L'utilisation de cette technique engendre la création de modèles animaux dit « mosaïque », qui miment davantage le processus de développement tumoral réel puisque toutes les cellules n'auront pas forcément intégré les altérations génétiques (on estime qu'environ 20% des hépatocytes seront transfectés lors de l'injection). De cette manière, nous pourrions tester l'effet coopératif de RSK2 avec plusieurs altérations génétiques ciblées sur la carcinogenèse hépatique, tout en s'affranchissant des manipulations génétiques souvent très lourdes et longues à mettre en place, et des nombreux croisements nécessaires pour obtenir les génotypes d'intérêts comme c'était le cas jusqu'à présent. L'injection hydrodynamique provoque en revanche un stress

hépatique, qui se traduit par des irrégularités du rythme cardiaque, une augmentation de la pression veineuse et de la perméabilité des membranes, mais ces modifications ne sont que transitoires et l'état physiologique basal de l'animal est rapidement retrouvé. Les plasmides qui seront utilisés pour la réalisation de cette technique ont déjà été amplifiés par mes soins lors des années précédentes et sont donc déjà disponibles, bien qu'une vérification par séquençage soit nécessaire avant leur utilisation *in vivo*. Les gènes d'intérêt qui seront explorés sont les suivants : *Axin1* à nouveau, *Apc*, *Arid1a* et *Tp53*.



Injection rapide par la veine caudale de 1,5 à 2 mL de solution d'ADN plasmidique (environ 10% du volume sanguin total) → Reflux de la circulation sanguine jusque dans le foie de la souris.

Figure 38 : Principe de l'injection hydrodynamique couplée au système Crispr/Cas9, pour la création de mutants hépatocytaires *in vivo* chez la souris. Une solution d'ADN plasmidique contenant le vecteur d'expression du système Crispr/Cas9 ainsi qu'une ou plusieurs constructions permettant de cibler un ou des gènes d'intérêt est injectée par la veine caudale en quelques secondes, créant un reflux de la circulation sanguine à l'inverse du sens physiologique directement jusqu'au foie, et forçant ainsi les hépatocytes à absorber le surplus de solution. Cette technique permet la création de souris transgéniques directement par recombinaison *in vivo* en s'affranchissant des méthodes de transgénèse embryonnaire classique qui sont lourdes et longues à mettre en place.

Ce nouveau protocole devrait donc être mis en place dans un futur proche. De plus, le Centre de Recherche des Cordeliers qui héberge nos locaux doit faire prochainement l'acquisition d'un échographe à l'animalerie, dont l'utilisation lors de nos protocoles pourrait permettre de suivre de façon non-invasive le développement tumoral, et cela permettrait de cette manière d'éviter un sacrifice trop précoce des animaux. En revanche, le changement de fond génétique des animaux utilisés dans nos protocoles implique de ne pas pouvoir comparer les différentes méthodes entre elles, chaque fond génétique ayant ses propres caractéristiques génomiques et phénotypiques.

3) Identification de nouvelles cibles pharmacologiques :

Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors du développement de tumeurs mutées pour *Rps6ka3* pourrait permettre une prise en charge clinique plus efficace des patients présentant ce type de tumeur en particulier, dans l'optique d'une médecine plus personnalisée qui peine à se développer dans la prise en charge médicamenteuse du CHC. En effet ce type de cancer est souvent détecté tardivement, et ne répond pas toujours correctement aux traitements (apparition de résistances, efficacité limités). De plus, les gènes les plus fréquemment mutés dans le CHC ne peuvent être directement ciblés de façon médicamenteuse (Demory, Nault, 2020), ce qui représente un obstacle majeur. Les chimiothérapies globales étant relativement peu efficaces, il est indispensable d'identifier des cibles pharmacologiques précises à moduler, mais cela implique que seuls les patients présentant un certain type de CHC pourront être intégrés aux essais cliniques, et à terme bénéficier des traitements.

L'identification de biomarqueurs spécifiques d'un sous-type bien précis de CHC est donc indispensable et pourrait aider à orienter le traitement. En effet, ces dernières années, de nouvelles molécules ont fait leur apparition sur le marché pour le traitement du cancer du foie. On peut par exemple citer les inhibiteurs de tyrosine kinase comme le lenvatinib, le cabozantinib et le regorafenib, et l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans le cadre des immunothérapies, comme le ramucirumab qui est anti-VEGFR2 ou l'atezolizumab qui est un anti-PDL1 (Demory, Nault, 2020 ; Rebouissou, Nault, 2020). Des techniques de séquençage haut débit précédemment réalisées au laboratoire ont déjà permis d'identifier des biomarqueurs spécifiques dans des lignées cellulaires issues de cancers du foie, après avoir testé différents traitements mettant en jeu une ou plusieurs molécules (Caruso *et al*, 2019) ; nous souhaiterions pouvoir faire à terme un screening similaire sur nos modèles murins, modélisant ainsi *in vivo* la réponse à divers traitements avant d'envisager de potentiels essais cliniques chez l'humain. La méthode inverse pourrait également être envisagée, en réalisant des cultures d'hépatocytes à partir des tumeurs développées dans nos modèles, afin de tester *in vitro* l'effet de nouvelles molécules. Quoi qu'il en soit, la caractérisation des CHC mutés pour *Rps6ka3* permettra à terme, nous l'espérons, d'envisager le développement d'un traitement spécifique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abitbol S, Dahmani R, Coulouarn C, Ragazzon B, Mlecnik B, Senni N, Savall M, Bossard P, Sohler P, Drouet V, Tournier E, Dumont F, Sanson R, Calderaro J, Zucman-Rossi J, Vasseur-Cognet M, Just PA, Terris B, Perret C, Gilgenkrantz H ; “AXIN deficiency in human and mouse hepatocytes induces hepatocellular carcinoma in the absence of β -catenin activation” ; *Journal of Hepatology* ; 2018 ; 68(6) : 1203-1213.

Ahn Sung-Min, Se Jin Jang, Ju Hyun Shim, Deokhoon Kim, Seung-Mo Hong, Chang Ohk Sung, Daehyun Baek, Farhan Haq, Adnan Ahmad Ansari, Sun Young Lee, Sung-Min Chun, Seongmin Choi, Hyun-Jeung Choi, Jongkyu Kim, Sukjun Kim, Shin Hwang, Young-Joo Lee, Jong-Eun Lee, Wang-Rim Jung, Hye Yoon Jang, Eunho Yang, Wing-Kin Sung, Nikki P Lee, Mao Mao, Charles Lee, Jessica Zucman-Rossi, Eunsil Yu, Han Chu Lee, Gu Kong ; “Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: Implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification” ; *Hepatology* ; 2014 ; 60(6), 1972–1982.

Akinyemiju Tomi, Semaw Abera, Muktar Ahmed, Noore Alan, Mulubirhan Assefa Alemayohu, Christine Allen, Rajaa Al-Raddadi, Nelson Alvis-Guzman, Yaw Amoako, Al Artaman, Tadesse Awoke Ayele, Aleksandra Barac, Isabela Bensenor, Adugnaw Berhane, Zulfiqar Bhutta, Jacqueline Castillo-Rivas, Abdulaal Chitheer, Jee-Young Choi, Benjamin Cowie, Lalit Dandona, Rakhi Dandona, Subhojit Dey, Daniel Dicker, Huyen Phuc, Donatus U. Ekwueme, Maysaa El Sayed Zaki, Florian Fischer, Thomas Fürst, Jamie Hancock, Simon I. Hay, Peter Hotez, Sun Ha Jee, Amir Kasaeian, Yousef Khader, Young-Ho Khang, Anil Kumar, Michael Kutz, Heidi Larson, Alan Lopez, Raimundas Lunevicius, Reza Malekzadeh, Colm McAlinden, Toni Meier, Walter Mendoza, Ali Mokdad, Maziar Moradi-Lakeh, Gabriele Nagel, Quyen Nguyen, Grant Nguye, Felix Ogbo, George Patton, David M. Pereira, Farshad Pourmalek, Mostafa Qorbani, Amir Radfar, Gholamreza Roshandel, Joshua A Salomon , Juan Sanabria, Benn Sartorius, Maheswar Satpathy, Monika Sawhney, Sadaf Sepanlou, Katya Shackelford, Hirbo Shore, Jiandong Sun, Desalegn Tadesse Mengistu, Roman Topór-Mądry, Bach Tran, Kingsley Nnanna Ukwaja , Vasiliy Vlassov, Stein Emil Vollset, Theo Vos, Tolassa Wakayo, Elisabete Weiderpass, Andrea Werdecker, Naohiro Yonemoto, Mustafa Younis, Chuanhua Yu, Zoubida Zaidi, Liguozhu, Christopher J. L. Murray, Mohsen Naghavi, Christina Fitzmaurice ; “The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015” ; *JAMA Oncology* ; 2017 ; 3(12): 1683-1691.

Albagli Olivier ; Protéger et sévir : p53, métabolisme et suppression tumorale ; *Médecine/Sciences* ; 2015 ; 31 : 869-880.

Aleksic K, Lackner C, Geigl JB, Scwarz M, Auer M, Ulz P, Fischer M, Trajanoski Z, Otte M, Speicher MR ; “Evolution of genomic instability in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice” ; *Hepatology* ; 2011 ; 53(3) : 895–904.

Allaire Manon, Nault Jean-Charles ; Genetics of hepatocellular carcinoma ; *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue* ; 2017 ; 20(1) : 18-23.

Amaddeo Giuliana, Qian Cao, Yannick Ladeiro, Sandrine Imbeaud, Jean-Charles Nault, Daphne Jaoui, Yann Gaston Mathe, Christophe Laurent, Alexis Laurent, Paulette Bioulac-Sage, Julien Calderaro, Jessica Zucman-Rossi ; “Integration of Tumour and Viral Genomic Characterisations in HBV-Related Hepatocellular Carcinomas” ; *Gut* ; 2015 ; 64(5): 820–829.

