

Université de Montréal

**Influence de la fibrose hépatique sur le développement du  
carcinome hépatocellulaire**

Par  
Benoit Lacoste

Sciences biomédicales  
Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Sciences biomédicales

21 décembre 2013

©, Benoit Lacoste, 2013

## Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un cancer au pronostic sombre, car il est souvent diagnostiqué trop tardivement pour entreprendre un traitement curatif. Il se développe dans 80-90% des cas sur fond de cirrhose. On connaît mal comment la fibrose, étape préliminaire à la cirrhose, et son principal constituant, le collagène de type 1 (COL1), peuvent jouer un rôle dans le processus du CHC. Nous avons tout d'abord étudié le développement de la fibrose dans un modèle utilisant la souris nue. Nous avons déterminé qu'après 16 semaines d'administration de thioacétamide dans l'eau de boisson, il est possible d'obtenir une fibrose suffisante pour induire une hépatoprotection en présence de différents hépatotoxiques (AST dans le sérum de souris fibrotiques vs non-fibrotiques : Anti-Fas JO2 ( $4665 \pm 2596$  vs.  $13953 \pm 2260$  U/L;  $P < 0.05$ ), acétaminophène ( $292 \pm 66$  vs.  $4087 \pm 2205$  U/L;  $P < 0.01$ ) et CCL<sub>4</sub> ( $888 \pm 268$  vs.  $15673 \pm 2782$  U/L;  $P < 0.001$ )). Ces résultats confirment que la présence de COL1 et de fibrose favorise la survie des hépatocytes normaux tel qu'observé précédemment au laboratoire. Par la suite, nous avons sélectionné *in vivo*, par injection intrasplénique de la lignée de CHC Hepa1-6, une lignée à forte tumorigénicité nommée dt-Hepa1-6 ( $28 \pm 12$  lésions vs.  $0 \pm 0$  lésions à 21 jours). Cette lignée était composée d'une sous-population cellulaire arborant la protéine de surface EpCAM ( $34.0 \pm 0.1\%$ ). Par tri cellulaire, nous avons démontré que ces cellules étaient partiellement responsables de la tumorigénicité accrue (EpCAM+ ( $86.7 \pm 2.3\%$ ) :  $1093 \pm 74$  lésions vs. EpCAM- ( $15.3 \pm 1.0\%$ ) :  $473 \pm 100$  lésions;  $P < 0.01$ ). Nous avons alors démontré que la présence de fibrose favorise le

développement de la lignée dt-Hepa1-6 *in vivo* ( $604 \pm 242$  vs  $22 \pm 9$  lésions;  $P < 0.05$ ). De plus, la présence de fibrose réduit l'efficacité du traitement au cisplatine *in vivo* ( $44.5 \pm 4.9$  vs.  $78.7 \pm 6.9\%$ ;  $P < 0.01$ ) confirmant les résultats obtenus *in vitro* (Apoptose : COL1  $13.75 \pm 0.44\%$  vs. plastique  $31.45 \pm 1.37\%$ ;  $P < 0.001$ ). En conclusion, la présence de fibrose et de son principal constituant, le COL1, favorise la survie et la progression du CHC.

Mots-clés :

Carcinome hépatocellulaire, Collagène de type I, Fibrose hépatique, MAPK, EpCAM, Survivine, Hépatoprotection, Cellule souche cancéreuse, Résistance aux anti-cancéreux

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a dreadful pathology, often diagnosed too late to be cured. In 80-90% of cases, it arises in the context of liver cirrhosis. Little is known on the implication of liver fibrosis, one of the key elements of cirrhosis, and its major constituent, type I collagen (COL1), on the development of HCC. We first studied the development of fibrosis in a nude mouse model. We determined that, after 16 weeks of thioacetamide administration in drinking water, we obtained a sufficient degree of fibrosis to reach a hepatoprotective state when animals were exposed to different hepatotoxic agents (Serum AST of fibrotic vs non-fibrotic mice : Anti-Fas JO2 ( $4665 \pm 2596$  vs.  $13953 \pm 2260$  U/L;  $P < 0.05$ ), acetaminophen ( $292 \pm 66$  vs.  $4087 \pm 2205$  U/L;  $P < 0.01$ ) et CCL<sub>4</sub> ( $888 \pm 268$  vs.  $15673 \pm 2782$  U/L;  $P < 0.001$ )). This confirmed that COL1 and the presence of fibrosis protects normal hepatocytes as observed previously in our laboratory. Next, we selected *in vivo*, by intrasplenic injection of the murine HCC cell line Hepa1-6, a highly tumorigenic cell line that we named dt-Hepa1-6 ( $28 \pm 12$  lesions vs.  $0 \pm 0$  lesions at 21 days). This cell line was constituted of cell subsets expressing EpCAM protein at their surface ( $34.0 \pm 0.1\%$ ). Through cell sorting, we demonstrated that these cells were partially responsible for the enhanced tumorigenicity observed (EpCAM + ( $86.7 \pm 2.3\%$ ) :  $1093 \pm 74$  lesions vs. EpCAM- ( $15.3 \pm 1.0\%$ ) :  $473 \pm 100$  lesions;  $P < 0.01$ ). We then showed that the presence of liver fibrosis increases the development of dt-Hepa1-6 cell line *in vivo* ( $604 \pm 242$  vs  $22 \pm 9$  lesions;  $P < 0.05$ ). Moreover, fibrosis reduced the anti-neoplastic efficacy of cisplatinum *in vivo* ( $44.5 \pm 4.9$  vs.  $78.7 \pm 6.9\%$ ;  $P < 0.01$ )

confirming *in vitro* results (Apototic index : COL1  $13.75 \pm 0.44\%$  vs. plastic  $31.45 \pm 1.37\%$ ;  $P < 0.001$ ). In conclusion, fibrosis and its major constituent, COL1, favor the survival and progression of HCC.

Key-words :

Hepatocellular carcinoma, Type I collagen, Liver fibrosis, MAPK, EpCAM, Survivin, Hepatoprotection, Cancer stem cell, Chemotherapy resistance

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XI</b>
<b>SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XII</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XV</b>
<b>CHAPITRE 1 - INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1-1 FOIE ET FIBROSE.....</b>	<b>1</b>
1-1-1 Foie sain.....	1
1-1-1-1 Architecture hépatique normale.....	1
1-1-1-2 Les acteurs cellulaires .....	2
1-1-1-3 La matrice extra-cellulaire (MEC) : constitution et rôle physiologique .....	3
1-1-2 Foie fibrotique .....	4
1-1-2-1 Physiopathologie de la fibrose.....	4
1-1-2-1-1 Initiation .....	4
1-1-2-1-2 Progression et changements structuraux (Figure 1.2).....	7
1-1-2-1-3 Réversibilité.....	11
1-1-2-1-4 Évolution vers la cirrhose.....	12
1-1-2-2 Modèles d'étude de la fibrose hépatique .....	12
1-1-2-2-1 Modèles chirurgicaux.....	13
1-1-2-2-2 Modèles métaboliques.....	14
1-1-2-2-3 Modèles génétiques.....	14
1-1-2-2-4 Modèles chimiques .....	15
1-1-2-3 Interaction MEC et hépatocytes dans le contexte fibrotique .....	16
<b>1-2 AGRESSION HÉPATIQUE ET HÉPATOPROTECTION .....</b>	<b>18</b>
1-2-1 Mort et survie cellulaires.....	18
1-2-1-1 Apoptose .....	18
1-2-1-1-1 Voie extrinsèque .....	18
1-2-1-1-2 Voie intrinsèque.....	21
1-2-1-2 Nécrose .....	23
1-2-1-3 Autophagie .....	24
1-2-1-4 Survie cellulaire.....	27

1-2-1-4-1 Voie MAPK.....	27
1-2-1-4-2 Voie Wnt/ $\beta$ -catenin.....	29
1-2-1-4-3 Protéines inhibitrices de l'apoptose.....	29
1-2-1-5 Cycle cellulaire.....	30
<b>1-2-2 Agents hépatotoxiques.....</b>	<b>30</b>
1-2-2-1 Tétrachlorure de carbone (CCl <sub>4</sub> ).....	31
1-2-2-2 Acétaminophène.....	32
1-2-2-3 TNF $\alpha$ et actinomycine D (actD).....	32
1-2-2-4 Anticorps agonistes de Fas.....	33
<b>1-2-3 Hépatoprotection.....</b>	<b>33</b>
<b>1-3 CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE.....</b>	<b>37</b>
<b>1-3-1 Carcinogénèse.....</b>	<b>37</b>
1-3-1-1 Théories d'étude du cancer.....	37
1-3-1-1-1 Accumulation d'insultes.....	37
1-3-1-1-2 Sélection clonale.....	38
1-3-1-1-3 Carcinogénèse à étapes multiples.....	38
1-3-1-1-4 Cellules souches cancéreuses.....	39
1-3-1-2 Caractéristiques du CHC.....	39
1-3-1-3 Facteurs de risque du CHC.....	40
1-3-1-3-1 Virus de l'hépatite C (VHC).....	41
1-3-1-3-2 Virus de l'hépatite B (VHB).....	42
1-3-1-3-3 Stéatose d'origine non-alcoolique (NAFLD).....	42
1-3-1-3-4 Intoxication à l'alcool.....	43
1-3-1-3-5 Hémochromatose.....	44
1-3-1-3-6 Sexe.....	45
1-3-1-3-7 Âge.....	46
1-3-1-3-8 Tabagisme.....	46
1-3-1-3-9 Diabète.....	46
1-3-1-3-10 Aflatoxines.....	47
1-3-1-4 Progression.....	47
1-3-1-4-1 Initiation.....	48
1-3-1-4-2 Promotion.....	49
1-3-1-5 Marqueurs des cellules souches cancéreuses.....	50
<b>1-3-2 Modèles d'étude du CHC.....</b>	<b>52</b>
1-3-2-1 Modèle chimique.....	52
1-3-2-2 Modèle métabolique.....	53
1-3-2-3 Modèles génétiques.....	53
1-3-2-4 Modèles chirurgicaux.....	54
<b>1-3-3 CHC et fibrose hépatique (Figure 1.10).....</b>	<b>56</b>
<b>CHAPITRE 2 - HYPOTHÈSE.....</b>	<b>59</b>
<b>CHAPITRE 3 - ARTICLE 1.....</b>	<b>60</b>
3.1 Abstract.....	61
3.2 Introduction.....	63
3.3 Material and methods.....	65
3.4 Results.....	72

3.5 Discussion.....	76
3.6 References .....	79
3.7 Figures.....	82
<b>CHAPITRE 4 - ARTICLE 2.....</b>	<b>88</b>
4.1 Abstract .....	89
4.2 Introduction .....	91
4.3 Material and methods.....	94
4.4 Results .....	106
4.5 Discussion.....	113
4.6 References .....	118
4.7 Figures.....	122
<b>CHAPITRE 5 - ARTICLE 3.....</b>	<b>133</b>
5.1 Abstract .....	134
5.2 Introduction.....	136
5.3 Material and methods.....	139
5.4 Results.....	152
5.6 References.....	164
5.7 Figures and tables.....	168
<b>CHAPITRE 6 - DISCUSSION .....</b>	<b>181</b>
<b>CHAPITRE 7 - CONCLUSION .....</b>	<b>200</b>
<b>CHAPITRE 8 - RÉFÉRENCES.....</b>	<b>201</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>XII</b>



# Liste des figures

## Chapitre 1 - Introduction

Figure 1.1 : Initiation et progression de la fibrose hépatique.	6
Figure 1.2 : Structure du foie normal et fibrotique.	10
Figure 1.3 : Voie extrinsèque de l'apoptose.	21
Figure 1.4 : Voie intrinsèque de l'apoptose.	23
Figure 1.5 : Voie MAPK.	28
Figure 1.6 : Progression.	48
Figure 1.7 : Initiation.	49
Figure 1.8 : Promotion.	50
Figure 1.9 : Injection intrasplénique.	55
Figure 1.10 : Fibrose et CHC.	58

## Chapitre 3 - Article 1

Figure 1: Liver fibrosis progression.	82
Figure 2: Liver fibrosis histological features.	83
Figure 3: Activation of hepatic stellate cells.	84
Figure 4: ERK1/2 phosphorylation.	85
Figure 5: Protective effect of liver fibrosis in nude mice against different cytotoxic agents.	86
Figure 6: Histological features of hepatoprotective effect of liver fibrosis against different cytotoxic agents.	87

## Chapitre 4 - Article 2

Figure 1: Time-dependent tumor development of dt-Hepa1-6.	122
Figure 2: Dose-dependent tumor development of dt-Hepa1-6.	123
Figure 3: In vivo liver specificity of dt-Hepa1-6.	125
Figure 4: In vitro evaluation of Hepa1-6 and dt-Hepa1-6 characteristics associated with tumorigenicity.	126
Figure 5: Effect of EpCAM enrichment on tumorigenicity	128
Figure 6: Comparison of gene and protein expressions with tumorigenicity or EpCAM expression.	129
Supplementary Figure 1: Origins of dt-Hepa1-6 cell line.	130
Supplementary Figure 2: Correlation analysis between tumor load, $\beta$ -catenin protein expression and EpCAM positive cell population.	131
Supplementary Figure 3: Comparison of pro-survival and pro-apoptotic protein expression between Hepa1-6 and dt-Hepa1-6.	132

## Chapitre 5 - Article 3

Figure 1: COL1 protects against cell death in the hepatoma cell lines.	168
Figure 2: ERK1/2 phosphorylation is enhanced by COL1.	170
Figure 3: COL1 increases Survivin, CyclinB1 and ILK gene expression through ERK1/2 pathway while FAK, P53, Itga1 and Itgb1 gene expression is not influenced by COL1.	172

Figure 4: Dt-Hepa1-6 are sensitive to TAA toxicity, COL1 is not influencing proliferation but increases attachment and 3 dimensional development.	173
Figure 5: Liver fibrosis enhances HCC progression in immunocompetent C57/bl6 mice.	174
Figure 6: Liver fibrosis enhances HCC progression in immunodeficient nude mice.	175
Figure 7: Liver fibrosis decreases efficacy of cisplatin treatment in C57/bl6 inoculated with HCC.	176
<b>Chapitre 6 – Discussion</b>	
Figure 6.1 : Résumé des résultats principaux de l'article 1.	181
Figure 6.2 : Résumé des résultats principaux de l'article 2.	183
Figure 6.3 : Résumé des résultats principaux de l'article 3.	184
Figure 6.4 : Perspective : évaluation de l'influence de la MEC fibrotique et fibrotique de rats sur le comportement des CHC.	191
Figure 6.5 : Perspective : évaluation in vivo de l'inhibition de l'expression d'ERK1/2 sur le développement et la résistance aux agents chimiothérapeutiques des CHC.	194
Figure 6.6 : Perspective : évaluation de l'influence du COL1 et de la MEC fibrotique sur les différentes sous-populations de CSC.	197

## Liste des tableaux

### Chapitre 5 - Article 3

Table 1: Experimental design of HCC inoculation using C57/bl6 mice.	178
Table 2: Experimental design of HCC inoculation using FoxN1 nu/nu nude mice.	179
Table 3: Experimental design of HCC inoculation followed by cisplatin treatment in C57/bl6 mice.	180

## Sigles et abréviations

ActD	Actinomycine D
AFP	Alpha Foeto-Protéine
AKT	Protein Kinase B
APAP	Acétaminophène
ATG	Autophagy gene
ATP	Adénosine Triphosphate
ATP7A	Copper-transporting ATPase 1
Bak	Bcl-2 homologous Antagonist Killer
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BIR	Baculoviral IAP Repeat
CAD	Caspase-activated DNase
CBP	CREB binding protein
CCl <sub>4</sub>	Tétrachlorure de carbone
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CK	Cellules de Kupffer
CMA	Chaperon Mediated Autophagy
COL1	Collagène de type I
CP	Cisplatine
CREB	cAMP response element binding protein
CSC	Cellules Souches Cancéreuses
CSH	Cellules Stellaires Hépatiques
CTGF	C transforming Growth Factor
DAMP	Damage Associated Motif Pattern
DEN	N-Diéthylnitrosamine
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMN	N-Diméthylnitrosamine
EGF	Epithelial Growth Factor
EGO	Exit from rapamycin-induced growth arrest
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fas	Apoptosis stimulating fragment
FasL	Fas Ligand
FasR	Fas Récepteur
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HH	Hémochromatose Héritaire
HIF	Hypoxia Induced Factor
hnRNP	Hétérogène nucléaire ribonucléoprotéines
Hsc70	Heat Shock Chaperon 70kD
Hsp70	Heat Shock Protein 70kD
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein

ICAD	Inhibitor of CAD
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IL	Interleukine
ILK	Integrin Linked Kinase
IP	Intra-péritonéal
IRS-2	Insulin Receptor Substrate 2
JAK	Janus Kinase 1
JNK	C-jun N terminal kinase
KLF6	Kruppel Like Factor 6
LAMP-2A	Lysosome Associated Membrane Protein 2A
Lhx2	LIM/homeobox protein Lhx2
LPS	Lipopolysacharrides
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Induced meloid leukemia cell differentiation protein
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
mTOR	mammalian Target of Rapamycine
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinone imine
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NF-κB	Necrosis Factor κB
NO	Oxyde Nitreux
P300	E1A-binding protein, 300kD
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	PDGF récepteur
PI3K	Phosphatidyl Inoside 3 Kinase
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RIP	Receptor-Interacting Protéine
RIPK	RIP Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
RSK	ERK-activated p90 ribosomal S6 kinase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAA	Thioacetamide
t-Bid	Truncated-Bid
TGF	Tumor Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TLR4	Toll-like Receptor 4
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	TNF-receptor
TRADD	TNF receptor-associated protein with death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C

*Curiosité n.f. : Appétit de connaître se manifestant par le questionnement,  
par la lecture, par des investigations sur du matériel.*

-Le grand dictionnaire terminologique (Office québécois de la langue française)

## **Remerciements**

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr Bilodeau qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a poussé à développer mon sens critique tout au long de ces années. Tout en me faisant confiance, il a su aiguïser mon jugement et me permettre de garder un œil toujours ouvert pour éviter les erreurs. Finalement, le développement de mon projet à l'intérieur de son laboratoire m'a permis de garder une vue d'ensemble sur la recherche et ainsi de mieux percevoir les implications futures de mes travaux.

Mille mercis à mes parents qui m'ont supporté dans tout et qui ont su pousser ma curiosité sans laquelle je n'aurais sûrement pas entrepris ce chemin.

Merci à Catherine pour m'avoir épaulé et été si compréhensive durant ces années.

Merci à Val qui est passée de professeur à collègue à amie et ce pour très longtemps.

Merci aux membres passés du labo et plus particulièrement à Sven qui a été un excellent mentor. Merci aux membres présents du labo, Grégory et Benoît, pour toutes les discussions plus intéressantes les unes que les autres. Finalement, je voudrais remercier pour leurs lectures, commentaires et précieux conseils sur ce travail : Val, Benoît et Grégory.

## **Avant-propos**

Le foie, de par son rôle dans le métabolisme de nombreux agents toxiques, constitue une des principales lignes de défense du corps humain. Lors d'agressions répétées, la matrice extracellulaire s'accumule dans le foie : nous parlons alors de fibrose hépatique. La cirrhose, étape ultime de la fibrose, est fortement associée au risque de développement du carcinome hépatocellulaire (CHC). Le pronostic de ce cancer reste sombre car il est rarement diagnostiqué à un stade précoce qui permettrait d'envisager un traitement curatif. La relation unissant la fibrose hépatique et le CHC est, quant à elle, encore peu comprise. Nous allons tenter de mieux documenter et étudier cette relation.



# **Chapitre 1 - Introduction**

## **1-1 Foie et Fibrose**

### ***1-1-1 Foie sain***

#### **1-1-1-1 Architecture hépatique normale**

Le foie a entre autres pour fonction d'assurer le métabolisme de nombreux composés toxiques afin d'assurer leur élimination (1). Il assure le maintien de la glycémie par le stockage du glucose sous forme de glycogène, le transit des lipides, la production des composants de la bile et fait office de première ligne de défense contre les endotoxines provenant du système entérique par la veine porte (1, 2). Sa structure normale se compose d'une multitude de lobules hexagonaux ayant en leur centre une veine centro-lobulaire et à leurs sommets un espace porte formé de ramifications de la veine porte, de l'artère hépatique et des voies biliaires. Une structure vasculaire appelée les sinusoides, formés par les hépatocytes organisés en travées, relie les espaces portes à la veine centro-lobulaire. Ils constituent une zone d'échange optimale entre le tissu sanguin et les hépatocytes. Les canalicules biliaires situés entre les hépatocytes permettent de récolter la bile et de la déverser dans de plus gros canaux situés dans l'espace porte, appelés les canaux biliaires interlobulaires. La vascularisation hépatique provient pour 1/3 de l'artère hépatique, apportant au foie l'oxygène et l'énergie, et aux 2/3 de la veine porte, transportant les

différentes molécules à traiter ainsi que les éléments nutritifs absorbés par le tube digestif. Le sang diffuse vers le centre des lobules pour rejoindre les veines centro-lobulaires qui formeront à la sortie du foie les veines sus-hépatiques (3).

### **1-1-1-2 Les acteurs cellulaires**

Les hépatocytes forment la principale population cellulaire du foie. Ils sont responsables de la grande majorité des fonctions hépatiques, tel que le métabolisme des composés toxiques, la production des lipoprotéines qui sont essentielles pour le transport des lipides, le stockage du sucre sous forme de glycogène et la production de la bile. En situation physiologique, ils sont situés de part et d'autre des sinusoides, derrière une rangée de cellules endothéliales offrant de grandes fenestrations (3). Ces ouvertures et la surface constituée de microvillosités des hépatocytes permettent un échange optimal entre le tissu sanguin et ces derniers (4). Les cellules de Kupffer (CK), situées dans les sinusoides, sont les macrophages résidents du foie et ont pour principale fonction d'éliminer les débris cellulaires (1). Les cellules stellaires hépatiques (CSH), se trouvent dans l'espace de Disse situé entre la rangée de cellules endothéliales et les hépatocytes. À l'état de repos, les CSH sont gorgées de vitamine A (1).

### **1-1-1-3 La matrice extra-cellulaire (MEC) : constitution et rôle physiologique**

Les hépatocytes, bien qu'ils soient des cellules épithéliales, ne reposent pas sur une membrane basale (3). Dans le foie sain, les principaux composants de la MEC présents sont la laminine, le collagène de type IV et le collagène de type VI : on les retrouve en petites quantités et de façon désorganisée dans l'espace de Disse entre les cellules endothéliales des capillaires sinusoides et la pôle vasculaire des hépatocytes (4).

La laminine est une glycoprotéine formée de trois sous-unités associée à la membrane basale qui permet la liaison des cellules au sein d'une architecture complexe (5). Dans le foie, elle est le principal constituant du tissu vasculaire et sert de support aux cellules endothéliales qui bordent les sinusoides (6, 7). La laminine peut interagir avec les cellules par l'entremise de sa sous-unité alpha (5). La liaison de la laminine aux cellules épithéliales se fait généralement par l'entremise des intégrines  $\alpha 6\beta 4$  et  $\alpha 6\beta 1$ . Par contre, les hépatocytes normaux ne sont pas en contact direct avec la laminine. Dans l'espace de Disse, la laminine n'est présente qu'au stade fœtal et disparaît à l'âge adulte (8). De plus, les hépatocytes ne produisent pas d'intégrines  $\alpha 6$  ni  $\beta 4$  à l'âge adulte (9). Dans le cas du CHC, il est possible de d'observer une augmentation de l'expression du couple d'intégrines  $\alpha 6\beta 1$  ce qui est d'ailleurs associé à un mauvais pronostic (10, 11).

Le collagène de type IV est une protéine formée de six chaînes alpha différentes (12). Sa localisation et son rôle dans le foie sont similaires à celui de la laminine, c'est-à-dire qu'il sert de support aux cellules endothéliales et se retrouve dans l'espace de Disse (8).

Le collagène de type VI est présent dans la membrane basale des cellules vasculaires du circuit veineux hépatique ainsi qu'en faible quantité dans l'espace de Disse (8).

## ***1-1-2 Foie fibrotique***

### **1-1-2-1 Physiopathologie de la fibrose**

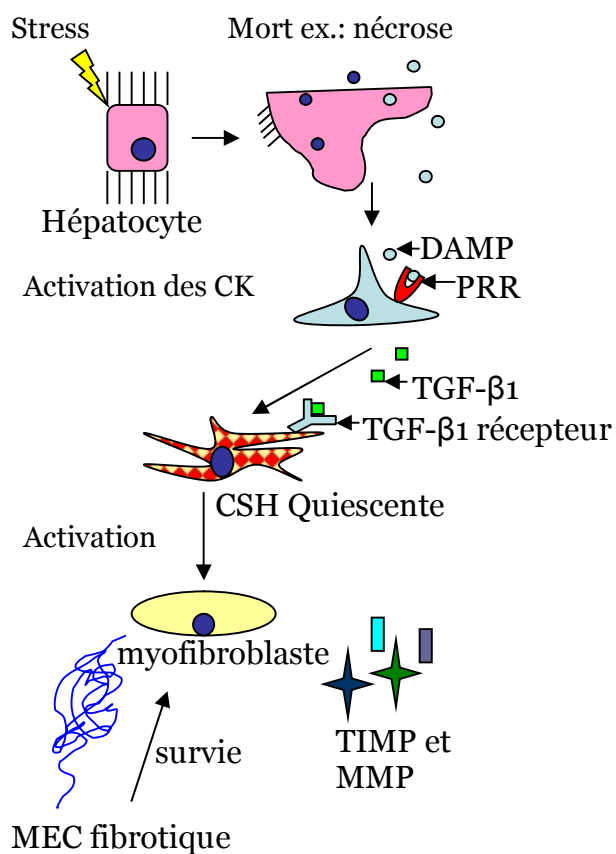
#### **1-1-2-1-1 Initiation**

La fibrose hépatique apparaît en réponse à un stress hépatique soutenu d'origine virale, chimique, inflammatoire, etc. (4, 13, 14). Dans le cas d'un stress chimique, il y aura induction de nécrose hépatocytaire et ainsi relargage de débris cellulaires (Figure 1.1). Ces débris présentent un motif particulier appelé DAMP (Damage associated motif pattern) qui réagira avec les récepteurs cellulaires de la famille des PRR (Pattern recognition receptor) dont fait partie le TLR4 (Toll-Like Receptor 4) (15). Ce récepteur se trouve à la surface, entre autres des macrophages, et plus particulièrement dans le foie, à la surface des

CK (15). Ces cellules ont pour fonction de phagocyter les débris cellulaires et de réagir à la présence d'endotoxines, aussi connues sous le nom de lipopolysaccharides (LPS) (16). Ces molécules d'origine bactérienne parviennent au foie par la veine porte à partir du tube digestif (16). Une augmentation de la perméabilité intestinale est observée dans de nombreuses hépatopathies et notamment dans les atteintes d'origine éthylique. Elle a pour conséquence une augmentation de l'afflux des LPS vers le foie (17-19). Cette hausse de LPS provoquera ainsi l'activation des CK tout comme le feraient les résidus provenant de la nécrose des hépatocytes (15). Une fois activées, les CK produiront de nombreuses cytokines dont le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ 1 (19, 20). Dans ce contexte d'inflammation associé à la production de cytokines, il y aura poursuite de l'activation des CK encore quiescentes par les composantes du complément C3a et C5a (16). Le TGF- $\beta$ 1 libéré par les CK induira l'activation des CSH, et la production de MEC qui y est associée (4).

En plus des CK, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type TH2 ont la capacité de sécréter les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13, toutes 3 profibrosantes (21-23). Ainsi, en situation de récurrence fibrosante de l'hépatite C après greffe de foie, l'IL-4 est fortement exprimée. *In vitro*, l'IL-4 stimule l'expression des gènes du collagène de type I, III et IV dans les CSH (23). L'IL-13, quant à elle, induit la production de CTGF (C Transforming Growth Factor) *in vivo*, un fort stimulant de la production de MEC (24). Par ailleurs, l'IL-5 exerce un effet modulateur de la production d'IL-13 et de son effet profibrosant *in vivo* (22). En plus des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type TH2, la sous-population de type Th17 a

récemment été impliquée dans la fibrose liée aux maladies autoimmunes, où sa cytokine spécifique, l'IL-17, a montré un potentiel profibrosant (25). L'IL-17 provoquerait l'activation des CSH par sa liaison au récepteur IL-17RA (26). Les Th17 sont aussi associées aux maladies hépatiques d'origine alcoolique, à la stéatohépatite non-alcoolique et aux hépatites virales (27). Toutefois, l'implication des cellules T dans la fibrogenèse demeure limitée, car même en leur absence la fibrose peut se développer (28).



**Figure 1.1 : Initiation de la fibrose hépatique.** Illustration de la voie de transformation des CSH en myofibroblaste par l'activation des CK suite à un stress entraînant une nécrose hépatocytaire. Le stress induit la mort des hépatocytes par nécrose qui relargueront des DAMP. Le récepteur PRR de CK activé par la présence de DAMP stimulera la sécrétion de TGF-β1. Une fois liée

à son récepteur TGF- $\beta$ 1R, la CSH quiescente se transformera en myofibroblaste produisant de la MEC ainsi que les MMP et TIMP favorisant son accumulation.

### **1-1-2-1-2 Progression et changements structuraux (Figure 1.2)**

Lorsque l'atteinte toxique est persistante, plusieurs cellules, telles que les CK, les hépatocytes, les CSH, les NK, les lymphocytes et les cellules dendritiques, libéreront une grande variété de cytokines pro-inflammatoires. En plus de provoquer la réaction inflammatoire qui définit l'hépatite, les cytokines continueront à stimuler l'activation des différents intervenants cellulaires entraînant la réponse physiologique vers un stade pathologique. Premièrement, le TNF- $\alpha$  par l'activation de son récepteur (29) induira des changements dans la régulation de la transcription génique des CSH qui entraîneront la production de MEC ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (30). Une des deux molécules les plus importantes dans l'activation des CSH est le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) : sa liaison au récepteur tyrosine kinase PDGFR- $\alpha$  ou  $\beta$  provoque l'activation de la voie PI3K/AKT qui régule plusieurs fonctions cellulaires (31-33). L'autre molécule d'importance est le TGF- $\beta$ , plus précisément son isoforme  $\beta$ 1, qui est principalement produite dans le foie par les monocytes et les macrophages (4). Le TGF- $\beta$ 1 induit, en se liant au récepteur TGF- $\beta$  de type 1, la dimérisation du récepteur de type 1 avec celui de type 2 et permet l'activation des molécules de signalisation SMAD 2 et 3. Une fois activées, les molécules SMAD 2 et 3 formeront un hétérodimère avec

SMAD4 et migreront au noyau où ils opèreront des changements transcriptionnels (34). Les cytokines interféron- $\gamma$  et la leptine initieront, elles, ces changements dans le noyau grâce à la voie JAK/STAT (Janus kinase 1/Signal Transducers and Activators of Transcription) (4). Il ne s'agit ici qu'une fraction des cytokines libérées afin d'illustrer les principales voies moléculaires contrôlant l'activation, la prolifération et la production de fibrose par les CSH. Ces signaux intracellulaires induiront la production de COL1 ainsi qu'une modification de l'expression des MMP (Matrix Metalloproteinases), enzymes impliqués dans la dégradation de la MEC, et de leurs inhibiteurs, les TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases). Au niveau génique, l'expression de la forme courte du facteur de transcription KLF6 induira la croissance cellulaire et la production du COL1. La production de CBF1 et MeCP2 induira l'inhibition des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (Necrosis factor  $\kappa$ B) et donc une baisse dans la production de certaines enzymes de dégradation de la MEC. De plus, la baisse de l'activité transcriptionnelle de Lhx2 limitera les facteurs favorisant la quiescence des CSH (35). Les CSH quiescentes servent de réserve lipidique dans lesquelles est stockée près de 80% de la vitamine A totale (36). Une fois activées, des mécanismes d'autophagie seront enclenchés dans les CSH; il y aura alors disparition du stock de lipides, libération de la vitamine A et de son dérivé l'acide rétinoïque ainsi qu'une transition de la cellule vers son phénotype activé de myofibroblaste (37, 38). De plus, l'activation des CSH assure une plus grande stabilité des ARNm de preCol1A1 via une molécule de la famille des hnRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), nommée  $\alpha$ -CP laquelle, en

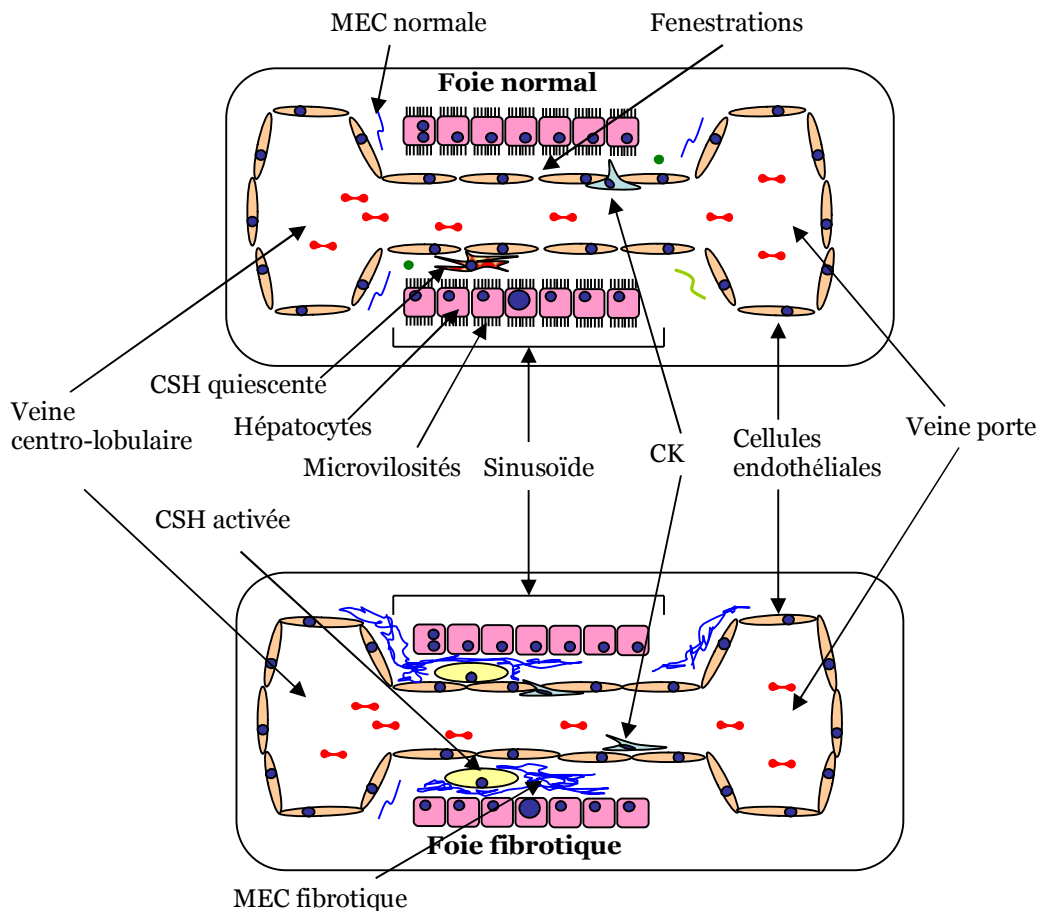


se liant au brin d'ARN permet leur stabilisation et leur traduction en protéines (39).

Une fois les CSH activées, elles entameront un processus réduisant la proportion des constituants normaux de la MEC par l'action des MMP. Au début de l'activation des cellules stellaires, les MMP3 et 13 sont sécrétées par ces dernières, et permettent alors la dégradation des composantes de la MEC (40). Par la suite, la sécrétion de la TIMP2, un inhibiteur des MMP1 et 13, qui possèdent toutes deux une activité collagénase, ainsi que la production de MMP2, une enzyme de dégradation de la MEC associée au foie sain, favoriseront une accumulation des fibrilles de collagène de type I (COL1) et III (40). La dégradation des composantes de la MEC du foie sain libère des fragments de MEC que l'on nomme néo-épitopes qui sont principalement étudiés à titre de biomarqueurs (41-43). La présence de TIMP-1 favorise de plus la survie des CSH et donc la poursuite de leur rôle pro-fibrotique (44). Le COL1 produit par le CSH est un des principaux constituant de la MEC du foie fibrotique avec le collagène de type III et la fibronectine (2, 4).