Aubrey Brandon J , Gemma L Kelly, Ana Janic, Marco J Herold et Andreas Strasser ; How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression ? ; *Cell Death and Differentiation* ; 2018 ; 25 : 104–113.

Aydinlik H, Nguyen TD, Moennikes O, Buchmann A, Schwarz M ; “Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of b-catenin mutated mouse liver tumors” ; *Oncogene* ; 2001 ; 20(53) : 7812-7816.

Bakiri Latifa, Erwin F. Wagner ; “Mouse Models for Liver Cancer” ; *Molecular Oncology* ; 2013 ; 7(2) : 206–223.

Bioulac-Sage Paulette, Hervé Laumonier, Christophe Laurent, Jean Blanc, Charles Balabaud ; “Benign and Malignant Vascular Tumors of the Liver in Adults” ; *Seminars in Liver Disease* ; 2008 ; 28(3) : 302-14.

Boyault Sandrine, David S Rickman, Aurélien de Reyniès, Charles Balabaud, Sandra Rebouissou, Emmanuelle Jeannot, Aurélie Hérault, Jean Saric, Jacques Belghiti, Dominique Franco, Paulette Bioulac-Sage, Pierre Laurent-Puig, Jessica Zucman-Rossi ; “Transcriptome Classification of HCC Is Related to Gene Alterations and to New Therapeutic Targets” ; *Hepatology* ; 2007 ; 45(1) : 42–52.

Braeuning Albert , Pavék Petr ; β -catenin signaling, the constitutive androstane receptor and their mutual interactions ; *Archives of Toxicology* ; 2020 ; 94(12) : 3983-3991.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A ; “Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN, Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries” ; *CA : A Cancer Journal for Clinicians* ; 2018 ; 68(6) : 394–424.

Bressac Brigitte, Michael Kew, Jack Wands, Mehmet Ozturk ; “Selective G to T Mutations of P53 Gene in Hepatocellular Carcinoma from Southern Africa” ; *Nature* ; 1991 ; 350(6317): 429–431.

Burrel Marta, María Reig, Alejandro Forner, Marta Barrufet, Carlos Rodríguez de Lope, Silvia Tremosini, Carmen Ayuso, Josep M Llovet, María Isabel Real, Jordi Bruix ; “Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma Treated by Transarterial Chemoembolisation (TACE) Using Drug Eluting Beads. Implications for Clinical Practice and Trial Design” ; *Journal of Hepatology* ; 2012 ; 56(6) : 1330–1335.

Cadoret Axelle, Christine Ovejero, Sihem Saadi-Kheddouci, Evelyne Souil, Monique Fabre, Beatrice Romagnolo, Axel Kahn, Christine Perret ; “Hepatomegaly in Transgenic Mice Expressing an Oncogenic Form of Beta-Catenin” ; *Cancer Research* ; 2001 ; 61(8) : 3245-3249.

Calderaro Julien, Gabrielle Couchy, Sandrine Imbeaud, Giuliana Amaddeo, Eric Letouzé, Jean-Frédéric Blanc, Christophe Laurent, Yacine Hajji, Daniel Azoulay, Paulette Bioulac-Sage, Jean-Charles Nault, Jessica Zucman-Rossi ; “Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification” ; *Journal of Hepatology* ; 2017 ; 67(4) : 727–738.

Carriere A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP ; “Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation” ; *Current Biology* ; 2008 ; 18(17) : 1269-1277.

Carriere Audrey , Hind Ray, John Blenis, Philippe P. Roux ; The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade ; *Frontiers in Bioscience* ; 2008 ; 13 : 4258-4275.

Caruso S, Calatayud AL, Pilet J, La Bella T, Rekić S, Imbeaud S, Letouzé E, Meunier L, Bayard Q, Rohr-Udilova N, Péneau C, Grasl-Kraupp B, de Koning L, Ouine B, Bioulac-Sage P, Couchy G, Calderaro J, Nault JC, Zucman-Rossi J, Rebouissou S ; “Analysis of liver cancer cell lines identifies agents with likely efficacy against hepatocellular carcinoma and markers of response” ; *Gastroenterology* ; 2019 ; 157(3) : 760-776.

Cazzalini Ornella, Scovassi A. Ivana, Savio Monica, Stivala Lucia A., Prosperi Ennio ; Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21^{CDKN1A} in the DNA damage response ; *Mutation Research* ; 2010 ; 704 : 12–20.

Chan Lo-Kong, Daniel Wai-Hung Ho, Charles Shing Kam, Elley Yung-Tuen Chiu, Irene Lai-Oi Lo, Derek Tsz-Wai Yau, Elaine Tin-Yan Cheung, Chung-Ngai Tang, Victor Wai-Lun Tang, Terence Kin-Wah Lee, Carmen Chak-Lui Wong, Kenneth Siu-Ho Chok, Albert Chi-Yan Chan, Tan-To Cheung, Chun-Ming Wong, Irene Oi-Lin Ng ; “RSK2-inactivating mutations potentiate MAPK signaling and support cholesterol metabolism in hepatocellular carcinoma” ; *Journal of Hepatology* ; 2021 ; 74(2) : 360-371.

Chang Mei-Hwei, San-Lin You, Chien-Jen Chen, Chun-Jen Liu, Ming-Wei Lai, Tzee-Chung Wu, Shu-Fen Wu, Chuan-Mo Lee, Sheng-Shun Yang, Heng-Cheng Chu, Tsang-Eng Wang, Bor-Wen Chen, Wan-Long Chuang, Maw-Soan Soon, Ching-Yih Lin, Shu-Ti Chiou, Hsu-Sung Kuo, Ding-Shinn Chen ; “Long-Term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer” ; *Gastroenterology* ; 2016 ; 151(3): 472-480.

Cho Yong-Yeon ; “Molecular Targeting of ERKs/RSK2 Signaling in Cancers” ; *Current Pharmaceutical Design* ; 2017 ; 23(29) : 4247-4258.

Cho YY, He Z, Zhang Y, Choi HS, Zhu F, Choi BY, Kang BS, Ma WY, Bode AM, Dong Z ; “The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction” ; *Cancer Research* ; 2005 ; 65(9): 3596-3603.

Cioni D, Lencioni R, Rossi S, Garbagnati F, Donati F, Crocetti L, Bartolozzi C ; “Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma: using contrast-enhanced harmonic power doppler sonography to assess treatment outcome” ; *American Journal of Roentgenology* ; 2001 ; 177(4) : 783-788.

Clavien Pierre-Alain, Mickael Lesurtel, Patrick MM Bossuyt, Gregory J Gores, Bernard Langer, Arnaud Perrier ; “Recommendations for Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: An International Consensus Conference Report” ; *The Lancet Oncology* ; 2012 ; 13(1) : e11–22.

Colnot S, T Decaens, M Niwa-Kawakita, C Godard, G Hamard, A Kahn, M Giovannini, C Perret ; “Liver-Targeted Disruption of Apc in Mice Activates b-Catenin Signaling and Leads to Hepatocellular Carcinomas” ; *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* ; 2004 ; 101(49) : 17216-17221.

Connor F, Rayner TF, Aitken SJ, Feig C, Lukk M, Santoyo-Lopez J, Odom DT ; “Mutational landscape of a chemically-induced mouse model of liver cancer” ; *Journal of Hepatology* ; 2018 ; 69(4) : 840-850.

Cucchetti Alessandro, Fabio Piscaglia, Matteo Cescon, Antonio Colecchia, Giorgio Ercolani, Luigi Bolondi, Antonio D. Pinna ; “Cost-Effectiveness of Hepatic Resection versus Percutaneous Radiofrequency Ablation for Early Hepatocellular Carcinoma” ; *Journal of Hepatology* ; 2013 ; 59(2) : 300–307.

Delaunoy J., F. Abidi, M. Zeniou, S. Jacquot, K. Merienne, S. Pannetier, M. Schmitt, C. Schwartz, and A. Hanauer ; “Mutations in the X-Linked RSK2 Gene (RPS6KA3) in Patients with Coffin-Lowry Syndrome” ; *Human Mutation* ; 2001 ; 17(2) : 103–116.

Delire Benedicte et Starkel Peter ; The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma : pathogenesis and therapeutic implications ; *European Journal of Clinical Investigation* ; 2015 ; 45(6) : 609-623.

Demory Alix, Nault Jean-Charles ; “Molecular perspectives for the treatment of hepatocellular carcinoma” ; *Acta Gastroenterologica Belgica* ; 2020 ; 83(2) : 309-312.

DeNicola Gina M, Florian A Karreth, Timothy J Humpton, Aarthi Gopinathan, Cong Wei, Kristopher Frese, Dipti Mangal, Kenneth H Yu, Charles J Yeo, Eric S Calhoun, Francesca Scrimieri, Jordan M Winter, Ralph H Hruban, Christine Iacobuzio-Donahue, Scott E Kern, Ian A Blair, David A Tuveson ; “Oncogene-Induced Nrf2 Transcription Promotes ROS Detoxification and Tumorigenesis” ; *Nature* ; 2011 ; 475(7354) : 106-109.

Devereux Theodora R., Izumi Horikawa, Colleen H. Anna, Lois A. Annab, Cynthia A. Afshari, et J. Carl Barrett ; DNA Methylation Analysis of the Promoter Region of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene ; *Cancer Research* ; 1999 ; 59 : 6087– 6090.

Dobrowolski Peter, Melina Fischer, Ronald Naumann ; “Novel insights into the genetic background of genetically modified mice” ; *Transgenic Research* ; 2018 ; 27(3) : 265–275.