Une fois le processus enclenché, les fibrilles de collagène de type I et III produites stimuleront la survie des CSH (4). L'accumulation de MEC le long des sinusoides limitera les échanges entre le tissu sanguin et les hépatocytes provoquant une hypoxie libérant ainsi de l'HIF (Hypoxia induced factor) qui, à son tour, favorisera la production de molécules pro-fibrogéniques par les hépatocytes (45-47). L'atteinte hépatique provoquera une baisse de production

d'un important vasodilatateur, l'oxyde nitreux NO qui participera à la genèse de l'hypertension portale (48). En réponse à ces signaux, des modifications architecturales et la capillarisation des sinusoides vont se développer : cela aura pour effet d'augmenter la résistance vasculaire en limitant les échanges du sang vers le milieu interstitiel et les hépatocytes. L'hypertension portale qui en résulte, limitera encore plus la perfusion parenchymateuse et ainsi augmentera le stress hépatique. In fine, ces modifications, associées à la présence d'une réaction de régénération hépatocytaire, forment la base de ce que l'on connaît des caractéristiques de la cirrhose (49).



**Figure 1.2 : Structure du foie normal et fibrotique.** Principaux changements associés au développement de la fibrose au niveau des sinusoides hépatiques. Le foie fibrotique se différencie du foie normal par l'activation des CSH, une augmentation de la MEC dans l'espace de Disse, la perte des microvillosités à la surface des hépatocytes ainsi que la disparition des fenestrations des cellules endothéliales.

### **1-1-2-1-3 Réversibilité**

La réversibilité de la fibrose peut survenir, chez l'homme, lorsque le stress initial est éliminé (50, 51). Les mécanismes de réversibilité de la fibrose ont été étudiés dans des modèles murins (51, 52). Les macrophages, de type scar-associated macrophages, auraient un rôle, en tant que source de production de MMP-13 et comme responsables de la phagocytose des débris, dans la réversibilité de la fibrose (53, 54). La désactivation des CSH joue également un rôle prépondérant dans la réversibilité de la fibrose. Des études chez la souris ont démontré une augmentation de l'apoptose des CSH suite à une baisse des signaux de survie associés au COL1 (55, 56); par contre, une étude récente a démontré que ces cellules ne mourraient pas toutes mais qu'elles pouvaient retourner à un phénotype quiescent (57). Toutefois, les CSH, ainsi désactivées, se montrent plus sensibles à la réactivation (57). L'étude de voies thérapeutiques permettant d'accélérer la régression de la fibrose ou encore la réversibilité de celle-ci au stade cirrhotique pose un grand défi en recherche. Une des voies potentielles étudiées cible la galectine. La galectine est une protéine de surface ayant une affinité spécifique pour les sucres de type galactose situés à la fin de certaines glycoprotéines et dont la présence est

associée à l'inflammation (58). La génération de modèle KO pour la galectine-3 rend les souris résistantes au développement de la fibrose par induction chimique et au développement de la stéatohépatite (59, 60). Récemment, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques aux galectines 1 et 3 a entraîné une réversibilité accélérée de la fibrose et de la cirrhose chez le rat faisant des galectines des cibles de choix dans le développement de traitements anti-fibrotiques chez l'humain (61).

#### **1-1-2-1-4 Évolution vers la cirrhose**

En plus de la présence excédentaire des composantes de la MEC, le tissu cirrhotique est caractérisé par la désorganisation architecturale hépatique (62). À ce stade, il n'y a pour l'instant aucun traitement curatif de la maladie. Si la fonction hépatique est préservée, on dit que la maladie est compensée (63). La cirrhose peut être associée à de graves complications telles que la présence d'ascite, le développement d'une encéphalopathie, l'augmentation du risque d'infections, la dénutrition, le syndrome hépato-rénal, etc. (64-66).

#### **1-1-2-2 Modèles d'étude de la fibrose hépatique**

Cette section offre une description des principaux modèles utilisés dans l'étude de la fibrose hépatique. Elle permet ainsi de mieux établir quel modèle serait le

plus adapté pour permettre d'élucider la relation fibrose/CHC. Le choix optimal sera évidemment le plus simple, le plus facilement reproductible et dont l'étude est déjà bien établie. Le modèle choisi doit aussi nous permettre d'étudier l'impact des composantes physiques de la fibrose, comme la présence de MEC fibrotique, sans trop présenter d'autres facteurs d'interférences. Le stress à la source du modèle doit pouvoir être enlevé afin de permettre d'étudier éventuellement la réversibilité du processus, ce qui permettra d'évaluer si la disparition de l'environnement fibrotique est accompagnée d'une disparition des effets identifiés sur le CHC.

### **1-1-2-2-1 Modèles chirurgicaux**

La ligature des voies biliaires est un modèle bien documenté et surtout adapté pour les rats (67). Chez la souris, la présence de la vésicule biliaire, absente chez le rat, rend l'opération beaucoup plus complexe et risquée (68). La ligature des voies biliaires entraîne une augmentation des acides biliaires qui sont toxiques pour le foie et provoque ainsi l'inflammation soutenue nécessaire au développement de la fibrose (69). L'hypertension portale associée à la fibrose est couramment observée dans ce modèle (70). Par contre, il est rare d'y voir les changements structuraux de l'architecture du foie typiques de la cirrhose (69).

### **1-1-2-2-2 Modèles métaboliques**

Il s'agit ici surtout d'un modèle mimant le développement de fibrose hépatique associé à la stéatose hépatique vulgairement appelée NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis) qui est associé aux facteurs de risque métabolique que sont le diabète de type 2 et l'obésité (71). Dans ces modèles, les animaux sont soumis à une diète déficiente en méthylcholine et en choline. Ces deux molécules, essentielles à la fabrication de la phosphatidylcholine dans le foie, assurent le transport des acides gras du foie vers les organes (72). Une baisse de production de la phosphatidylcholine se traduira donc par une accumulation toxique des acides gras dans le foie communément appelée stéatose hépatique (73). À long terme, il y aura une forte augmentation des molécules pro-inflammatoires dans le foie dont le TGF- $\beta$ 1 et donc une fibrogenèse subséquente (72). Ce modèle chez la souris entraîne une fibrose centrilobulaire hautement reproductible. Par contre, il n'arrive pas à bien reproduire tous les détails associés avec le NASH tel que la résistance à l'insuline (72, 74).

### **1-1-2-2-3 Modèles génétiques**

Ces modèles utilisent les modifications génétiques de façon à vérifier l'implication d'une protéine donnée dans le processus de fibrogenèse. De façon générale, les souris présentant une mutation limitant ou stimulant l'expression d'un gène sont soumises à un protocole de fibrogenèse afin de vérifier si la

fibrose induite sera amplifiée ou réduite (75, 76). En utilisant ce procédé, une équipe de recherche a démontré que la fibrose produite par l'injection de tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ), un agent hépatotoxique reconnu, était réduite lorsque les gènes codant pour le fibroblast growth factor de type 1 et 2 étaient absents (77). Par ailleurs l'utilisation de modèle inductible permettant une surexpression du TGF-  $\beta$ 1 montre bien le rôle prédominant de cette molécule dans la fibrogénèse (78). Une technique semblable fut aussi utilisée pour évaluer l'importance du PDGF-B (79).

#### **1-1-2-2-4 Modèles chimiques**

L'utilisation de produits chimiques hépatotoxiques pour induire la fibrose dans le foie est un modèle classique très bien étudié. La dose utilisée dans les modèles chimiques est très importante : lorsque trop élevée, elle induira une atteinte aigüe de la fonction hépatique et potentiellement la mort de l'animal. L'utilisation du tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ), dont les mécanisme d'action chez la souris induit principalement une fibrose péricentrale formant des ponts centro-centriques, qui apparaissent après 4-7 semaines d'injection intrapéritonéale (IP) (80). Le N-Diéthylnitrosamine (DEN) ou le N-Diméthylnitrosamine (DMN), deux agents hépatotoxiques, ont aussi la capacité d'induire la fibrose hépatique (28). L'activation des nitrosamines, comme le DEN ou le DMN se fait par l'hydroxylation lors de leur biotransformation par le cytochrome P450 dans les hépatocytes. Le composé formé est hautement réactif

et produit alors des adduits d'ADN qui entraîneront la mort de l'hépatocytes (81, 82). Par contre, de par son mode d'action très mutagène, l'utilisation de nitrosamines est fréquemment utilisé comme inducteur à moyen terme de foyers de CHC, ce qui les rend moins intéressantes pour l'étude de la fibrose hépatique (83). Le thioacetamide (TAA) entraîne quant à lui une fibrose péri-centrale et péri-portale au bout de 12 semaines d'injection IP chez la souris (84). Le TAA lui-même n'est pas toxique; il doit tout d'abord être métabolisé par le cytochrome P450 2PE1 en thioamide sulfoxide (TASO(2)) (85). Le TASO(2) est un produit hépatotoxique puissant qui induit par son action oxydante, la mort des hépatocytes par nécrose et aussi par apoptose (85). Le TASO(2) provoque des adduits en formant des liens covalents avec les protéines. Ces dernières se trouvant modifiées par ce lien, s'accumuleront jusqu'à être toxiques pour la cellule (86).

Il est donc apparu que le modèle d'induction au TAA semblait le plus approprié pour la réalisation de nos expériences en raison de sa simplicité d'exécution, de son utilisation reconnue et de la possibilité d'étudier la phase de réversibilité de la fibrose.

### **1-1-2-3 Interaction MEC et hépatocytes dans le contexte fibrotique**

La MEC ne joue pas seulement un rôle de séparateur physique des cellules du foie. Elle interagit avec les cellules par des molécules d'attachements nommées



intégrines. Les intégrines forment une grande famille de récepteurs hétérodimériques. Les 24 différents agencements possibles des 8 sous-unités  $\alpha$  et 18 sous-unités  $\beta$  permettent la liaison à une panoplie de molécules de la MEC (87). Les intégrines doivent, pour permettre une pleine liaison de leur site d'attachement à la MEC, être activées de l'intérieur ce qui induira un changement conformationnel de la position repliée à dépliée (87). Les intégrines, dans leur état replié, ont une faible affinité pour leur ligand. Cependant, la liaison avec le ligand active des processus intracellulaires qui induisent un changement de conformation de la taline dans le cytoplasme qui permettra l'extension de l'intégrine dans sa structure de haute affinité de liaison (88). Les intégrines ne possèdent pas d'activité catalytique intracellulaire. Pour y pallier, elles recrutent différentes kinases agencées à une sous-unité. Par exemple, l'ILK (Integrin Linked Kinase) est généralement associé à une sous-unité  $\beta$  tel la  $\beta 1$  (89, 90) et FAK (Focal Adhesion Kinase) transmet le signal des sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 5$  (91-93). Ces kinases permettent ainsi la transmission du signal de la MEC à l'intégrine vers le milieu intra-cellulaire ainsi que tous les effets subséquents. Le couple  $\alpha 1\beta 1$  est le récepteur permettant la transmission intracellulaire du message induit par le COL1 (94).

## **1-2 Agression hépatique et hépatoprotection**

### ***1-2-1 Mort et survie cellulaires***

#### **1-2-1-1 Apoptose**

Le mot apoptose est dérivé des termes grec apo- (de loin) -ptosis (chuter) qui font ainsi référence à la chute des feuilles d'un arbre. Il fut pour la première fois utilisé par la spécialiste de pathologie hépatique John Kerr en 1972 (95). D'abord décrite selon ses caractéristiques morphologiques, tel que la condensation de la chromatine, l'apparition de bourgeons cellulaires contenant des organelles et le fractionnement de son noyau, l'apoptose fut, par la suite, dépeinte en fonction de l'activation de deux principales voies moléculaires : la voie nécessitant l'activation d'un récepteur de mort cellulaire, ou voie extrinsèque et celle induite par une accumulation de stress au sein de la cellule, ou voie intrinsèque (96, 97).

#### **1-2-1-1-1 Voie extrinsèque**

La voie extrinsèque (Figure 1.3) est ainsi dénommée car elle implique l'activation d'une famille de récepteurs de surface : les récepteurs de mort. Les principaux récepteurs qui seront abordés dans ce travail sont Fas, TNF-R,

TRAIL-R et le TGF- $\beta$ R. Ils constituent les principaux récepteurs de morts présents dans le foie (98, 99).

Le récepteur Fas est activé par sa liaison à la molécule FasL (100). Il s'en suit une oligomérisation des récepteurs activés. L'oligomère formé recrute alors la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated Protein with Death Domain) sur le domaine de mort intracellulaire de Fas. Les deux domaines effecteurs de mort du prodomaine de la pro-caspase 8 se lient alors à FADD. Le tout forme le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). L'association de la pro-caspase 8 à ce complexe entraîne son activation en caspase 8. Cette voie d'activation constitue la voie majeure d'induction physiologique ou pathologique de l'apoptose dans le foie. La caspase 8 peut aussi entraîner le clivage de Bid en t-Bid ce qui favorisera ensuite la séquence pro-apoptotique propre à la mitochondrie (98).

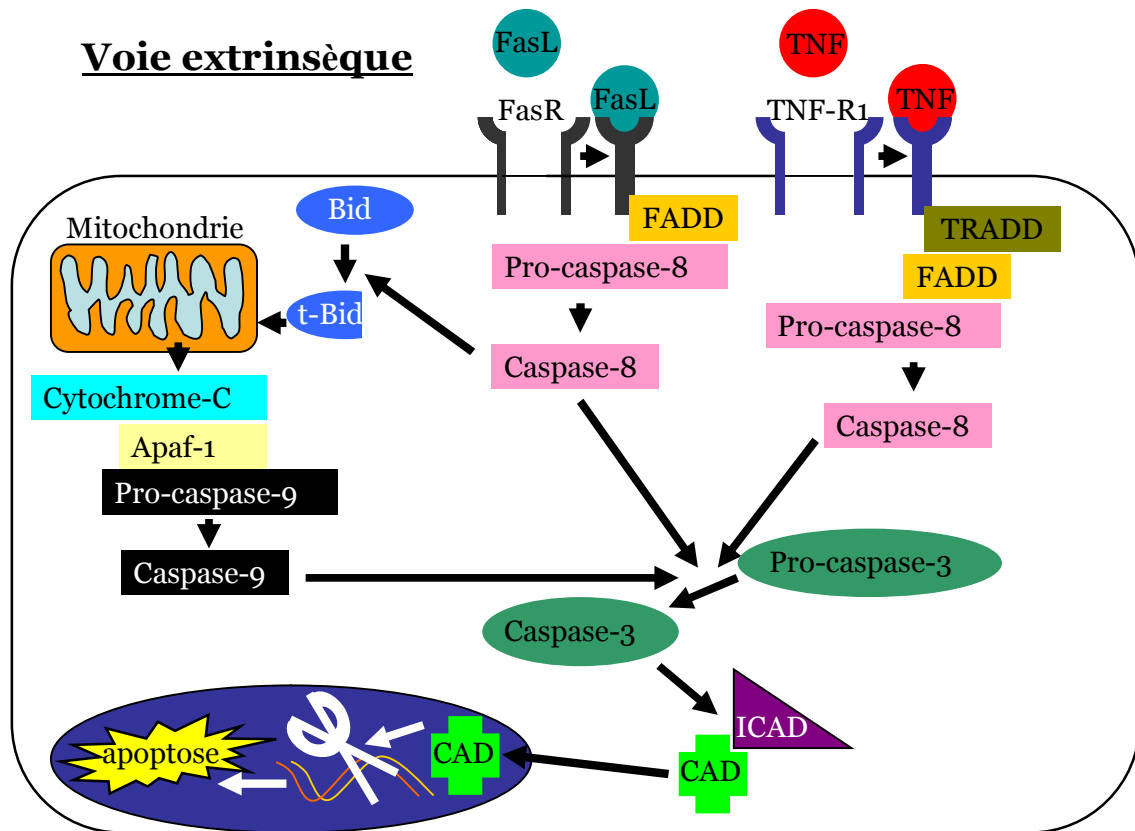
Les deux récepteurs activés par le TNF possèdent des domaines intracellulaires très différents l'un de l'autre. Le TNF-R2 n'ayant aucun domaine de mort, son implication dans l'induction de l'apoptose n'est pas établie (101). Le TNF-R1, possédant un domaine de mort, est impliqué dans l'induction de l'apoptose. L'activation du TNF-R1 suit, entre autres, une voie similaire à celle du FasR. Après avoir été activé, le TNF-R1 s'oligomérisé et grâce à la protéine adaptatrice TRADD (TNF Receptor-Associated protein with Death Domain) provoque le recrutement de FADD et de la pro-caspase 8 qui sera ainsi activée. Une voie parallèle, passant également par TRADD, repose sur le recrutement de RIP

(Receptor-Interacting Protéin) qui agit à titre de molécule adaptatrice (98). RIP permet ainsi la liaison de RAIDD/CRADD au complexe déjà formé. Cette macromolécule permettra le passage de la pro-caspase 2 en caspase 2 activée (102).

La famille de récepteurs TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) comprend deux récepteurs de morts (R1 et R2) ainsi que deux récepteurs leurres (R3 et R4)(103). Les voies de signalisation subséquentes de ces récepteurs de mort ne sont pas tout à fait établies mais déclencheront l'activation de la caspase initiatrice 8 et probablement celle de la caspase 10 (97).

Le TGF- $\beta$  une fois lié à son récepteur peut enclencher l'apoptose dans l'hépatocyte en libérant SMAD et en permettant ainsi sa translocation au noyau. Ces modifications moduleront la production de Bax et Bcl-XL ce qui aura pour effet de stimuler la voie des caspases (104).

Les caspases initiatrices 8 et 10 induisent le clivage des pro-caspase 3, 6 et 7 en caspases exécutrices 3, 6 et 7 ce qui entrainera l'apoptose de la cellule (105). Ces caspases nouvellement activées iront cliver ICAD un inhibiteur de CAD (Caspase-Activated DNase) (106). Cette molécule entrainera la découpe de l'ADN selon un patron, en multiple de 180 paires de base, reconnu pour être caractéristique de l'apoptose (97).



**Figure 1.3 : Voie extrinsèque de l'apoptose.** Schématisation des principaux acteurs de l'apoptose extrinsèque stimulée par le FasL et le TNF. Suite la liaison de FasL son récepteur s'oligomérise avec FADD et la Pro-caspase-8, ce qui active la Caspase-8. Une fois activée, la Caspase-8 favorise le clivage de Bid en t-Bid ce qui provoque la libération du Cytochrome-C. Le Cytochrome-C lié à Apaf-1 favorise l'activation de la Pro-caspase-9 en Caspase-9. Le TNF en se liant au récepteur TNF-R1 provoque une oligomérisation avec la molécule de recrutement TRADD permettant ainsi la liaison de FADD et le passage de la Pro-caspase-8 en Caspase-8 activée. Les Caspase-8 et -9 stimulent le passage de la Pro-caspase-3 en Caspase-3. La Caspase-3 lève l'inhibition d'ICAD sur CAD qui se déplace au noyau et entraîne la fragmentation de l'ADN et l'apoptose.

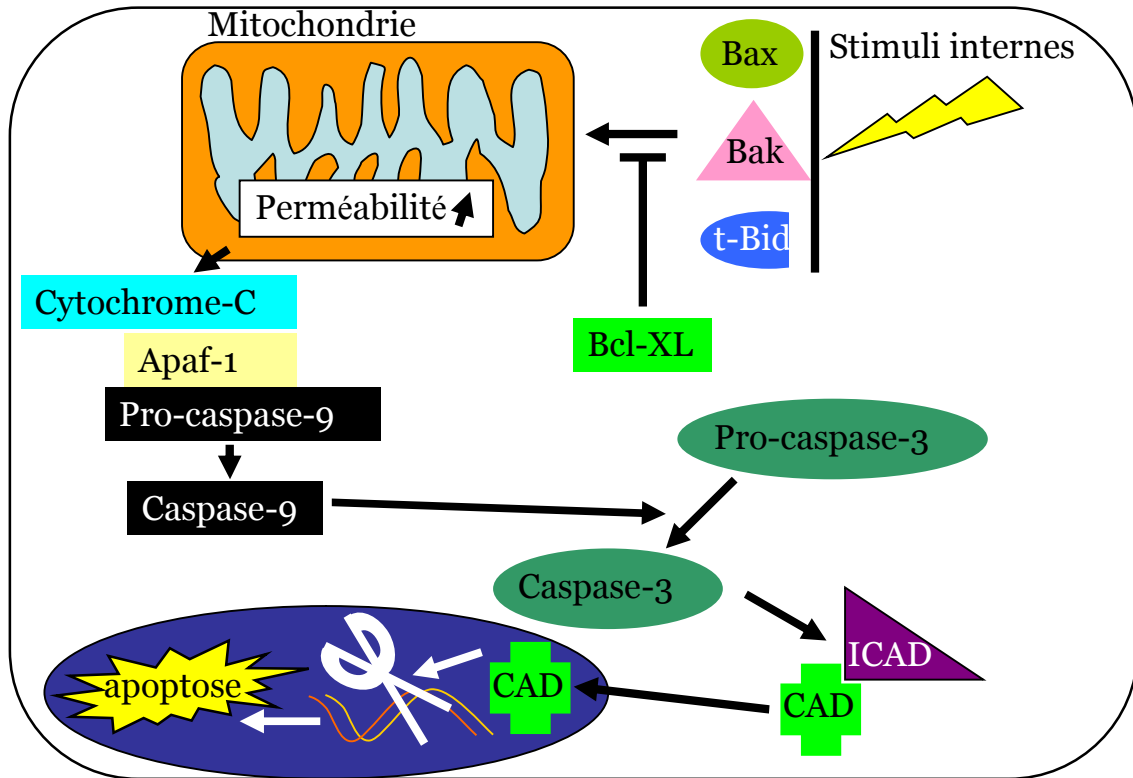
### 1-2-1-1-2 Voie intrinsèque

La voie intrinsèque (Figure 1.4) tient son nom de la localisation intracellulaire des signaux nécessaires à son déclenchement (107). Les causes d'initiation de cette voie passent du stress occasionné dans le réticulum endoplasmique par

l'accumulation de protéines malformées, à la perméabilisation des lysosomes ou encore par la stimulation de voies de signalisation intracellulaire tel que JNK (C-jun N terminal kinase) (107).

L'activation de ces voies entrainera une variation dans la balance pro/anti apoptotique des protéines de la famille Bcl-2. Par exemple, la protéine Bcl-xl joue un rôle anti-apoptotique alors que Bax, Bak et t-Bid ont une fonction inverse (108). Lorsque la balance penche du côté pro-apoptotique, il en résulte une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (109). Des molécules normalement isolées dans la mitochondrie sont alors relâchées dans le cytosol (110). Elles vont ensuite former un complexe nommé apoptosome qui, composé de la pro-caspase 9, de la molécule Apaf-1, et du cytochrome C, provoquera l'activation de la caspase 9 et l'initiation de la voie des caspases effectrices menant à l'apoptose (111).

## Voie intrinsèque



**Figure 1.4 : Voie intrinsèque de l'apoptose.** Suite une présence de stimuli internes suffisant, il y a déséquilibre en faveur des molécules pro-apoptotiques Bax, Bak ou t-Bid par rapport à la molécule anti-apoptotique Bcl-XL. Une augmentation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie favorise le relargage, entre autres, du cytochrome-C. Ce dernier une fois lié à Apaf-1 provoque le passage de la Pro-caspase-9 en Caspase-9. La Caspase-9 stimule le passage de la Pro-caspase-3 en Caspase 3, qui lève l'inhibition d'ICAD sur CAD. CAD se déplace au noyau où il provoque la fragmentation de l'ADN et l'apoptose.

### **1-2-1-2 Nécrose**

Le terme nécrose, issu du grec « necros » désignant un mort, est considéré comme une mort cellulaire accidentelle non contrôlée (112). Elle se caractérise par un gonflement des cellules, un bourgeonnement dépourvu d'organelles, par

opposition aux bourgeons apoptotiques qui en contiennent, et finalement par une rupture précoce de la membrane cytoplasmique.

Contrairement à l'apoptose, dont une des caractéristiques est la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, la nécrose est associée à une perméabilisation des membranes mitochondriales internes et externes. Ce phénomène est plus connu sous le nom de transition de perméabilité mitochondriale (MPT) (113). À la suite de cette perméabilisation, le gradient de proton nécessaire à la fabrication de l'ATP disparaît. Le niveau d'ATP intracellulaire chute alors et empêche le fonctionnement d'une multitude de procédés cellulaires, ce qui provoquera finalement le gonflement et le bourgeonnement typique de la nécrose (97).

Selon les stimuli provoquant la nécrose, la réponse sera contrôlée par différentes familles de molécules dont par exemple RIPK1 et RIPK3 (114, 115). Tous deux forment les acteurs principaux de la nécroptose, une voie de mort cellulaire déclenchée par le TNF et qui peut, selon le niveau d'activité kinase de RIPK1 et RIPK3, déboucher sur l'apoptose ou la nécrose (116, 117).

### **1-2-1-3 Autophagie**

L'autophagie comme son nom l'indique, signifie « se manger soi-même », est à la fois un processus de mort cellulaire où la cellule s'élimine par elle-même et



un processus de survie où la cellule récupère les nutriments nécessaires à son fonctionnement à partir de ses propres composants cellulaires (118). Il existe trois voies majeures d'autophagie, la macroautophagie, la voie nécessitant les protéines chaperonnes (CMA pour Chaperon Mediated Autophagy) et la microautophagie. Le point commun de toutes ces voies est l'importance du lysosome dans la digestion des composants (119). Ces trois mécanismes sont souvent induits par des stress similaires et sont donc souvent observés en même temps de façon complémentaire dans les modèles étudiés (120).

La macroautophagie, forme principale d'autophagie, est caractérisée par l'internalisation des organelles ou autres composants cellulaires dans des vacuoles appelés autophagosomes. Ces vacuoles se fusionnent ensuite aux lysosomes pour former des autophagolysosomes qui accompliront la digestion des composants internalisés (119). L'initiation de ce processus survient en réponse à une série de stress comme le manque de nutriments, la baisse de facteurs de croissance, la diminution des réserves d'ATP ou l'accumulation de protéines malformées. Le phénomène est régi par une série de gènes nommés « autophagy genes » ou ATG. En contre-partie, la protéine mTOR peut jouer un rôle d'inhibition de la macroautophagie (121). La présence d'un stress lève cette inhibition favorisant ainsi la libération de ATG1 qui stimulera alors la production d'autres ATG. C'est alors que le processus de formation de la vacuole entourant les composants à éliminer ainsi que son internalisation dans le lysosome sera enclenché (122).

Lors d'une autophagie de la voie CMA, les protéines portant un motif pentapeptidique spécifique seront ciblées par des protéines chaperonnes de 70kDa (Hsc70) qui permettront leur passage dans un lysosome en faisant appel à LAMP-2A, une protéine membranaire du lysosome, et y seront dégradées (119). Une série de co-chaperonnes, les Hsp70, gèrent l'activité de Hsc70 et ainsi celle de la voie CMA. Le rôle de cette voie est de permettre l'élimination de protéines spécifiques par opposition aux deux autres modes qui dégradent de façon non-spécifiques l'ensemble des macromolécules (121). La stimulation physiologique de cette voie a été identifiée en situations de jeûne cellulaire prolongé. En absence de nutriments, les protéines seront éliminés par la voie CMA afin de recycler les acides aminés (123).

Le phénomène de microautophagie est aussi induit par une baisse de nutriments ou des réserves d'énergie cellulaire : on observe ainsi la perte de l'effet inhibiteur de mTOR permettant alors la libération de ATG1 comme dans la macroautophagie. Sous le contrôle du complexe EGO, le lysosome séquestre les composants cellulaires à éliminer par une invagination tubulaire. Contrairement à la macroatophagie, on n'observe pas de formation de vacuoles avant d'accomplir la séquestration des constituants cellulaires (120).

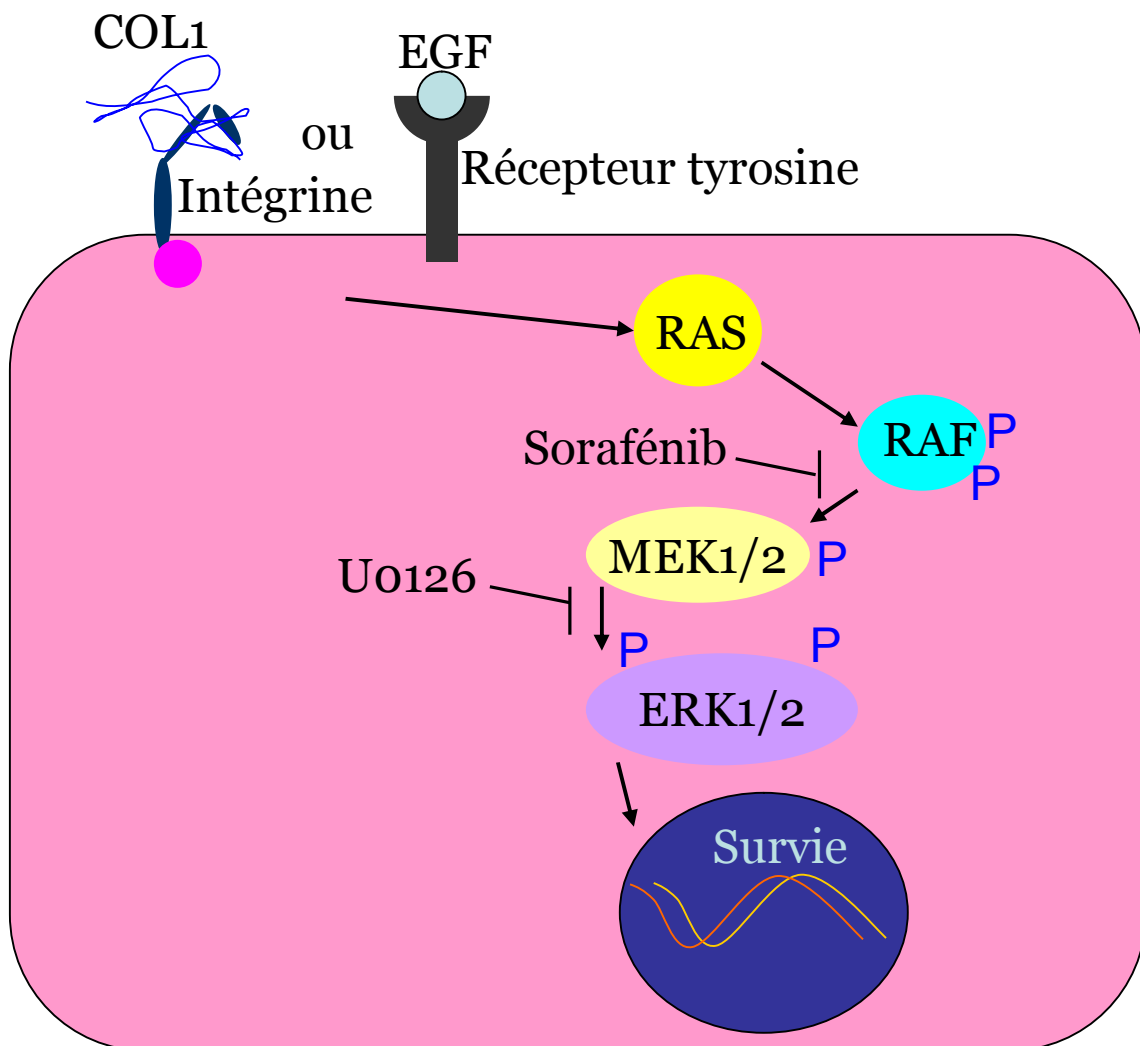
#### **1-2-1-4 Survie cellulaire**

Le choix d'une cellule entre la mort cellulaire ou la survie cellulaire dépendra de la balance des différentes voies de stimulations. Dans les prochains paragraphes, seront détaillées les principales voies de survie cellulaire rencontrées dans le foie.

##### **1-2-1-4-1 Voie MAPK**

Le déclenchement de la voie a lieu sur une amarre liée au récepteur tyrosine kinase activé après stimulation par un mitogène tel que l'EGF (Epithelial Growth Factor) (124) (Figure 1.5). La voie stimule alors la séquence Ras/Raf/MEK1-2/ERK1-2 qui enclenche les modifications responsables de son effet promoteur sur la survie et le cycle cellulaire (103). L'activation de Ras, une GTPase, sur l'amarre du récepteur activé de l'EGF permet le remplacement de sa molécule de GDP par une molécule de GTP et ainsi l'activation subséquente de Raf (125). Une fois Raf activé, il entraînera la phosphorylation de MEK 1 ou 2. Cette étape activera MEK 1 et 2 qui phosphoryleront et activeront à leur tour ERK 1 et 2 (126). Une importante molécule pharmaceutique dans le traitement du CHC, le sorafénib, cible en partie cette voie en inhibant l'activité de Raf (127). Les mécanismes par lesquels la voie MAPK favorise la survie cellulaire passent par A) l'inhibition de molécules pro-apoptotiques : par exemple, l'activation de RSK (ERK-activated p90 ribosomal S6 kinase) entraîne

l'inhibition de la molécule pro-apoptotique BAD ; B) la stimulation de molécules anti-apoptotiques : par exemple, la phosphorylation induite par ERK1-2 de Mcl-1 (Induced meloid leukemia cell differentiation protein) augmente la stabilité de cette molécule anti-apoptotique; ou C) la stimulation de molécule pro-survie : par exemple, l'activation de RSK phosphoryle le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) qui recrutera CBP (CREB binding protein) et P300 (E1A-binding protein, 300kD) augmentant la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la survie cellulaire (103, 128).



**Figure 1.5 : Voie MAPK.** Schématisation de l'activation de la voie MAPK par un signal mitogène tel que l'EGF ou la présence de COL1, ainsi que la mise en contexte de deux inhibiteurs connus de cette voie : le sorafenib et le U0126.

### **1-2-1-4-2 Voie Wnt/ $\beta$ -catenin**

Cette voie est activée par l'interaction entre Wnt et un récepteur transmembranaire de la famille Frizzled provoquant ainsi la libération de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme (129). Si cette dernière se trouve en quantité suffisante dans le cytoplasme, elle subira une translocation vers le noyau (129). La  $\beta$ -caténine a le pouvoir d'inhiber la transcription de FoxO3, une molécule pro-apoptotique chez la souris (130). Son absence chez la souris, entraîne une baisse de l'activité du cycle de Krebs, de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et, par le fait même une diminution de la production d'ATP et du potentiel membranaire mitochondrial (131). De plus, on observe dans le même modèle de souris knock-out, une diminution de la synthèse de différentes molécules du cycle cellulaire, mettant en évidence son rôle dans la régénération hépatique et la survie cellulaire (132).

### **1-2-1-4-3 Protéines inhibitrices de l'apoptose**

Cette famille de molécules connues sous l'abréviation IAP, limite la mort cellulaire en inhibant directement les molécules de la cascade apoptotique. Leurs différents domaines BIR (Baculoviral IAP Repeat) sont responsables de

leur activité inhibitrice (133). Une de ces protéines, la survivine, a le pouvoir d'inhiber les caspases 3 et 7 (134).

### **1-2-1-5 Cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire se divise en 4 phases : G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M. Lorsque les cellules ne sont pas dans le cycle, elles sont en phase quiescente ou G<sub>0</sub> (135). À plusieurs stades du cycle, on retrouve des points de contrôle permettant d'assurer qu'aucune anomalie dans l'ADN ne soit transmise (136, 137). La progression dans le cycle se fait par un système impliquant les cyclines ainsi que leurs kinases les CDK (Cyclin Dependent Kinase) (138). Lorsque l'ADN est trop lésé, il y a arrêt du cycle et induction de l'apoptose (139). Toutefois, si des mutations surviennent et modifient l'abondance des cyclines ou l'activité des CDK, la cellule peut progresser dans le cycle et se diviser : cela entraînera toutefois une accumulation de mutations et augmente le risque de transformation néoplasique de la cellule (140).