Dong Bingning, Ju-Seog Lee, Yun-Yong Park, Feng Yang, Ganyu Xu, Wendong Huang, Milton J. Finegold et David D. Moore ; Activating CAR and b-catenin induces uncontrolled liver growth and tumorigenesis ; *Nature Communications* ; 2015 ; 6 : 5944.

Dong Ding, Xiaoyan Lou, Dasong Hua, Wei Yu, Lisha Li, Jun Wang, Feng Gao, Na Zhao, Guoping Ren, Lanjuan Li, Biaoyang Lin ; “Recurrent Targeted Genes of Hepatitis B Virus in the Liver Cancer Genomes Identified by a Next-Generation Sequencing–Based Approach” ; Edited by Hamish S. Scott ; PLoS Genetics ; 2012 ; 8(12): e1003065.

Douville E, Downward J ; “EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2” ; Oncogene ; 1997 ; 15(4) : 373-383.

Dow Michelle, Rachel M Pyke, Brian Y Tsui, Ludmil B Alexandrov, Hayato Nakagawa, Koji Taniguchi, Ekihiro Seki, Olivier Harismendy, Shabnam Shalapour, Michael Karin, Hannah Carter, Joan Font-Burgada ; “Integrative Genomic Analysis of Mouse and Human Hepatocellular Carcinoma” ; Proceedings of the National Academy of Sciences ; 2018 ; 115(42) : E9879–9888.

Du Ruijuan, Chuntian Huang, Kangdong Liu, Xiang Li et Zigang Dong ; Targeting AURKA in Cancer : molecular mechanisms and opportunities for Cancer therapy ; Molecular Cancer ; 2021 ; 20 : 15.

El-Serag Hashem B. ; “Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma” ; Gastroenterology ; 2012 ; 142(6) : 1264-1273.

Fan Yannan, Maria Arechederra, Sylvie Richelme, Fabrice Daian, Chiara Novello, Julien Calderaro, Luca Di Tommaso, Guillaume Morcrette, Sandra Rebouissou, Matteo Donadon, Emanuela Morengi, Jessica Zucman-Rossi, Massimo Roncalli, Rosanna Dono, Flavio Maina ; “A phosphokinome-based screen uncovers new drug synergies for cancer driven by liver-specific gain of nononcogenic receptor tyrosine kinases” ; Hepatology ; 2017 ; 66(5) : 1644-1661.

Fang Chi-Hua, Jia-Qing Gong, Wei Zhang ; “Function of oval cells in hepatocellular carcinoma in rats” ; World Journal of Gastroenterology ; 2004 ; 10(17) : 2482-2487.

Farazi Paraskevi A., Ronald A. DePinho ; “Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: From Genes to Environment” ; Nature Reviews Cancer ; 2006 ; 6(9): 674–87.

Feng GJ, Cotta W, Wei XQ, Poetz O, Evans R, Jarde T, Reed K, Meniel V, Williams GT, Clarke AR, Dale TC ; “Conditional disruption of Axin1 leads to development of liver tumors in mice” ; Gastroenterology ; 2012 ; 143(6) : 1650-1659.

Finn Richard S., Shukui Qin, Masafumi Ikeda, Peter R. Galle, Michel Ducreux, Tae-You Kim, Masatoshi Kudo, Valeriy Breder, Philippe Merle, Ahmed O. Kaseb, Daneng Li, Wendy Verret, Derek-Zhen Xu, Sairy Hernandez, Juan Liu, Chen Huang, Sohail Mulla, Yulei Wang, Ho Yeong Lim, Andrew X. Zhu, Ann-Lii Cheng ; “Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma” ; The New England Journal of Medicine ; 2020 ; 382(20) : 1894-1905.

Fracanzani A L, D Conte, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A, Fargion S ; “Increased Cancer Risk in a Cohort of 230 Patients with Hereditary Hemochromatosis in Comparison to Matched Control Patients with Non–Iron-Related Chronic Liver Disease” ; *Hepatology* ; 2001 ; 33 (3) : 647–651.

Franklin CL, Ericsson AC ; “Microbiota and Reproducibility of Rodent Models” ; *Lab Animal* ; 2017 ; 46(4) : 114–122.

Frith CH, L Wiley ; “Spontaneous Hepatocellular Neoplasms and Hepatic Hemangiosarcomas in Several Strains of Mice” ; *Laboratory Animal Science* ; 1982 ; 32(2) : 157–162.

Frödin M, Jensen C J, Merienne K, Gammeltoft S ; A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1 ; *The EMBO Journal* ; 2000 ; 19(12) : 2924-2934.

Fujimoto Akihiro , Yasushi Totoki, Tetsuo Abe, Keith A Boroevich, Fumie Hosoda, Ha Hai Nguyen, Masayuki Aoki, Naoya Hosono, Michiaki Kubo, Fuyuki Miya, Yasuhito Arai, Hiroyuki Takahashi, Takuya Shirakihara, Masao Nagasaki, Tetsuo Shibuya, Kaoru Nakano, Kumiko Watanabe-Makino, Hiroko Tanaka, Hiromi Nakamura, Jun Kusuda, Hidenori Ojima, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Masaki Ueno, Yoshinobu Shigekawa, Yoshiiku Kawakami, Koji Arihiro, Hideki Ohdan, Kunihiro Gotoh, Osamu Ishikawa, Shun-Ichi Ariizumi, Masakazu Yamamoto, Terumasa Yamada, Kazuaki Chayama, Tomoo Kosuge, Hiroki Yamaue, Naoyuki Kamatani, Satoru Miyano, Hitoshi Nakagama, Yusuke Nakamura, Tatsuhiko Tsunoda, Tatsuhiro Shibata, Hidewaki Nakagawa ; “Whole-Genome Sequencing of Liver Cancers Identifies Etiological Influences on Mutation Patterns and Recurrent Mutations in Chromatin Regulators” ; *Nature Genetics* ; 2012 ; 44(7) : 760–764.

Gábor Lendvai, Tímea Szekerczés, Idikó Illyés, Réka Dóra, Endre Kontsek, Alíz Gógl, András Kiss, Klára Werling, Ilona Kovalszky, Zsuzsa Schaff, Katalin Borka ; « Cholangiocarcinoma: Classification, Histopathology and Molecular Carcinogenesis » ; *Pathology & Oncology Research* ; 2020 ; 26(1) : 3-15.

Galle Peter R., Alejandro Forner, Josep M. Llovet, Vincenzo Mazzaferro, Fabio Piscaglia, Jean-Luc Raoul, Peter Schirmacher, Valérie Vilgrain ; “EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma” ; *Journal of Hepatology* ; 2018 ; 69(1): 182–236.

Gao Wei et Ho Mitchell ; The role of glypican-3 in regulating Wnt in hepatocellular carcinomas ; *Cancer Reports* ; 2011 ; 1(1) ; 14-19.

Guichard Cécile, Giuliana Amaddeo, Sandrine Imbeaud, Yannick Ladeiro, Laura Pelletier, Ichrafe Ben Maad, Julien Calderaro, Paulette Bioulac-Sage, Mélanie Letexier, Françoise Degos, Bruno Clément, Charles Balabaud, Eric Chevet, Alexis Laurent, Gabrielle Couchy, Eric Letouzé, Fabien Calvo, Jessica Zucman-Rossi ; “Integrated Analysis of Somatic Mutations and Focal Copy-Number Changes Identifies Key Genes and Pathways in Hepatocellular Carcinoma” ; *Nature Genetics* ; 2012 ; 44(6) : 694–698.

Guo X., A. Ramirez, D. S. Waddell, Z. Li, X. Liu, X.-F. Wang ; “Axin and GSK3- Control Smad3 Protein Stability and Modulate TGF- Signaling” ; *Genes & Development* ; 2008 ; 22(1) : 106–120.

Hart Matthew J, Paul Polakis ; “Downregulation of B-Catenin by Human Axin and Its Association with the APC Tumor Suppressor, b-Catenin and GSK3b” ; *Current Biology* ; 1998 ; 8 : 573–581.

Hoshida Yujin, Bryan C. Fuchs, Nabeel Bardeesy, Thomas F. Baumert, Raymond T. Chung ; “Pathogenesis and Prevention of Hepatitis C Virus-Induced Hepatocellular Carcinoma” ; *Journal of Hepatology* ; 2014 ; 61(1): 79–90.

Hoshida Yujin, Sebastian M B Nijman, Masahiro Kobayashi, Jennifer A Chan, Jean-Philippe Brunet, Derek Y Chiang, Augusto Villanueva, Philippa Newell, Kenji Ikeda, Masaji Hashimoto, Goro Watanabe, Stacey Gabriel, Scott L Friedman, Hiromitsu Kumada, Josep M Llovet, Todd R Golub ; “Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma” ; *Cancer Research* ; 2009 ; 69(18) : 7385–7392.

Houles Thibault, Philippe P.Roux ; Defining the role of the RSK isoforms in cancer ; *Seminars in Cancer Biology* ; 2018 ; 48 : 53-61.

Huang Weitai, Anders Jacobsen Skanderup, Caroline G. Lee ; “Advances in genomic hepatocellular carcinoma research” ; *GigaScience* ; 2018 ; 7(11) : 1–22.

Ioannou George N., Christopher L. Bryson, Noel S. Weiss, Richard Miller, John D. Scott, Edward J. Boyko ; “The Prevalence of Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection” ; *Hepatology* ; 2013 ; 57(1) : 249–257.

Jabbur JR, Huang P, Zhang W ; “DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo” ; *Oncogene* ; 2000 ; 19 : 3–8.

Jin Rongguan, Enrico De Smaele, Francesca Zazzeroni, Dung U Nguyen, Salvatore Papa, Joy Jones, Carrie Cox, Celine Gelinis, Guido Franzoso ; “Regulation of the gadd45beta promoter by NF-kappaB” ; *DNA and Cell Biology* ; 2002 ; 21(7) : 491-503.