### **1-2-2 Agents hépatotoxiques**

Les différents agents hépatotoxiques décrits dans cette section sont principalement ceux qui sont utilisées afin d'établir une atteinte aigue du foie dans nos modèles *in vivo* afin de mettre en lumière l'effet hépatoprotecteur de

la fibrose sur le foie normal. Le TNF $\alpha$  accompagnée d'actinomycine D est utilisée comme inducteur d'apoptose dans nos études *in vitro* sur des lignées de CHC palliant à la faible efficacité *in vitro* des anti-corps agonistes de Fas sur ces mêmes lignées. Par contre, les anticorps agonistes de Fas sont très adaptés à l'induction *in vivo* d'une atteinte hépatocytaire apoptotique. Bien que les agents chimiques décrits dans la section 1-1-2-2 sur les modèles d'étude de la fibrose hépatique à la page 12 soient aussi hépatotoxiques, nous ne les avons pas retenus, à l'exception du CCl<sub>4</sub>, comme agents inducteurs d'atteinte cellulaire aiguë pour les raisons suivantes : A) Le TAA n'a pas été utilisé pour induire un stress aigu afin d'éviter d'utiliser un mécanisme d'action trop similaire à celui de l'agent inducteur de fibrose, car il pourrait y avoir présence d'un phénomène de désensibilisation à l'agent hépatotoxique en question; B) Le DEN et le DMN n'offrent pas un mécanisme d'action suffisamment différent du CCl<sub>4</sub> et de l'APAP pour justifier leur utilisation. À l'exception du CCl<sub>4</sub>, les différents agents hépatotoxiques mentionnés dans cette section sont peu ou pas documentés comme inducteurs de fibrose chez la souris ce qui explique pourquoi ils n'ont pas été considérés à cette fin.

### **1-2-2-1 Tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>)**

L'action hépatotoxique du CCl<sub>4</sub> passe par sa biotransformation en radicaux libres CCl<sub>3</sub> $\cdot$  via les cytochromes P450 2E1, 2B1 et 2B2 (141). En présence d'oxygène, le CCl<sub>3</sub> $\cdot$  se transforme en CCl<sub>3</sub>OO $\cdot$ , un radical libre encore plus réactif (142). Ces radicaux libres entraîneront la peroxydation des lipides ainsi que des

liaisons covalentes provoquant un dysfonctionnement de la cellule et éventuellement la mort de celle-ci, principalement par nécrose (143).

### **1-2-2-2 Acétaminophène**

L'acétaminophène (APAP) est un agent hépatotoxique puissant. Sa cytotoxicité est due à un métabolite créé en faible dose (environ 10% de l'APAP) par les cytochromes P450 2E1, 1A2 et 3A4 (144, 145). Le *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine, aussi appelé NAPQI, réagit via la glutathion-*s*-transférase avec le glutathion libre, un agent cytoprotecteur (146). Si la dose du cytotoxique excède celle du glutathion, le NAPQI réagira avec les protéines pour former des adduits protéiques (147). Ces liens covalents surviennent principalement dans les protéines de la mitochondrie bloquant ainsi la chaîne respiratoire (148). La mitochondrie rendue ainsi dysfonctionnelle jouera le rôle d'amplificateur de la cytotoxicité en libérant une importante quantité de molécule pro-oxydantes (149). Ces événements sont à la source de la nécrose oncotique observée en cas de toxicité par l'APAP (150).

### **1-2-2-3 TNF $\alpha$ et actinomyicine D (actD)**

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine très importante dans la biologie du foie et son spectre d'action est très grand. Il se lie à la famille de récepteurs TNF-R et plus



précisément, dans le foie, au TNF-R1 (151). Les voies d'actions enclenchées vont de la survie à l'inflammation en passant par l'apoptose (152). Le TNF seul n'induit pas l'apoptose mais plutôt une production de NF-kb qui va bloquer la cascade apoptotique (153). De cette façon, pour induire l'apoptose chez les hépatocytes *in vitro*, il est primordial de les sensibiliser avec l'actD (151). L'actD, en se liant à l'ADN, empêche la transcription et provoque un arrêt du cycle cellulaire (154, 155). Le TNF $\alpha$  peut alors cliver la pro-caspase 8 en caspase 8 activée qui activera la voie extrinsèque d'apoptose jusqu'à la caspase effectrice 3 (151).

#### **1-2-2-4 Anticorps agonistes de Fas**

Comme le TNF $\alpha$ , l'activation du récepteur Fas induit la voie extrinsèque de l'apoptose hépatocytaire. Les anticorps agonistes de Fas, en se liant au récepteur, simulent la liaison de ce dernier par son ligand naturel. On peut, *in vivo*, observer une hépatite aigüe sévère, qui est caractérisée par la présence d'une apoptose massive et la mort des souris (156).

#### **1-2-3 Hépatoprotection**

L'hépatoprotection correspond à l'ensemble des facteurs qui induiront une réponse de survie de l'hépatocyte et augmenteront ainsi ses chances de résister

à une agression toxique. Une meilleure compréhension des phénomènes d'hépatoprotection nous permettrait d'influencer ces voies dans le traitement de pathologies hépatiques aiguës et chroniques. En administrant chez le rat de la silibinine, le composé actif du chardon marie, il est par exemple possible d'améliorer la sensibilité à l'insuline et de limiter le stress hépatique des animaux soumis à un protocole expérimental de NASH (157). L'utilisation d'agents hépatoprotecteurs pourrait permettre d'améliorer le pronostic de patients souffrant d'atteinte hépatique aiguë. L'administration de N-acétylcystéine, un précurseur du glutathion, stimule la production de glutathion et augmente ainsi les réserves de cet agent détoxifiant. Cette stratégie permet, si elle est utilisée précocement, de limiter les dommages dus à une surdose d'APAP (150, 158). L'ajout d'une stimulation de la voie de survie wnt/ $\beta$ -caténine par la prostaglandine E2 au traitement par N-acétylcystéine dans les poissons zèbres augmente l'efficacité de ce dernier pour limiter les dommages hépatiques causés par l'APAP (159). Une autre approche étudiée pour stimuler l'hépatoprotection consiste à inhiber la voie TNF- $\alpha$  par l'injection d'anti-corps antagonistes du TNF- $\alpha$  ce qui a pour effet chez le rat de limiter l'inflammation et donc l'établissement de la fibrose hépatique (160, 161). Par contre, à cause du caractère ubiquitaire du TNF- $\alpha$ , celui-ci n'est peut-être pas une cible thérapeutique de choix : en effet, l'utilisation d'anticorps antagonistes du TNF- $\alpha$  dans le traitement de l'hépatite alcoolique aiguë s'est d'ailleurs avéré un échec en raison des effets immunologiques de cette protéine dans le contrôle des infections (162).

Le stress oxydatif subit lors d'une atteinte hépatique peut entraîner la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. La présence de molécules antioxydantes comme le glutathion permet de réduire l'importance de l'effet des espèces réactives oxygénées (163). Le développement de thérapie utilisant des molécules à fort potentiel antioxydant issues de la pharmacopée naturelles, comme la curcumine, est un domaine en plein essor (164, 165). D'un autre côté, notre laboratoire a démontré que le maintien d'une balance d'oxydoréduction à un niveau physiologique favorise l'apoptose induite par le FAS en favorisant l'activité catalytique de la caspase-8 dont la réduction d'une cystéine est nécessaire (166). Suivant ce concept, notre laboratoire a mis en évidence que l'ajout d'EGF in vitro provoque une baisse des niveaux totaux et réduits de glutathion limitant ainsi l'activité caspase-3 induite par le FAS (167). Le glutathion réduit peut ainsi avoir un effet hépatoprotecteur. De plus, nous avons mis en évidence au laboratoire que la présence d'EGF baissait la production de Bid, une molécule pro-apoptotique, et ainsi avait une deuxième voie d'action hépatoprotectrice (168).

Lors d'une transplantation, le foie du donneur passe par une phase d'ischémie suivie d'une réoxygénation suite à la reperfusion. La phase ischémique entraîne une baisse d'énergie et d'oxygène et, si elle est prolongée, provoquera des dommages cellulaires importants. Cependant, c'est lors de la reperfusion que la majorité des dommages surviennent en raison de la présence accrue de radicaux libres associées à la réoxygénation. La perfusion avec du fructose limite le dommage cellulaire du à l'ischémie reperfusion chez le rat en

augmentant l'activité mitochondriale (169). Limiter les dommages dus au stress oxydatif suivant la reperfusion est un enjeu majeur dans ce domaine. L'utilisation de NAC ou de GSH afin d'augmenter les stocks de glutathion libre n'a pas donné les effets escomptés chez l'humain bien que son utilisation chez les animaux ait donné des résultats prometteurs (170). Un autre défi consiste à utiliser le foie de donneurs dont le cœur ne bat plus, car pour le moment ces derniers sont rejetés à cause des dommages causés par l'ischémie chaude. En perfusant des rats avec une solution faiblement oxygénée contenant de la prostaglandine E<sub>1</sub>, un agent vasodilatateur aux propriétés hépatoprotectrices, il est possible de limiter grandement les dommages associés à ce type d'ischémie (171).

Dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence les effets hépatoprotecteurs de la MEC du foie fibrotique sur les hépatocytes normaux (172). Cependant, la MEC fibrotique pourrait jouer un rôle délétère en favorisant la survie, au lieu de leur élimination par apoptose, de cellules ayant été soumises à des agents mutagènes et favoriser ainsi l'apparition de cellules néoplastiques hépatiques. L'environnement fibrotique pourrait également augmenter la résistance des cellules néoplasiques aux agressions et donc favoriser le développement de tumeurs plus agressives. La fibrose hépatique pourrait ainsi agir dans la carcinogénèse hépatique en promouvant l'initiation du CHC et son développement.

## **1-3 Carcinome hépatocellulaire**

### ***1-3-1 Carcinogenèse***

#### **1-3-1-1 Théories d'étude du cancer**

Au fil des ans, plusieurs hypothèses ont été mises de l'avant afin d'expliquer l'origine et le développement du cancer. Ces théories expliquent chacune différentes facettes de la pathologie. Bien comprendre ces modèles, permet une meilleure analyse du développement du CHC et du contexte particulier dans lequel il apparaît.

##### **1-3-1-1-1 Accumulation d'insultes**

Il s'agit ici de la théorie classique pour expliquer l'origine du cancer. Elle a été suggérée par Knudson en 1971 et se base sur un fondement statistique. Cette théorie repose sur l'idée qu'il faut une accumulation d'insultes, ou mutations, afin qu'il y ait développement d'une tumeur (173). Elle permet d'expliquer l'observation faite par Nordling en 1953 qui avait démontré une corrélation entre l'âge des patients et leur risque d'être atteint d'un cancer : ainsi, plus les individus vieillissent, plus il y a de risques qu'ils accumulent suffisamment d'insultes pour développer un cancer (174).

### **1-3-1-1-2 Sélection clonale**

La sélection clonale, dans le cadre du cancer, ou l'évolution clonale, a été décrite pour la première fois en 1976 par Nowell (175). Elle se base sur la théorie des insultes mais ajoute que l'environnement dans lequel la cellule pré-cancéreuse évolue crée une pression et une sélection naturelle à l'échelle cellulaire. Ce sont donc les cellules qui acquerront les mutations nécessaires à leur prolifération et leur survie qui seront à la base du futur tissu cancéreux.

### **1-3-1-1-3 Carcinogenèse à étapes multiples**

Dans cette théorie énoncée pour la première fois par Barrett en 1993, la ligne directe « accumulation de mutation, sélection des clones, apparition d'un cancer » n'est pas remise en question mais plutôt affinée (176). Il propose que l'acquisition des propriétés propres au cancer survienne à la suite d'une série de mutations au sein de différents gènes. Ces mutations, tantôt activeront des gènes promoteurs de cancer (i.e. pro-oncogène) et, dans d'autres cas, empêcheront le bon fonctionnement de gènes suppresseurs de cancer. De cette façon, il y aura une série d'initiations, ou mutations, suivie par une étape de promotion, où des facteurs externes à la cellule favoriseront sa survie malgré l'accumulation d'erreurs dans son ADN. Hanahan et Weinberg, en 2000, spécifieront 6 phénotypes devant être acquis lors de la carcinogenèse avant le développement d'un cancer soit : l'évasion de l'apoptose, la croissance auto-

suffisante en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, l'angiogenèse soutenue, le potentiel réplicatif illimité ainsi que l'invasion des tissus et le potentiel métastatique (177).

#### **1-3-1-1-4 Cellules souches cancéreuses**

Bonnet et Dick décrivent pour la première fois, en 1997, les cellules souches cancéreuses (CSC) dans le cadre de leurs études sur la leucémie (178). Contrairement aux théories découlant de la sélection clonale où toutes les cellules de la tumeur sont des clones issus de la prolifération d'une cellule ayant survécu, les tumeurs issues de CSC sont hétérogènes et donc formées de sous-populations aux propriétés variées (179-181). À leur base, se trouve une population cellulaire formant le bassin de CSC : ces cellules sont hautement dédifférenciées et sont à l'origine des phénotypes variés rencontrés dans la tumeur (182).

#### **1-3-1-2 Caractéristiques du CHC**

Le CHC est le 5<sup>e</sup> cancer le plus fréquent et le 3<sup>e</sup> plus mortel dans le monde (183). Le CHC est un cancer au pronostic sombre. Le taux de survie à 5 ans suivant une transplantation est de 67%, une hépatectomie de 35%, une ablation de 20% et en l'absence de traitement de 3% (184). Ce terrible pronostic est

principalement dû au fait que le CHC est rarement découvert à temps pour entreprendre un traitement curatif (185).

Une des caractéristiques du CHC est son hétérogénéité, à la fois inter-individuelle et dans sa composition cellulaire (186, 187). Ainsi, d'un individu à l'autre, la composition de la tumeur et, par le fait même, son comportement variera grandement (188). De plus, le CHC se manifeste généralement, i.e. dans 80-90% des cas, dans le contexte d'une cirrhose sous-jacente (189). En plus de survenir dans ce contexte, les pathologies sous-jacentes au développement de la fibrose jouent, elles aussi, un rôle dans son éclosion.

### **1-3-1-3 Facteurs de risque du CHC**

#### **A) Maladies du foie**

Quelle que soit l'étiologie de la maladie hépatique sous-jacente, la fibrose observée est un facteur de risque majeur de carcinogenèse hépatique. Toutefois, elle n'est pas essentielle puisque le CHC peut se développer sur un foie sain. De plus, des mécanismes spécifiques à une pathologie hépatique ont aussi été identifiés par exemple dans l'hépatite virale B. Les modèles développés pour étudier le CHC tentent de mimer certains aspects de ces pathologies tout en limitant le nombre de facteurs afin de faciliter leur étude.



### **1-3-1-3-1 Virus de l'hépatite C (VHC)**

L'infection chronique par le VHC, entraîne le maintien d'un stress hépatique. En réponse à ce stress, le processus de fibrogenèse est enclenché. La prévalence cumulative sur 5 ans du CHC est de 30% chez les patients cirrhotiques atteints de VHC (189). Le VHC est un virus à ARN qui est dépourvu d'activité transcriptase inverse et qui ne peut donc intégrer son génome dans celui de son hôte (190). En plus de la réponse inflammatoire de l'hôte à l'infection au VHC, la protéine virale VHC-core peut stimuler la production de TGF- $\beta$  et ainsi stimuler la fibrogenèse. VHC-core peut également modifier l'activité de régulateurs du cycle cellulaire tels que p53, p21, pRb et p73, stimulant ainsi la survie et donc l'acquisition de mutations (191-194). VHC-core stimule d'autres voies de survie cellulaire telle que la voie MAPK favorisant l'apparition du CHC (195). Les protéines non-structurelles NS3 et NS5A ont la capacité de diminuer l'activité P53 (196, 197). En plus de limiter l'apoptose, NS3 stimule la survie par la voie JNK (198) et NS5A par la voie  $\beta$ -caténine (199). De surcroit, l'infection au VHC est associée chez certains génotypes à une insulino-résistance, une perturbation du métabolisme lipidique et la présence de stéatose hépatique (200, 201), des facteurs favorisant l'apparition de la fibrose et du CHC.

### **1-3-1-3-2 Virus de l'hépatite B (VHB)**

Le VHB est un virus à ADN qui possède une activité transcriptase inverse et qui peut s'intégrer au génome de l'hôte. On a démontré que la protéine virale HBx du VHB avait la capacité d'inhiber l'activité de p53 (202) et de gêner l'activité réparatrice d'ADN du facteur de transcription IIH (203), augmentant ainsi la tolérance de la cellule à l'apparition de mutations. On a aussi démontré qu'HBx pouvait stimuler la production de ROS en altérant les fonctions mitochondriales (204). HBx est réputée pour stimuler l'activité de différentes ADN méthyltransférases (205). Ces enzymes sont responsables de la méthylation de l'ADN, phénomène par lequel se font les changements épigénétiques, c'est-à-dire qui influencent l'exposition de l'ADN et sa capacité à être transcrit. De cette façon, la protéine HBx provoque des changements épigénétiques sur l'expression de différentes protéines tel que la cadhérine E (206). Les changements épigénétiques entraînant la production de protéines associées au développement tumoral tel que C-myc (207) ou encore la surexpression de miRNA, comme le miRNA-602, (208) lesquels favorisent l'apparition du CHC dans le contexte d'infection au VHB.

### **1-3-1-3-3 Stéatose d'origine non-alcoolique (NAFLD)**

La NAFLD est principalement liée à l'obésité et au diabète de type 2. Elle se caractérise par une accumulation de lipides dans les hépatocytes (stéatose

hépatique). Cette surcharge deviendra lentement toxique pour la cellule, ce qui stimulera l'inflammation et la production de cytokines associée à la NASH. Si la NASH se maintient dans le temps, il y aura enclenchement de la fibrogenèse puis la transition éventuelle vers la cirrhose (209). L'apparition future du CHC dans les cas de NASH survient majoritairement en présence de cirrhose (210). La NAFLD est associée à une hyperinsulinémie provoquant une surproduction d'IGF-1, un facteur de prolifération et de résistance à l'apoptose qui est associé à l'apparition du cancer (211). La présence d'une NASH est reliée à une hausse des niveaux de ROS pouvant provoquer des mutations dans l'ADN (212). La survie et la prolifération peuvent aussi être sur-stimulées étant donné l'augmentation d'expression de la voie JNK lors de la progression d'une NAFLD en NASH (213, 214).

### **1-3-1-3-4 Intoxication à l'alcool**

L'implication de la consommation excessive et chronique d'alcool dans la genèse du CHC, est principalement due à l'apparition d'inflammation soutenue et d'une cirrhose par la suite (215). Toutefois, l'alcool et son métabolite toxique, l'acétaldéhyde, possèdent un potentiel carcinogène qui leur est propre. L'acétaldéhyde peut former des adduits protéiques qui rendront non-fonctionnelles les différentes enzymes ou protéines atteintes. Dans le cas où ces enzymes jouent un rôle dans la détoxification ou la réparation de l'ADN, la production de ces adduits pourrait augmenter le nombre de mutations dans les

cellules. L'acétaldéhyde peut engendrer des adduits d'ADN et ainsi induire des mutations favorisant l'apparition du CHC. L'alcool augmente l'activité du cytochrome P450 2E1 ainsi que la production de ROS, de peroxydation et d'adduits provenant de la peroxydation des lipides, favorisant aussi l'apparition de mutations (216).

### **1-3-1-3-5 Hémochromatose**

L'hémochromatose héréditaire (HH) est due à la présence d'une mutation dans le produit de synthèse protéique codé par le gène HFE. Les mutations les plus fréquentes sont celles de type C282Y et H63D (215, 217). Ces mutations entraînent une hyperabsorption du fer et donc une surcharge hépatique en fer devenant toxique pour le foie. L'HH non traitée entraînera une fibrose qui évoluera vers la cirrhose (218). Le lien entre l'hémochromatose et l'apparition d'un CHC n'est pas seulement dû à l'établissement d'une cirrhose, certains cas de CHC chez des patients souffrant d'HH en absence de cirrhose ayant été recensés (219). Une partie de ces derniers résultats s'explique par la toxicité tissulaire du fer (220).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'association statistique entre l'HH et l'apparition d'un CHC. En premier lieu, un milieu enrichi en fer augmente la synthèse d'ADN d'hépatocytes primaires de rats en culture et stimule la prolifération de lignées cellulaires de CHC (221, 222). Le fer étant essentiel à la

prolifération, l'hypothèse proposée est que la présence accrue de fer chez ces patients constituerait un terrain favorable à la prolifération de foyers néoplasiques. Des données montrent que l'administration de fer par voie orale n'augmente pas l'apparition de cancer et la surdose de fer serait plutôt un facteur de promotion que d'initiation du CHC. D'un autre côté, le fer libre induit une augmentation de la production de ROS pouvant ainsi provoquer des dommages à l'ADN (223). De plus, l'augmentation de ce stress oxydatif favoriserait l'apparition plus rapide de la cirrhose et donc du CHC (224). Finalement, la présence de fer libre diminuerait l'efficacité du système immunitaire et par conséquent du contrôle tumoral (225).

## **B) Autres facteurs de risque**

### **1-3-1-3-6 Sexe**

Les hommes ont un risque plus élevé de développer un CHC. Une des explications probables semble être que les hommes aient en moyenne plus de facteurs de risque de développer les différentes hépatopathies qui elles-mêmes mènent au CHC : les hommes consomment plus d'alcool, sont plus sujets à développer une NAFLD, sont de plus grands utilisateurs de drogues injectables et ont des pratiques sexuelles plus risquées. Il est donc logique devant l'ensemble de ces facteurs de risque qu'ils présentent un risque accru de CHC. Des facteurs hormonaux pourraient également jouer un rôle puisque les androgènes seraient capables de promouvoir le CHC (183, 226, 227).

### **1-3-1-3-7 Âge**

Comme le temps augmente le risque de survenue des mutations, l'âge est un facteur de risque constant de cancer. L'âge moyen où les gens sont diagnostiqués avec un CHC dépend grandement des facteurs de risques associés à son développement. Il peut également dépendre de l'ancienneté de la maladie hépatique sous-jacente (183, 226).

### **1-3-1-3-8 Tabagisme**

La consommation de tabac étant souvent associé à prise d'alcool, il n'est pas exclus qu'un biais d'analyse fasse du tabagisme un facteur de risque pour le développement du CHC (183). D'un autre côté, une étude fait état d'une association directe entre le développement du CHC et le tabagisme (228). Les fumeurs sont d'ailleurs exposés à d'importantes doses de nitrosamines, de puissant carcinogènes (81).

### **1-3-1-3-9 Diabète**

Le diabète est un puissant facteur de risque pour le développement du CHC. Non seulement à cause des risques accrus de développer une NAFLD mais aussi

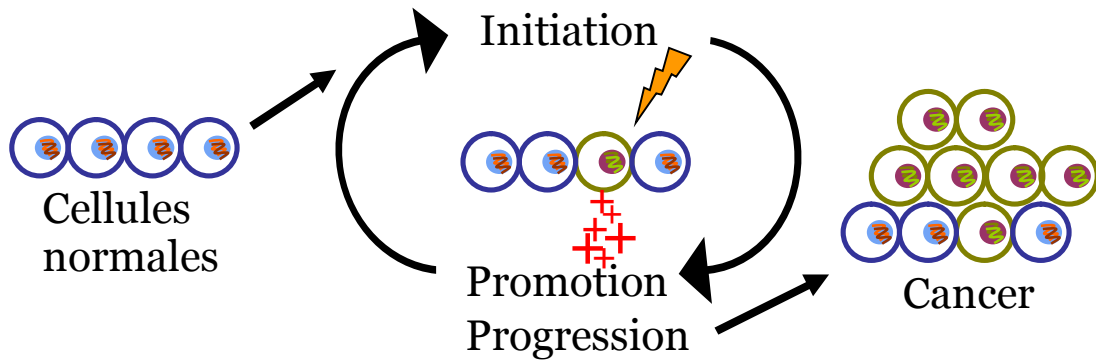
à cause du phénomène d'insulino-résistance. La résistance à l'insuline stimule la production de récepteurs pour les hormones hépatiques ce qui entraîne une production d'IGF-1 qui est un stimulant de la prolifération cellulaire par la voie AKT (229). De plus, l'hyperinsulinémie augmente les chances de stimuler la prolifération des cellules néoplastiques exprimant le récepteur IRS-2 (Insulin Receptor Substrate 2) impliqué dans la signalisation des voie MAPK et AKT (230).

### **1-3-1-3-10 Aflatoxines**

L'aflatoxine-b1 est un contaminant alimentaire hydrosoluble du à la présence d'un champignon de la famille *aspergillus*. Sa présence dans la nourriture périmée, principalement dans les pays en voie de développement entraîne des dommages à l'ADN une fois l'aflatoxine B1 biotransformée sous sa forme active d'aflatoxine B1-exo-8,9-epoxide (183).

### **1-3-1-4 Progression**

La progression d'une cellule normale vers le cancer se fait par une série de passages dans des cycles d'initiation et de promotion décrits dans cette section (figure 1.6).



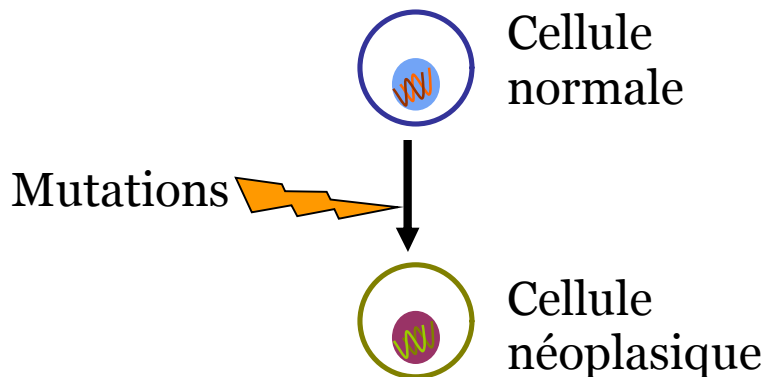
**Figure 1.6 : Progression.** La progression des cellules normales puis néoplasiques vers le cancer se fait par une série de passages dans les étapes d'initiation et de promotion.

### 1-3-1-4-1 Initiation

Les facteurs d'initiation sont ceux qui auront un impact direct sur l'ADN via la genèse de mutations (figure 1.7). Il s'agit principalement d'adduits résultant du stress oxydatif, sous forme de ROS, que l'on retrouve dans les conditions inflammatoires associées aux pathologies sous-jacentes du développement de la fibrose. Ces adduits peuvent aussi être causés par des métabolites toxiques lors d'intoxication chronique. D'autres facteurs d'initiation, principalement retrouvés dans les atteintes virales, favorisent l'apparition de mutations en augmentant la tolérance des cellules ou en activant des voies associées aux modifications épigénétiques. Ces facteurs sont à la frontière entre l'initiation et la promotion du cancer.



## Initiation

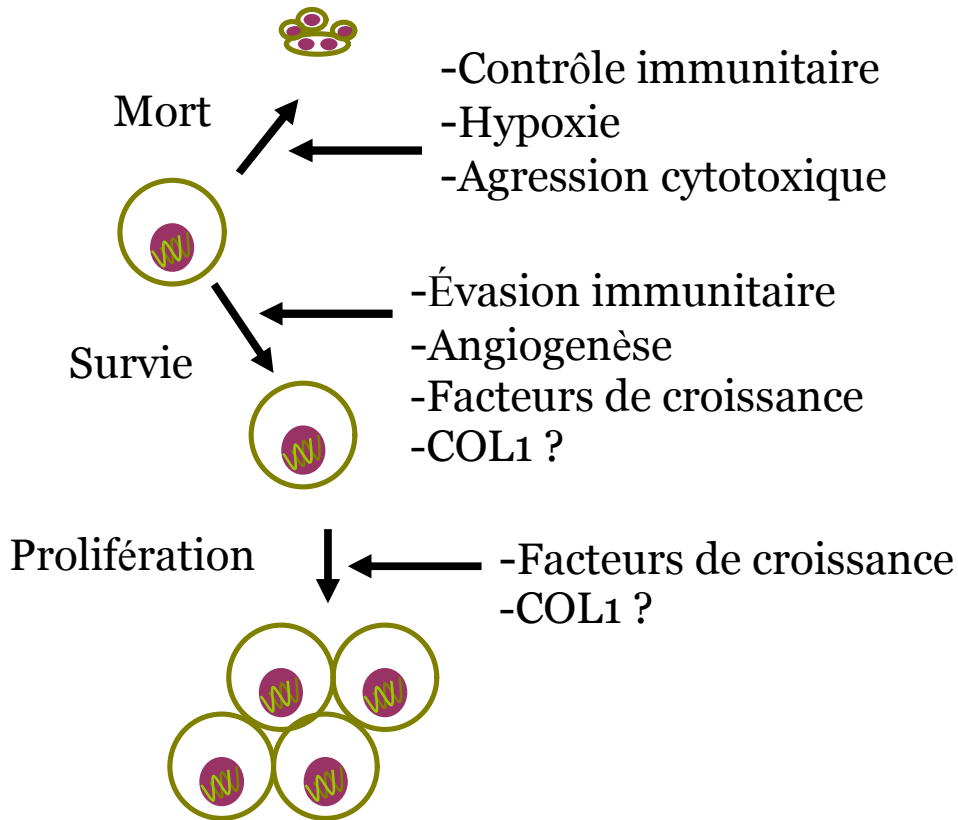


**Figure 1.7 : Initiation.** Représentation graphique du concept d'initiation où l'induction de mutations dans une cellule normale stimule son passage en cellule néoplasique.

### **1-3-1-4-2 Promotion**

Lorsque les conditions dans lesquelles le cancer écloso influence sa progression, nous parlons alors de promotion (Figure 1.8). Par exemple, l'environnement pro-inflammatoire et le relargage d'une panoplie de cytokines peuvent stimuler la prolifération et la survie des cellules néoplasiques (231, 232). La stimulation de voies de survie cellulaire au profit de celles de mort cellulaire peut aussi augmenter la tolérance des cellules néoplasiques aux mutations et ainsi promouvoir la progression vers le stade tumoral. Par exemple, la présence de COL1 qui offre une protection chez l'hépatocyte normal (172) pourrait très bien favoriser son passage en cellule tumorale.

## Promotion



**Figure 1.8 : Promotion.** Représentation graphique du concept de promotion où différents facteurs favorisent la survie et la prolifération des cellules néoplasiques.

### **1-3-1-5 Marqueurs des cellules souches cancéreuses**

Définir et connaître les différents marqueurs des cellules souches cancéreuses est primordial dans la lutte au CHC car cela permettrait d'améliorer le diagnostic et de développer des stratégies thérapeutiques visant spécifiquement ces sous-populations cancéreuses.

L'alpha foeto-protéine (AFP) est, pour l'instant, le marqueur le plus utilisé en clinique dans le diagnostic et le suivi du CHC. L'AFP est exprimée dans les

cellules souches du foie lors de l'embryogénèse hépatique et de la régénération hépatique (233). En association avec la présence d'EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), un autre marqueur de CHC, elle reflète le caractère dédifférencié de la cellule (234, 235).

EpCAM, aussi connu sous le nom de CD326 ou d'antigène 17-1a, est une protéine membranaire de 30-40 kDa qui a tout d'abord été identifiée comme une molécule d'adhésion (236). Par la suite, son étude a montré qu'elle ne permettait qu'un faible lien d'adhésion, mais en revanche possédait un domaine intra-cellulaire pouvant acheminer un signal au noyau (237). De plus, son activation, lorsque deux EpCAM se rencontrent, provoque une modification de liaison par la cadhérine E, une molécule d'adhésion beaucoup plus puissante (238-240). Sa portion intra-cellulaire EpICD, clivée lors de l'activation, peut promouvoir la transcription de plusieurs gènes tel que *NANOG*, *SOX2*, *C-MYC* et celui de la cycline D1, *CCND1* (237-239). Sa présence à la surface des cellules de CHC est associée à un mauvais pronostic (235). De plus, les cellules arborant EpCAM ont des caractéristiques associées aux CSC tel que l'augmentation de la tumorigénicité et la chimiorésistance (234, 241).

CD90 est une protéine de surface que l'on retrouve dans les cellules souches hépatiques (242). Sa présence à la surface d'une cellule de CHC est associée à un phénotype mésenchymateux et à un comportement de type fibroblastique avec une tendance invasive accentuée (241).

### ***1-3-2 Modèles d'étude du CHC***

Plusieurs modèles ont été mis au point afin d'étudier le CHC. Ils visent principalement à mimer partiellement certaines caractéristiques de la maladie tel que rencontrée chez l'humain. Jusqu'à tout récemment avec l'arrivée des souris humanisées, il était impossible d'avoir un modèle mimant complètement l'infection par le HCV autrement que chez les chimpanzés (243, 244). Toutefois, les modèles énumérés dans cette section ne recréent pas l'ensemble des facteurs impliqués dans les pathologies humaines, car il y aurait alors trop de variables à intégrer pour permettre une étude claire des différents aspects de chacun des facteurs de risque. Dans cette section, les modèles les plus documentés sont décrits afin d'offrir un portrait d'ensemble. Le modèle idéal pour évaluer l'effet de la fibrose sur le développement du CHC devrait permettre une coexistence du CHC et de la fibrose sans modification du processus de fibrogenèse induite par le TAA.

#### **1-3-2-1 Modèle chimique**

L'administration de N-nitrosodiéthylamine (DEN) chez la souris provoque l'apparition de CHC en induisant l'alkylation de l'ADN et en stimulant la production de ROS par l'activation des cytochromes P450 (81, 245). Lorsqu'utilisé seul, le DEN demande plusieurs injections et une longue période avant l'apparition de CHC (81). On a souvent recours à une hépatectomie partielle préalable à l'administration de DEN dans le but d'augmenter la

fréquence de développement des CHC et de raccourcir la période expérimentale (246).

### **1-3-2-2 Modèle métabolique**

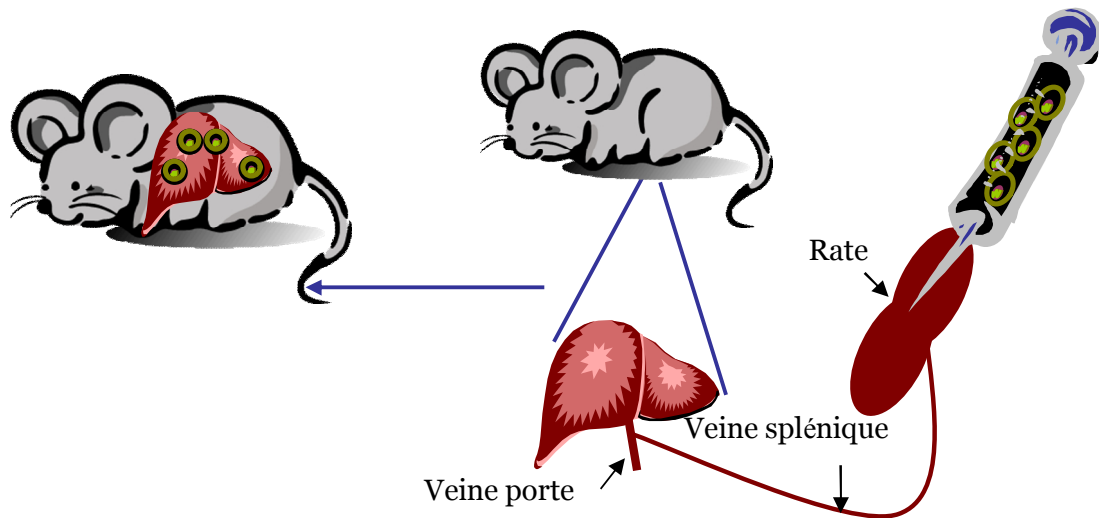
L'utilisation de diète déficiente en choline, tel qu'employée dans l'étude de la NASH, permet à très long terme d'observer le développement du CHC (247). L'utilisation d'agent initiateur tel que le DEN permet un développement accéléré du CHC dans ce modèle (248).

### **1-3-2-3 Modèles génétiques**

L'approche des modèles génétiques est d'évaluer l'implication d'un gène dans le développement du CHC soit par l'ajout ou le retrait du gène. Dans un cas, les animaux sont ensuite soumis à un protocole de carcinogenèse où ils développeront plus ou moins de tumeurs permettant d'évaluer le rôle du gène. Cette méthode est utilisée dans l'évaluation de l'implication du VHC dans le développement du CHC (249). D'autre part, des modèles génétiques provoquant l'éclosion spontanée du CHC ont aussi été développés. Par exemple, le modèle PTEN induit d'abord une NASH et, par la suite, conduit à l'apparition de CHC (250).

#### **1-3-2-4 Modèles chirurgicaux**

Les modèles chirurgicaux consistent en l'implantation de cellules de CHC dans des animaux. Le premier modèle utilisé est l'injection sous-cutanée qui permet un suivi du développement tumoral mais, par contre, n'offre pas un environnement adapté au développement du CHC (251). Le second modèle consiste en l'implantation de tube perméable au milieu extérieur remplis de cellules de CHC. Ils permettent l'étude de plusieurs lignées de cancer dans un même animal donc dans les mêmes conditions (252). Par contre, leur microenvironnement ne ressemble en rien à celui du foie puisque ces tubes sont implantés par voie sous-cutané. L'implantation orthotopique constitue l'approche la plus semblable à la réalité. Deux méthodes différentes sont utilisables. Dans le premier cas, les cellules sont injectées directement dans le foie afin qu'elles forment une tumeur en un point précis. Les données rassemblées permettront d'évaluer la progression de la tumeur en mesurant son diamètre et aussi la présence de micro-satellites à son pourtour témoignant de sa capacité à envahir le tissu avoisinant (253). L'autre technique consiste à injecter un lot de cellules dans la rate afin qu'elles diffusent dans le foie via les veines splénique et porte (Figure 1.9). Cette méthode offre une implantation diffuse d'un lot de cellules de CHC et permet l'analyse du nombre de foyers s'étant développés dans le foie dans une condition donnée (254).



**Figure 1.9 : Injection intrasplénique.** Représentation de la technique d'implantation orthotopique de CHC par la voie intrasplénique.

Plusieurs modèles animaux sont disponibles pour accomplir ce type d'expérience. Il y a tout d'abord les modèles immunosupprimés qui ouvrent la possibilité à l'utilisation de CHC d'origine humaine puisque ces souris ont perdu la capacité à distinguer le non-soi du soi. Par contre, l'effet du système immunitaire ne peut plus être évalué dans ce type de souris. Les souris immunocompétentes exercent la pression immunitaire normalement retrouvée dans le développement du cancer, mais seuls les CHC d'origine murine peuvent alors être étudiés.

L'utilisation de lignées cellulaires pour obtenir un développement de CHC orthotopique n'engendre pas systématiquement leur implantation si aucune manipulation n'est faite sur ces lignées. Une des techniques consiste à enrichir artificiellement, par tri-cellulaire, ces lignées afin qu'elles soient formées de cellules à haut potentiel tumorigène (234). Par contre, ces méthodes ne

témoignent pas du caractère hétérogène du CHC. La lignée cellulaire devrait aussi être très tumorigène, c'est-à-dire capable d'induire des tumeurs très rapidement, et spécifiquement dans le foie, car l'étude de son développement doit avoir lieu durant la période où la fibrose hépatique est encore présente. Cette période est d'environ 2-3 semaines chez la souris C57/bl6 et balb/c (172). Une pré-étape de sélection *in vivo* de clones ayant la capacité de former des tumeurs strictement hépatiques en moins de 21 jours par implantation intrasplénique de cellules de CHC murins a été réalisée à cette fin dans notre laboratoire.

### ***1-3-3 CHC et fibrose hépatique (Figure 1.10)***

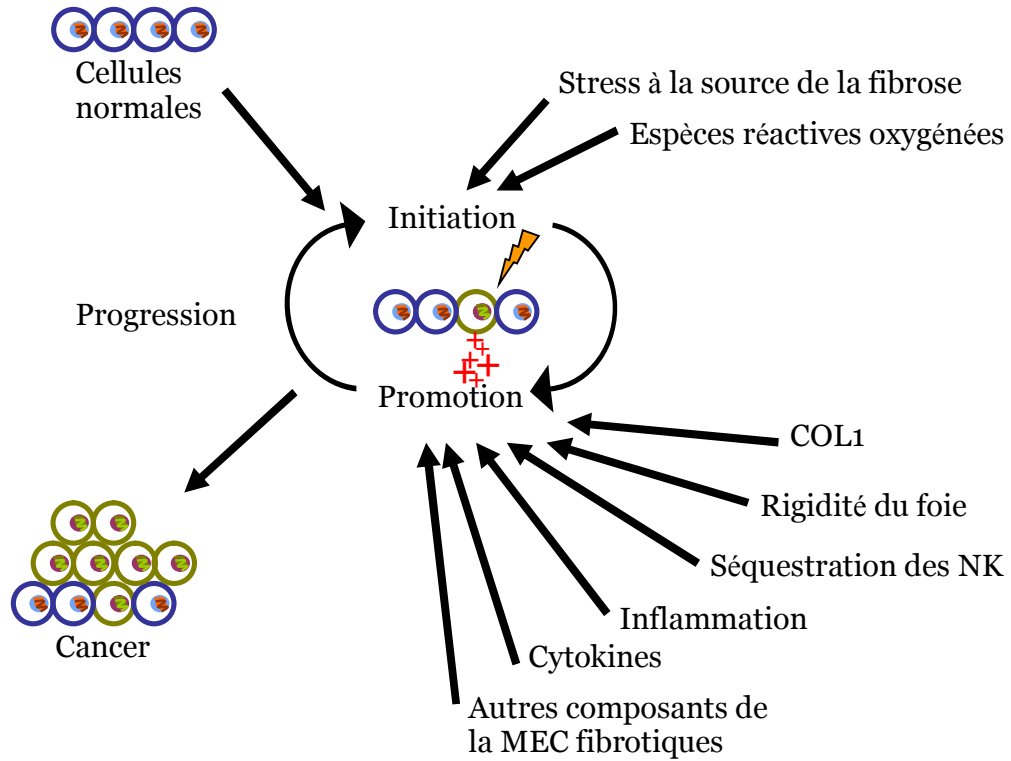
Il est difficile de déterminer si la fibrose, caractérisée par l'accumulation de MEC et la formation de nodules de régénération, est directement liée à l'apparition d'un CHC, où s'il s'agit plutôt de la pathologie chronique à la base de son apparition qui en est la cause. Un fait demeure : le CHC se développe dans 80-90% sur fond de cirrhose (183). Des données préliminaires obtenues dans notre laboratoire font état d'un effet protecteur du plus important composant de la MEC, le collagène de type 1, sur les hépatocytes primaires et les lignées d'hépatocarcinome lorsqu'ils sont soumis à un stress hépatotoxique. D'autres études menées chez la souris *in vivo*, montrent un lien entre le développement du CHC et la présence de fibrose hépatique (253, 255). Cependant, ces études ne tiennent pas compte des facteurs pro-inflammatoires



libérés en réponse aux atteintes toxiques répétées dues à l'utilisation de la molécule hépatotoxique, la TAA. Des données tendent à démontrer que la présence d'inflammation et de stress hépatique favorisent grandement l'implantation des hépatocytes néoplasiques (256). Il est donc difficile de déterminer si l'augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses injectées est due à l'inflammation ou aux caractéristiques de la fibrose elle-même. Une étude a récemment démontré que la rigidité du foie associé à la présence de la fibrose pouvait influencer le comportement des cellules de CHC en augmentant leur résistance à l'apoptose (257). De plus, il est aussi admis que la MEC peut séquestrer des facteurs de croissance et ainsi promouvoir le développement du CHC (258, 259). Des études font aussi état d'une séquestration par la MEC des cellules NK, limitant ainsi leur fonction de contrôle immunitaire (260, 261). D'autres études sont nécessaires afin d'établir les systèmes impliqués dans l'augmentation du risque statistique d'apparition du CHC associé à la présence de fibrose ou de cirrhose.

Développement du CHC

Caractéristiques de la fibrose



**Figure 1.10 : Fibrose et CHC.** Caractéristiques de la fibrose hépatique pouvant influencer le développement du CHC.

## Chapitre 2 - Hypothèse

En tenant compte que la fibrose hépatique et le COL1 produisent un effet hépatoprotecteur chez les hépatocytes normaux en plus de l'association statistique entre le développement du CHC et la présence de cirrhose, nous formulons l'hypothèse suivante :

**La présence de fibrose hépatique et du collagène de type I augmentent la survie et stimule la progression du CHC.**

Objectifs :

**A)** Instaurer un modèle d'induction de fibrose chez la souris immunodéficiente Foxn1 nu/nu et vérifier la présence de l'effet hépatoprotecteur

**B)** Développer un modèle de CHC *in vivo*, permettant son étude dans le contexte d'un protocole de fibrogenèse expérimentale et sans le recours à une souris immunodéficiente

**C)** Évaluer l'influence de la fibrose et du COL1 sur la progression et la survie du CHC

## **Chapitre 3 - Article 1**

### **Thioacetamide administered in drinking water to nude mice as a reliable model of liver fibrosis**

Benoit Lacoste<sup>1</sup>, Valérie-Ann Raymond<sup>1</sup> and Marc Bilodeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'hépatologie cellulaire du Centre de recherche du CHUM-Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada.

***Running head: Thioacetamide-induced liver fibrosis in nude mice***

Manuscrit non soumis.

### **3.1 Abstract**

#### **Aim:**

This study focused on the establishment of a nude mouse model of liver fibrosis, its standard characterisation and the evaluation of the hepatoprotective state associated with liver fibrosis in this model.

#### **Method:**

Induction of liver fibrosis in nude mice was induced by the administration of 0.02% thioacetamide (TAA) in drinking-water.

#### **Results:**

Significant levels of fibrosis were obtained in nude mice after 16 weeks of TAA exposure. Reversal of fibrosis was observed 3 weeks after stopping the exposure. Liver fibrosis was associated with phosphorylation of ERK1/2 (controls  $0.03 \pm 0.01$  vs 16 weeks  $0.18 \pm 0.06$  AU;  $P < 0.05$ ). Nude mice with liver fibrosis were more resistant than non-fibrotic ones to different cytotoxic agents as assessed histologically and by serum AST levels:  $0.5 \mu\text{g/g}$  bw anti-Fas JO2 ( $4665 \pm 2596$  in fibrotic vs.  $13953 \pm 2260$  U/L in non-fibrotic;  $P < 0.05$ ),  $750 \text{ mg/kg}$  bw acetaminophen ( $292 \pm 66$  in fibrotic vs.  $4087 \pm 2205$  U/L in non-fibrotic;  $P < 0.01$ ) and  $0.5 \text{ mL/Kg}$  bw  $\text{CCl}_4$  ( $888 \pm 268$  in fibrotic vs.  $15673 \pm 2782$  U/L in non-fibrotic;  $P < 0.001$ ).

#### **Conclusion:**

After 16 weeks of treatment with TAA in drinking water, nude mice develop significant degrees of fibrosis: this is accompanied with MAPK pathway activation and hepatoprotection against known hepatotoxic agents.

Keywords: liver; fibrosis; nude; hepatoprotection; MAPK

### **3.2 Introduction**

Liver fibrosis is the accumulation of extracellular matrix (ECM) in response to the chronic inflammatory state induced by sustained liver injury (1-3). This pathophysiological response is observed in humans during a number of chronic pathological conditions (2). Cirrhosis is the most severe state of liver fibrosis and is associated with the risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC), a cancer associated with poor prognosis (4).

Liver fibrogenesis is a highly complex and tightly regulated process that is still under investigation. It is triggered by the activation of non-parenchymal cells together with a coordinated secretion of cytokines (2, 5, 6). Kupffer cells (KC) are liver macrophages that become activated by lipopolysaccharides (LPS) and/or endotoxins through binding with pattern recognition receptors (PRRs), e.g., the toll-like receptor 4 (TLR4). KC can also be activated by damage-associated-pattern-molecules (DAMPs) issued from intracellular constituents released by necrotic cells (7). Once activated, KC secrete TGF- $\beta$ 1 and proinflammatory molecules such as TNF- $\alpha$  that activate hepatic stellate cells (HSC) (1, 8, 9). Activated HSC lose their vitamin A content, start expressing alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) and become the major producers of ECM components (3, 10-12).

Many experimental models have been developed to study liver fibrosis (13). Among the chemically-induced models, the hepatotoxic agent thioacetamide (TAA) has long been used (14). TAA, through its secondary metabolite TASO<sub>2</sub>, exerts cytotoxic effects on hepatocytes leading to KC activation, cytokine production (such as TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1) and subsequent HSC activation (15-18). Characteristic aspects of liver fibrosis include alpha-SMA expression, Col1a1 mRNA expression, histological evidence of ECM deposition and COL1 accumulation. Recently, fibrosis has been associated with an increased resistance to acute liver stress *in vivo* through mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation (19). When mice are subjected to a period of recovery after fibrosis development, reversal of fibrosis is observed, a process that is associated with HSC deactivation and apoptosis (20-22).

Despite extensive work on liver fibrosis in immunocompetent animals, we could not find in the literature a reliable model of liver fibrosis in immunodeficient animals: indeed, so far, the use of TAA in nude mice, that lack mature T cells (23), has been reported to cause a high mortality (24). We have used an alternative route for TAA administration in this animal model.



### **3.3 Material and methods**

#### Animals

Male nude mice (20g) were purchased from Charles-River (Saint-Constant, Qc, Canada) and were fed ad libidum with normal chow in vented cages in the immunodeficient specific area of the animal welfare at CRCHUM St-Luc. All procedures were performed in accordance with Canadian Council on animal care and approved by the Comité institutionnel de protection animale du CHUM.

#### Chemicals

Thioacetamide (TAA), acetaminophen (APAP) and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Fas JO2 antibody was purchased from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). TRIZOL reagent was bought from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Quantitect reverse transcription kit and SYBRGreen kit were purchased from QIAGEN (Toronto, Ontario, Canada). Enhanced chemiluminescence (ECL) reactives were purchased from Perkin-Elmer (Woodbridge, Ontario, Canada). Developer and fixator solution kits were from Kodak (Rochester, NY). Unless stated otherwise, all other products were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

### Fibrogenesis protocol

A sterile filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) 2% TAA stock solution in spring water (low in iron) was prepared and stored at room temperature. The 0.02% TAA solution was renewed from the stock solution every 2 weeks. Animals (1/cage) received the 0.02% TAA solution as regular drinking water, bottles being changed once every two weeks. To facilitate TAA intake and reduce mortality due to toxicity, mice received a solution of 0.01% TAA during the first 2 weeks after which the dose was increased to 0.02% for 16 weeks. Animals were sacrificed at 4, 8, 12 and 16 weeks following the beginning of the administration of 0.02% TAA dose (2-week 0.01% TAA period excluded). Two other groups of animals received normal drinking water for 2 or 3 weeks after the end of the 16-week treatment to assess fibrosis regression. These animals were compared to a control group of Foxn1 nu/nu animals receiving normal drinking water for the entire treatment and pre-treatment period.

### Acute liver injury

Following a 16-week fibrogenic TAA treatment in drinking water, nude mice were injected IP 48h after the end of the TAA treatment with the following cytotoxic agents: 0.5 mL/kg bw  $\text{CCl}_4$  as a 20% solution in sterile mineral oil followed by animal sacrifice at 24 hours, 0.5  $\mu\text{g/g}$  bw Fas Jo2 antibody followed by animal sacrifice at 6 hours or 750 mg/kg bw APAP followed by animal sacrifice at 6 hours. The concentrations and time points used for the three products are known to cause acute liver injury in mice (23-25).

## Histology

Formalin-fixed liver specimens were sliced, mounted on slides and stained in the Pathology Department of Saint-Luc Hospital. Masson's trichrome staining was performed to assess the degree of fibrosis while hematoxylin-phloxin-safranin (HPS) staining was used for histological evaluation of liver injury. Microphotographs were taken under Carl Zeiss Axioplan 2 (Göttingen, Germany) microscope at 100x magnification with Northern Eclipse 6.0 software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada).

## Immunofluorescence

Slides of formalin-fixed and paraffin-embedded liver samples were dewaxed in xylene for 10 minutes. Slides were then rehydrated in successive baths of ethanol and water (100% for 6 minutes; 95% for 3 minutes, 70% for 3 minutes and water only for 3 minutes). Slides were then blocked for 60 minutes in immunofluorescence buffer (IF buffer) that consists of PBS<sub>1x</sub> added with 3% BSA and 0.05% Tween-20. Primary anti-alpha-SMA mouse antibody (Dako, Burlington, Ontario, Canada) was incubated overnight at a 1:100 dilution in IF buffer at 4°C. Slides were washed 3 times for 3 minutes and then incubated for 120 minutes with secondary FITC-labelled antibody (Dako, Burlington, Ontario, Canada) at a 1:20 dilution in IF buffer in the dark at room temperature. Slides were washed in PBS<sub>1x</sub> 0.05% Tween (PBST) and nuclei were stained with Hoechst 33258 [10 ng/mL] in PBS for 60 minutes in the dark. Slides were washed 2 times for 5 minutes in PBS<sub>1x</sub> and microphotographs obtained using Northern Eclipse 6.0 software (Empix Imaging, Mississauga,

Ontario, Canada) were taken by fluorescent microscopy (Carl Zeiss Axioplan 2, Göttingen, Germany). Image analysis was performed with ImageJ 1.46 software (NIH, USA) using 5 representative pictures at 100x magnification of each slide. Results were expressed as percentage of positive pixels for alpha-SMA of the total picture area.

#### Hydroxyproline content

The hydroxyproline content was expressed as  $\mu\text{g/g}$  of liver as previously reported (26). Briefly, 20 mg of frozen liver samples were hydrolysed in 6N HCl at  $110^{\circ}\text{C}$  in an autoclave at a pressure of  $1.2 \text{ kgf/cm}^2$  during 16 hours. After centrifugation at 2000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes, 2 mL of supernatant was transferred to another tube. Samples were neutralized (pH 7–8) using 8N KOH added with 1% phenolphthalein. Two mL of this solution was then stirred with 2 g of KCl and 1 mL of 0.5M borate buffer (pH 8.2) for 15 minutes at room temperature followed by another 15 minutes at  $0^{\circ}\text{C}$ . Chloramine T [0.2M] solution (1 mL) was added and stirred for 60 minutes at  $0^{\circ}\text{C}$ . The resulting solution was then mixed with 3.6M sodium thiosulfate (2 mL) and incubated for 30 minutes at  $120^{\circ}\text{C}$ . Toluene (3 mL) was added to the mixture for 20 minutes. Finally, Ehrlich's solution (16% 4-diméthylaminobenzaldehyde + 59% Isopropanol + 25% concentrated perchloric acid (70%)) (0.8 mL) was added to 2 mL of supernatant obtained after centrifugation at 2000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$ , left for 30 minutes at room temperature and stirred 5 times during this period. Absorbance of the lower phase was measured at 560 nm.

### mRNA measurement

Frozen liver samples (80–90 mg) were homogenized with a potter in 1 mL of TRIZOL reagent at 4°C in accordance with manufacturer's recommendations. Two hundred µL of chloroform were added to the solution for RNA extraction, mixed thoroughly and centrifuged for 15 minutes at 14 000 g at 4°C. The aqueous phase was taken and incubated with 1:3 volume of isopropanol for 10 minutes at room temperature and then centrifuged for 10 minutes at 14 000 g at 4°C. The RNA pellets obtained were washed in 75% ethanol and re-suspended in sterile RNase/DNase-free water. According to the manufacturer's recommendations of the Quantitect reverse transcription kit, 250 ng of each RNA samples were wiped out of genomic DNA and transcribed in DNA. Gene expression was analyzed following Quantitect SYBRGreen kit manufacturer's guide with a RotorGene (Corbett Life Science, CA) Real-time PCR. For each gene tested, 35 cycles with a 59°C melting temperature were performed. Mouse Collagen 1a1 precursor (Col1a1) gene (F:5'-CATG TTCAGCTTTGTGGACCT-3'; R:5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3') was evaluated using these genes as references: HPRT1 (F:5'-GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG-3'; R:5'-CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT-3', Ppia (F:5'-CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG-3'; R:5'-TGTAAGTCACCACCCTGGCACAT) and H2afz (F:5'-ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA-3'; R:5'-TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA-3') (27). Relative gene expression was measured using the delta delta CT method (28).

### Western blot analysis

Frozen liver samples (100 mg) were homogenized in 300  $\mu$ L of complete RIPA buffer using a potter and dosed according to Bradford (29). Protein extracts were prepared, subjected to a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then blotted as described (30). Briefly, after a 1-hour block in 10% milk in PBST at room temperature, membranes were probed with the following antibodies: anti-ERK1/2, anti-phosphospecific ERK1/2 [1:1000] (both from Cell Signalling, Pickering, Ontario, Canada) and anti-actin kit [1:10 000] from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 2 hours in PBST containing 1% milk at room temperature. Membranes were washed 3 times for 10 minutes in PBST and then incubated with a secondary antibody (HRP-conjugated anti-rabbit IgG [1:1000] or anti-mouse IgG [1:5000] both from BD Pharmingen, CA) or anti-mouse IgM [1:20 000] from Actin kit during 1 hour in PBST containing 5% milk at room temperature. Finally, after a 3 times wash in PBST, membranes were incubated in presence of enhanced chemiluminescence (ECL) reactive. In a dark room, Hyblot CL films (Denville scientific inc., Metuchen, NJ) were exposed to chemiluminescent membranes and then developed and fixed using Kodak solutions kits. Band densitometry was measured using ImageJ 1.46 software (NIH, USA).

### Aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) activities

Blood was obtained at sacrifice, left at room temperature for 30 minutes and then centrifuged for 5 minutes at 1400 rpm in order to isolate serum. Serum

samples were then sent in a 1:10 dilution to the Biochemistry Department. Quantitative determination of ALT and AST activities was performed by the Hospital Biochemistry Department using an automatic multianalyzer (Synchron LX System, Beckman Coulter, Mississauga, Ontario, Canada).

#### Statistical analysis

All experiments were performed on 4-10 animals. Results are expressed as means  $\pm$  SE. Difference between groups were analyzed by Student's *t*-test. A *P*-value below 0.05 was considered significant.

### **3.4 Results**

#### Liver fibrosis development

The fibrosis protocol was very well tolerated by the nude mice. No mortality was observed in the 50 nude mice that received the full 16-week TAA treatment in drinking water. Fibrosis development was first evaluated by measuring Col1a1 mRNA expression levels (Fig.1A). Levels increased early after the beginning of TAA treatment and reached their highest level after 16 weeks ( $11.7 \pm 4.1$  fold changes;  $P < 0.05$  vs. control). Col1a1 mRNA levels dropped to near normal values 2 weeks after the end of TAA treatment. Figure 1B shows collagen accumulation as assessed by hydroxyproline content over time in nude mice over a 16-week period followed by a 3-week period of recovery after the end of TAA exposure. Collagen progressively accumulated over the 16-week observation to reach levels that were 6 times higher than controls. Following the end of TAA exposure, it took 3 weeks for the hydroxyproline content to come back to control levels.

When liver fibrosis was evaluated histologically by Masson's trichrome staining(31), evidence of ECM accumulation could be observed progressively during the treatment period in nude mice (Fig.2B to 2E). Histological signs of liver fibrosis decreased 2 weeks after the end of the TAA treatment. However, it took 3 weeks for nude mice for all signs of liver fibrosis to disappear (Fig.2F, 2G).



Figure 3A shows the activation of stellate cells evaluated by alpha-SMA immunofluorescence staining. After 4, 8, 12 and 16 weeks of treatment with TAA, these cells were progressively observed along the newly formed fibrosis septa. Following the 2-week recovery period, all evidence of alpha-SMA positive cells had disappeared. Quantitatively, HSC activation, as a parameter of fibrosis induction, was evaluated by the measurement of the alpha-SMA positive area (Fig.3B). Results show a similar course of activation in comparison to collagen content although the regression to control levels was faster after the end of the TAA exposure.

Next, activation of MAPK pathway during liver fibrogenesis was evaluated (Fig.4) by densitometric analysis of total and phosphorylated ERK1/2 levels. No change was observed in total ERK1 and 2, but the phosphorylation of ERK1 was increased significantly after 16 weeks in nude mice (16 weeks:  $0.18 \pm 0.06$  AU vs. control mice:  $0.03 \pm 0.01$  AU;  $P < 0.05$  and 16 weeks+3w:  $0.03 \pm 0.01$  AU vs. 16 weeks;  $P < 0.05$ ). Furthermore, the phosphorylation of ERK2 increased to a higher extent and took 3 weeks in order to come back to baseline levels (16 weeks:  $\pm$  AU vs. control mice:  $\pm$  AU;  $P < 0.05$  and 16 weeks+3w:  $\pm$  AU vs. 16 weeks;  $P < 0.05$ ).

### Hepatoprotective effect of liver fibrosis against different cytotoxic agents

Liver fibrosis has been shown to induce a distinctive hepatoprotective state (22). By using three different hepatotoxic agents in fibrotic and non-fibrotic nude mice, we assessed whether fibrosis could exert this particular effect in nude mice. In order to evaluate the sensitivity of fibrotic animals to hepatotoxic agents, AST and ALT levels were measured in the serum of animals (Fig.5). Control levels of AST were significantly higher in fibrotic ( $188 \pm 8$  U/L) than in non-fibrotic ( $95 \pm 19$  U/L) nude mice ( $P < 0.05$ ) but were still lower than all other conditions. AST levels were significantly lower in fibrotic ( $292 \pm 66$  U/L) than in non-fibrotic nude mice ( $4087 \pm 2205$  U/L) 6 hours after APAP injection ( $P < 0.01$ ). Similar differences were observed 6 hours after Anti-Fas Jo2 injection ( $4665 \pm 2596$  U/L in fibrotic animals vs.  $13953 \pm 2782$  U/L in non-fibrotic animals;  $P < 0.01$ ) and 24 hours after CCl<sub>4</sub> injection (fibrotic:  $888 \pm 268$  U/L vs. non-fibrotic:  $15673$  U/L;  $P < 0.001$ ). This was confirmed by serum enzyme ALT measurements.

Histological representative microphotographs of liver samples from animals submitted to the above hepatotoxic agents showed that liver injury, such as red blood cell infiltration caused by APAP, was more prominent in non-fibrotic mice (Fig.6A) than in fibrotic ones (Fig.6B). Signs of acute liver injury caused by anti-Fas Jo2 agonist antibody were also more significant in the control animals (Fig.6C) than in the fibrotic animals (Fig.6D). Finally, parenchymal necrosis was more important in animals not submitted to the fibrogenic

protocol administered with a single toxic dose of  $\text{CCl}_4$  (Fig.6E) in comparison to fibrotic animals (Fig.6F).

### 3.5 Discussion

The present study successfully demonstrates that administration of TAA in drinking water combined with step-wise dose-increase is a reproducible and well tolerated liver fibrosis model in nude mice. This observation is of importance in order to achieve adequate experimental observations in immunodeficient animals with liver fibrosis. Indeed, animal demise was consistently observed by Hyon *et al.* using dimethylnitrosamine (DMN) model in NOD-SCID mice and also by Gandillet *et al.* in a nude mouse model using IP injection of TAA (32, 33). In the present study, by using step-wise increase of TAA dose and a more constant delivery method (through regular drinking water), the toxicity of TAA was reduced without undermining the extent of its fibrogenic potential. This mode of delivery can probably be considered for use in other immunodeficient mouse strains.

Fibrosis was associated with an increased expression of alpha-SMA along fibrous septae, which is a clear sign of HSC activation, the main producer of ECM in the liver (3, 34). This activation is necessary for the production of ECM molecules such as COL1 (35). In order to produce COL1, Col1a1 mRNA levels are increased during fibrogenesis (36). As expected, Col1a1 levels increased following a similar pattern to hydroxyproline content measurements.

Fibrosis regression occurs when the pre-set stimulus for fibrosis is removed (19). Fibrosis reversal requires the deactivation and death of HSCs and the modulation of ECM components to their normal ratios through specialised collagenases named matrix metalloproteinases (19, 20). Two weeks after the end of TAA treatment, alpha-SMA levels were similar to their respective non-fibrotic controls. In parallel, Col1a1 mRNA levels dropped to normal value after the 2-week recuperation as previously shown in other models (37). However, Masson's trichrome histology and hydroxyproline contents measurements took longer to reach control levels. Masson's trichrome and hydroxyproline measure the presence of ECM in the liver while alpha-SMA is a reflection of the activation of HSC while Col1a1 mRNA expression is necessary for the production of COL1 production (3, 31, 36, 38). Thus it is not surprising that these parameters dropped faster than the ECM degradation as has been reported by others (19-21). Up until now, no model has evaluated fibrosis regression in nude mice and this study confirms the presence of this important hallmark of liver fibrosis.

The increase in MAPK phosphorylation has been shown to be a key feature of fibrosis progression in Balb/c mice and has been shown to be associated with the hepatoprotective state induced by liver fibrosis (22). In nude mice, both ERK1 and 2 subunits phosphorylation increased during TAA exposure.

The protective effect of fibrosis was assessed in nude mice under three different stress conditions. Agonist FasR antibody is known to induce apoptotic cell

death through the extrinsic Fas pathway (23, 39). APAP injury is caused by its reactive metabolite N-acetyl-*p*-benzoquinonimine (NAPQI) which is generated by CYP2E1, CYP1A2, and CYP3A4 (40). Finally, CCl<sub>4</sub> toxicity is caused by its biotransformation into the highly reactive free radical CCl<sub>3</sub>• by CYP2E1, CYP2B1 and CYP2B2 (41). Both, NAPQI and CCl<sub>3</sub>•, induce cell death through oxidative stress (42-44). The hepatoprotective effect observed in fibrotic mice, assessed under these three hepatotoxic conditions, is known to be associated with the action of ECM on hepatocyte survival (22). The protective effect, being present in three different types of liver injury, confirms that fibrosis was responsible for the hepatoprotection as previously demonstrated by us (22). The appearance of a clear hepatoprotective effect against different cytotoxic stress in fibrotic nude mice strengthens that a physiologically meaningful level of fibrosis was reached in our model.

In conclusion, the induction of liver fibrosis in nude mice by the addition of TAA in drinking water offers a reproducible model of liver fibrosis in an immunodeficient context that recapitulates all the standard characteristics of fibrosis development. This well-characterized model reproduces the MAPK-mediated hepatoprotective effects described in immunocompetent mice and confirms that it can now be considered as one of the hallmarks of liver fibrosis.

### 3.6 References

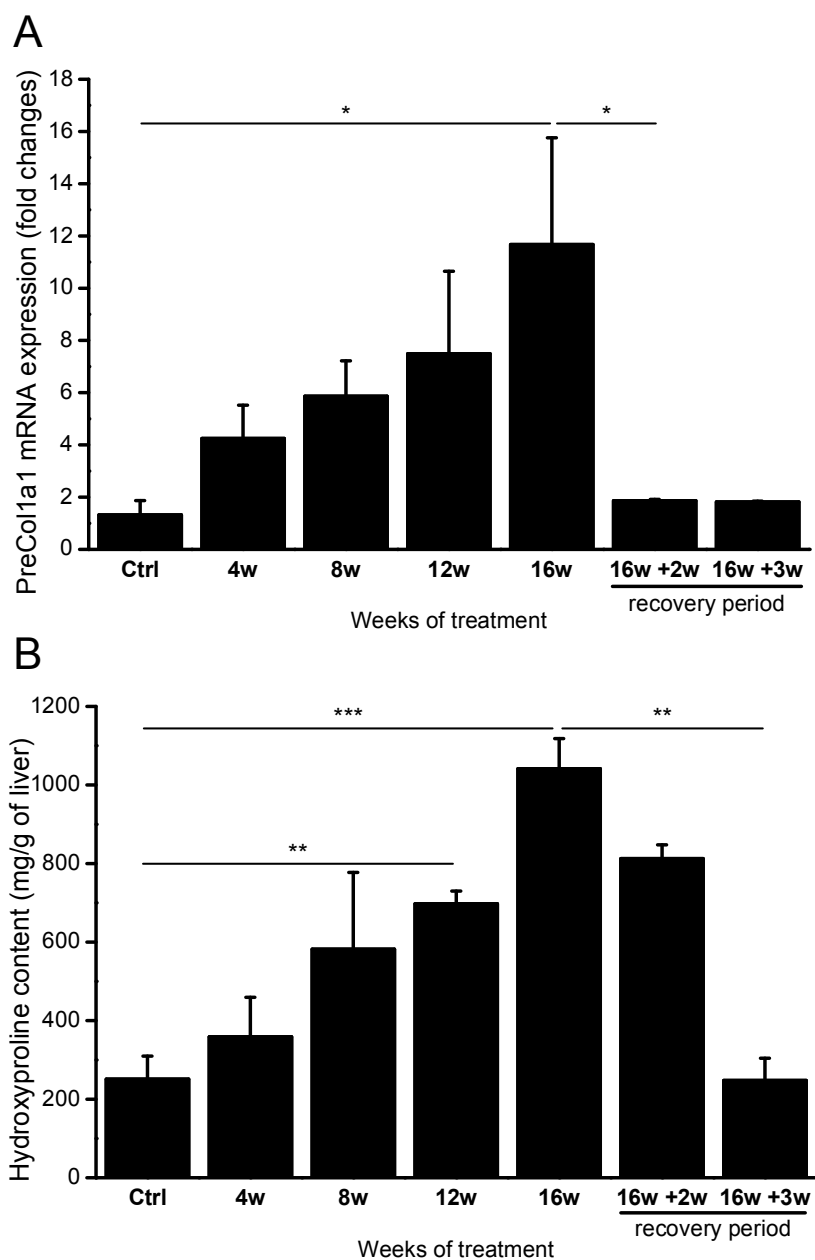
1. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2010.
2. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003;38:257-265.
3. Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2009;2:4.
4. Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2012;56:769-775.
5. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27 Suppl 2:65-68.
6. Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:759-768, viii.
7. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol* 2012;3:56.
8. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008;47:729-736.
9. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003;38:1188-1198.
10. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:195-206.
11. Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:207-217.
12. Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012;142:938-946.
13. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:319-333.
14. Salguero Palacios R, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Gressner OA, et al. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2008;88:1192-1203.
15. Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* 2007;230:105-116.
16. Sarma D, Hajovsky H, Koen YM, Galeva NA, Williams TD, Staudinger JL, Hanzlik RP. Covalent modification of lipids and proteins in rat hepatocytes and in vitro by thioacetamide metabolites. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1868-1877.

17. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, Staudinger JL, et al. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide s-oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1955-1963.
18. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Autophagy fuels tissue fibrogenesis. *Autophagy* 2012;8:849-850.
19. Bourbonnais E, Raymond VA, Ethier C, Nguyen BN, El-Leil MS, Meloche S, Bilodeau M. Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury. *Gastroenterology* 2012;142:130-139 e134.
20. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, Pradere JP, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 2012;143:1073-1083 e1022.
21. Ramachandran P, Iredale JP. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM* 2012;105:813-817.
22. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008;134:657-667.
23. Romano R, Palamaro L, Fusco A, Iannace L, Maio S, Vigliano I, Giardino G, et al. From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:467101.
24. Gandillet A, Vidal I, Alexandre E, Audet M, Chenard-Neu MP, Stutzmann J, Heyd B, et al. Experimental models of acute and chronic liver failure in nude mice to study hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 2005;14:277-290.
25. Gottschalk S, Zwingmann C, Raymond VA, Hohnholt MC, Chan TS, Bilodeau M. Hepatocellular apoptosis in mice is associated with early upregulation of mitochondrial glucose metabolism. *Apoptosis* 2012;17:143-153.
26. Ishida Y, Kondo T, Tsuneyama K, Lu P, Takayasu T, Mukaida N. The pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55 in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Leukoc Biol* 2004;75:59-67.
27. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, Serriere-Lanneau V, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671-676.
28. Sakaida I, Matsumura Y, Kubota M, Kayano K, Takenaka K, Okita K. The prolyl 4-hydroxylase inhibitor HOE 077 prevents activation of Ito cells, reducing procollagen gene expression in rat liver fibrosis induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Hepatology* 1996;23:755-763.
29. Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol* 2007;7:14.
30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001;25:402-408.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
32. Ethier C, Raymond VA, Musallam L, Houle R, Bilodeau M. Antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes associated with downregulation of

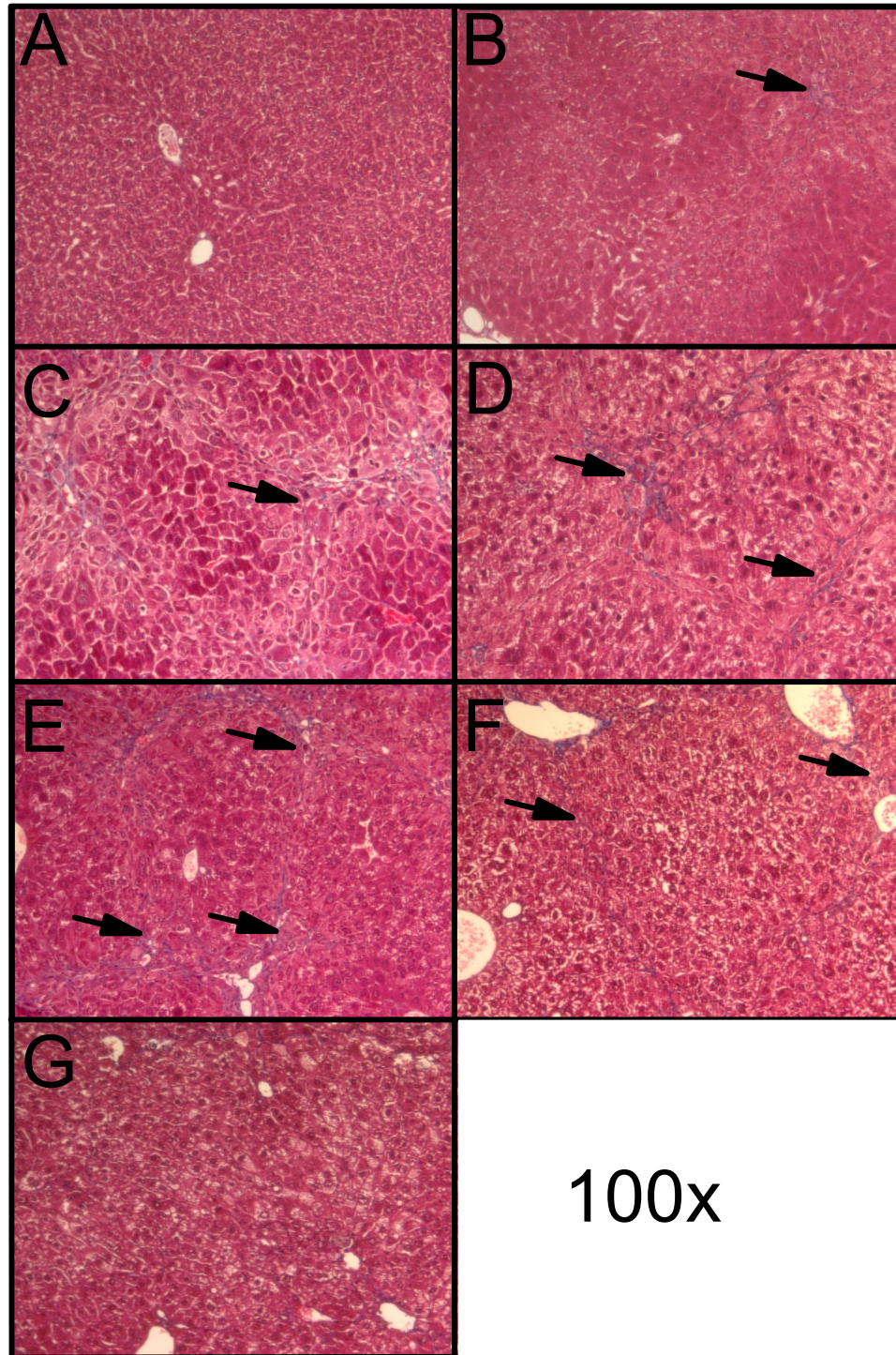


- proapoptotic Bid protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G298-308.
33. Goldner J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol* 1938;14:237-243.
  34. Hyon MK, Kwon E, Choi HJ, Kang BC. Dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and recovery in NOD/SCID mice. *J Vet Med Sci* 2011;73:739-745.
  35. Friedman SL. Transcriptional regulation of stellate cell activation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21 Suppl 3:S79-83.
  36. Lang A, Sakhnini E, Fidler HH, Maor Y, Bar-Meir S, Chowers Y. Somatostatin inhibits pro-inflammatory cytokine secretion from rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005;25:808-816.
  37. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Arai K, Takeda K, et al. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol* 2011;54:1195-1204.
  38. Schnur J, Olah J, Szepesi A, Nagy P, Thorgeirsson SS. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:127-133.
  39. Gorres KL, Raines RT. Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45:106-124.
  40. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999;29:1-4.
  41. Moyer AM, Fridley BL, Jenkins GD, Batzler AJ, Pelleymounter LL, Kalari KR, Ji Y, et al. Acetaminophen-NAPQI hepatotoxicity: a cell line model system genome-wide association study. *Toxicol Sci* 2011;120:33-41.
  42. Gruebele A, Zawaski K, Kaplan D, Novak RF. Cytochrome P4502E1- and cytochrome P4502B1/2B2-catalyzed carbon tetrachloride metabolism: effects on signal transduction as demonstrated by altered immediate-early (c-Fos and c-Jun) gene expression and nuclear AP-1 and NF-kappa B transcription factor levels. *Drug Metab Dispos* 1996;24:15-22.
  43. Meyers LL, Beierschmitt WP, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;93:378-387.
  44. Yan HM, Ramachandran A, Bajt ML, Lemasters JJ, Jaeschke H. The oxygen tension modulates acetaminophen-induced mitochondrial oxidant stress and cell injury in cultured hepatocytes. *Toxicol Sci* 2010;117:515-523.
  45. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.

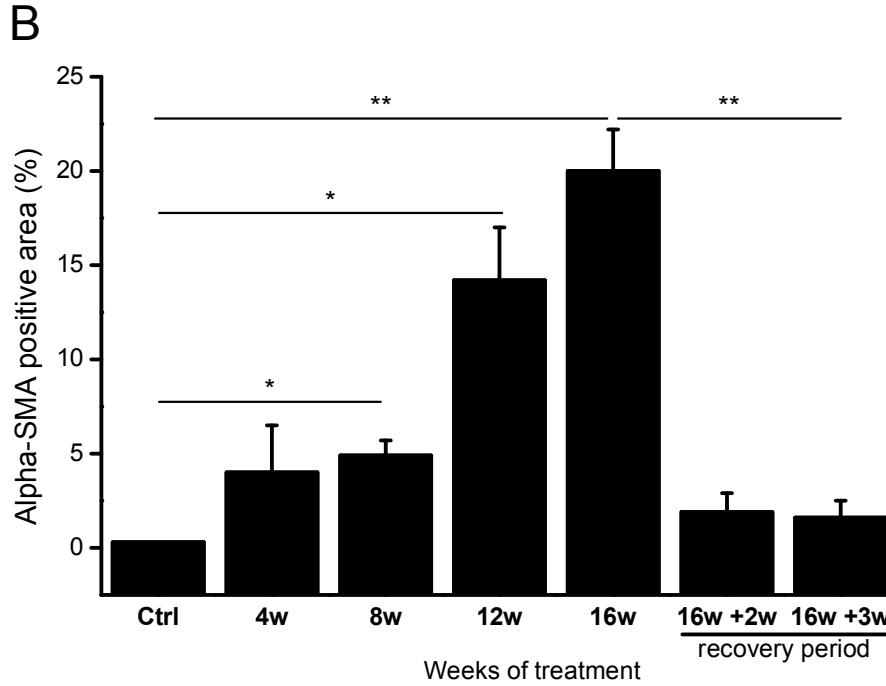
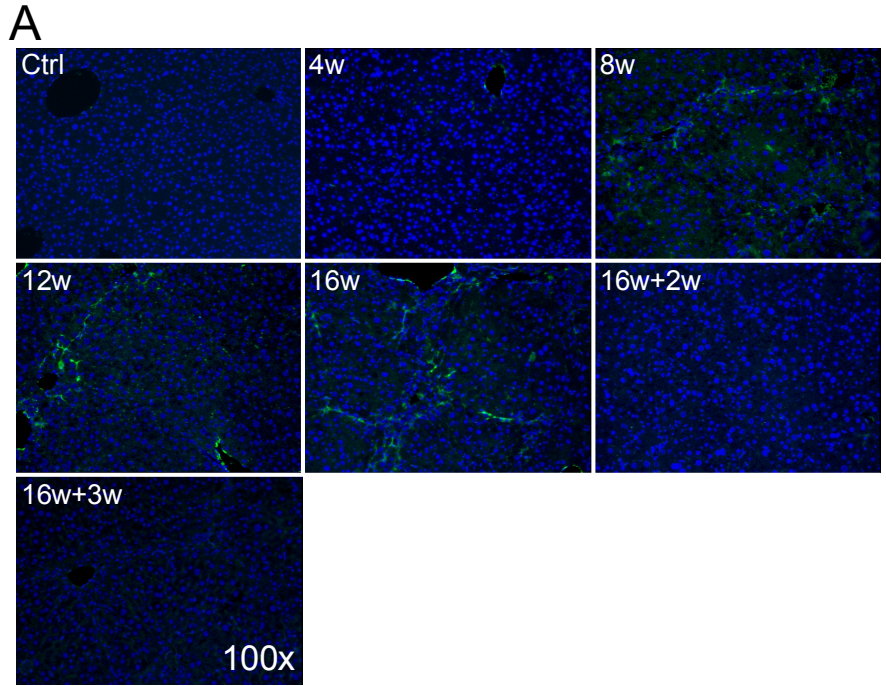
### 3.7 Figures



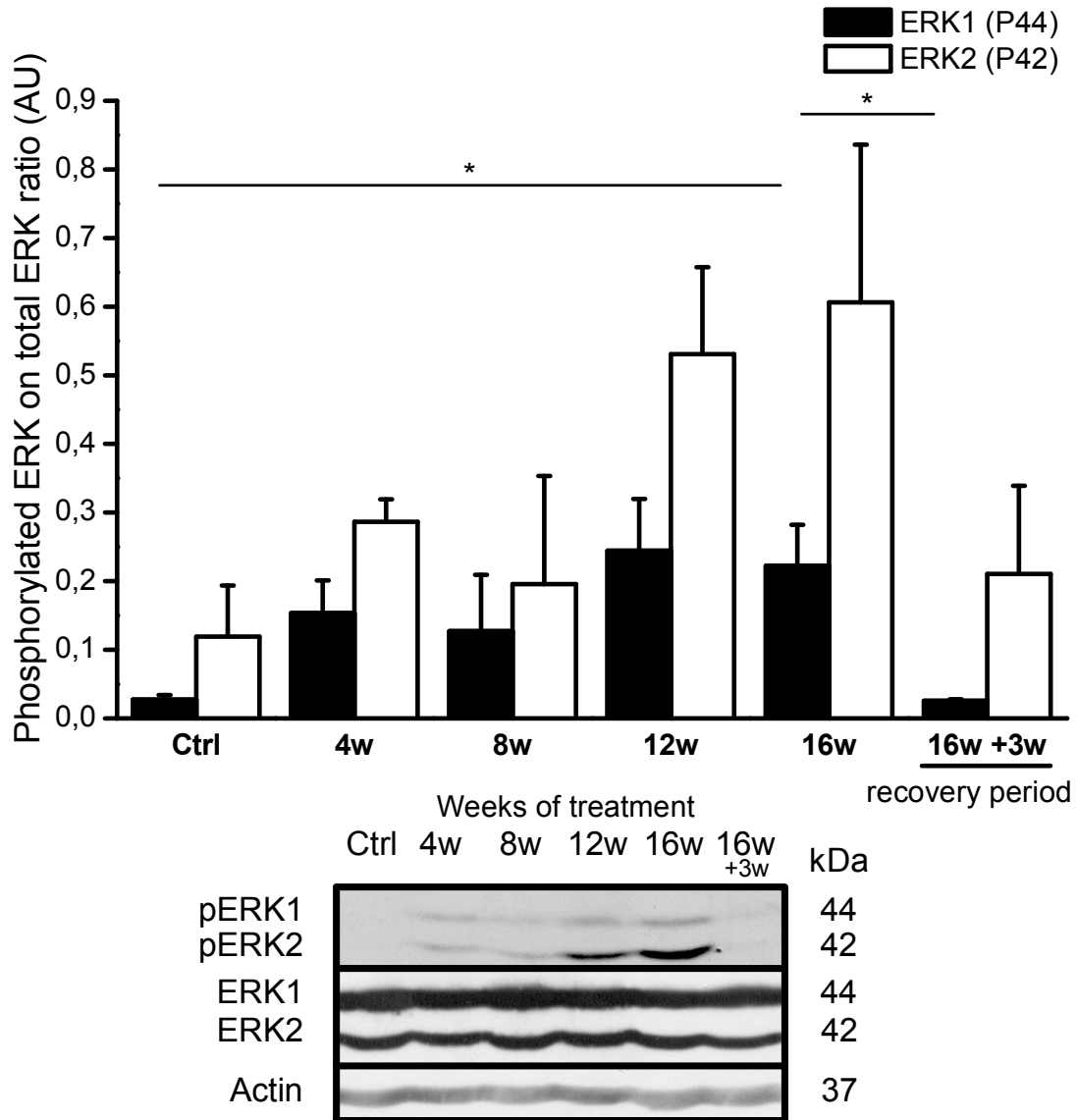
**Figure 1: Liver fibrosis progression.** (A) Col1a1 mRNA relative expression qPCR and (B) Hydroxyproline content of nude mice liver samples following TAA fibrogenesis induction (n=4 for each condition). Weeks of recovery are indicated as +nw. Results are expressed as mean  $\pm$  SE. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ) and



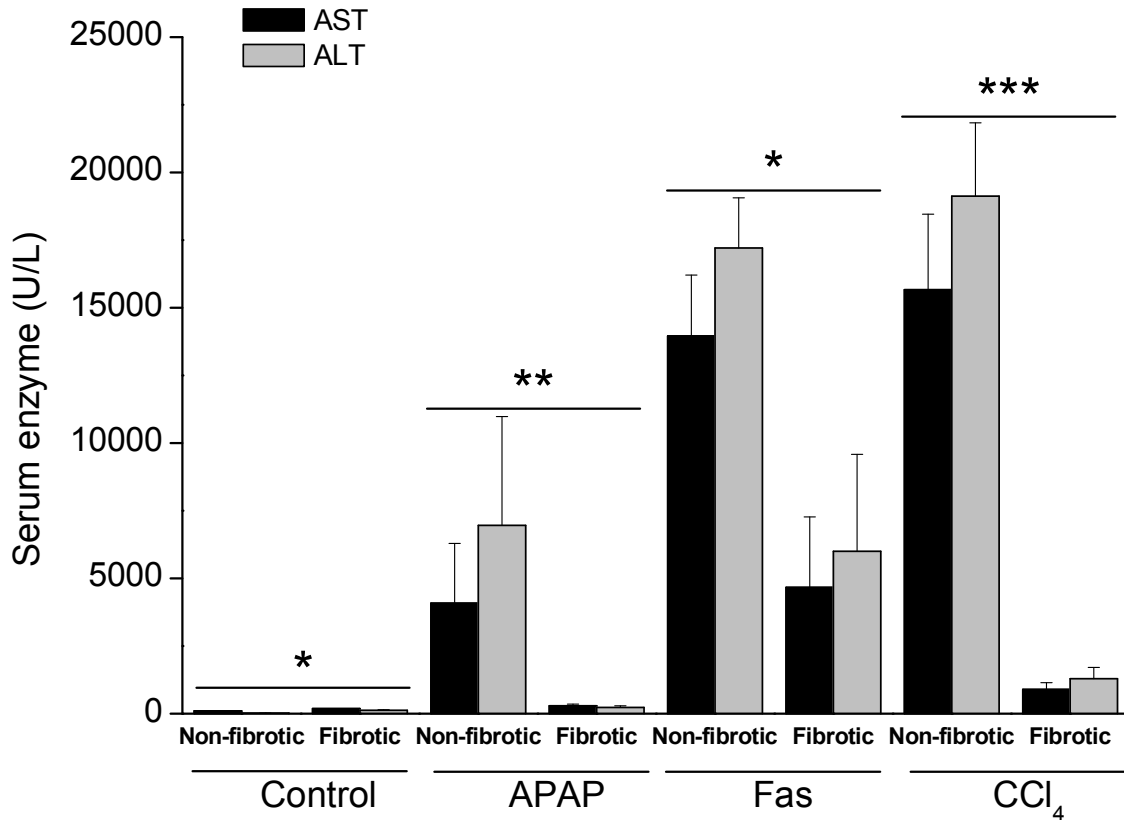
**Figure 2: Liver fibrosis histological features.** Representative microphotographs of Masson's trichrome stained liver samples slides from nude mice receiving (A) normal drinking water, (B) 0.02% TAA in drinking water for 4 weeks, (C) 8 weeks, (D) 12 weeks, (E) 16 weeks, (F) 16 weeks followed by 2 weeks and (G) 3 weeks of recuperation period. Magnification 100x. Arrows indicate fibrotic septa. (n=4 for each condition)



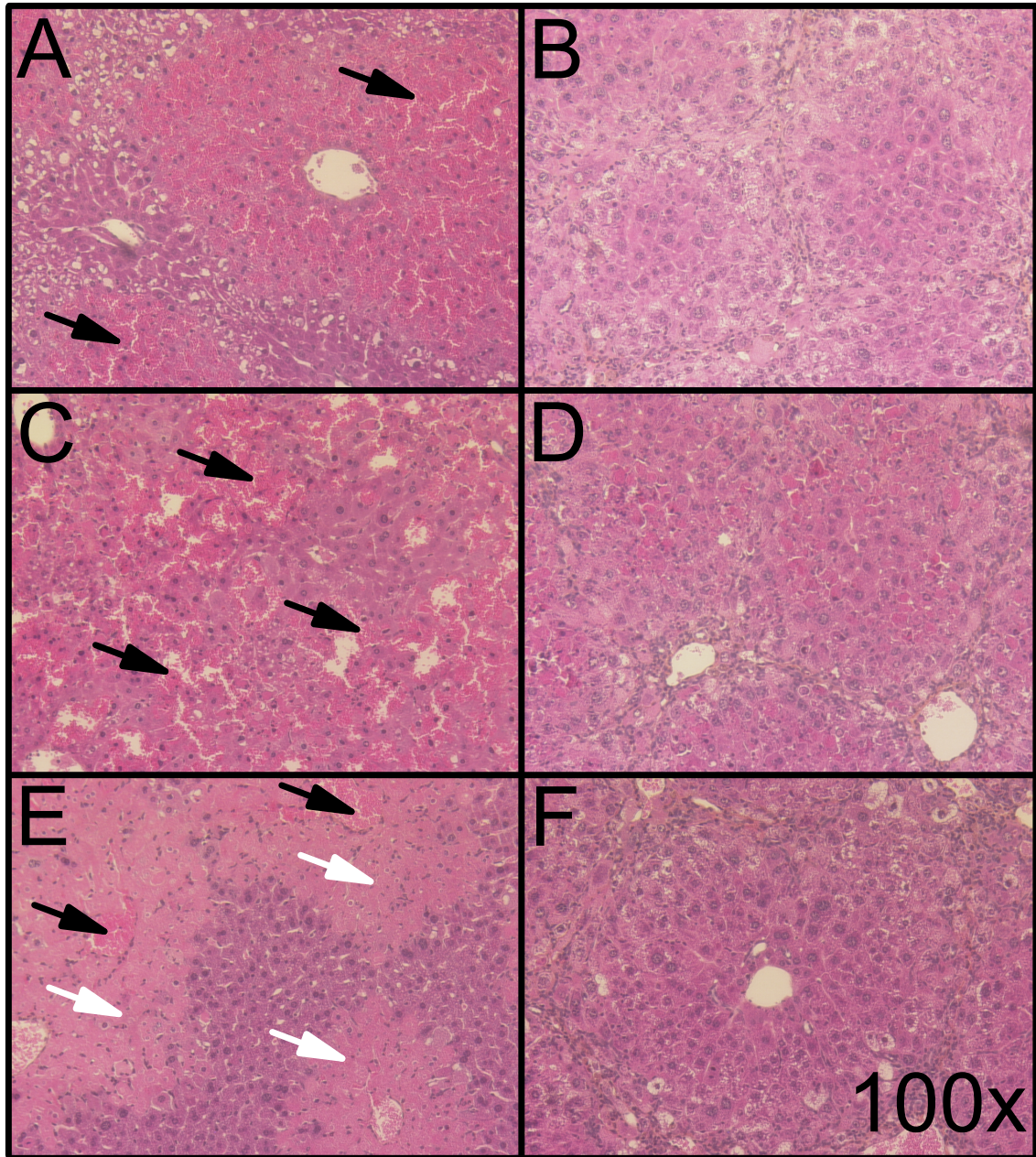
**Figure 3: Activation of hepatic stellate cells.** (A) Histological alpha-SMA (green) immunofluorescently stained liver slides microphotographs from nude mice following 0.02% TAA fibrogenesis induction. Nuclei were stained with Hoechst 33258 (blue). Magnifications 100X. (B) Alpha-SMA image analysis representing percentage of positive pixels of total area from immunofluorescently stained liver slides microphotographs (n=4 for each condition). (\*P<0.05, \*\*P<0.01)



**Figure 4: ERK1/2 phosphorylation.** ERK1/2 phosphorylation by Western blot of nude mice liver samples following TAA fibrosis induction (n=4 for each condition). Representative blots are also shown below. pERK stands for phosphorylated ERK. Number of weeks of the recovery period is indicated as +nw. Results are expressed as mean  $\pm$  SE. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )



**Figure 5: Protective effect of liver fibrosis in nude mice against different cytotoxic agents.** Serum AST and ALT levels from fibrotic nude mice after 0.02% TAA administration in drinking water for 16 weeks + 2 weeks pre-treatment (0.01% TAA) and from non-fibrotic mice receiving normal drinking water for the same period (n=10 for each condition). Cytotoxic agents were injected 48h after the end of treatment : IP0.5 mL/kg bw CCl<sub>4</sub> (sacrifice 24 hours following injection), 0.5µg/g bw Fas Jo2 antibody (sacrifice 6 hours following injection) and 750 mg/kg bw APAP (sacrifice 6 hours following injection). Results are expressed as mean ± SE. (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001)



**Figure 6: Histological features of hepatoprotective effect of liver fibrosis against different cytotoxic agents.** HPS-stained liver slices of nude mice injected with the following cytotoxic agents: 750 mg/kg bw APAP in (A) non-fibrotic and (B) fibrotic mice (16 weeks of 0.02% TAA + 2 weeks of 0.01% TAA pre-treatment in drinking water); 0.5  $\mu$ g/g bw Fas Jo2 antibody in (C) non-fibrotic and (D) fibrotic mice; and 0.5 mL/kg bw CCl<sub>4</sub> in (E) non-fibrotic and (F) fibrotic mice. Representative microphotographs are shown. Magnifications 100X. Black arrows indicate parenchymal red blood cell infiltration and white arrows indicates necrotic foci. (n=10 for each condition)

## **Chapitre 4 - Article 2**

**In vivo cell selection of a highly tumorigenic hepatocellular carcinoma cell line with characteristics of tumor initiating cells.**

Benoit Lacoste<sup>1</sup>, Valérie-Ann Raymond<sup>1</sup> and Marc Bilodeau<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire d'hépatologie cellulaire du Centre de recherche du CHUM-Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada.

***Running head: In vivo cell selection of tumor initiating hepatoma cells***

Manuscrit non soumis



## 4.1 Abstract

There are a limited number of models to study hepatocellular carcinoma (HCC) in an immunocompetent context. We injected low tumorigenic Hepa1-6 cells intrasplenically in C57/bl6 mice. A solid liver tumor developed 70 days later. We then isolated cells from this tumor and noticed that the appearance of these cells was different from Hepa1-6 cells. Studies were performed to compare the newly derived dt-Hepa1-6 with the original Hepa1-6 cells. Dt-Hepa1-6 showed enhanced tumorigenicity in comparison with Hepa1-6 by developing tumors more often ( $28 \pm 12$  lesions vs.  $0 \pm 0$  lesions at 21 days) and more rapidly (21 days (100%) vs. 70 days (10%)). The dt-Hepa1-6 cell concentration required to obtain visible tumors in each mouse was  $1 \times 10^5$  ( $9.0 \pm 5.7$  lesions vs. control;  $P < 0.05$ , AFP expression  $8.2 \pm 3.6$  fold changes;  $P < 0.05$ ). Dt-Hepa1-6 subcutaneous injection was accompanied by liver tumor implantation. However, no tumor was seen in lung and spleen after histological analysis following subcutaneous or intrasplenic injection of dt-Hepa1-6. *In vitro*, dt-Hepa1-6 showed an increased anchorage-independent growth ( $34.7 \pm 6.8$  colonies vs.  $12.3 \pm 3.3$  colonies;  $P < 0.001$ ). *EpCAM* (*Epcam*) ( $9.6 \pm 1.1$  fold changes;  $P < 0.001$ ), *beta-catenin* (*Ctnnb1*) ( $6.2 \pm 0.3$  fold changes;  $P < 0.01$ ) and *Cyclin D1* (*Ccnd1*) ( $1.4 \pm 0.1$  fold changes;  $P < 0.05$ ) gene expression was upregulated in dt-Hepa1-6. A larger cell subpopulation expressing EpCAM at their surface was detected in dt-Hepa1-6 compared to Hepa1-6 ( $34.0 \pm 0.1\%$  vs  $0.7 \pm 0.3\%$ ;  $P < 0.001$ ). Cells enriched by the surface expression of EpCAM ( $86.7 \pm 2.3\%$  positive cells) led to higher tumor load ( $1093 \pm 74$  tumors;  $P < 0.01$ )

than those isolated for absence of surface EpCAM (473±100 tumors). In conclusion, the characterisation of the dt-Hepa1-6 cell line selected *in vivo* by its ability to grow in the liver shows increased tumorigenicity and liver specificity. This was associated with an increase in expression of genes encoding for EpCAM,  $\beta$ -catenin and Cyclin D1, and the appearance of an important EpCAM positive subpopulation.

Key words: Hepatocellular carcinoma, EpCAM, Neoplastic stem cells, Tumorigenicity, Neoplasms.

## 4.2 Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most frequent cancer and the third most deadly cancer worldwide (1). Overall survival rates are typically less than 5% (2). It is rarely diagnosed early enough to perform curative therapy: this can partly explain its poor prognosis (3).

Over the years, several animal models have been developed to study its pathogenesis and evaluate potential therapies. These models are categorized as 1) chemically-induced, 2) genetically-modified or 3) xenograft models (4). Cell lines are widely used to study HCC *in vitro* but they do not systematically give rise to solid tumors when implanted *in vivo* (5). Moreover, immunodeficient animals need to be used to allow *in vivo* implantation of these cell lines because animals easily reject such cells unless they stem from syngenic animals(6).

The main paradigm underlying cancer development over the last 40 years has been the clonal selection model in which the cell clone with the highest tumorigenicity, or the ability to form tumor *in vivo*, is at the origin of the tumor mass (7). On the other hand, the cancer stem cells/tumor initiating cells (TIC) theory that has emerged in the last decade suggests that cancer cells are divided in subpopulations with different characteristics, such as the ability to form new tumors, to resist chemotherapy or to divide rapidly (8-10). Increased tumorigenicity can therefore occur either by increasing the subpopulation of

TIC in the cell pool and/or by selecting a cell lineage that has developed a particular ability to grow in a defined environment.

The identification of TIC is possible by their association with cell surface markers (11, 12). Among these markers, the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), a type 1 transmembrane glycoprotein, is exclusively expressed in epithelial-derived cells (8). Its down regulation by siRNA in gastric cancer cell lines is accompanied by a lower clonal colony rate, anchorage-independent growth and *in vivo* tumorigenicity (13). In the Huh-7 hepatoma cell line, preselection of EpCAM-positive cells has been associated with strong enhancement of *in vivo* tumorigenicity and *in vitro* characteristics associated with aggressiveness, such as anchorage independent growth (14). Inhibition of EpCAM by siRNA has been associated with loss of tumorigenicity in a murine model of HCC (15).

Still, most of the HCC murine models require immunodeficient animals and translate poorly to the clinical context. Natural selection of tumorigenic cells submitted to the constant surveillance of the immune system is an important key event in cancer development (16).

The Hepa 1-6 clone, which is isolated from the BW7756 tumour that arose spontaneously in the syngenic C57L/J mouse strain, is widely used, well characterized *in vitro* and shows high expression of alpha foeto-protein (AFP) (17-19). AFP is a glycoprotein expressed in foetal liver and in hepatic progenitor

cells that is only present in trace amount in normal adult liver. AFP is often expressed in HCC cells and its dosage in serum samples can be used to follow tumor progression (20).

In order to obtain a tumorigenic cell line in an immunocompetent context, we inoculated Hepa1-6 cells in congenic C57/bl6 mice by the intrasplenic route (21) until the appearance of a solid tumor. Cells isolated from this tumor were isolated and cultured *in vitro*. The newly derived cell line was named dt-Hepa1-6 and subsequently characterized *in vivo* and *in vitro*. We show that this *in vivo* selection has led to a cell line with enhanced tumorigenicity compared to the original cell line, a hallmark characteristic of TIC.

### **4.3 Material and methods**

#### Chemicals:

Soft agar, as Bacto-agar powder, and Type 1 collagen (COL1) from rat tail were purchased from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). TRIZOL reagent was purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Quantitect reverse transcription kit, Taq DNA polymerase kit and SYBRGreen kit were purchased from QIAGEN (Toronto, Ontario, Canada). Enhanced chemiluminescence (ECL) reactive was bought from Perkin-Elmer (Woodbridge, Ontario, Canada). Developer and fixation solution kits were purchased from Kodak (Rochester, New York, USA). Unless stated otherwise, all other products were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

#### Cell line:

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

#### Cell line culture:

All cultures were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cell lines were cultured in Dulbecco modified eagle media (DMEM) supplemented with 10% FBS. All products used to culture cells were from Invitrogen. Dishes coated with COL1 [13.9µg/cm<sup>2</sup>] were prepared as previously described (22)

### Cell Aggregation Study:

The protocol for cell aggregation was adapted from the slow aggregation protocol published by Boterberg *et al.* (23). The same cell concentration was used for each cell line to ensure adequate comparison. Wells from a 96-well plate were covered with 50 $\mu$ L of a sterile soft agar gel [1.3%] in lactated Ringer's solution (Baxter, Mississauga, Ontario, Canada) to prevent cell adhesion. Medium (100 $\mu$ L) containing 2x10<sup>4</sup> single cells was added to the well and let stand for 24h. Using a 200 $\mu$ L micropipette, the cell suspension was set between slide and coverslip and the number of cells per aggregate was counted under a Zeiss Axioplan 2 microscope (Göttingen, Germany) at 400x magnification. Representative microphotographs were obtained with the Northern Eclipse 6.0 software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada).

### Soft-Agar Colony Formation Assay:

In order to evaluate anchorage-independent growth, individual cells were seeded in a soft agar gel (13, 24). A single cell concentration was used for both cell lines in order to be able to compare experiments. Soft agar solutions maintained at 50°C were diluted in warm supplemented media just before pouring to avoid polymerization in the tubes. Briefly, 6-well plates were filled with 2mL of warm 0.6% soft agar solution and allowed to solidify on ice for 5min. Then, 1mL of a warm soft agar 0.3% mixture containing 1x10<sup>4</sup> freshly trypsinized single cells was poured on top of each well and let to polymerize for 5min on ice. In order to trap the cells present in the gel layer, another 2mL of the warm solution was added on top and allowed to solidify on ice. Afterwards,

cells were maintained at 37°C with 1mL of supplemented medium; medium was changed every week for 5 weeks. At the end of this period, visible foci were counted manually and representative microphotographs were obtained at 25x.

#### Colony-Forming Cell Assay:

The ability of independent cells to form colonies without cell-cell contact was assessed by a proliferative clonal colony assay as previously described (13). Briefly, each cell line was seeded at a low concentration of  $1 \times 10^3$  cells in 2mL of supplemented media to obtain single attached cells and thus isolated foci of proliferation. Media was changed once every week for 4 weeks. At the end of experiment, the number of colonies per well was counted manually.

#### Double-layered Droplet Cell Invasion Assay:

The potential for invasiveness was evaluated with a derived version of a previously described double hemisphere invasion assay (25). Briefly, concentrated COL1 ice-cold solution was diluted with DMEM and neutralized with NaOH in order to obtain a 3mg/mL COL1 smooth gel. This gel was mixed with freshly trypsinized cells at a concentration of  $4 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L. Droplets of 5 $\mu$ L were then plated at 3 different locations in a 3.5cm diameter dish and allowed to solidify at 37°C for 15min. A 30 $\mu$ L of the ice-cold COL1 smooth gel alone was then poured on top of each cell containing droplets and let to polymerize for 15min at 37°C. Then, 2mL of warm supplemented medium was gently added. Cells invading the outer layer were counted manually every 12h for 168h. Area under the curve (AUC) of time-dependent invasion was



calculated for each experiment and used for statistical analysis. At the end of the experiment, dishes were fixed in 5% formalin and nuclei stained with Hoechst 33258 [50ng/mL]. Representative microphotographs were obtained using Northern Eclipse 6.0 software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada) under a fluorescent Zeiss Axioplan 2 microscope (Göttingen, Germany) at 25x magnification and were assembled using GIMP 2.6 image editor (Boston, Massachusetts, USA) in order to obtain a representative single microphotograph of the whole droplet.

#### Wound Healing Assay (WHA) and COL1-Embedded WHA:

For both assays, cells were seeded in supplemented media at a defined density for Hepa1-6 ( $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and dt-Hepa1-6 ( $7.6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) for 7h in 3.5cm diameter dishes to reach nearly full confluence. Fresh supplemented media was then changed after 24h or until cells had reached full confluence. Media was then removed, and using a 200 $\mu$ L pipette tip, a line was scratched at 3 different places changing tip each time. Dishes were then cleaned 3 times with warm PBS in order to remove floating cells. Fresh supplemented medium was then added to the WHA experimental dishes. COL1 embedded WHA experimental dishes were covered with a layer of 2 mL COL1 [3mg/mL] supplemented media and covered with fresh supplemented medium once COL1 gel had polymerized at 37°C for 15min. Microphotographs were obtained at the beginning of the experiment and after 24h. The distance travelled by cells was then measured using image 1.46 software (NIH, USA).

### Spreading Assay:

To ensure proper comparison of experiments, both cell lines were seeded at a  $3 \times 10^5$  cells/mL in DMEM in 24-well COL1 [ $13.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]-covered plates. Six hours after seeding, cells were examined on an inverted microscope (Motic, Richmond, British Columbia, Canada) and cells showing an elongated morphology were counted in 10 different fields per well at a 400x magnification.