Kanwal Fasiha, Jennifer Kramer, Steven M. Asch, Maneerat Chayanupatkul, Yumei Cao, Hashem B. El-Serag ; “Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents” ; *Gastroenterology* ; 2017 ; 153(4): 996-1005.

Karimian Ansar, Ahmadi Yasin, Yousefi Bahman ; Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage ; *DNA Repair* ; 2016 ; 42 : 63–71.

Kastenhuber Edward R, Lowe Scott W ; Putting p53 in Context ; *Cell* ; 2017 ; 170(6) : 1062-1078.

Kikuchi A. ; “Roles of Axin in the Wnt Signalling Pathway” ; Cellular Signalling ; 1999 ; 11(11) : 777–788.

Kudo Masatoshi, Richard S Finn, Shukui Qin, Kwang-Hyub Han, Kenji Ikeda, Fabio Piscaglia, Ari Baron, Joong-Won Park, Guohong Han, Jacek Jassem, Jean Frederic Blanc, Arndt Vogel, Dmitry Komov, T R Jeffrey Evans, Carlos Lopez, Corina Dutcus, Matthew Guo, Kenichi Saito, Silvija Kraljevic, Toshiyuki Tamai, Min Ren, Ann-Lii Cheng ; “Lenvatinib versus Sorafenib in First-Line Treatment of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial” ; The Lancet ; 2018 ; 391(10126) : 1163-1173.

Kulik Laura, Hashem B. El-Serag ; “Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma” ; Gastroenterology ; 2019 ; 156(2): 477-491.

L'épidémiologie du cancer du foie (hépatocarcinome) ; Arcagy/InfoCancer ; mise à jour le 29 mars 2020, consulté le 29 juin 2021 [en ligne] ; disponible sur le lien suivant : <https://www.arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancers-du-foie/maladie/epid-miologie.html/>

La Bella Tiziana, Sandrine Imbeaud, Camille Peneau, Iadh Mami, Shalini Datta, Quentin Bayard, Stefano Caruso, Theo Z Hirsch, Julien Calderaro, Guillaume Morcrette, Catherine Guettier, Valerie Paradis, Giuliana Amaddeo, Alexis Laurent, Laurent Possenti, Laurence Chiche, Paulette Bioulac-Sage, Jean-Frederic Blanc, Eric Letouze, Jean-Charles Nault, Jessica Zucman-Rossi ; “Adeno-Associated Virus in the Liver: Natural History and Consequences in Tumour Development” ; Gut ; 2020 ; 69(4) : 737-747.

Lee Cheol-Jung, Mee-Hyun Lee, Ji-Young Lee, Ji Hong Song, Hye Suk Lee, Yong-Yeon Cho ; “RSK2-Induced Stress Tolerance Enhances Cell Survival Signals Mediated by Inhibition of GSK3 β Activity” ; Biochemical and Biophysical Research Communications ; 2013 ; 440(1) : 112–118.

Lee Ju-Seog, In-Sun Chu, Arsen Mikaelyan, Diego F Calvisi, Jeonghoon Heo, Janardan K Reddy, Snorri S Thorgeirsson ; “Application of comparative functional genomics to identify best-fit mouse models to study human cancer” ; Nature Genetics ; 2004 ; 36(12) : 1306-1311.

Lee Ju-Seog, In-Sun Chu, Jeonghoon Heo, Diego F. Calvisi, Zongtang Sun, Tania Roskams, Anne Durnez, Anthony J. Demetris, Snorri S. Thorgeirsson ; “Classification and Prediction of Survival in Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling” ; Hepatology ; 2004 ; 40(3) : 667–676.

Lemaigre Frédéric ; « Le développement des lignages hépatiques dans le foie normal et durant la régénération » ; Médecine/sciences ; 2012 ; 28(11) : 958-962.

Lim Alexander J. Bondoc, James I. Geller, Gregory M. Tiao ; “Hepatoblastoma—The Evolution of Biology, Surgery, and Transplantation” ; Children ; 2018 ; 6(1) : 1.

Lim HC, Xie L, Zhang W, Li R, Chen ZC, Wu GZ, Cui SS, Tan EK, Zeng L ; “Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) maintains genomic stability by activating the Atm/p53-dependent DNA damage pathway” ; PLoS One ; 2013 ; 8(9) : e74334.

Lin Chun-Chieh and Hui-Min Yang ; “Fibrolamellar Carcinoma: A Concise Review” ; Archives of Pathology & Laboratory Medicine ; 2018 ; 142(9) : 1141-1145.

Lin Ming V, Lindsay Y King, Raymond T Chung ; Hepatitis C virus-associated cancer ; Annual Review of Pathology ; 2015 ; 10 : 345-370.

Llovet J M, Brú C, Bruix J ; “Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification” ; Seminars in Liver Disease ; 1999 ; 19(3) : 329-338.

Llovet Josep M. , Jessica Zucman-Rossi, Eli Pikarsky, Bruno Sangro, Myron Schwartz, Morris Sherman, Gregory Gores ; “Hepatocellular carcinoma” ; Nature Review Disease Primers ; 2016 ; 14 ; 2 : 16018.

Llovet Josep M, Sergio Ricci, Vincenzo Mazzaferro, Philip Hilgard, Edward Gane, Jean-Frédéric Blanc, Andre Cosme de Oliveira, Armando Santoro, Jean-Luc Raoul, Alejandro Forner, Myron Schwartz, Camillo Porta, Stefan Zeuzem, Luigi Bolondi, Tim F Greten, Peter R Galle, Jean-François Seitz, Ivan Borbath, Dieter Häussinger, Tom Giannaris, Minghua Shan, Marius Moscovici, Dimitris Voliotis, Jordi Bruix, SHARP Investigators Study Group ; “Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma” ; The New England Journal of Medicine ; 2008 ; 359(4) : 378-390.

Loeppen Sandra, Daniela Schneider, Frank Gaunitz, Rolf Gebhardt, Raffael Kurek, Albrecht Buchmann, Michael Schwarz ; “Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital” ; Cancer Research ; 2002 ; 62(20) : 5685-5688.

Luo Wen, Wilson W Ng, Li-Hua Jin, Zhiyun Ye, Jiahuai Han, Sheng-Cai Lin ; Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation ; Journal of Biological Chemistry ; 2003 ; 278(39) : 37451-37458.

Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T ; p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage ; Genes & development ; 1995 ; 9(8) : 935-944.

Madhurima Saha, Audrey Carriere, Mujeeburahiman Cheerathodi, Xiaocui Zhang, Geneviève Lavoie, John Rush, Philippe P. Roux, Bryan A. Ballif ; “RSK Phosphorylates SOS1 Creating 14-3-3- Docking Sites and Negatively Regulating MAPK Activation” ; Biochemical Journal ; 2012 ; 447(1) : 159–166.

Marette André, Nicolas Smadja-Lamère, Michael Shum, Paul Déléris, Philippe P. Roux, Jun-Ichi Abe ; Insulin Activates RSK (p90 Ribosomal S6 Kinase) to Trigger a New Negative Feedback Loop That Regulates Insulin Signaling for Glucose Metabolism ; The Journal Of Biological Chemistry ; 2013 ; 288(43) : 31165–31176.

Marques Pereira Patricia, Anne Schneider, Solange Pannetier, Delphine Heron, André Hanauer ; “Coffin–Lowry Syndrome” ; *European Journal of Human Genetics* ; 2010 ; 18(6) : 627–633.

Marrero Jorge A., Robert J. Fontana, Sherry Fu, Hari S. Conjeevaram, Grace L. Su, Anna S. Lok ; “Alcohol, Tobacco and Obesity Are Synergistic Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma” ; *Journal of Hepatology* ; 2005 ; 42(2) : 218–224.

Martinez Eliana C., Catherine L. Passariello, Jinliang Li, Christopher J. Matheson, Kimberly Dodge-Kafka, Philip Reigan, et Michael S. Kapiloff ; RSK3 – A Regulator of Pathological Cardiac Remodeling ; *IUBMB Life* ; 2015 ; 67(5): 331–337.

Mehrabi Arianeb, Katrin Hoffmann, Alexander Johannes Nagel, Omid Ghamarnejad, Elias Khajeh, Mohammad Golriz, Markus W. Büchler ; “Technical Aspects of Stapled Hepatectomy in Liver Surgery: How We Do It” ; *Journal of Gastrointestinal Surgery* ; 2019 ; 23 : 1232–1239.

Messina Antonietta, Eléanor Luce, Marwa Hussein, Anne Dubart-Kupperschmitt ; “Pluripotent-Stem-Cell-Derived Hepatic Cells: Hepatocytes and Organoids for Liver Therapy and Regeneration” ; *Cells* ; 2020 ; 9(2) : 420.

Michalopoulos George K., Bhushan Bharat ; “Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications” ; *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* ; 2021 ; 18(1) : 40-55.

Mishra Manish, Shuchita Tiwari, Aldrin V. Gomes ; “Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques” ; *Expert Review of Proteomics* ; 2017 ; 14(11) : 1037–1053.

Molina-Sánchez Pedro, Marina Ruiz de Galarreta, Melissa A Yao, Katherine E Lindblad, Erin Bresnahan, Elizabeth Bitterman, Tiphaine C Martin, Troy Rubenstein, Kai Nie, Jonathan Golas, Shambhunath Choudhary, Marina Bárcena-Varela, Abdulkadir Elmas, Veronica Miguela, Ying Ding, Zhengyan Kan, Lauren Tal Grinspan, Kuan-Lin Huang, Ramon E Parsons, David J Shields, Robert A Rollins, Amaia Lujambio ; “Cooperation Between Distinct Cancer Driver Genes Underlies Intertumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma” ; *Gastroenterology* ; 2020 ; 159(6) : 2203-2220.

Nault Jean-Charles, Gabrielle Couchy, Charles Balabaud, Guillaume Morcrette, Stefano Caruso, Jean-Frédéric Blanc, Yannick Bacq, Julien Calderaro, Valérie Paradis, Jeanne Ramos, Jean-Yves Scoazec, Viviane Gnemmi, Nathalie Sturm, Catherine Guettier, Monique Fabre, Eric Savier, Laurence Chiche, Philippe Labrune, Janick Selves, Dominique Wendum, Camilla Pilati, Alexis Laurent, Anne De Muret, Brigitte Le Bail, Sandra Rebouissou, Sandrine Imbeaud, GENTHEP Investigators, Paulette Bioulac-Sage, Eric Letouzé, Jessica Zucman-Rossi ; “Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation” ; *Gastroenterology* ; 2017 ; 152(4) : 880-894.

Nault Jean-Charles, Massih Ningarhari, Sandra Rebouissou, Jessica Zucman-Rossi ; “The Role of Telomeres and Telomerase in Cirrhosis and Liver Cancer” ; Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology ; 2019 ; 16(9) : 544–558.

Nault Jean-Charles, Shalini Datta, Sandrine Imbeaud, Andrea Franconi, Maxime Mallet, Gabrielle Couchy, Eric Letouzé, Camilla Pilati, Benjamin Verret, Jean-Frédéric Blanc, Charles Balabaud, Julien Calderaro, Alexis Laurent, Mélanie Letexier, Paulette Bioulac-Sage, Fabien Calvo, Jessica Zucman-Rossi ; “Recurrent AAV2-Related Insertional Mutagenesis in Human Hepatocellular Carcinomas” ; Nature Genetics ; 2015 ; 47(10) : 1187–1193.

Nault Jean-Charles, Yoann Martin, Stefano Caruso, Théo Z Hirsch, Quentin Bayard, Julien Calderaro, Cecile Charpy, Christiane Copie-Bergman, Marianne Zioli, Paulette Bioulac-Sage, Gabrielle Couchy, Jean-Frédéric Blanc, Pierre Nahon, Giuliana Amaddeo, Nathalie Ganne-Carrie, Guillaume Morcrette, Laurence Chiche, Christophe Duvoux, Sandrine Faivre, Alexis Laurent, Sandrine Imbeaud, Sandra Rebouissou, Josep M Llovet, Olivier Seror, Eric Letouzé, Jessica Zucman-Rossi ; “Clinical Impact of Genomic Diversity from Early to Advanced Hepatocellular Carcinoma” ; Hepatology ; 2020 ; 71(1) : 164-182.

Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J ; “Real-time PCR detection chemistry” ; Clinica Chimica Acta ; 2015 ; 439 : 231–250.

Nguyen Tam Luong, Rick Gussio, Jeffrey A Smith, Deborah A Lannigan, Sidney M Hecht, Dominic A Scudiero, Robert H Shoemaker, Daniel W Zaharevitz ; Homology model of RSK2 N-terminal kinase domain, structure based identification of novel RSK2 inhibitors, and preliminary common pharmacophore ; Medical Chemistry ; 2006 ; 14 : 6097–6105.

Noureddin Mazen, Mary E. Rinella ; “Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Diabetes, Obesity, and Hepatocellular Carcinoma” ; Clinics in Liver Disease ; 2015 ; 19(2): 361–379.

Péneau Camille, Sandrine Imbeaud, Tiziana La Bella, Théo Z Hirsch, Stefano Caruso, Julien Calderaro, Valerie Paradis, Jean-Frederic Blanc, Eric Letouzé, Jean-Charles Nault, Giuliana Amaddeo, Jessica Zucman-Rossi ; Hepatitis B virus integrations promote local and distant oncogenic driver alterations in hepatocellular carcinoma ; Gut ; 2021 ; 0 : 1–11.

Peng Cong, Yong-Yeon Cho, Feng Zhu, Jishuai Zhang, Weihong Wen, Yanming Xu, Ke Yao, Wei-Ya Ma, Ann M. Bode, Zigang Dong ; “Phosphorylation of Caspase-8 (Thr-263) by Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) Mediates Caspase-8 Ubiquitination and Stability” ; Journal of Biological Chemistry ; 2011 ; 286(9) : 6946–6954.

Pilati Camilla, Eric Letouzé, Jean-Charles Nault, Sandrine Imbeaud, Anaïs Boulai, Julien Calderaro, Karine Poussin, Andrea Franconi, Gabrielle Couchy, Guillaume Morcrette, Maxime Mallet, Saïd Taouji, Charles Balabaud, Benoit Terris, Frédéric Canal, Valérie Paradis, Jean-Yves Scoazec, Anne de Muret, Catherine Guettier, Paulette Bioulac-Sage, Eric Chevet, Fabien Calvo, Jessica Zucman-Rossi ; “Genomic Profiling of Hepatocellular Adenomas Reveals Recurrent FRK Activating Mutations and the Mechanisms of Malignant Transformation” ; Cancer Cell ; 2014 ; 25(4): 428–441.

Qiao Yu , Jingxiao Wang, Eylul Karagoz, Binyong Liang, Xinhua Song, Runze Shang, Katja Evert, Meng Xu, Li Che, Matthias Evert, Diego F Calvisi, Junyan Tao, Bruce Wang, Satdarshan P Monga, Xin Chen ; “Axis Inhibition Protein 1 (Axin1) Deletion–Induced Hepatocarcinogenesis Requires Intact B-Catenin but Not Notch Cascade in Mice” ; *Hepatology* ; 2019 ; 70(6) : 2003-2017.

Qin Ancheng , Jianwu Wu, Min Zhai, Yijie Lu, Bo Huang, Xingsheng Lu, Xinwei Jiang, Zhiming Qiao ; Axin1 inhibits proliferation, invasion, migration and EMT of hepatocellular carcinoma by targeting miR-650 ; *American Journal of Translational Research* ; 2020 ; 12(3) : 1114-1122.

Razungles Julie, Vincent Cavallès, Stéphan Jalaguier, Catherine Teyssier ; L’effet Warburg : De la théorie du cancer aux applications thérapeutiques en cancérologie ; *Médecine/Sciences* ; 2013 ; 29 : 1026-1033.

Rebouissou Sandra, Nault Jean-Charles ; “Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma” ; *Journal of Hepatology* ; 2020 ; 72(2) : 215-229.

Romeo Y, Moreau J, Zindy P-J, Saba-El-Leil M, Lavoie G, Dandachi F, Baptissart M, Borden K L B, Meloche S, Roux P P ; “RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth” ; *Oncogene* ; 2013 ; 32 : 2917–2926.

Romeo Y, Zhang X, Roux PP ; “Regulation and function of the RSK family of protein kinases” ; *The Biochemical Journal* ; 2012 ; 441(2) : 553-569.

Rooks Judith Bourne, Howard W. Ory, Kamal G. Ishak, Lilo T. Strauss, Joel R. Greenspan, Annlia Paganini Hill, Carl W. Tyler Jr. ; “Epidemiology of Hepatocellular Adenoma: The Role of Oral Contraceptive Use” ; *JAMA* ; 1979 ; 242(7) : 644-648.

Roux P. P., S. A. Richards, J. Blenis ; “Phosphorylation of P90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase Docking and RSK Activity” ; *Molecular and Cellular Biology* ; 2003 ; 23(14) : 4796-4804.

Rui Yanning, Zhen Xu, Shuyong Lin, Qinxi Li, Hongliang Rui, Wen Luo, Hai-Meng Zhou, Po-Yan Cheung, Zhenguo Wu, Zhiyun Ye, Peng Li, Jiahuai Han, Sheng-Cai Lin ; “Axin Stimulates P53 Functions by Activation of HIPK2 Kinase through Multimeric Complex Formation” ; *The EMBO Journal* ; 2004 ; 23(23) : 4583–4594.

Sabine Stahl, Carina Ittrich, Philip Marx-Stoelting, Christoph Köhle, Ozge Altug-Teber, Olaf Riess, Michael Bonin, Jurgen Jobst, Stephan Kaiser, Albrecht Buchmann, Michael Schwarz ; “Genotype–Phenotype Relationships in Hepatocellular Tumors From Mice and Man” ; *Hepatology* ; 2005; 42(2) : 353-361.

Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y ; “AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1” ; *Nature Genetics* ; 2000 ; 24(3) : 245-250.

Schneider, A., Mehmood, T., Pannetier, S., Hanauer, A. ; “Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the *mrsk2_KO* mouse model of Coffin-Lowry syndrome” ; *Journal of Neurochemistry* ; 2011 ; 119(3) : 447–459.

Schubbert S., Shannon K. & Bollag G. ; “Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer” ; *Nature Review Cancer* ; 2007 ; 7(4) : 295-308.

Schulze Kornelius, Sandrine Imbeaud, Eric Letouzé, Ludmil B Alexandrov, Julien Calderaro, Sandra Rebouissou, Gabrielle Couchy, Clément Meiller, Jayendra Shinde, Frederic Soysouvanh, Anna-Line Calatayud, Roser Pinyol, Laura Pelletier, Charles Balabaud, Alexis Laurent, Jean-Frederic Blanc, Vincenzo Mazzaferro, Fabien Calvo, Augusto Villanueva, Jean-Charles Nault, Paulette Bioulac-Sage, Michael R Stratton, Josep M Llovet, Jessica Zucman-Rossi ; “Exome Sequencing of Hepatocellular Carcinomas Identifies New Mutational Signatures and Potential Therapeutic Targets” ; *Nature Genetics* ; 2015 ; 47(5) : 505–511.

Servick K ; “Of Mice and Microbes” ; *Science* ; 2016 ; 353(6301) : 741–743.