### $^3\text{H}$ -Thymidine Incorporation Assay:

Following overnight serum deprivation in 6-well plates, media was changed for fresh DMEM containing 10% SVF and supplemented with  $1 \mu\text{Ci}/\text{mL}$   $^3\text{H}$ -thymidine (MP Biomedicals, Solon, OH). Cells were washed 24h later twice with 1X PBS. Ice-cold 10% trichloroacetic acid was added for 1h. Following this, wells were washed with ice-cold methanol and let to dry. One ml of lytic solution ( $0.5 \text{ mol}/\text{L}$  NaOH,  $1 \text{ mmol}/\text{L}$  EDTA, and  $1 \mu\text{L}/\text{mL}$  Triton X-100) was added to each well and let stand for 2h at room temperature.  $200 \mu\text{L}$  of this solution was added to a scintillation cocktail (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and radioactivity measured using a TRI-Carb 2800TR analyzer (PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada). Protein content was evaluated by the Bradford assay (26). Results are expressed as CPM/mg of protein.

### Western blotting:

Cells were seeded in supplemented media at a determined density for Hepa1-6 ( $4 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$ ) and dt-Hepa1-6 ( $5.6 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$ ) for 7h on 10cm dishes

coated with COL1 [13.9µg/cm<sup>2</sup>] to reach 70% confluence. Media was then changed overnight for serum-free DMEM. At the end of this period, cells were harvested in 10mL PBS1x at 4 °C, centrifuged 5min at 3000g and the resulting pellet resuspended in RIPA buffer (27). Protein concentration was dosed by the Bradford assay (26). Protein extracts were prepared, subjected to a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then blotted as described (27). Briefly, membranes were blocked 1h in 10% milk 1X PBS + 0.05% TWEEN (PBST) at room temperature and probed with the following antibodies: anti-β-catenin [1:40 000] (cell signalling, Pickering, Ontario, Canada), anti-ERK1/2 and anti-phosphospecific ERK1/2 [1:1000] (both from Cell Signalling, Pickering, Ontario, Canada), anti-AKT and anti-phosphospecific AKT [1:1000] (both from Cell Signalling, Pickering, Ontario, Canada), anti-Bcl-XL [1:1000] (Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada), anti-Bak [1:1000] (Upstate, Lake placid, New York, USA), anti-Bad and anti-phosphospecific Bad [1:1000] (Cell Signalling, Pickering, Ontario, Canada), anti-Bid [1:1000] (R&D system, Minneapolis, Minnesota, USA), and anti-actin [1:10 000] (Calbiochem kit, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 2h in PBST containing 1% milk at room temperature. Membranes were washed 3 times for 10min in PBST and then incubated with a HRP-conjugated secondary anti-rabbit IgG [1:5000], anti-mouse IgG [1:10 000] (both from BD Pharmingen, San Diego, California, USA), anti-rat IgA [1:5000] (Cedarlane labs, Burlington, Ontario, Canada) or anti-mouse IgM [1:20 000] (from anti-actin kit) antibodies at room temperature in PBST containing 5% milk during 1h. After extensive washes in PBST, membranes were incubated with enhanced chemiluminescence reagents.

In a dark room, Hyblot CL films (Denville scientific inc, Metuchen, New Jersey, USA) were exposed to chemiluminescent membranes. Films were then developed and fixed using Kodak solutions kit and band densitometry processed using ImageJ 1.46 software (NIH, USA).

#### Flow Cytometry Analysis:

One million freshly trypsinized cells were washed on ice in 3mL of 1X PBS+0.2%BSA and centrifuged for 5min at 1400rpm at 4°C. The pellet was resuspended in 100µL of PBS+2% BSA, supplemented with APC-tagged anti-CD326 (EpCAM) antibody (Ebioscience, San Diego, California, USA) and incubated for 30min on ice in the dark. Cells were then washed again on ice in 3mL of 1X PBS+0.2% BSA and centrifuged for 5min at 1400rpm at 4°C. The pellet was resuspended in 300µL of PBS+BSA2%. Samples were processed on a FACS BD LSRII flow cytometer with DIVA6 software (both from BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) and analysed with FlowJo software (Tree Star, Oregon, USA) by the Cytometric Analysis Department of the CRCHUM.

#### Cell Sorting:

Forty million freshly trypsinized dt-Hepa1-6 cells were washed on ice in 3mL 1X PBS+0.2%BSA and centrifuged for 5min at 1400rpm at 4°C. Cells were resuspended in 100µL of PBS+ 2% BSA , supplemented with AP-tagged anti-CD326 (EpCAM) (Ebioscience, San Diego, California, USA) and incubated on ice in the dark for 30min. Cells were then washed in 3mL of 1X PBS+0.2% BSA

on ice and centrifuged at 4°C for 5min at 1400rpm. The pellet was resuspended in 20mL of 1X PBS containing 5% FBS and 25mM Hepes and passed through a 100µm filter to avoid aggregates. Samples were brought to the Cytometric Analysis Department of the CRCHUM and processed at low pressure (20Psi) sorting with a 100µm nozzle on a FACS ARIA II with DIVA6 software (both from BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). Sorted cells were stored in DMEM containing 50% FBS. Cells were then washed in L-15 medium and cultured *in vitro* until enough cells could be harvested for further experiments.

#### Animals:

Male C57/bl6 and Foxn1 nu/nu mice (20g) were bought from Charles River (Saint-Constant, Qc, Canada) and fed ad libidum with normal chow in the animal welfare at CRCHUM St-Luc. All procedures were performed in accordance with Canadian Council on Animal Care and approved by the Comité institutionnel de protection animale (CIPA) du CHUM.

#### Intrasplenic Cell Injection:

The Hepa1-6 or the dt-Hepa1-6 cell lines were trypsinized and resuspended in saline solution containing 0.25% albumin at the selected concentration depending on experimental design. A cell aliquot (200µL) was loaded in 21G syringes for intrasplenic injection. Under gaz anaesthesia, abdominal incision was performed and the spleen was pulled out on 37°C saline soaked gauze. In order to avoid cell clogging into the syringe, the cell suspension was mixed before injection. The needle was then inserted in the spleen parenchyma and

cells were injected slowly. After the spleen regained its bright red color, the needle was slowly drawn back and a droplet of Vetbound veterinary glue (3M, London, Ontario, Canada) applied at the insertion site. The spleen was put back into the abdominal cavity and the abdominal incision closed.

#### Dt-Hepa1-6 Cell Line Isolation:

At time of sacrifice, the identified tumor was excised and maintained in a preservation solution (Belzer UW; Dupont Pharma, Mississauga, ON, Canada). The tumor was gently sliced and incubated at 37°C in DMEM containing type IV collagenase [0,35mg/mL] (Worthington Biochemical Corp. Lakewood, NJ, USA) and CaCl<sub>2</sub> [1mg/mL] for 15min under agitation. The cellular solution was then washed and centrifuged in L-15 medium 3-times. The final cell suspension was seeded at a 2.5x10<sup>5</sup> cells/mL concentration on COL1-coated dishes in supplemented medium. Medium was changed until cells reached 80-90% confluence. Cells from different dishes were then pooled and cultured in 75cm<sup>2</sup> flasks.

#### Dt-Hepa1-6 Characterization:

To determine time response curve, dt-Hepa1-6 cells were injected intrasplenically at 1x10<sup>6</sup> concentration in C57/bl6 mice and were sacrificed 3, 5, 7, 14, 21 and 28 days later. Different cell concentrations (1x10<sup>3</sup>, 1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>5</sup> and 1x10<sup>6</sup> cells) were injected intrasplenically in C57/bl6 to evaluate the dose response curve: animals were sacrificed at 28 days. Dt-Hepa1-6 cells were

also injected intrasplenically into Foxn1 nu/nu mice at a  $1 \times 10^6$  concentration for 7 and 35 days.

Histology:

Formalin-fixed liver, spleen and lung samples obtained at the time of sacrifice were set in paraffin block, sliced and stained with HPS by the Pathological Department of our institution. Representative microphotographs were obtained with a Carl-Zeiss Axioplan 2 microscope (Göttingen, Germany) at 100x magnification using the Northern Eclipse 6.0 software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada).

qPCR gene expression analysis:

Sample preparation:

*Cells before injection:*

Cells that were 70%-confluent were trypsinated, washed in L-15 media and centrifuged for 2 min at 1000rpm. The resulting pellet was resuspended in 1mL TRIZOL reagent at 4 °C and sonicated.

*In vivo:*

Whole frozen liver was crushed over carbonated ice and liquid nitrogen. Three different picks of liver powder were taken from each liver samples for a total of 80-90mg per sample. Using a potter, samples were homogenized in 1mL TRIZOL reagent at 4 °C.

Samples were then treated according to manufacturer's recommendations. Briefly, 200µL of chloroform were added to the TRIZOL solution and mixed. Samples were centrifuged at 14 000g for 15 min and 200µL of supernatant was mixed with isopropanol. Tubes were then centrifuged at 14 000g for 10 min and the resulting pellet was washed with 75% ethanol and resuspended in RNase-DNase free water. Quantitect reverse transcription was then processed on 250ng of the samples after gDNA cleaning.

#### Gene amplification:

Albumin (*Alb*) expression was evaluated with Taq DNA polymerase kit for 30 cycles at a 59 °C melting temperature ( $T_m$ ). After the amplification for albumin, samples were run on 8% acrylamide. The gel was then stained with ethidium bromide (Fisher, Ottawa, Ontario, Canada) and photographs were obtained using Bio-Rad Gel-doc (Mississauga, Ontario, Canada). Samples gene expression were analysed with a RotorGene Real-time PCR and the Quantitect SybrGreen kit. For each gene tested, amplification for 35 cycles at 59 °C  $T_m$  took place. The following sequences were used: *AFP* (*Afp*) (F:5'-GCTGGCCCTGGATGTGGCTC-3'; R:5'-GAGCTGGCAGCACGTGGAGG-3'), Albumin (*Alb*) (F:5'-TGCTGCGCTGAAGCCAATCCT-3'; R:5'-AAGCATGGCCGCCTTTCCAC-3'), *EpCAM* (*Epcam*) (F:5'-AAAGCCAAGCAGTGCAACGGCA-3'; R:5'-TGTGAACGCCTCTTGAAGCGCA-3'), *Beta-catenin* (*Ctnnb1*) (F:5'-GTACCTGAAGCTCAGCGCACA-3'; R:5'-AGCAGCGTCAAACCTGCGTGGA-3'), *Cyclin D1* (*Ccnd1*) (F:5'-TCCCTGGCTTGCTCAGTGCCTA-3'; R:5'-TGCCACACGCCATGAGACCA-3'),



*Integrin-alpha1* (*Itga1*) (F:5'- AATGGGCCCCGTGCTCGATGA-3'; R:5'- TGTCGGGGTGTGTACGCACT-3') and *Integrin-beta1* (*itgb1*) (F:5'- TGCAGGTCGATCCTGTGACCCA-3'; R:5'-CCAGCAACCACGCCTGCTACAA-3'). Relative expression was evaluated using 3 reference genes: *HPRT1* (F:5'- GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG-3'; R:5'- CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT-3', *Ppia* (F:5'- CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG-3'; R:5'-TGTAAGTCACCACCCTGGCACAT) and *H2afz* (F:5'-ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA-3'; R:5'- TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA-3') (28). Relative gene expression was evaluated using the deltadelta CT method (29). Normal liver homogenates from C57/bl6 mice were used as baseline comparative controls for *AFP* mRNA expression.

#### Statistical analysis:

All *in vitro* data represent the values of at least three different experiments made in triplicate. All *in vivo* data represent the values of at least two different experiments using five different animals. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. Differences among groups were analyzed by Student's *t*-test. The Pearson correlation coefficient was used to calculate the correlation between 2 variables. A *P*-value below 0.05 was considered significant.

## 4.4 Results

Seven congenic C57/bl6 mice were injected intrasplenically (IS) with  $1 \times 10^6$  Hepa1-6 cells and one mouse developed a 2mm diameter visible tumour seventy days later (supplementary Fig.1B). Cells from this tumor were isolated and cultured *in vitro*. We noticed that these cells had a different morphology from the original Hepa 1-6 cells and seemed to grow in closer aggregates than Hepa 1-6 cells. The newly derived cell line was named dt-Hepa1-6: we found similar levels of albumin gene expression (supplementary Fig.1C) between the 2 cell lines and normal primary mouse hepatocytes, thus confirming the hepatocytic origin of the dt-Hepa 1-6 cells.

To characterise the ability of this new derived cell line to form tumors *in vivo*, we performed a time course experiment in the C57/bl6 mouse. To establish its progression rate, we first inoculated  $1 \times 10^6$  dt-Hepa1-6 cells in C57/bl6 mice for a period up to 28 days. Visible tumours were counted at the time of sacrifice (Fig.1A). The first macroscopic tumors ( $>0.5\text{mm}$ ) appeared 21 days after intrasplenic injection in C57/bl6 mice ( $28 \pm 12$  lesions vs control;  $P < 0.05$ ) and tumor load increased further past 28 days inoculation ( $128 \pm 15$  lesions vs control;  $P < 0.001$ ). *AFP* mRNA expression was measured in homogenized liver samples since it is highly expressed in Hepa1-6. The *AFP* expression (Fig.1B) increased significantly after 21 days ( $14.9 \pm 6.9$  fold changes;  $P < 0.05$ ) with a further increase at 28 days ( $48.3 \pm 13.0$  fold changes;  $P < 0.01$ ) concomitant with the appearance of tumors. In comparison, the injection of Hepa1-6 in C57/bl6

resulted in only transient microscopic tumors after 21 days (supplementary Fig.1A). On the other hand, microscopic tumor formation appeared 3.5 days after injection of dt-Hepa1-6 (Fig.1C). The size of microscopic foci increased 7 days and 14 days after IS injection up to the development of visible tumors (Fig.1C).

Next, we assessed the dose-response to an increasing concentration of cells injected intrasplenically in C57/bl6 mice observed for a 28-day period. The cell concentration threshold required to obtain visible tumors in every animal mouse was of  $1 \times 10^5$  ( $9.0 \pm 5.7$  lesions vs control;  $P < 0.05$ ) (Fig.2A). This was confirmed by *AFP* expression ( $1 \times 10^5$ :  $8.2 \pm 3.6$  fold changes;  $P < 0.05$ ) (Fig.2B). Even if no visible tumors were observed, microscopic tumors could be identified with cell concentrations as low as  $1 \times 10^3$  and  $1 \times 10^4$  (Fig.2C). Increasing cell concentration during the IS protocol led to larger visible and more numerous tumors (Fig.2C).

Following different injection regimens, we assessed the specificity of the implantation of dtHepa1-6 in the liver by histological examination of the site of injection of dtHepa1-6 in the spleen and in the lungs after both intrasplenic and subcutaneous injections. Subcutaneous injection of dt-Hepa1-6 in the C57/bl6 mouse resulted in tumors developing in the mouse liver as confirmed by *AFP* expression ( $8.5 \pm 3.9$  fold changes;  $P < 0.05$ ) (Fig.3A). Tumors were visible macroscopically in the liver (Fig.3B) but no tumor could be observed either in the lungs, the subcutaneous site or spleens of these mice (Fig.3C). No tumor cell

was ever identified in the lungs or spleen of C57/bl6 mice when dt-Hepa1-6 cells were injected in the spleen (Fig.3D). On the other hand, rare isolated tumor cells could be identified at the site of IS injection when C57/bl6 were injected with Hepa1-6 cells (Fig.3E).

### *In vitro* neoplastic profile

Next, we evaluated the tumorigenicity and invasiveness of the cell line *in vitro*. The aggregation of cells over a non-adherent surface illustrates their ability to grow and survive in the absence of cell-cell contact (23). We quantified the number of cells in aggregates when seeded on soft agar. The number of cells per aggregate was significantly higher in Hepa1-6 than dtHepa1-6 ( $50.0 \pm 3.6$  cells vs  $7.0 \pm 0.9$  cells;  $P < 0.001$ ) suggesting that dt-Hepa1-6 required less cell-cell contact to survive and thus were more tumorigenic (Fig.4A). To further evaluate tumorigenicity *in vitro*, we used anchorage-independent growth and clonal colony formation assays (13). Anchorage-independent growth by definition measures the individual cell growth in a non adherent matrix of soft agar. When the ability to form colonies in soft agar was compared between dt-Hepa 1-6 cells and the parental Hepa 1-6 cells, the number of colonies formed in soft agar was significantly higher with dt-Hepa1-6 cells ( $12.3 \pm 3.3$  colonies vs  $34.7 \pm 6.8$  colonies;  $P < 0.001$ ) (Fig.4B). Similarly, the number of colonies formed under the colony forming assay was higher with dt-Hepa1-6 cells than with the parental Hepa1-6 cells ( $47.7 \pm 3.2$  vs  $1.3 \pm 0.9$  colonies respectively;  $P < 0.001$ ). Since isolated single cells are used in the colony forming assay, this result

confirms the higher cell-cell independent growth ability of dt-Hepa1-6 cells (Fig.4C).

Invasion and motility are characteristics associated with metastatic potential and tissue invasiveness. The invasive potential of cells in a double-layered COL1 hemisphere is a surrogate measure for the *in vivo* microenvironment (25). We found that invasion of the outer COL1 layer was more important by Hepa1-6 than dt-Hepa1-6 cells ( $38412 \pm 6519$  Area under the curve (AUC) vs.  $13770 \pm 3184$  AUC;  $P < 0.01$ ) (Fig.4D). The ability of cells to move on a surface, or their motility, is a complementary assay that evaluates the invasion potential of a cell line. In a wound-healing assay (WHA), the Hepa1-6 showed higher mobility than dt-Hepa1-6 both on plastic ( $1472 \pm 24$  AU vs.  $423 \pm 49$  AU;  $P < 0.001$ ) and in a COL1-embedded gel ( $1436 \pm 20$  AU vs.  $505 \pm 28$  AU;  $P < 0.001$ ) (Fig.4E). Cell attachment, in opposition to anchorage-independent growth enables the evaluation of the adaptation of a cell line to the *in vitro* bidimensional environment. The Hepa1-6 cells adopted a spread morphology 6h after seeding on plastic, significantly faster than the dt-Hepa1-6 cells ( $19.2 \pm 1.2$  cells vs.  $0.2 \pm 0.2$  cells;  $P < 0.001$ ) or COL1 ( $74.7 \pm 1.6$  cells vs.  $27.3 \pm 0.6$  cells;  $P < 0.001$ ) (Fig.4F).

### Gene expression

We next evaluated the expression profile of genes associated with poor tumor prognosis between the 2 cell lines. *EpCAM* (Epcam) mRNA expression, a known marker of enhanced tumorigenicity and tumor initiating cells, was first

evaluated. *EpCAM* (*Epcam*) mRNA was significantly upregulated in dt-Hepa1-6 compared to Hepa1-6 ( $8.7 \pm 1.0$  fold changes;  $P < 0.01$ ) (Fig.5A). To confirm the presence of EpCAM at the surface of the dt-Hepa1-6 cells, we used flow cytometry after staining with anti-EpCAM fluorescent antibodies. The number of cells expressing EpCAM at their surface was significantly higher in dt-Hepa1-6 than Hepa1-6 ( $34.8 \pm 1.1\%$  vs.  $0.9 \pm 0.1\%$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig.5B). Dt-Hepa1-6 were then sorted on the basis of their EpCAM expression and cultured for 4 weeks in two groups: dt-Hepa1-6 EpCAM+high and dt-Hepa1-6 EpCAM+low. Fig 5B shows that  $86.7 \pm 2.3\%$  of EpCAM+high cells were EpCAM+ and had a  $16.2 \pm 1.3$  fold higher level of EpCAM mRNA expression (Fig 5A).

Dt-Hepa1-6 EpCAM+high, dt-Hepa1-6 EpCAM+low and non-sorted dt-Hepa1-6 cells were then injected IS in C57/bl6 mice. Dt-Hepa1-6 EpCAM+high cells resulted in higher tumor load than dt-Hepa1-6 EpCAM+low cells (Tumor load (Fig.5C):  $1093 \pm 74$  tumors vs  $473 \pm 100$  tumors  $P < 0.01$  and AFP (Fig.5D:  $877.3 \pm 140.7$  fold changes vs.  $279.6 \pm 36.4$  fold changes  $P < 0.01$ ). Unsorted dt-Hepa1-6 cells resulted in tumor loads that were proportional to the levels of EpCAM positive cells within the unsorted population (Fig 5B and D). *EpCAM* mRNA levels were quantified in cell samples prior to IS injection and confirmed the results of the cytometry analysis (Fig 5A). When the 4 cell types were evaluated for their proliferative capacity, no significant differences were observed in the level of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation (Fig.5E).

The  $\beta$ -catenin (*Ctnnb1*) pathway regulates the expression of *EpCAM* (30). The expression of  $\beta$ -catenin was measured at the mRNA and protein levels. We found that dt-Hepa1-6 cells expressed higher levels of  $\beta$ -catenin at the mRNA (Fig.6:  $5.4 \pm 1.0$  fold changes in Hepa1-6: vs.  $1.2 \pm 0.6$  fold changes in dt-Hepa1-6;  $P < 0.01$ ) and protein levels (Fig 6B). No significant difference in  $\beta$ -catenin expression was found between dt-Hepa1-6 EpCAM+high and EpCAM+low cells ( $6.1 \pm 0.8$  fold changes vs.  $5.6 \pm 1.2$  fold changes). However, when we performed a correlation analysis, we observed a strong correlation (Supplementary Fig.2A) between the proportion of EpCAM positive cells and tumor load ( $R^2 = 0.671244$ ;  $P < 0.001$ ), (Supplementary Fig.2B) between  $\beta$ -catenin protein expression and tumor load ( $R^2 = 0.788700$ ;  $P < 0.001$ ) and (Supplementary Fig.2C) between the percentage of EpCAM positive cells and  $\beta$ -catenin protein expression ( $R^2 = 0.457952$ ;  $P < 0.05$ ). Cyclin D1 (*Ccnd1*), a protein essential for cell growth and survival that is under the control of EpCAM (31) was then assessed. Dt-Hepa1-6 cells expressed higher levels of cyclinD1 mRNA compared to Hepa1-6 ( $9.4 \pm 0.6$ ;  $P < 0.01$ ) (Fig.6C). However, no significant difference was observed between dt-Hepa1-6 EpCAM+high and EpCAM+low cells.

In order to explain the difference in the rate of spreading between the 2 cell lines, the expression of two attachment molecules was assessed. Integrin-alpha1 (*Itga1*) gene expression was lower in dt-Hepa1-6 relative to the parental Hepa1-6 cell line ( $0.23 \pm 0.1$  fold changes;  $P < 0.01$ ) (Fig.6D) while no changes were seen in integrin-beta1 (*Itgb1*) expression (Fig.6E). Again, no difference was found

between dt-Hepa1-6 EpCAM+high and EpCAM+low cells in the levels of integrins.

The level of expression of cell survival proteins was finally assessed by western blotting. No differences were detected between Hepa1-6 and dt-Hepa1-6 cells in the levels of expression of a panel of pro-survival (AKT, ERK1/2 and Bcl-XL) and pro-apoptotic (Bak, Bad and Bid) proteins (supplementary Fig.3).



## 4.5 Discussion

In this study, we have drastically enhanced the tumorigenicity of the Hepa1-6 cell line in a commonly used mouse background by selecting a pool of cells with the ability to grow in the hepatic environment *in vivo*. This cell line (named dt-Hepa1-6) is very well adapted for *in vivo* growth in immunocompetent C57/bl6 mice showing a quasi exponential time-development curve characteristic of the growth usually observed in cancer models. The  $1 \times 10^6$  cell dose resulted in a fast and reproducible development of visible tumors; furthermore, doses as low as  $1 \times 10^3$  cells were sufficient to trigger microscopic tumor development. This low cell dose model could well represent the lengthy and slow cancer development allowing the testing of drugs designed to control liver cancer recurrence.

*In vitro*, the ability to grow in an anchorage-dependent manner is a criterion associated with tumorigenicity (32, 33). This experiment reproduces, in a certain way, the *in vivo* environment and the process of tumor growth from one tumoripotent cell. Since dt-Hepa1-6 cell line is derived from a clone selected for its ability to grow *in vivo*, the increase in anchorage-independent growth found in dt-Hepa 1-6 cells confirmed this particularity of the cell line.

Besides anchorage-independence, we have also tested the importance of cell-cell contacts in tumor growth as measured by the slow aggregation assay described by Boterberg *et al.* (23). This assay is useful to evaluate if cancer cells have decreased cell-cell contact interactions, a process that is often mediated by

E-cadherin (23, 34). Interestingly, E-cadherin expression can be abrogated by EpCAM (35), a cell surface molecule known to be associated with highly tumorigenic cells (36). The lower the number of cells per aggregates, the less those cells need cell-cell interaction to survive and proliferate (23). The number of dt-Hepa1-6 cells per aggregates was lower than Hepa1-6, suggesting that dt-Hepa1-6 were indeed less dependent on cell-cell contact.

The lower dependence on cell-cell contact was also confirmed by the colony formation assay, which is also associated with the tumorigenic potential (13). Our results show that isolated cells from the dt-Hepa1-6 cell line led to the formation of proliferating colonies at a rate 50 times higher than the parental Hepa1-6 cell line. This is in accordance with the *in vivo* experiments that showed a very low capacity of Hepa1-6 cells to lead to the formation of visible tumours in comparison to dt-Hepa1-6 cells.

As the expression of EpCAM on tumor cells is associated with increased tumorigenicity and anchorage-independent growth, we evaluated its expression in dt-Hepa1-6 and Hepa1-6 cells. The exact mechanisms by which EpCAM might exert its role remain unclear, but the current hypothesis suggests that homologous activation occurs by another EpCAM molecule through cell-cell contact (37). Activation of EpCAM would then result in the cleavage of its intracellular domain (EpCID) that will then be co-translocated with  $\beta$ -catenin to the nucleus leading to the activation of several genes associated with survival, proliferation and pluripotentiality such as *nanog*, *sox2*, *cmyc* and *cyclin D1* (37-

39). Overexpression of  $\beta$ -catenin, which is an important membrane to nucleus messenger molecule, has been shown to be associated with HCC aggressiveness (40). Overabundance of  $\beta$ -catenin will lead to induction of EpCAM transcription and is also associated with the transcriptional regulator role of EpCAM (38). In addition, cyclin D1 is under the transcriptional control of the wnt/ $\beta$ -catenin pathway (41). Cyclin D1 is an important molecule of the G1/S transition of the cell cycle under normal conditions and has been shown to be overexpressed by oncogenic signals in different cancers including breast, lung and HCC (31, 42, 43). Genes coding for these 3 molecules were highly upregulated in dt-Hepa1-6, when compared to Hepa1-6.

Evaluation of the presence of EpCAM at the surface of the cells by flow cytometry showed that a large cell subset expressed EpCAM in dt-Hepa1-6 while few or no EpCAM positive cells were detected in Hepa1-6. This result is in accordance with the TIC model that shows that dt-Hepa1-6 is a heterogeneous cell population that has the ability to form tumors *in vivo* (44). This result also confirms EpCAM as a marker of tumorigenicity, as the cells selected for their tumorigenicity *in vivo* show increased proportion of EpCAM positive cells. The selection of EpCAM positive subpopulations and reinjection *in vivo* resulted in increased tumor loads. This result confirmed the importance of the EpCAM positive subpopulations in tumor development (37). Interestingly, mRNA and protein expression of  $\beta$ -catenin did not differ between EpCAM+low and EpCAM+high cells suggesting that this pathway is enhanced in dt-Hepa1-6 but

is not the main regulator of EpCAM expression at the surface of the cell. However, we have been able to identify a strong correlation between EpCAM surface expression,  $\beta$ -catenin protein expression and tumor load, confirming their potential interrelation. *CyclinD1* mRNA overexpression observed in dt-Hepa1-6 compared to Hepa1-6 was also not associated with the level of EpCAM expression, suggesting that cyclinD1 is not the main molecule affected by EpCAM to enhance tumorigenicity.

The level of protein expression of main pro-survival and pro-apoptotic pathways was next compared between Hepa1-6 and dt-Hepa1-6 to assess their potential role in regulating the differential tumorigenicity between the two cell lines. No significant difference in the levels of expression of the pro-apoptotic Bak, Bad and Bid and pro-survival AKT, ERK1/2 and Bcl-XL proteins were detected suggesting that in this model, they were not major players.

Cell spreading, which is part of the attachment process, was more rapid in the Hepa1-6 than dt-Hepa1-6 on both plastic and COL1 supports (45). This could be explained by the lowered expression of integrin-alpha1 found in dt-Hepa1-6: indeed, integrin-alpha1 is known to interact with COL1 when paired with integrin- $\beta$ 1 (46). This result, in apparent contradiction with our *in vivo* results, may in fact reflect the lessened ability to form monolayers, which is a well-known hallmark of TIC (14, 47).

Motility and invasiveness associated with metastatic potential and tissue invasion *in vivo* were lower in dt-Hepa1-6 than Hepa1-6 (48). In our model, dt-Hepa1-6 cells only led to the development of tumors inside the liver. Studies done by Li *et al.* have shown that by selecting metastasis of a certain tumor type, one was able to increase the metastatic potential of this cancer (49). In the present study, cells were selected for their ability to form tumors in the liver as intrasplenic injection provides a diffuse portocentric implantation method (21). Our subcutaneous experiment confirms the particular adaptation of dt-Hepa1-6 cells for growth inside the liver and not in other organs. Interestingly, EpCAM overexpression in many different cell line models such as lung, ovarian, colon and bladder cancer, has been associated with low invasiveness potential (50, 51).

In conclusion, the characterisation of the dt-Hepa1-6 cell line isolated from a tumor selected *in vivo* on its ability to grow in the liver has shown a drastic increase in its tumorigenicity and specificity to the liver. This was associated with an increase in the expression of genes encoding for EpCAM,  $\beta$ -catenin and Cyclin D1. This was also linked with the appearance of an important EpCAM positive subpopulation, one of the hallmarks of TIC.

## 4.6 References

1. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
2. Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010;16:3603-3615.
3. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010;29:4989-5005.
4. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol* 2009;90:367-386.
5. Schnater JM, Bruder E, Bertschin S, Woodtli T, de Theije C, Pietsch T, Aronson DC, et al. Subcutaneous and intrahepatic growth of human hepatoblastoma in immunodeficient mice. *J Hepatol* 2006;45:377-386.
6. Wang Q, Luan W, Goz V, Burakoff SJ, Hiotis SP. Non-invasive in vivo imaging for liver tumour progression using an orthotopic hepatocellular carcinoma model in immunocompetent mice. *Liver Int* 2011;31:1200-1208.
7. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis* 2010;31:1703-1709.
8. Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr* 2012;6:30-38.
9. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8:755-768.
10. Lee TK, Cheung VC, Ng IO. Liver tumor-initiating cells as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2012.
11. Zhou J, Wang H, Cannon V, Wolcott KM, Song H, Yates C. Side population rather than CD133(+) cells distinguishes enriched tumorigenicity in hTERT-immortalized primary prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2011;10:112.
12. Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergent PA, Koulouris CR, Friel AM, Roberts DJ, et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells* 2009;27:2875-2883.
13. Wenqi D, Li W, Shanshan C, Bei C, Yafei Z, Feihu B, Jie L, et al. EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1277-1285.
14. Chen Y, Yu D, Zhang H, He H, Zhang C, Zhao W, Shao RG. CD133(+)EpCAM(+) phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 cells. *Int J Biol Sci* 2012;8:992-1004.
15. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009;136:1012-1024.
16. Whiteside TL, Mandapathil M, Szczepanski M, Szajnik M. Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs. *Bull Cancer* 2011;98:E25-31.

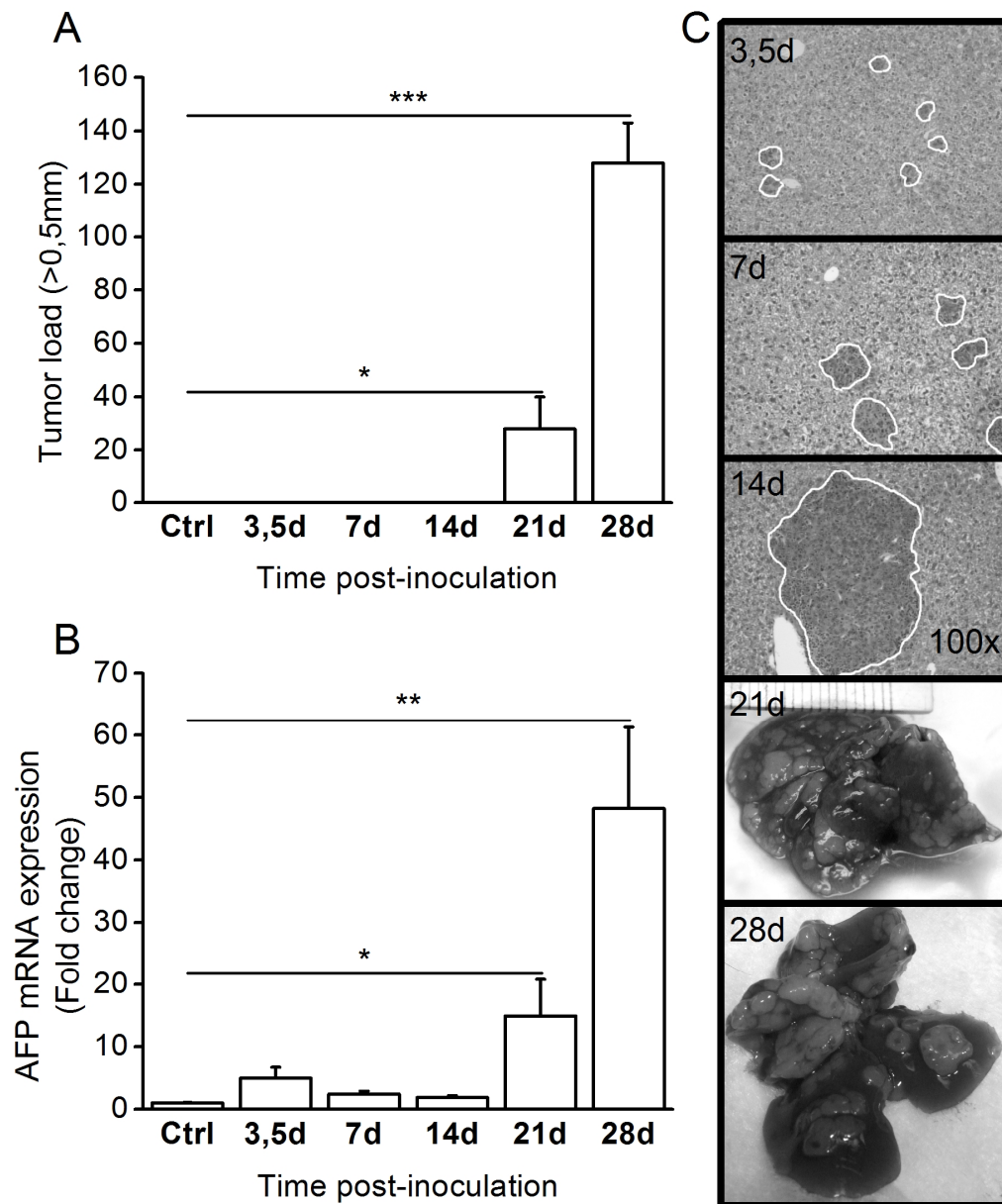
17. Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA, Ruddle FH. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1980;64:809-819.
18. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:443-450.
19. Grimm CF, Ortman D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, et al. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000;119:1104-1112.
20. Terentiev AA, Moldogazieva NT. Alpha-fetoprotein: a renaissance. *Tumour Biol* 2013;34:2075-2091.
21. Figueiredo ML, Wentworth KM, Sandgren EP. Quantifying growth and transformation frequency of oncogene-expressing mouse hepatocytes in vivo. *Hepatology* 2010;52:634-643.
22. Bourbonnais E, Raymond VA, Ethier C, Nguyen BN, El-Leil MS, Meloche S, Bilodeau M. Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury. *Gastroenterology* 2012;142:130-139 e134.
23. Boterberg T, Bracke ME, Bruyneel EA, Mareel MM. Cell aggregation assays. *Methods Mol Med* 2001;58:33-45.
24. Sugden B, Mark W. Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* 1977;23:503-508.
25. Takata M, Maniwa Y, Doi T, Tanaka Y, Okada K, Nishio W, Ohbayashi C, et al. Double-layered collagen gel hemisphere for cell invasion assay: successful visualization and quantification of cell invasion activity. *Cell Commun Adhes* 2007;14:157-167.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
27. Ethier C, Raymond VA, Musallam L, Houle R, Bilodeau M. Antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes associated with downregulation of proapoptotic Bid protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G298-308.
28. Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol* 2007;7:14.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
30. Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:10831-10839.
31. Chaves-Perez A, Mack B, Maetzel D, Kremling H, Eggert C, Harreus U, Gires O. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 2013;32:641-650.

32. Letourneau I, Quinn MC, Wang LL, Portelance L, Caceres KY, Cyr L, Delvoe N, et al. Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012;12:379.
33. Xie C, Song LB, Wu JH, Li J, Yun JP, Lai JM, Xie DY, et al. Upregulator of cell proliferation predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and contributes to hepatocarcinogenesis by downregulating FOXO3a. *PLoS One* 2012;7:e40607.
34. Borghi N, Sorokina M, Shcherbakova OG, Weis WI, Pruitt BL, Nelson WJ, Dunn AR. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:12568-12573.
35. Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 2003;285:50-58.
36. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:1451-1461.
37. Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 2009;69:5627-5629.
38. Denzel S, Maetzel D, Mack B, Eggert C, Barr G, Gires O. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer* 2009;9:402.
39. Chaves-Perez A, Mack B, Maetzel D, Kremling H, Eggert C, Harreus U, Gires O. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 2012.
40. Monga SP. Role of Wnt/beta-catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1021-1029.
41. Yang T, Cai SY, Zhang J, Lu JH, Lin C, Zhai J, Wu MC, et al. Kruppel-like factor 8 is a new Wnt/beta-catenin signaling target gene and regulator in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012;7:e39668.
42. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145:5439-5447.
43. Deane NG, Parker MA, Aramandla R, Diehl L, Lee WJ, Washington MK, Nanney LB, et al. Hepatocellular carcinoma results from chronic cyclin D1 overexpression in transgenic mice. *Cancer Res* 2001;61:5389-5395.
44. Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* 2009;27:44-46.
45. Humphries MJ. Cell adhesion assays. *Mol Biotechnol* 2001;18:57-61.
46. Jokinen J, Dadu E, Nykvist P, Kapyla J, White DJ, Ivaska J, Vehvilainen P, et al. Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *J Biol Chem* 2004;279:31956-31963.
47. Qian YW, Chen Y, Yang W, Fu J, Cao J, Ren YB, Zhu JJ, et al. p28(GANK) prevents degradation of Oct4 and promotes expansion of tumor-initiating cells in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2012;142:1547-1558 e1514.
48. Wang N, Zhu M, Tsao SW, Man K, Zhang Z, Feng Y. Up-Regulation of TIMP-1 by Genipin Inhibits MMP-2 Activities and Suppresses the Metastatic Potential of Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2012;7:e46318.

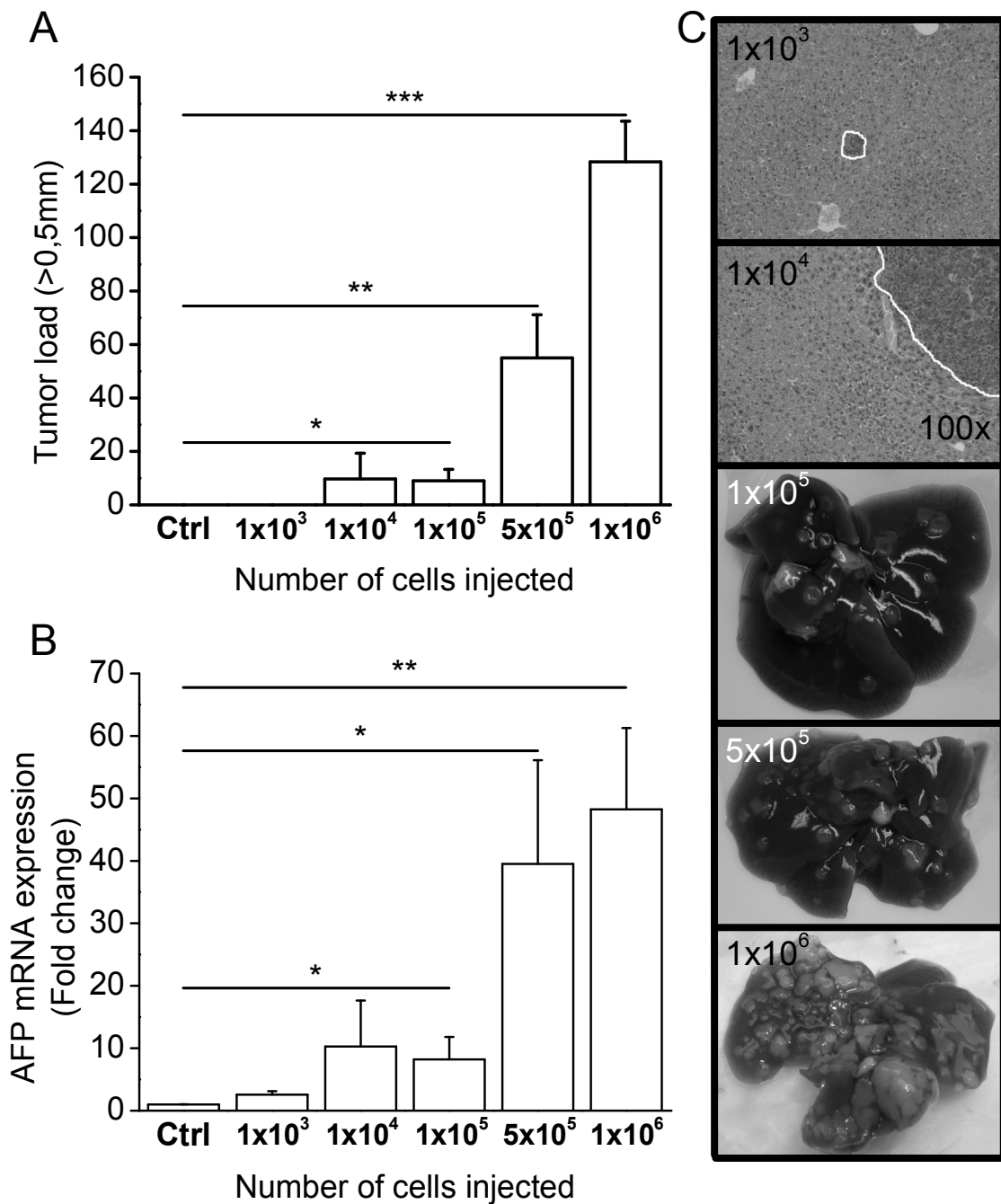


49. Li Y, Tian B, Yang J, Zhao L, Wu X, Ye SL, Liu YK, et al. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive in vivo selection and studies on metastatic characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:460-468.
50. Gosens MJ, van Kempen LC, van de Velde CJ, van Krieken JH, Nagtegaal ID. Loss of membranous Ep-CAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol* 2007;20:221-232.
51. Tai KY, Shiah SG, Shieh YS, Kao YR, Chi CY, Huang E, Lee HS, et al. DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. *Oncogene* 2007;26:3989-3997.

## 4.7 Figures

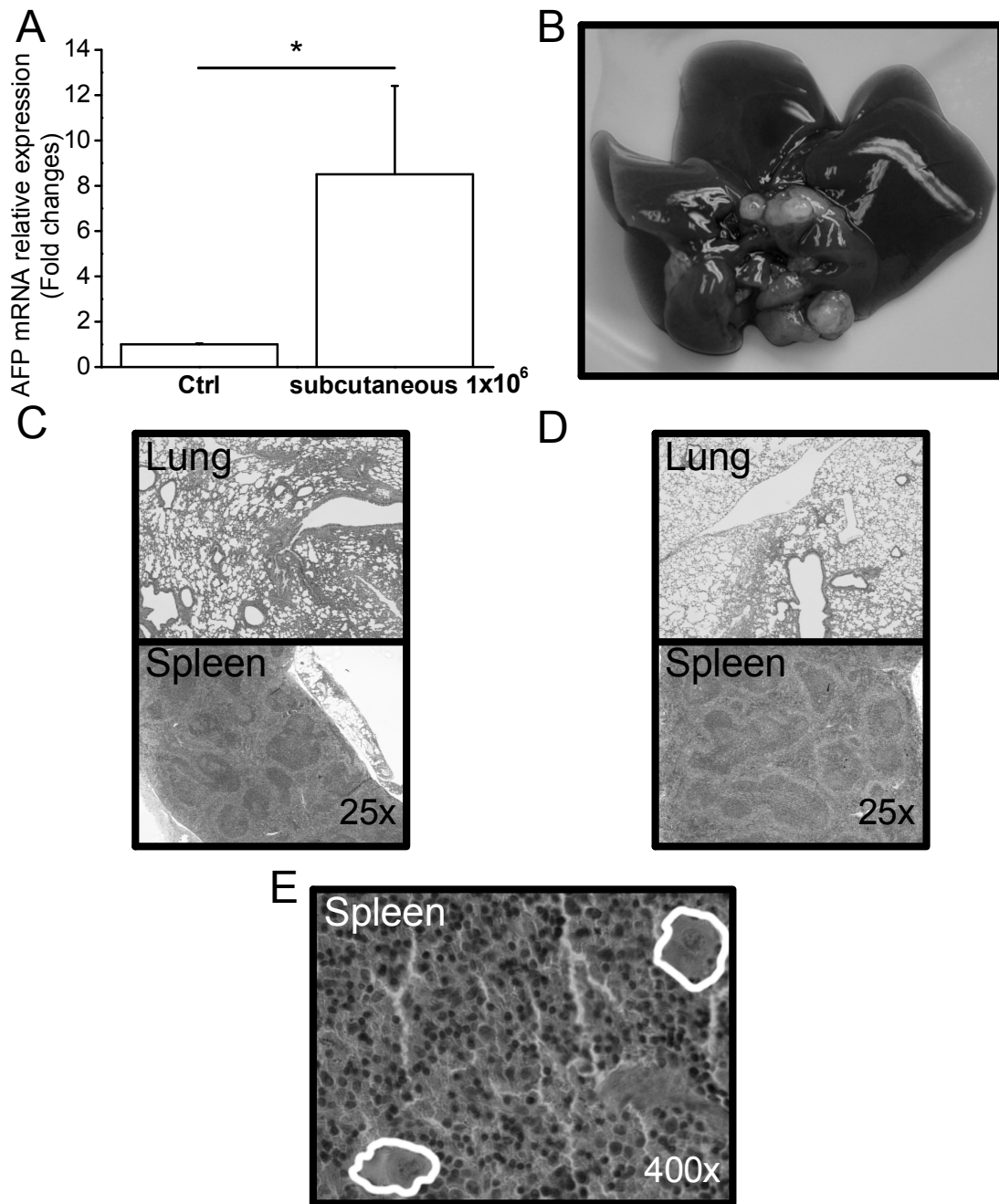


**Figure 1: Time-dependent tumor development of dt-Hepa1-6.** A suspension of  $1 \times 10^6$  dt-Hepa1-6 cell was injected intrasplenically in C57/bl6 mice and animals sacrificed after 3.5 days to 28 days. (A) manual count of tumor  $>0.5\text{mm}$  and (B) Alpha fetoprotein (AFP) (Afp) mRNA expression of liver homogenates by qPCR was performed. (C) Microphotographs at 100x magnification of HPS-stained liver slices were obtained after 3.5 days, 7 days and 14 days. Photographs were also obtained at time of sacrifice after 21 days and 28 days.

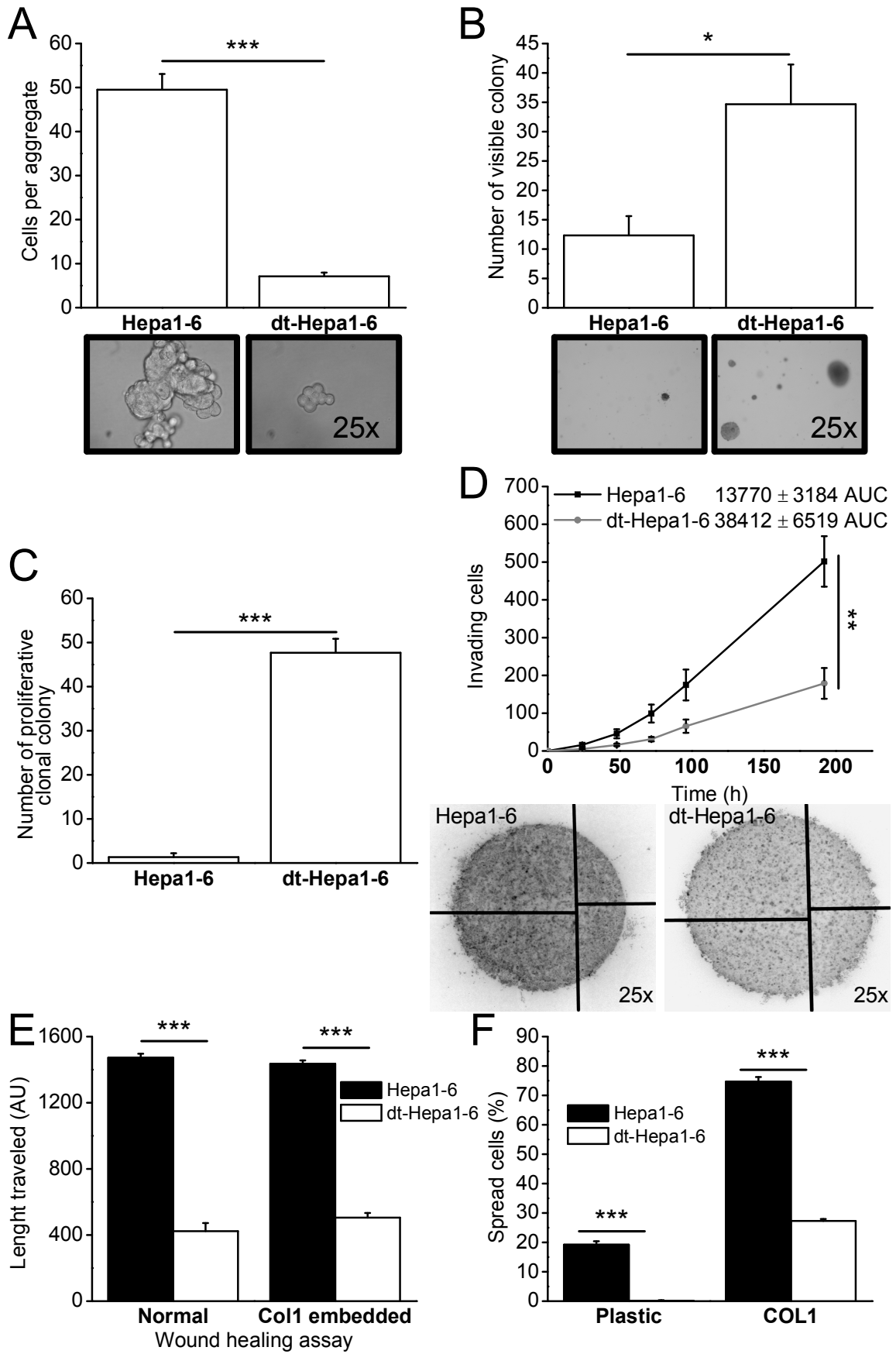


**Figure 2: Dose-dependent tumor development of dt-Hepa1-6.** 28 days after the injection of dt-Hepa1-6 cell suspension [ $1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^6$ ] (A) manual count of tumor  $>0.5\text{mm}$  and (B) *AFP* (*Afp*) mRNA expression in liver homogenates by qPCR was evaluated. When mice were sacrificed, (C) representative microphotographs of HPS-stained liver slices were obtained after injection with  $1 \times 10^3$  cells and  $1 \times 10^4$  cells. Whole liver photographs were obtained at time of sacrifice of mice injected with  $1 \times 10^5$  cells,  $5 \times 10^5$  cells and

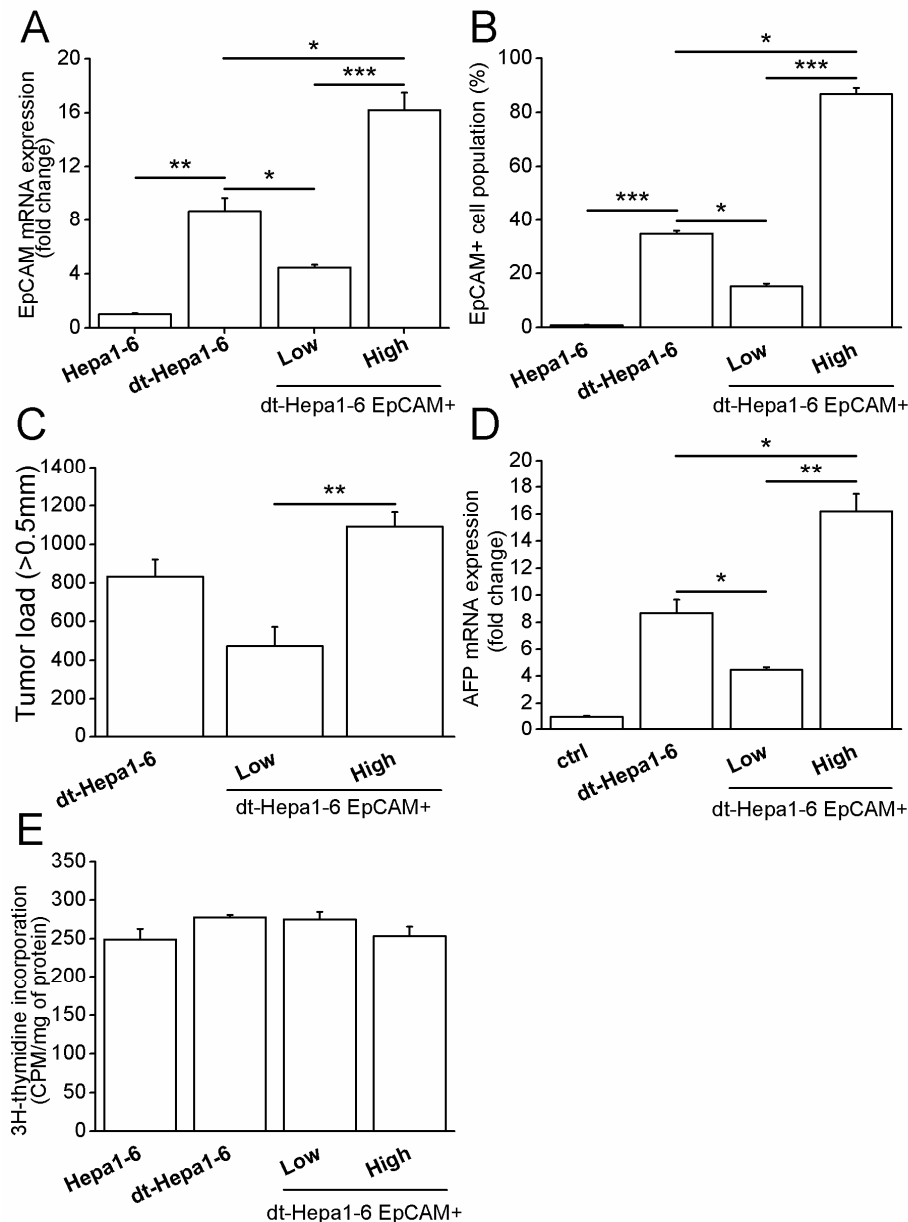
$1 \times 10^6$  cells. Representative microphotographs were obtained at 100x magnification.



**Figure 3: In vivo liver specificity of dt-Hepa1-6.** A suspension of  $1 \times 10^6$  dt-Hepa1-6 cells was injected subcutaneously (SC) in the left flank of C57/bl6 mice for 28 days. (A) *AFP* mRNA relative expression in control and SC injected C57/bl6 mice. (B) Whole liver photographs at time of sacrificed Representative microphotographs of HPS-stained slices (25X) of spleen and lung tissue obtained from C57/Bl6 mice 21 days after intrasplenic (C) and subcutaneous(D) injection of  $1 \times 10^6$  dt-Hepa1-6 cells. (E) Spleen from C57/bl6 mice IS injected with a suspension of  $1 \times 10^6$  Hepa1-6 cells at 400x magnification where isolated cancer cells are circled in white. (\* $P < 0.05$ )

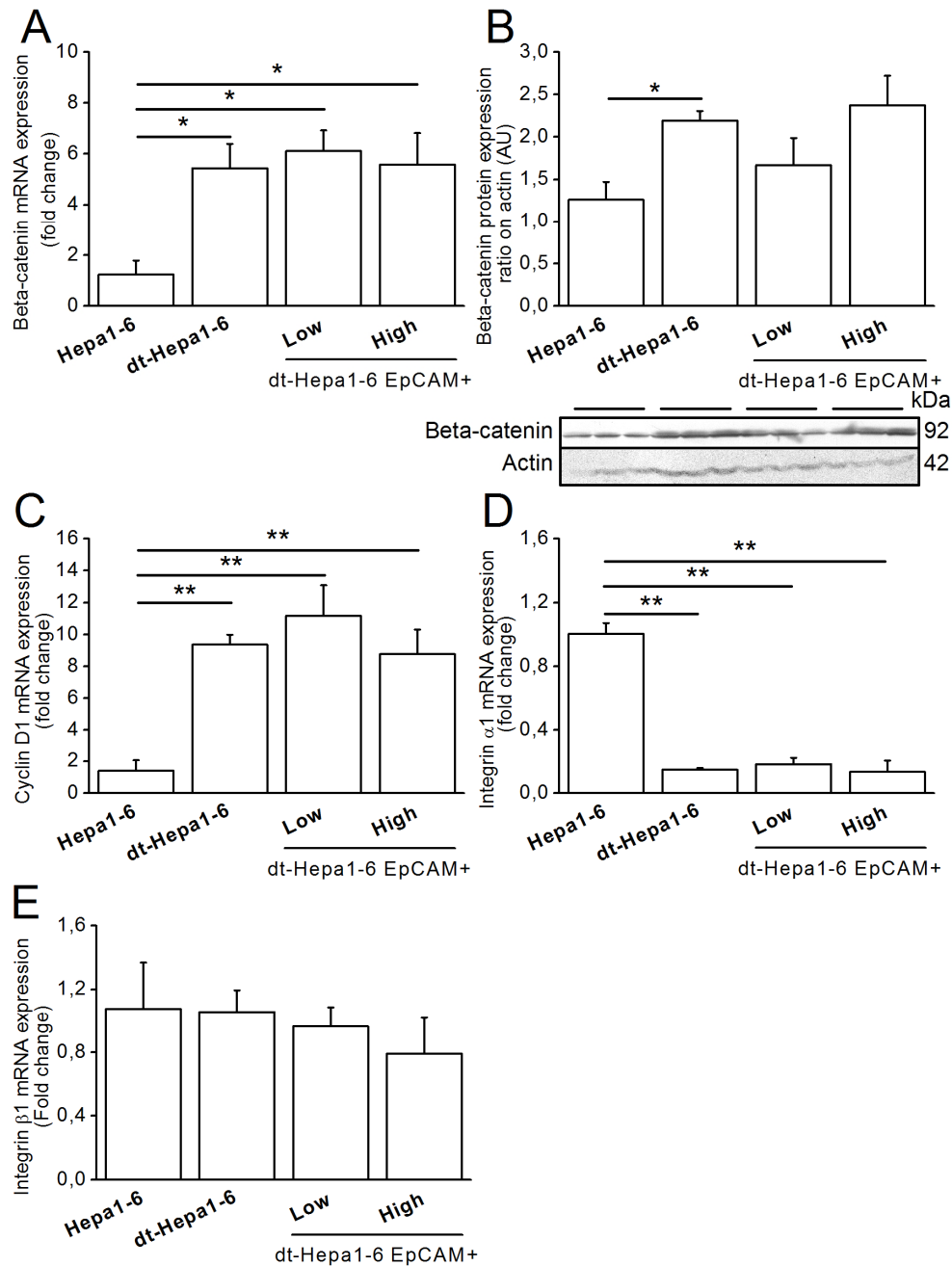


**Figure 4: In vitro evaluation of Hepa1-6 and dt-Hepa1-6 characteristics associated with tumorigenicity.** (A) Number of cells per aggregate was calculated 24h after seeding both cell lines in non-adherent agar-coated wells and representative microphotographs were obtained. (B) Cell lines were seeded at  $1 \times 10^4$ -cell concentration in soft-agar gel [0.3%] in order to form visible colonies that were counted 5 weeks later and representative microphotographs were obtained at the end of experiment. (C) Cell lines were seeded at  $3 \times 10^3$ /mL concentration in order to obtain isolated cells that grow as colonies overtime and were counted 4 weeks after seeding. (D) Cell lines [ $2 \times 10^4$  cells] were embedded in COL1 [3mg/mL] to form a double layered droplet and cells penetrating the outer COL1 layer were counted every 12h for 186h. Area under the curves (AUC) of the time-dependent invasion was calculated and used for statistical analysis. Composite representative microphotographs were obtained at the end of experiments (black lines separate each different microphotographs of the composite). (E) Normal and a COL1-embedded wound healing assay, were performed on confluent cells for 24h and length traveled was evaluated with ImageJ. (F) Cell lines were seeded for 6h on plastic and COL1 and cells showing an elongated morphology were counted manually. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

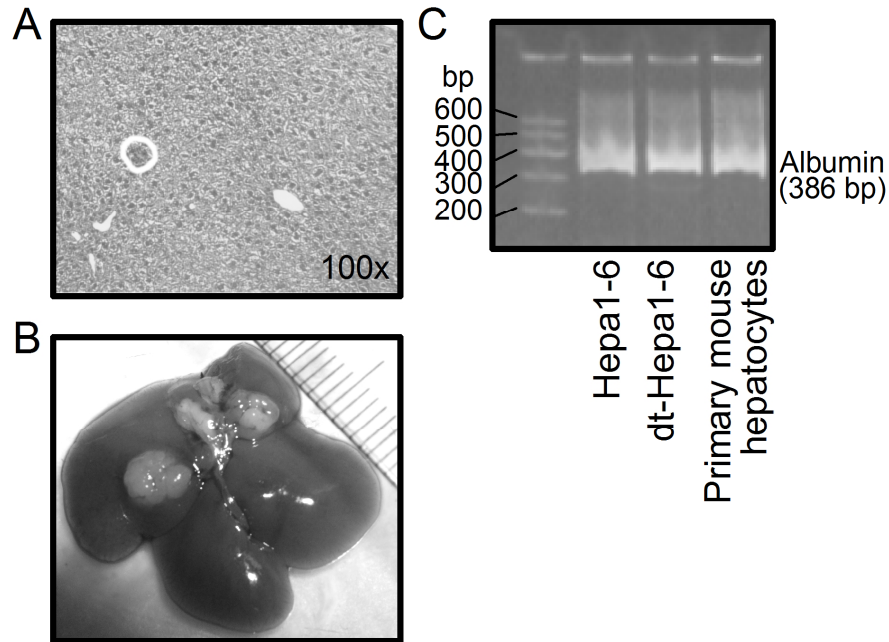


**Figure 5: Effect of EpCAM enrichment on tumorigenicity.** Dt-Hepa1-6 cells were marked with APC-tagged anti-CD326 (EpCAM) and sorted by FACS in order to obtain two cell populations: one enriched in EpCAM positive cells (EpCAM+high) and one with few of them (EpCAM+low). Hepa1-6, dt-Hepa1-6, EpCAM+high and EpCAM+low were then analysed (A) by qPCR for their EpCAM mRNA expression and (B) by flow cytometry after labelling with APC-tagged anti-CD326 (EpCAM). Dt-Hepa1-6, EpCAM+low and EpCAM+high were then injected intrasplenically in C57/bl6 mice and sacrificed after 21 days. (C) tumor load (>0.5mm) was assessed and (D) *AFP* mRNA expression was compared to healthy liver controls. (E) In parallel, proliferation was evaluated by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

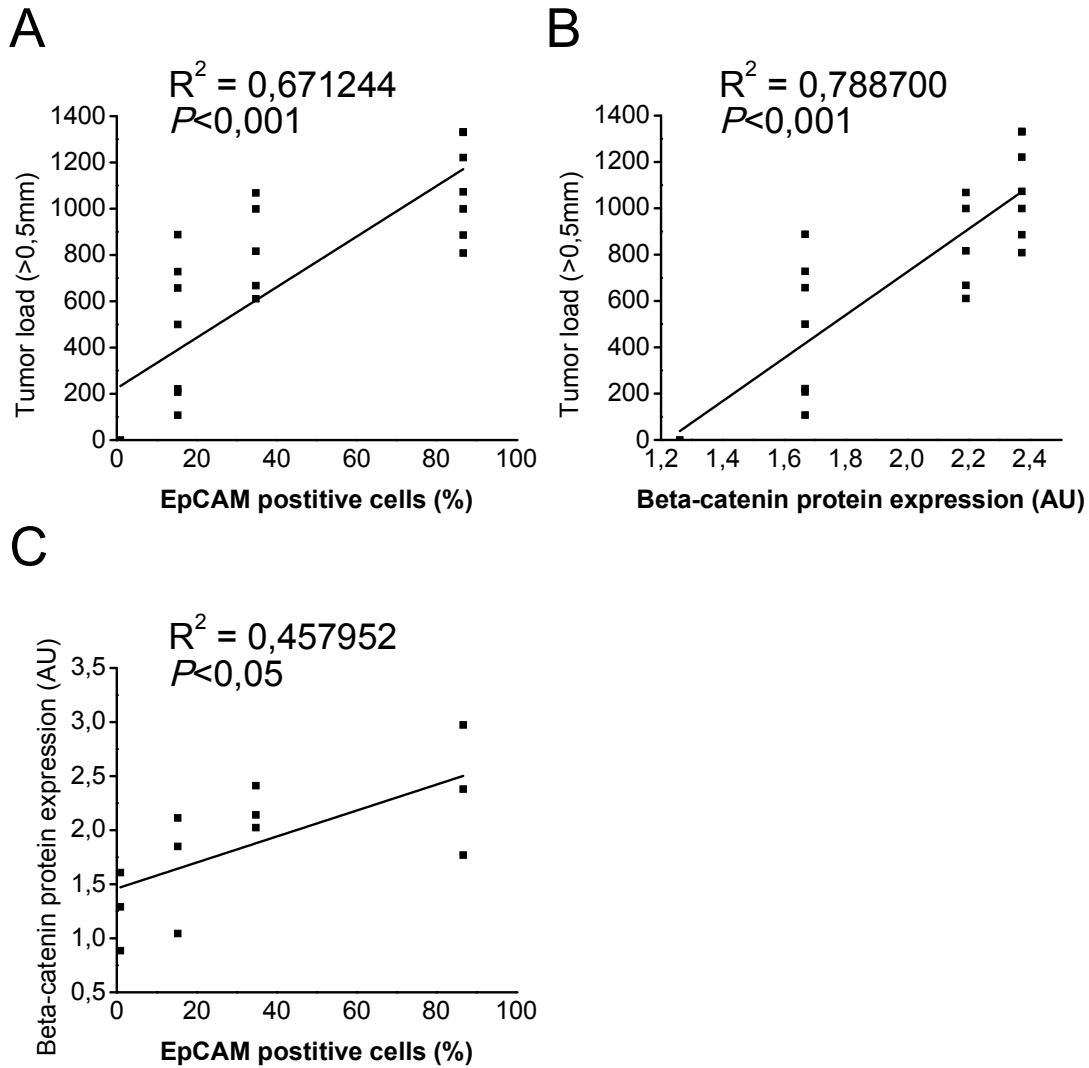




**Figure 6: Comparison of gene and protein expressions with tumorigenicity or EpCAM expression.** All experiments were performed on freshly trypsinized cells prior to their injection *in vivo*. Genes or proteins of interest were tested in Hepa1-6, dt-Hepa1-6, EpCAM+Low and EpCAM+High cell lines by qRT-PCR or western blot. (A) Beta-Catenin (*Ctnnb1*) gene and (B) protein expression shown on immunoblot (C) Cyclin D1 (*Ccnd1*), (D) Integrin- $\alpha$ 1 (*Itga1*) and (E) Integrin- $\beta$ 1 (*Itgb1*) gene expression. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )

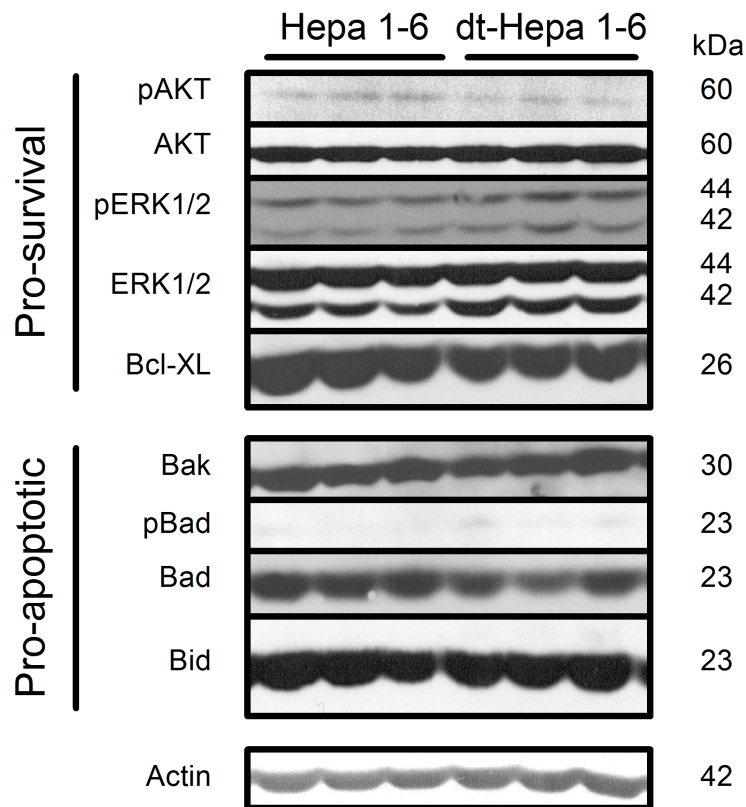


**Supplementary Figure 1: Origins of dt-Hepa1-6 cell line.** A suspension of  $1 \times 10^6$  Hepa1-6 cells was injected intrasplenically in C57/bl6 mice. (A) HPS-stained liver slices 21 days post-inoculation with a microscopical tumor circled in white and (B) whole liver photographs 70 days post-inoculation were obtained. The tumor was isolated, cultured *in vitro* and named dt-Hepa1-6. (C) Expression of albumin (Alb) was assessed and compared to Hepa1-6 and normal primary mouse hepatocytes to confirm the hepatic origin of dtHepa1-6.



**Supplementary Figure 2: Correlation analysis between tumor load,  $\beta$ -catenin protein expression and EpCAM positive cell population.**

Correlation was calculated by Pearson's R correlation test and statistical analysis by ANOVA. (A) Correlation between percentage of positive EpCAM cells injected and tumor load at 21d post-inoculation. (B) Correlation between  $\beta$ -catenin protein expression of injected cells and tumor load at 21d post-inoculation. (C) Correlation between percentage of positive EpCAM cells and  $\beta$ -catenin expression.



**Supplementary Figure 3: Comparison of pro-survival and pro-apoptotic protein expression between Hepa1-6 and dt-Hepa1-6.** Protein expression of both cell lines was evaluated after 24h in culture in non-supplemented DMEM of 70% confluent cells that were seeded on COL1 [13.9 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>]. Immunoblots were obtained of pro-survival proteins: AKT, ERK1/2 and Bcl-XL; and pro-apoptotic proteins: Bak, Bad and Bid.

## **Chapitre 5 - Article 3**

**Type 1 collagen and liver fibrosis enhance hepatocellular carcinoma progression and chemoresistance through an ERK1/2 mediated pro-survival effect.**

Lacoste Benoit<sup>1</sup>, Raymond Valérie-Ann<sup>1</sup> and Bilodeau Marc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Hépatologie Cellulaire du Centre de Recherche du CHUM-Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada.