She Qing-Bai, Wei-Ya Ma, Shuping Zhong, and Zigang Dong ; “Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 Is Involved in Serine 112 Phosphorylation of Bad by Ultraviolet B Radiation” ; *Journal of Biological Chemistry* ; 2002 ; 277(27) : 24039–24048.

Siddharth Singh, Alina M. Allen, Zhen Wang, Larry J. Prokop, Mohammad H. Murad, Rohit Loomba ; “Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Paired-Biopsy Studies” ; *Clinical Gastroenterology and Hepatology* ; 2015 ; 13(4): 643-654.

Stappenbeck TS, Virgin HS ; “Accounting for Reciprocal Host-Microbiome Interactions in Experimental Science” ; *Nature* ; 2016 ; 534(7606) : 191–199.

Stevenson Mary Ann, Mei-Juan Zhao, Alexzander Asea, C. Norman Coleman, et Stuart K. Calderwood ; Salicylic Acid and Aspirin Inhibit the Activity of RSK2 Kinase and Repress RSK2-Dependent Transcription of Cyclic AMP Response Element Binding Protein- and NF-κB-Responsive Genes ; *The Journal of Immunology* ; 1999 ; 163 : 5608–5616.

Sturgill Thomas W., L. Bryan Ray, Eleanor Erikson et James L. Maller ; Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II ; *Nature* ; 1988 ; 334: 715–718.

Sung Wing-Kin, Hancheng Zheng, Shuyu Li, Ronghua Chen, Xiao Liu, Yingrui Li, Nikki P Lee, Wah H Lee, Pramila N Ariyaratne, Chandana Tennakoon, Fabianus H Mulawadi, Kwong F Wong, Angela M Liu, Ronnie T Poon, Sheung Tat Fan, Kwong L Chan, Zhuolin Gong, Yujie Hu, Zhao Lin, Guan Wang, Qinghui Zhang, Thomas D Barber, Wen-Chi Chou, Amit Aggarwal, Ke Hao, Wei Zhou, Chunsheng Zhang, James Hardwick, Carolyn Buser, Jiangchun Xu, Zhengyan Kan, Hongyue Dai, Mao Mao, Christoph Reinhard, Jun Wang, John M Luk ; “Genome-Wide Survey of Recurrent HBV Integration in Hepatocellular Carcinoma” ; *Nature Genetics* ; 2012 ; 44(7): 765–769.

Takayama Takuma, Masami Ukawa, Yuki Kanazawa, Hidenori Ando, Taro Shimizu, Tatsuhiro Ishida ; “Hydrodynamic Tail Vein Injection as a Simple Tool for Yielding Extended Transgene Expression in Solid Tumors” ; Biological and Pharmaceutical Bulletin ; 2016 ; 39(9) : 1555–1558.

Tamura Rodrigo Esaki, Jaíra Ferreira de Vasconcellos, Devanand Sarkar, Towia A Libermann, Paul B Fisher, and Luiz Fernando Zerbini ; “GADD45 proteins: central players in tumorigenesis” ; Current Molecular Medicine ; 2012 ; 12(5) : 634–651.

Tolba R, Kraus T, Liedtke C, Schwarz M, Weiskirchen R ; “Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice” ; Laboratory Animals ; 2015 ; 49(1 Suppl) : 59-69.

Totoki Yasushi, Kenji Tatsuno, Kyle R Covington, Hiroki Ueda, Chad J Creighton, Mamoru Kato, Shingo Tsuji, Lawrence A Donehower, Betty L Slagle, Hiromi Nakamura, Shogo Yamamoto, Eve Shinbrot, Natsuko Hama, Megan Lehmkuhl, Fumie Hosoda, Yasuhito Arai, Kim Walker, Mahmoud Dahdouli, Kengo Gotoh, Genta Nagae, Marie-Claude Gingras, Donna M Muzny, Hidenori Ojima, Kazuaki Shimada, Yutaka Midorikawa, John A Goss, Ronald Cotton, Akimasa Hayashi, Junji Shibahara, Shumpei Ishikawa, Jacfranz Guiteau, Mariko Tanaka, Tomoko Urushidate, Shoko Ohashi, Naoko Okada, Harsha Doddapaneni, Min Wang, Yiming Zhu, Huyen Dinh, Takuji Okusaka, Norihiro Kokudo, Tomoo Kosuge, Tadatoshi Takayama, Masashi Fukayama, Richard A Gibbs, David A Wheeler, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiro Shibata ; “Trans-Ancestry Mutational Landscape of Hepatocellular Carcinoma Genomes” ; Nature Genetics ; 2014 ; 46(12) : 1267–1273.

Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A ; “Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome” ; Nature ; 1996 ; 384 : 567-570.

Villanueva Augusto ; “Hepatocellular Carcinoma” ; New England Journal of Medicine ; 2019 ; 380(15) : 1450-1462.

Villanueva Augusto, Derek Y Chiang, Pippa Newell, Judit Peix, Swan Thung, Clara Alsinet, Victoria Tovar, Sasan Roayaie, Beatriz Minguez, Manel Sole, Carlo Battiston, Stijn Van Laarhoven, Maria I Fiel, Analisa Di Feo, Yujin Hoshida, Steven Yea, Sara Toffanin, Alex Ramos, John A Martignetti, Vincenzo Mazzaferro, Jordi Bruix, Samuel Waxman, Myron Schwartz, Matthew Meyerson, Scott L Friedman, Josep M Llovet ; “Pivotal Role of MTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma” ; Gastroenterology ; 2008 ; 135(6) : 1972-1983.

Wang Kai, Ho Yeong Lim, Stephanie Shi, Jeeyun Lee, Shibing Deng, Tao Xie, Zhou Zhu, Yuli Wang, David Pocalyko, Wei Jennifer Yang, Paul A Rejto, Mao Mao, Cheol-Keun Park, Jiangchun Xu ; “Genomic Landscape of Copy Number Aberrations Enables the Identification of Oncogenic Drivers in Hepatocellular Carcinoma” ; Hepatology ; 2013 ; 58(2) : 706–717.

Wang Kewei, Dianjun Sun ; “Cancer stem cells of hepatocellular carcinoma” ; Oncotarget ; 2018 ; 9(33) : 23306-23314.

Wang Zhiwei, Lixin Wan, Jiateng Zhong, Hiroyuki Inuzuka, Pengda Liu, Fazlul H. Sarkar, et Wenyi Wei ; Cdc20 : a potential novel therapeutic target for cancer treatment ; *Current Pharmaceutical Design* ; 2013 ; 19(18) : 3210–3214.

Wu Long, Zhao-You Tang, Yan Li ; “Experimental Models of Hepatocellular Carcinoma: Developments and Evolution” ; *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* ; 2009 ; 135(8) : 969–981.

Wu Raymond, Stephanie Pan, Yibu Chen, Yasuhiro Nakano, Meng Li, Steven Balog et Hidekazu Tsukamoto ; Fate and functional roles of Prominin 1+ cells in liver injury and cancer ; *Scientific Reports* ; 2020 ; 10 : 19412.

Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G ; “ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology : implication for Coffin-Lowry Syndrome” ; *Cell* ; 2004 ; 117(3) : 387-398.

Zeng Li, François Fagotto, Tong Zhang, Wei Hsu, Thomas J Vasicek, William L Perry, James J Lee, Shirley M Tilghman, Barry M Gumbiner, Frank Costantini ; “The Mouse Fused Locus Encodes Axin, an Inhibitor of the Wnt Signaling Pathway That Regulates Embryonic Axis Formation” ; *Cell* ; 1997 ; 90(1) : 181–192.

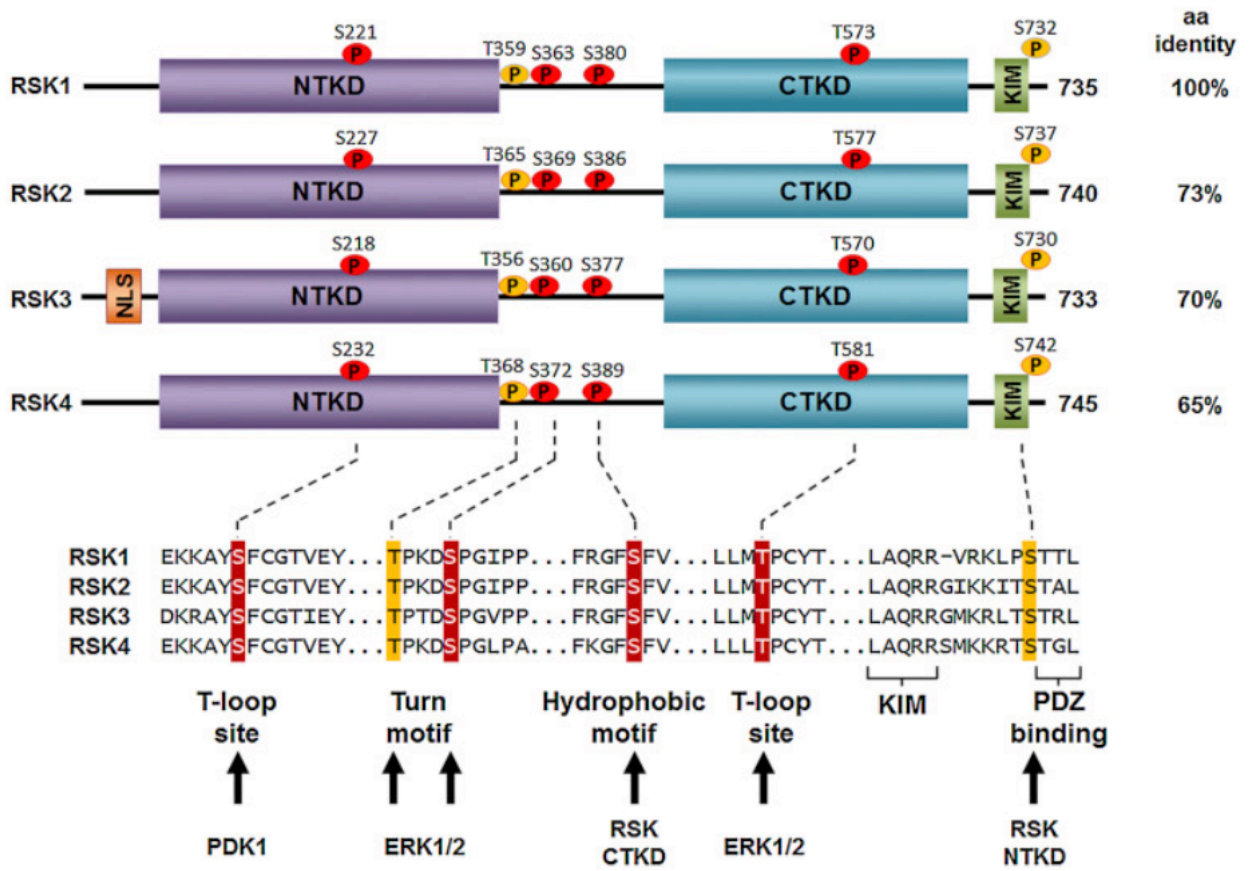
Zhao Ling-Hao, Xiao Liu, He-Xin Yan, Wei-Yang Li, Xi Zeng, Yuan Yang, Jie Zhao, Shi-Ping Liu, Xue-Han Zhuang, Chuan Lin, Chen-Jie Qin, Yi Zhao, Ze-Ya Pan, Gang Huang, Hui Liu, Jin Zhang, Ruo-Yu Wang, Yun Yang, Wen Wen, Gui-Shuai Lv, Hui-Lu Zhang, Han Wu, Shuai Huang, Ming-Da Wang, Liang Tang, Hong-Zhi Cao, Ling Wang, Tin-Lap Lee, Hui Jiang, Ye-Xiong Tan, Sheng-Xian Yuan, Guo-Jun Hou, Qi-Fei Tao, Qin-Guo Xu, Xiu-Qing Zhang, Meng-Chao Wu, Xun Xu, Jun Wang, Huan-Ming Yang, Wei-Ping Zhou, Hong-Yang Wang ; “Genomic and Oncogenic Preference of HBV Integration in Hepatocellular Carcinoma” ; *Nature Communications* ; 2016 ; 7(1): 12992.

Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, Cunha AS, Bioulac-Sage P, Perret C ; “Differential effects of inactivated Axin1 and activated b-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas” ; *Oncogene* ; 2007 ; 26(5) : 774-780.

Zucman-Rossi Jessica, Augusto Villanueva, Jean-Charles Nault, Josep M. Llovet ; “Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma” ; *Gastroenterology* ; 2015 ; 149 : 1226–1239.

Zumbrun Steven D, Barbara Hoffman, Dan A Liebermann ; “Distinct mechanisms are utilized to induce stress sensor gadd45b by different stress stimuli” ; *Journal of Cellular Biochemistry* ; 2009 ; 108(5) : 1220-1231.

ANNEXES



Annexe 1 : Caractéristiques structurales schématiques des membres de la famille des kinases S6 ribosomales (RSK1 à RSK4) chez l'homme. Elles présentent deux domaines kinase fonctionnels (N-terminal kinase = NTKD et C-terminal = CTKD) reliés par une région de liaison. L'extrémité C-terminale possède un domaine d'amarrage de la kinase ERK1/2. Six sites de phosphorylation hautement conservés sont impliqués dans l'activation des RSK : sites essentiels en rouge et accessoires en orange (Houles, Roux, 2018).

Gène cible	Amorce Forward	Amorce Reverse	Taille de l'amplicon
RPS6KA3	5'- TTGTTGGTTTACTTTCTTTC GGTCTG	5'- AAGATGATTGCTTTGCTTA GTTTA	WT : 230 pb
			KO : 320 pb
AXIN1	5'- CCTCAAGTAGACGGTACAA CGAAGGCAGAG	5'- CTGTGCAGGAGCTCTACTA AGCCTCTACAC	WT : 390 pb
			Flox : 520 pb
CRE	5'- TGACCGTACACCAAATTTG	5'- ATTGCCCTGTTTCACTATC	+ : 1100 pb

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des couples d'amorces utilisés pour réaliser le génotypage par PCR des animaux de nos lignées murines. La région d'intérêt des gènes *Rps6ka3*, *Axin1* et *Cre* est amplifiée grâce à l'utilisation de couples d'amorces spécifiques (forward + reverse) afin de déterminer le génotype de l'animal considéré, en fonction de la taille de l'amplicon qui sera détecté par électrophorèse capillaire suite à la réaction de PCR.

Réactifs	Concentration finale	Volume pour 1 échantillon
H2O Rnase Free	/	9,25 µL
Tampon RT 10X	1X	5 µL
dNTP 25X 100 mM	1X	2 µL
Amorces aléatoires 10X	1X	5 µL
Inhibiteurs Rnases 40 U/µL	1 U/µL	1,25 µL
Enzyme RT MultiScribe 50 U/µL	2,5 U/µL	2,5 µL
Volume total		25 µL

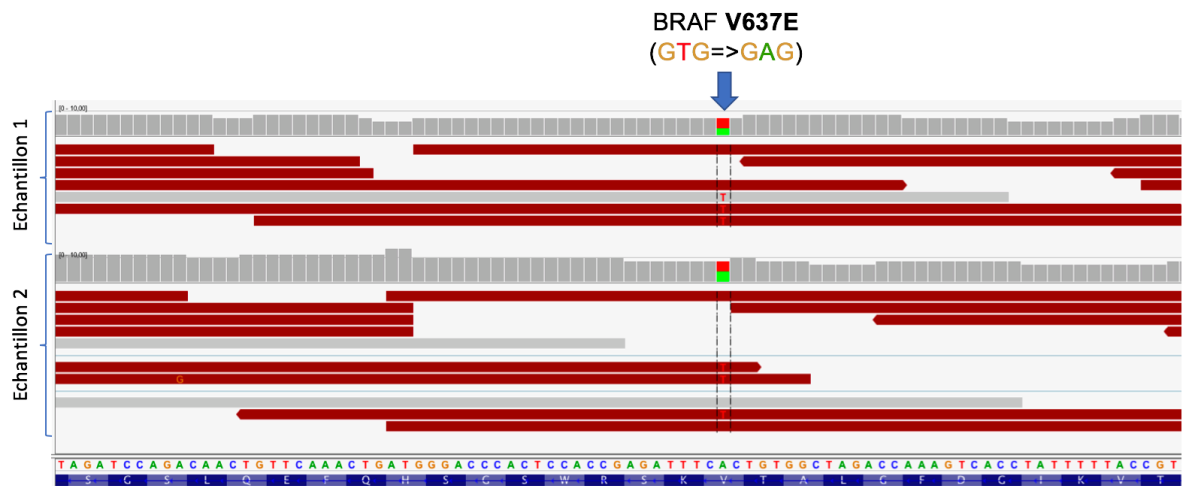
Annexe 3 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour la Reverse Transcription des ARN totaux en ADN complémentaire. Le mix est utilisé avec 500 ng d'ARN totaux dilués dans un volume de 25 µL, soit un volume de 50 µL pour la réaction, réalisée dans un thermocycleur.

Fournisseur	Référence	Gène cible	Description	Espèce cible
Applied Biosystems (ThermoFischer Scientifics)	4351372 TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM)	Krt19	Mm00492980_m1	Mus musculus
		Krt7	Mm00466676_m1	Mus musculus
		Prom1	Mm00477124_m1	Mus musculus
		Gpc3	Mm00516722_m1	Mus musculus
		Thy1	Mm00493681_m1	Mus musculus
		Cd34	Mm00519283_m1	Mus musculus
		Mki67	Mm01278617_m1	Mus musculus
		Aurka	Mm01248177_m1	Mus musculus
		Cdc20	Mm00650983_g1	Mus musculus
		Cdkn1a	Mm00432448_m1	Mus musculus
	Gadd45b	Mm00435123_m1	Mus musculus	
	4352930E Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (FAM)	ARN 18S	/	Mus musculus, Homo sapiens

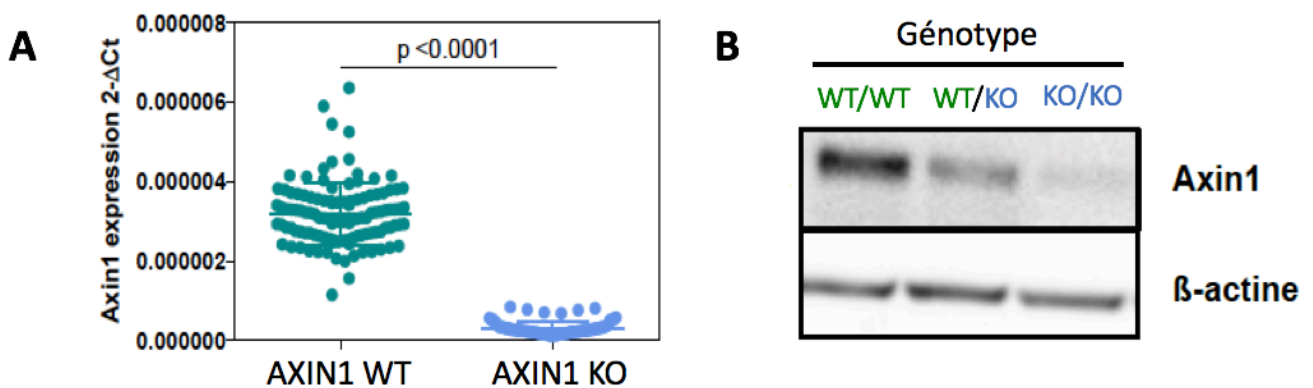
Annexe 4 : Liste des sondes Taqman utilisées pour la Q-RT-PCR. *Les sondes sont conçues spécifiquement pour les tests d'expression génique en temps réels, et sont couplées au marqueur fluorescent FAM à leur extrémité 5' et à un extincteur à leur extrémité 3', afin de pouvoir suivre la réaction en fluorescence lors de l'amplification des ADNc.*

Fournisseur	Référence	Nom de l'anticorps	Dilution validée	Concentration échantillon associée	Taille de la protéine (kDa)
Ozyme	9101	Phospho-p42/44 MAPK (ERK1/2)	1/10	1 mg/mL	42, 44
Ozyme	9102	Anti P44/42 MAP kinase (Erk1/2)	1/10	0,2 mg/mL	42, 44
Ozyme	2087	Axin1 (C76H11) Rabbit mAb	1/50	1 mg/mL	110
Ozyme	5528	RSK2 (D21B2) XP Rabbit mAb	1/10	0,8 mg/mL	90
Ozyme	32532	P53(D2H9O) Rabbit mAb, rodent spe	1/10	1,2 mg/mL	53

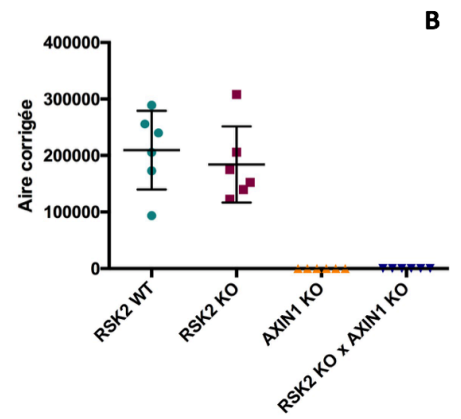
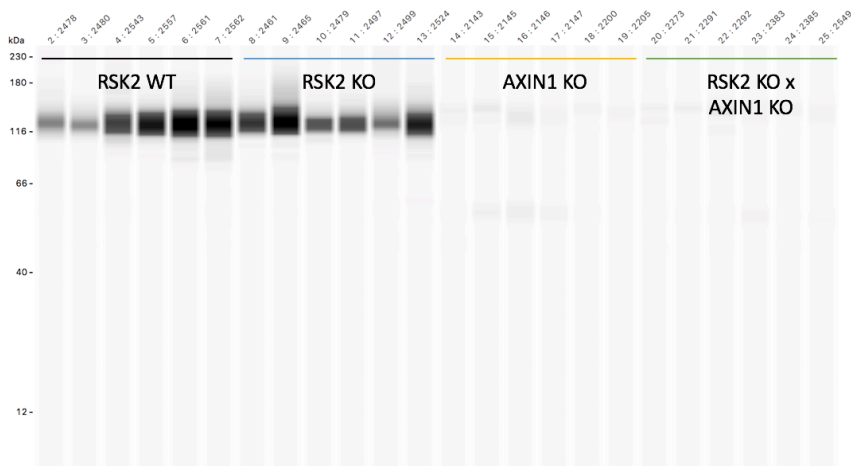
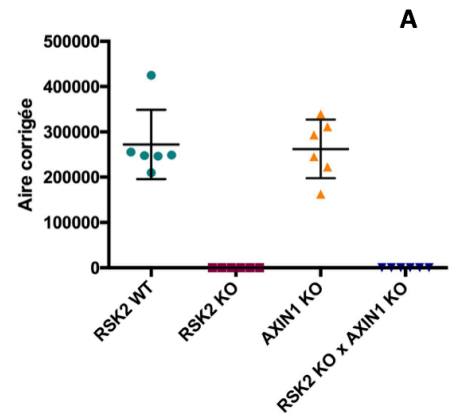
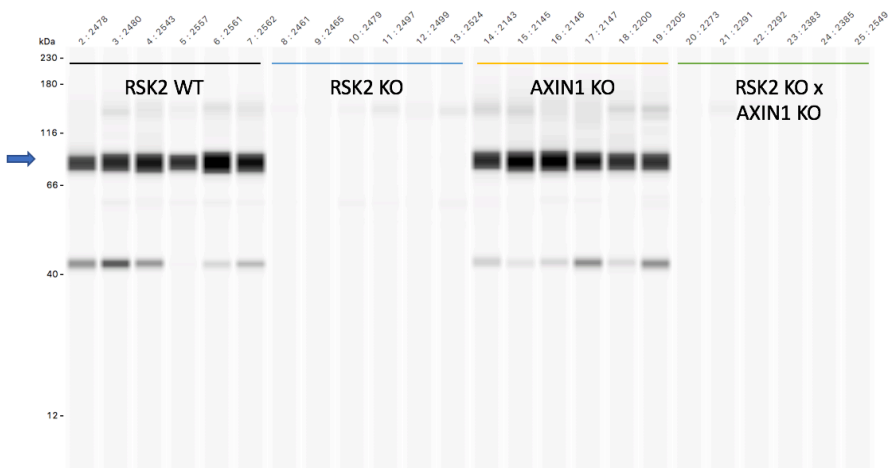
Annexe 5 : Tableau récapitulatif des conditions utilisées pour les anticorps testés en Western-Blot capillaire (automate Jess). *Une mise au point préalable à permis de déterminer ces conditions. Les anticorps primaires sont tous utilisés avec un anticorps secondaire couplé au système de détection HRP pour la révélation de la protéine d'intérêt.*



Annexe 6 : Mise en évidence des mutations activatrices de B-raf dans les tumeurs induites par le DEN à deux semaines d'âge. Les données proviennent du séquençage de deux échantillons tumoraux indépendants issus de nos expériences. On constate pour ces deux tumeurs distinctes une substitution d'acides aminés V637E (substitution d'une valine (V) par un acide glutamique (E) en position 637 dans les deux cas), qui correspond à la mutation activatrice V600E chez l'homme et confirme bien la sélection de tumeurs mutées B-raf dans notre modèle murin de DEN seul.



Annexe 7 : Vérification du génotype de l'Axin1 dans le foie, par une technique de RT-Q-PCR (A) ou par Western-Blot (B). La vérification est effectuée sur les ARN ou les protéines extraits du tissu hépatique des animaux, prélevé lors des autopsies, afin de vérifier que le génotype pour l'Axin1 est bien celui attendu. Le β -actine est utilisée comme témoin de charge lors de la détection des protéines par Western-Blot.



Annexe 8 : Recherche des protéines RSK2 (A) et AXIN1 (B) dans les lysats hépatiques des souris, analysés à 6 semaines d'âge en Western-Blot capillaire (automate Jess). L'intensité du signal correspond à la quantité de protéines dans l'échantillon. L'extinction du signal est bien constatée chez les animaux RSK2 KO, AXIN1 KO et/ou RSK2 KO x AXIN1 KO, confirmant bien le génotype attendu des animaux. Une bande aspécifique est constatée à environ 45 kDa avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine RSK2.

Rôle de l'inactivation du gène *Rps6ka3* dans la carcinogénèse hépatique

Samantha SCHAEFFER

Soutenance le lundi 6 décembre 2021

RÉSUMÉ DU RAPPORT :

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un cancer particulièrement agressif, souvent diagnostiqué fortuitement et de manière tardive, pour lequel les options thérapeutiques à un stade avancé sont très limitées. L'étude génomique des CHC, réalisée depuis plusieurs années dans notre laboratoire, a permis de mettre en évidence une forte hétérogénéité des profils moléculaires tumoraux, permettant la classification des CHC et l'orientation de la prise en charge en fonction des signatures moléculaires. Ce type d'étude permet une meilleure compréhension du paysage génétique du CHC, mais de nombreux mécanismes et acteurs impliqués dans la tumorigénèse restent encore mal connus. C'est le cas du gène *Rps6ka3*, retrouvé muté dans 6 à 9% des CHC (mutations inactivatrices de la protéine RSK2 pour laquelle code le gène), initialement décrit dans le syndrome neurologique de Coffin-Lowry et qui semble se comporter comme gène suppresseur de tumeur dans le foie. Des mutations conjointes ont également été identifiées. Dans l'étude présentée dans ce rapport, nous avons cherché à mettre en évidence les propriétés de suppresseur de tumeurs de RSK2, et nous avons testé son implication dans la carcinogénèse hépatique, seul mais aussi en coopération avec d'autres événements oncogéniques ciblés. Nous avons pour cela développé plusieurs modèles murins précliniques, génétiquement modifiés pour nos gènes d'intérêt, et couplés ou non à l'administration de molécules chimiques promouvant la carcinogénèse hépatique. L'utilisation de ce type de modèle est particulièrement utile pour étudier la biologie moléculaire du CHC, et peut également permettre la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques ou de biomarqueurs de réponse aux traitements. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur les conséquences moléculaires de l'inactivation de RSK2, dans le développement du CHC mais aussi de manière fonctionnelle chez des animaux sains. Nous avons pu mettre en évidence une coopération oncogénique entre la perte de RSK2, qui entraîne une surexpression de la voie Ras/MAPK, et une dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine (modélisée dans notre étude par l'inactivation de l'AXIN1 dans le foie, ou la surexpression de la β -caténine dans les tumeurs), suggérant une forte implication de ces deux voies de signalisation dans le sous-type de CHC concerné. Des caractéristiques telles que la présence de progéniteurs, de marqueurs de prolifération, et l'hyperphosphorylation de la protéine ERK, ont également été mises en évidence suite à l'inactivation constitutive de RSK2 associée à l'inactivation précoce de l'AXIN1, ce qui est compatible avec certaines caractéristiques moléculaires identifiées dans les tumeurs humaines mutées pour ces deux gènes.

MOTS-CLÉS : *carcinome hépatocellulaire, Rps6ka3, RSK2, coopération oncogénique, modèles murins précliniques.*