***Running head: Liver fibrosis enhances hepatocellular carcinoma progression and survival***

Manuscrit non soumis

## 5.1 Abstract

There is a strong link between the risk of developing hepatocellular carcinoma (HCC) and the presence of cirrhosis, the end stage of liver fibrosis characterized by the accumulation of extracellular matrix, particularly type 1 collagen (COL1). We have recently shown a protective effect of fibrosis and COL1 on normal hepatocytes. We hypothesized that liver fibrosis and COL1 also enhance HCC survival and thus progression. When tested *in vitro*, COL1 reduced apoptosis induced by CP (plastic:  $31.45 \pm 1.37\%$  and COL1:  $13.75 \pm 0.44\%$ ;  $P < 0.001$ ) and TNF- $\alpha$ +ActD (Plastic:  $27.85 \pm 3.80\%$  vs COL1:  $5.36 \pm 0.13\%$ ;  $P < 0.01$ ). Exposure to COL1 increased survivin ( $3.7 \pm 0.4$  fold changes;  $P < 0.001$ ), cyclin B1 ( $5.9 \pm 2.0$  fold changes;  $P < 0.05$ ) and ILK ( $9.2 \pm 2.3$  fold changes;  $P < 0.05$ ) mRNA *in vitro*. ERK1/2 phosphorylation occurred more rapidly and at higher levels in COL1-exposed cells (ERK1: COL1  $13.3 \pm 0.6$  area under the curve (AUC) vs plastic  $3.5 \pm 1.8$  AUC;  $P < 0.01$  and ERK2: COL1  $34.2 \pm 5.6$  vs plastic  $12.6 \pm 1.2$  AUC;  $P < 0.05$ ). We then evaluated the impact of thioacetamide-induced liver fibrosis and COL1 *in vivo*, using the highly tumorigenic cell line dt-Hepa1-6. Fibrotic C57/bl6 mice showed higher tumor development than non fibrotic mice ( $604 \pm 242$  vs  $22 \pm 9$  lesions;  $P < 0.05$ ; AFP:  $121.3 \pm 30.7$  vs  $14.9 \pm 6.9$  fold changes;  $P < 0.001$ ). Furthermore, tumor development was decreased in animals allowed to recover from fibrosis for 2 weeks ( $335 \pm 101$  lesions and AFP:  $42.5 \pm 14.9$  fold changes;  $P < 0.05$ ). This enhancement of cancer progression by liver fibrosis was also observed in nude mice (AFP:  $261.8 \pm 67.7$  vs  $41.2 \pm 14.8$  fold changes;  $P < 0.001$ ). Moreover, the presence of liver fibrosis dampened the effects of

cisplatinum (CP) treatment when compared to non-fibrotic mice ( $44.5 \pm 4.9$  vs.  $78.7 \pm 6.9\%$ ;  $P < 0.01$ ). This effect was abolished when mice recovered from fibrosis for 2 weeks ( $82.1 \pm 7.9\%$ ;  $P < 0.01$ ). In conclusion, hepatic fibrosis increased HCC progression *in vivo* an effect that is possibly explained by the protection afforded by COL1 on survival.

Keywords:

Fibrosis, type 1 collagen, hepatocellular carcinoma, ERK1/2, apoptosis

## 5.2 Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the cancers whose incidence is increasing worldwide. HCC is the third deadliest cancer and the 5-year survival rate in the absence of transplantation is less than 5% (1). HCC is the most common primary liver cancer and its poor prognosis is partly explained by the fact that it is often diagnosed too late to begin curative therapy (2).

Liver cirrhosis is a major risk factor for the development of HCC and also the final step of liver fibrosis (3, 4). Fibrosis is induced by sustained hepatotoxic stress such as chronic viral hepatitis or steato-hepatitis (5). Stressed hepatocytes trigger the activation of many immune cells including Kupffer cells (KC), the resident macrophages of the liver (6). These cells, when activated, lead to the transformation of hepatic stellate cells into myofibroblasts (HSC) (7). Activated HSC go on to modify the complex structure of the liver extracellular matrix (ECM) resulting in an increase in the levels of its major constituent, type 1 collagen (COL1) (8, 9).

According to the multistage carcinogenesis theory, two major points named as the initiation and promotion steps are necessary for cancer to develop (10). Initiation involves exposure of normal cells to chemical or physical carcinogens. These carcinogens cause genetic damage to DNA and other cellular macromolecules that provide initiated cells with both an altered responsiveness to their microenvironment and a proliferative advantage relative to the



surrounding normal cells (11). On the other hand, tumor promotion results in proliferation of the initiated cells to a greater extent than normal cells and enhances the probability of additional genetic damage, including endogenous mutations that accumulate in the expanding population (12).

Though there is a scarcity of information, on this subject there is a clear association between liver fibrosis and hepatocarcinogenesis (13). Liver fibrosis is characterised by a pro-inflammatory environment with an abundance of cytokines like TNF- $\alpha$  or TGF- $\beta$  (13-15). Some of these cytokines, such as TGF- $\beta$ , are known to be strong enhancers of tumor development (16). The stress at the origin of liver fibrosis can also induce reactive oxygen species which are known as key molecules in cancer development and initiation through the accumulation of DNA oxidizing damage (17). Recently, ECM stiffness, which is a key feature of fibrosis, has been shown to increase survival and development of HCC cell lines *in vitro* (18). The sustained presence of HSC is associated with an increase in cell survival, which can modulate cancer progression in mice models (19). A number of genes have been shown to be upregulated in the diseased liver tissue and HCC specimens: these genes, such as survivin (*Birc5*), cyclin B1 (*Ccnb1*) and Integrin linked kinase (ILK) (*Ilk*), are associated with increased cell survival and with poor HCC prognosis (20-22).

The hepatotoxic effect of thioacetamide (TAA) occurs after its metabolism through the cytochrome P450 2E1 into thioacetamidesulfdioxide (TASO<sub>2</sub>) in hepatocytes. TASO<sub>2</sub> induces oxidising damage and necrosis leading to KC

activation, TGF- $\beta$ 1 production and subsequent HSC activation resulting in liver fibrogenesis (23). Other groups have observed increased HCC development in experimental models of liver fibrosis and linked this observation with pro-angiogenic and pro-metastatic factors or with changes in immune response (24-26).

Tumor micro-environment has been shown over the years to play an important role in cancer progression and outcome (24). One of the key features of the fibrotic liver micro-environment is the modification of the ECM composition and particularly, the overabundance of COL1 fibers (7). As we recently demonstrated, fibrosis and COL1 can positively influence the survival of normal hepatocytes *in vitro* and *in vivo* (25). Here, we demonstrate that this protective effect is present in HCC cell lines and enhances cancer development.

### **5.3 Material and methods**

#### Reagents:

Rat tail COL1 was purchased from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). U0126 was obtained from Calbiochem (Gibbstown, NJ) and Crystal Violet was purchased from Bioshop (Burlington, Ontario, Canada). TRIZOL reagent was purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). The quantitect reverse transcription and SYBRGreen kits were purchased from QIAGEN (Toronto, Ontario, Canada). Enhanced chemiluminescence (ECL) reactive was obtained from Perkin-Elmer (Woodbridge, Ontario, Canada) and the developer and fixation solution kits from Kodak (Rochester, NY). Unless otherwise stated, all other products were from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

#### Cell lines:

Human (Huh7, Hep3B and HepG2) and murine (Hepa1-6) HCC cell lines were obtained from American Type of Cell Culture (Manassas, VA). The highly tumorigenic cell line, dt-Hepa1-6 was derived from the isolation of a 2mm tumor that grew in a C57/bl6 mouse 70 days following the injection of Hepa1-6 cells intrasplenically as described characterized (article 2).

### COL1 coating :

Plastic dishes were coated with COL1 diluted in 0.02N sterile acetic acid for 2 hours in order to create a 13.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  COL1 layer. Dishes were then washed 2 times with PBS<sub>1x</sub>, dried and stored in the dark at 4 °C for up to 12 months.

### Cell line culture:

All cultures were maintained in an incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> saturated in humidity. Cells were cultured in DMEM with 10% FBS (supplemented media). All reagents used to maintain cells in culture were obtained from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). In order to reach 70% confluence at the beginning of experiments, cells were seeded in supplemented media at a defined density for plastic (Huh7: 31 000 cells/cm<sup>2</sup>, HepG2: 52 000 cells/cm<sup>2</sup>, Hep3B: 31 000 cells/cm<sup>2</sup> and dt-Hepa1-6 77 000 cells/cm<sup>2</sup>) and COL1 (Huh7: 26 000 cells/cm<sup>2</sup>, HepG2: 42 000 cells/cm<sup>2</sup>, Hep3B: 26 000 cells/cm<sup>2</sup> and dt-Hepa1-6 56 000 cells/cm<sup>2</sup>) for 7h. Serum containing DMEM was then replaced overnight with serum-free DMEM.

### Primary hepatocyte isolation and culture

Hepatocytes were isolated from Balb/c mice as described (26) using the two step collagenase perfusion method. Freshly isolated cells were plated on plastic or COL1- coated dishes and left for 4 hours to attach in Williams' E +10% FBS at 26 000 cells/cm<sup>2</sup> density. Media was then changed for Williams' E medium without supplementation.

## Treatments

### *Induction of apoptosis by CP and inhibition of ERK1/2 phosphorylation:*

At the beginning of each experiment, the media was replaced with fresh media with or without the ERK 1/2 mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway inhibitor U0126 [25µM] for 1h after which the media was replaced with media containing only U0126 [25µM], only CP [25µg/mL] or with CP [25µg/mL] and U0126 [25µM] for 24h.

### *Induction of apoptosis by TNF-α and actinomycin D (ActD):*

After serum deprivation, media was replaced with fresh media in the presence or absence of ActD [10nM] for 30 min. ActD is a transcription inhibitor agent that sensitizes hepatocytes to TNF- α induced apoptosis (27, 28). The media were then changed again for DMEM supplemented or not with TNF-α [50ng/mL] and ActD [10nM] for 24h.

## Morphological apoptotic features

At the end of treatment, cells were fixed with 5% formalin and stained with Hoechst 33258 [50ng/mL]. The numbers of nuclei presenting morphological features characteristic with apoptosis were counted using a Leitz fluorescence microscope (Leica-microsystems, Concord, Ontario, Canada). Apoptotic nuclei were expressed as percentage of the total number of fluorescent nuclei. At least 400 nuclei were counted per dish.

Viability (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay):

In 24 wells plates, media was changed for 0.5mL of a MTT solution [2mg/mL] in DMEM and incubated for 4h. Media was aspirated and 1mL of dimethylsulfoxide was added and plates were gently shaken for 1h at room temperature. Plates were then read using a Synergy HT spectrofluorometer platereader (Biotek, Winooski, VT) at 495nm wavelength. Results of viability were expressed percent of control value (100% viability).

Caspase 3 activity

At the end of treatment, cells were scraped in 4 °C PBS<sub>1x</sub> and centrifuged for 5 min at 3000g. The resulting pellet was lysed in ice-cold caspase lysis buffer (10 mmol/L HEPES [pH 7.4], 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 42 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulonate (Calbiochem; San Diego, CA), 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L dithiothreitol, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL soybean trypsin inhibitor, and 100 µmol/L benzamidine) for 30 min. The lysates was then centrifuged for 10 min at 14 000g. Protein content was evaluated by the Bradford method (29) and the fluorimetric Ac-DEVD-AMC cleavage assay was performed. The reaction mixture contained 40µL of lysate (100µg of protein) and 50µL of reaction buffer (2×; 100 mmol/L HEPES [pH 7.2], 200 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 20% sucrose, 0.2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulonate, 20 mmol/L dithiothreitol). Plate was warmed to 37°C in the

pre-heated Synergy HT spectrofluorometer platereader (Biotek, Winooski, VT) and 10 $\mu$ L of ac-DEVD-AMC [100 $\mu$ mol/L] caspase 3 substrate was added to the reaction mixture. The cleavage activity of caspase 3 was evaluated using 380nm/440 nm as excitation and emission wavelengths respectively in the Synergy HT spectrofluorometer platereader (Biotek, Winooski, VT). The maximal cleavage rate ( $V_{max}/s$ ) was calculated and caspase 3 activity evaluated using calibration curves relating  $V_{max}/s$  to units of activated recombinant caspase-3.

#### ERK1/2 phosphorylation kinetic

After serum deprivation on plastic and COL1-coated 10 cm dishes, the media were changed for DMEM containing the ERK1/2 phosphorylation inhibitor U0126 [25 $\mu$ M] for 1h. Media was then replaced with fresh DMEM. The cells were scraped off and the proteins separated by western blotting as described below after 0, 15, 30, and 60 min of inhibition release. Densitometry results were compiled and the area under the curves was determined for each independent experiments using Origin 8 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

#### Western blot analysis

At the end of treatment, cells from 10 cm dishes were scraped off in 10mL PBS<sub>1x</sub> at 4 $^{\circ}$ C, centrifuged 5 min at 3000g and the pellet resuspended in RIPA buffer (26). Protein concentration was dosed according to Bradford (29). Protein extracts were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

and then blotted as described (26). Briefly, membranes were blocked 1 hour in 10% milk PBS<sub>1x</sub> + 0.05% Tween (PBST) at room temperature and probed with the following antibodies: anti-ERK1/2, anti-phosphospecific ERK1/2 [1:1000] (both from Cell Signalling, Pickering, Ontario, Canada) and anti-actin [1:10 000] kit from Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 2 hours in PBST containing 1% milk at room temperature. Membranes were washed 3 times for 10 min in PBST and then incubated with a secondary antibody, anti-rabbit IgG [1:1000] or anti-mouse IgG [1:5000] (or IgM from anti-actin kit [1:20 000]) HRP-conjugated (both from BD Pharmingen, San Diego, CA) for 1 hour in PBST containing 5% milk at room temperature. Finally, after 3 washes with PBST, membranes were exposed to chemiluminescence reactive. In a dark room, Hyblot CL films (Denville scientific inc, Metuchen, NJ) were exposed to chemiluminescent membranes and then developed and fixed using Kodak solution kits. Densitometry of films was evaluated using ImageJ 1.46 software (NIH, USA).

#### <sup>3</sup>H-Thymidine proliferation assay:

After serum deprivation in 6-well plates, media was changed for 10% FBS supplemented DMEM added with 1  $\mu$ Ci/mL <sup>3</sup>H-thymidine (MP Biomedicals, Solon, OH). After 24h, wells were washed 2 times with PBS<sub>1x</sub> and 10% ice cold trichloroacetic acid was added for 1h. Wells were then washed with ice cold methanol and left to dry. A 1mL lytic solution (0.5 mol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, and 1  $\mu$ L/mL Triton X-100) was added and cells were lysed for 2h at room temperature. 200 $\mu$ L of the lytic solution was added to scintillation



cocktail (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and radioactivity measured using a TRI-Carb 2800TR analyzer (PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada). Total protein was quantified by the Bradford method (29). Results were expressed as CPM/mg of protein.

#### Cell doubling time assay

Following serum deprivation in 96-well plates, media was changed for supplemented media (time zero). Cell concentration was evaluated every 12h for 72h. At each time point, cells were fixed with 5% formalin for 20 min and washed with PBS. Cells were then stained with crystal violet [0.05% w/v] solution in MOPS buffer [200mM] pH6 for 1 hour. Cells were then washed 3 times for 30 min, 1 time for 1h with water and left to dry. Then, 1mL of acetic acid [10%] was added for 1 hour with shaking. Plates were then read using a Synergy HT plate reader (Biotek, Winooski, VT) at 570nm wavelength. Cell doubling time was evaluated with Doubling Time Online Calculator (Roth V. 2006 <http://www.doubling-time.com/compute.php>) according to the following formula: Doubling time= $\ln(2)/(\text{growth rate as given by exponential regression of data})$  .

#### Attachment assay

Cells (0.5mL) were seeded in 24-well plates coated or not with COL1 at a concentration of 30 000 cells/mL in DMEM. Four and 6 hours after seeding, wells were gently washed with 37°C PBS<sub>1x</sub>, fixed with 5% formalin for 20 min and washed with PBS<sub>1x</sub>. Cells were then stained with crystal violet using the

same method as in the cell doubling time assay. Plates were then read using a Synergy HT plater reader (Biotek, Winooski, VT) at 570nm wavelength. Results were expressed as OD values.

#### Soft-agar colony assay

To assess the anchorage-independent growth, individual cells were seeded in a soft-agar gel (30, 31). Soft agar solutions maintained at 50°C were diluted in cold supplemented media just before pouring to avoid polymerization. Briefly, 6-well plates were filled with 1mL of warm 0.6% soft agar solution and let to solidify on ice for 5 min. Then, 2mL of a warm 0.3% soft agar mixture with or without COL1 [654µg/mL] containing 10 000 freshly trypsinated single cells was poured on top of each well and allowed to polymerize for 5 min on ice. In order to trap the cells present in the gel layer, another 1mL of the warm solution was added on top and let to solidify on ice. Afterwards, cells were kept at 37°C with 1mL of supplemented medium; medium was changed every week for 4 weeks.

#### Animals

Male Foxn1 nu/nu, Balb/c and C57/bl6 mice (20g) were purchased from Charles-River (Saint-Constant, QC, Canada) and were fed ad libidum with normal chow in vented cages in the immunodeficient specific area or in the normal area of the animal welfare at CRCHUM St-Luc. All procedures were performed in accordance with Canadian Council on Animal Care and approved by the "Comité institutionnel de protection animale du CHUM".

### Induction of liver fibrosis with TAA:

Liver fibrosis was induced in C57/bl6 mice by IP injection [200µg/g of body weight (bw)] of a sterile filtered 2% TAA solution in saline thrice a week for 12 weeks. Nude mice fibrogenesis was carried out by adding 0.02% TAA to a filtered sterile drinking springwater (low in iron) for 16 weeks after 2 weeks of half-dose [0.01%] pre-treatment. C57/bl6 non-fibrotic mice received saline injection while non-fibrotic nude mice received normal H<sub>2</sub>O.

### Intrasplenic cell injection

Dt-Hepa1-6 cells were trypsinized and resuspended in saline containing 0.25% human albumin at the selected concentration depending on experimental design. 200µl of cell solution was loaded in 21G syringes for intrasplenic injection. Under inhalational anaesthesia, animals were shaved and disinfected on their left flank. An incision was made and the spleen was taken out in warm saline soaked gauze and retained with humid cotton tip. The cell suspension was mixed before injection to avoid cell clogging in the syringe. The needle was inserted in the spleen and cells were slowly injected. When the spleen regained its bright red color, needle was slowly taken out and a droplet of Vetbound veterinary glue (3M, London, Ontario, Canada) was placed at the insertion site. Spleen was returned to the animal and the incision closed.

### Experimental design

C57/bl6 mice from 4 different treatment schedules (Table 1) were injected intrasplenically with a  $1 \times 10^6$  suspension of dt-Hepa1-6 cells. Nude mice were split into 4 different groups (Table 2). In the third treatment group (Table 3), C57/bl6 animals were treated with [3mg/Kg of bw] CP (0.3mg/mL solution in PBS1x) 5 days after IS injection for 6 times with 2 days between each injection. Half of the animals received PBS instead of CP. For each experimental group, mice were sacrificed 21 days after surgery. Mice and their livers were weighed, photographs were taken, tumors of more than 0.5mm were counted. A defined portion of the left liver lobe was removed and fixed in 5% formalin for histology. The remainder of the liver was frozen for further analysis. The efficacy of CP treatment was measured with the following formula:  $(1 - (\text{CP treated tumor load or liver weight} / \text{PBS treated tumor load or liver weight}))$  in percent.

### Histology:

Formalin-fixed liver samples obtained at the time of sacrifice were set in paraffin blocks, sliced and stained with HPS by the Pathology Department of our institution. Representative microphotographs were taken with a Carl-Zeiss Axioplan 2 microscope (Göttingen, Germany) at 100x magnification using the Northern Eclipse 6.0 software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada).

## qPCR gene expression analysis

### Sample preparation

Whole frozen liver was crushed into powder using mortar and pestle over carbonated ice and liquid nitrogen. Three different samples of liver powder were taken from each liver for a total of 80-90mg per sample. Using a potter, samples were homogenized in 1mL TRIZOL reagent at 4°C. Cells from *in vitro* experiments were scraped in 1 mL TRIZOL reagent at 4°C and sonicated.

### RNA extraction and reverse transcription

Samples were treated according to manufacturer's recommendations. Briefly, 200µL of chloroform was added to the TRIZOL solution and mixed thoroughly. Samples were centrifuged at 14 000g for 15 min and 200µL of supernatant was mixed with 500µL of isopropanol. Tubes were centrifuged at 14 000g for 10 min and the resulting pellet was washed with 75% ethanol and resuspended in RNase-DNase free water. Readings at 260/280nm were obtained using the Synergy HT spectrofluorometer (Biotek, Winooski, VT) to measure concentration and quality of extraction. After gDNA removal, Quantitect reverse transcription was performed on 250ng of total RNA.

### Gene amplification

Gene expression was analysed with the Quantitect SybrGreen kit using a RotorGene Real-time PCR. For each gene tested, 35 cycles with a 59°C melting temperature were performed. The following primers were used for mouse : *AFP*

(*Afp*)                      (F:5'-GCTGGCCCTGGATGTGGCTC-3';                      R:5'-

GAGCTGGCAGCACGTGGAGG-3'), Survivin (*Birc5*) (F:5'-CGAATGGCGGAGGCTGGCTT-3'; R:5'-CGCAGCCAGGGGAGTGCTTT-3'), Cyclin B1 (*Ccnb1*) (5'-AGGGTGTCTTCTCGAATCGGGG-3'; R:5'-ACTGTCACAGGCACACGCTTGG-3'), *ILK* (*Ilk*) (F:5'-TGCGCTTGTGGCTGGACAACA-3'; R:5'-TTTCGGGGCCTTGTGCGAGT-3'), *FAK* (*Ptk2*) (F:5'-AAGCTGGCAGGGAGGTGAACAGT-3'; R:5'-TTCCATTGCACCAGGGGACCGT-3'), p53 (*Trp53*) (F:5'-ACAGCAGGGCTCACTCCAGCTA-3'; R:5'-ACGGGATGCAGAGGCAGTCAGT-3'), integrin- $\alpha$ 1 (*Itga1*) (F:5'-AATGGGCCCGTGCTCGATGA-3'; R:5'-TGTCGGGTGTTGTACGCACT-3') and integrin- $\beta$ 1 (*Itgb1*) (F:5'-TGCAGGTCGATCCTGTGACCCA-3'; R:5'-CCAGCAACCACGCCTGCTACAA-3'). The following genes were used as internal controls: *HPRT1* (F:5'-GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG-3'; R:5'-CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT-3'), *Ppia* (F:5'-CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG-3'; R:5'-TGTAAGTCACCACCCTGGCACAT) and *H2afz* (F:5'-ACAGCGCAGCCATCCTGGAGTA-3'; R:5'-TTCCCGATCAGCGATTTGTGGA-3') (32). Relative gene expression was assessed using the deltadelta CT method (33). Normal liver homogenates of C57/bl6 or nude mice were used as baseline comparison control for *AFP* mRNA expression.

#### Statistical analysis:

The data presented are representative of at least four replicates per animal. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Differences among groups were analyzed

by using one- and two-way ANOVA for repeated measures or by the Student's *t*-test. A *P* value below 0.05 was considered significant.

## 5.4 Results

The effect of COL1 on the resistance of hepatoma to cell death was first evaluated in the dt-Hepa1-6 murine cell line. In Figure 1A, the apoptotic index of murine dt-Hepa1-6 hepatoma cells treated with the chemotherapeutic agent CP was significantly reduced upon exposure to COL1 (plastic:  $31.45 \pm 1.37\%$  vs. COL1:  $13.75 \pm 0.44\%$ ;  $P < 0.001$ ). To evaluate if the mechanism underlying the protective effect of COL1 was similar to what has been observed in normal hepatocytes, experiments were performed in the presence of U0126, a known chemical inhibitor of MEK, the upstream activator of ERK1 and 2. The protection afforded by COL1 when dt-Hepa1-6 cells were treated with CP was abrogated by U0126 (Apoptotic index (Figure 1A): COL1:  $28.62 \pm 1.34\%$ ).

To determine if the protective effect of COL1 was exclusive to the murine dt-Hepa1-6 cell line, we evaluated 3 different human HCC cell lines. In every case, exposure to COL1 significantly lowered the apoptotic index: Huh7 (Plastic:  $22.90 \pm 4.72\%$  vs COL1:  $7.4 \pm 1.14\%$ ;  $P < 0.05$ ), HepG2 (Plastic:  $15.00 \pm 1.52\%$  vs COL1:  $6.40 \pm 1.10\%$ ;  $P < 0.05$ ) and Hep3B (Plastic:  $20.10 \pm 1.67\%$  vs COL1:  $9.40 \pm 0.51\%$ ;  $P < 0.01$ ) (Figure 1B). Moreover, the protective effect (Figure 1B) was abolished in every cell line tested when U0126 ERK1/2 inhibitor was added (Huh7:  $17.7 \pm 0.95\%$ , HepG2:  $16.2 \pm 0.63\%$  and Hep3B:  $21.4 \pm 1.99\%$ ).

Next, we tested the effect of COL1 in the presence of TNF- $\alpha$  and the sensitizing agent ActD (28). Again, the hepatoprotective effect of COL1 was seen in dt-



Hepa1-6 (Plastic:  $27.85 \pm 3.80\%$  vs COL1:  $5.36 \pm 0.13\%$ ;  $P < 0.01$ ) as shown in Figure 1C. This observation was confirmed when the MTT assay was used as a measure of cell viability (Figure 1D) (Plastic:  $58.52 \pm 1.00\%$  vs COL1:  $66.92 \pm 0.27\%$ ;  $P < 0.001$ ).

Next, we evaluated if the effect of COL1 on dt-Hepa1-6 cells treated with CP was also observed when a cell viability assay and caspase-3 activity were measured. Dt-Hepa1-6 cells treated with CP and grown on COL1 had a higher cell viability (Figure 1D) (Plastic:  $22.66 \pm 0.53\%$  vs COL1:  $25.38 \pm 0.33\%$ ;  $P < 0.001$ ) but lower caspase-3 activity (Figure 1E) (Plastic:  $107.09 \pm 5.56$  U vs COL1:  $66.69 \pm 4.66$  U;  $P < 0.001$ ).

We then evaluated the levels of ERK1/2 phosphorylation in COL1-exposed HCC cells using phospho-specific antibodies. Figure 2 shows that the phosphorylation level of ERK1 and ERK2 was higher and occurred more rapidly in COL1-treated cells than untreated controls (ERK1: COL1  $13.3 \pm 0.6$  Area under the curve (AUC) vs plastic  $3.5 \pm 1.8$  AUC;  $P < 0.01$  and ERK2: COL1  $34.2 \pm 5.6$  vs plastic  $12.6 \pm 1.2$  AUC;  $P < 0.05$ ).

The impact of COL1 on the expression of different genes was then assessed. As shown in Figure 3, COL1 induced an increase in cancer survival associated genes such as survivin (*Birc5*) (Figure 3A) ( $3.7 \pm 0.4$  fold changes;  $P < 0.001$ ), cyclin B1 (*Ccnb1*) (Figure 3B) ( $5.9 \pm 2.0$  fold changes;  $P < 0.05$ ) and ILK (*Ilk*) (Figure 3C) ( $9.2 \pm 2.2$  fold changes;  $P < 0.05$ ). This effect was prevented by the

ERK1/2 inhibitor U0126 in all cases. There was no change in the expression levels of the other survival associated genes, FAK (*Ptk2*) (Figure 3D) and p53 (*p53*) (Figure 3E). Two adhesion molecules important in COL1 signalling, integrin- $\alpha$ 1 (*Itga1*) (Figure 3F) and integrin- $\beta$ 1 (*Itgb1*) (Figure 3G) did not show differences in their expression levels as well.

In order to evaluate *in vitro* whether TAA can interfere with dt-Hepa1-6, we compared the viability of dt-Hepa1-6 grown on plastic or COL1 to that of primary hepatocytes both types of cells being exposed to increasing concentrations of TAA. Figure 4A shows that TAA had a dose-dependent cytotoxic effect on dt-Hepa1-6, as viability slopes were negative. This effect was less important than the one observed on hepatocytes and was at least partially counteracted by the exposure to COL1. This result shows that TAA is toxic to both hepatocytes and dt-Hepa1-6 cells and that COL1 protects both cell types against this toxicity.

To evaluate the impact of COL1 on cellular proliferation, two different and independent assays were performed. No difference in the proliferation of dt-Hepa1-6 was seen between COL1-treated and untreated dishes by the  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay (Figure 4B) nor by cell doubling time (Figure 4C). Next, cell adhesion was evaluated in the presence and absence of COL1 (Figure 4D) and, as expected, was significantly enhanced in the presence of COL1 4h after seeding (Plastic:  $0.154 \pm 0.004$  OD vs COL1  $0.191 \pm 0.005$  OD;  $P < 0.001$ ) and 6h (Plastic:  $0.179 \pm 0.004$  OD vs COL1  $0.193 \pm 0.005$  OD;  $P < 0.05$ ).

To mimic the normal developmental course of cancer, a soft-agar colony assay was conducted on dt-Hepa1-6 cells. In Figure 4E, Isolated cells grown for 4 weeks in a soft-agar gel containing COL1 [654µg/mL] formed significantly more colonies than those grown on regular soft agar ( $27.7 \pm 4.9$  vs.  $6.7 \pm 2.2$  colonies;  $P < 0.05$ ).

In light of these findings, we then investigated the impact of fibrosis on hepatoma development using the dt-Hepa1-6 cells and its congenic mice, the C57/bl6 strain. Fibrotic and non fibrotic mice were inoculated with a  $1 \times 10^6$  cell suspension of dt-Hepa1-6 into the spleen as described in Table 1. At the time of sacrifice, fibrotic mice showed increased tumor load (Figure 5A) as well as *AFP* expression levels (Figure 5B) compared to non fibrotic mice ( $604 \pm 242$  vs  $22 \pm 9$  lesions;  $P < 0.05$ ; *AFP*:  $121.3 \pm 30.7$  vs  $14.9 \pm 6.9$  fold changes;  $P < 0.001$ ). This effect was reduced when animals were left untreated for 2 weeks to recover from fibrosis before inoculation ( $335 \pm 101$  lesions and *AFP*:  $42.5 \pm 14.9$  fold changes;  $P < 0.05$ ). Representative photographs of livers from non-fibrotic animals (Figure 5C), fibrotic animals (Figure 5D) and mice with 2 weeks of recovery (Figure 5E) were in accordance with these results.

In order to evaluate the influence of the absence of T-cell immunity in cancer cell development, the inoculation of dt-Hepa1-6 was performed in nude mice submitted or not to a fibrogenesis protocol. Twenty-one days after inoculation with  $5 \times 10^5$  cells, fibrotic nude mice, showed higher *AFP* levels (Figure 6A) than non-fibrotic ones ( $261.8 \pm 67.6$  vs  $41.2 \pm 14.8$  fold changes;  $P < 0.001$ ), reflecting

accurately in photographs from non-fibrotic (Figure 6B) and fibrotic (Figure 6C) livers. Finally, to distinguish the fibrotic micro-environment from systemic changes in the animals as the source of this effect, fibrotic and non-fibrotic nude mice were injected subcutaneously in the left flank with a  $1 \times 10^6$  cell suspension of dt-Hepa1-6. There were no differences in liver AFP mRNA expression between the two groups of animals injected subcutaneously (non-fibrotic:  $6.1 \pm 2.7$  vs fibrotic:  $8.9 \pm 0.6$  fold changes) (Figure 6A).

We then evaluated if liver fibrosis rendered HCC more resistant to chemotherapy *in vivo*. To investigate this, we treated different groups of C57/bl6 mice with CP after dt-Hepa1-6 inoculation (Table 3). Using the following formula:  $(1 - (\text{CP treated tumor load or liver weight} / \text{PBS treated tumor load or liver weight}))$  as a percentage of tumor load (Figure 7A) or liver weight data (Figure 7C), the efficacy of CP was evaluated (Figure 7B and D) According to tumor data, the efficacy of CP was significantly lower in fibrotic (12w) mice than in non-fibrotic mice ( $44.5 \pm 4.9$  vs  $78.7 \pm 6.9\%$ ;  $P < 0.01$ ). This effect was abolished with a 2 week fibrosis recovery period ( $82.1 \pm 7.9\%$ ;  $P < 0.01$ ) (Figure 7B). Alternatively, we used liver weight as a surrogate for tumor load: the more tumors will develop in animals, the heavier the liver will be (Figure 7D). Non-fibrotic animals exposed to CP had  $64.8 \pm 7.4\%$  reduction in liver weight demonstrating the efficacy of CP in reducing tumor load; in comparison, animals that underwent a 12-week fibrosis protocol followed by tumoral IS implantation were less sensitive to the effect of CP since the reduction in liver weight was  $43.1 \pm 5.3\%$  ( $P < 0.05$  in comparison to non-fibrotic animals). In

animals that had a 2w recuperation period, there was no difference in the importance of the reduction in liver weight ( $60.1 \pm 1.9\%$ ). Finally, Figure 7E shows that intra-tumoral cell death was present in HCC foci from CP- treated non-fibrotic mice while little evidence of cellular damage could be found microscopically in tumoral areas of CP-treated fibrotic mice.

## 5.5 Discussion

The protective effect of liver fibrosis and its major component COL1, as reported in primary murine hepatocytes, was confirmed in the murine dt-Hepa1-6 hepatoma cell line when exposed to the chemotherapeutic agent CP (25). As seen in primary hepatocytes, the hepatoprotection driven by COL1 was abolished by inhibiting the MAPK pathway. This observation was reproduced in all cell lines tested. HCC are known to be heterogeneous, but the widespread protective effect in human and murine HCC cell lines and its links with ERK1/2 signalling support that the underlying pathway is common to both human and murine HCC (34).

Fibrosis, specifically through COL1, protects HCC against other forms of toxicity. Hepatoprotection was indeed also observed with TNF- $\alpha$ . CP is known to induce apoptosis by provoking DNA damage, mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress (35). On the other hand, TNF- $\alpha$  binds to its receptors, the TNF receptor 1, leading to subsequent activation of caspase 8 (28, 36). In both cases, the end result is the induction of downstream effector caspases (35, 36).

The ERK1/2 pathway has been shown to be involved in the signal transduction of COL1 in primary hepatocytes (25). This was confirmed in the dt-Hepa1-6 hepatoma cell line, suggesting that fibrosis hepatoprotection in HCC induced by COL1 is driven through MAPK signalling.

Survivin (*Birc5*) gene expression was upregulated when cells were grown on COL1 and this effect was prevented by blockage of MAPK pathway. The inhibitory effect of survivin on caspase-3 remains controversial, but recent studies confirmed that survivin inhibits caspase-3 activity if expressed prior to its activation (37-40). Survivin is known to be overexpressed in many different cancers and has been a therapeutic target over the past years (41-43). Here, we suggest that COL1 increases survivin gene expression in hepatoma cells thus affording a higher survival advantage against apoptosis. Survivin is clinically associated with HCC and cirrhosis and is highly expressed in aggressive tumors (20). When Zhao and al. (2011) used non-apoptotic doses of an inhibitor of the Bcl-2 family in HCC cell lines, increases in ERK signalling and survivin expression were detected, but co-inhibition of the ERK pathway and Bcl-2 inhibited survivin expression suggesting the implication of ERK in survivin regulation (44). In addition, Cao and al. (2011) showed that inhibition of ERK or PI3K/AKT pathways in cardiomyocytes subjected to a pro-apoptotic stimuli decreases the expression of survivin and enhances caspase 3 cleavage and apoptosis (45). Taken together these studies support the involvement of COL1 in inducing survivin upregulation via the MAPK pathway.

P53 is a transcriptional repressor of survivin in different human cancer cell lines (46). Raj and al. showed that p53 represses the expression of survivin in human normal melanocytes by binding to E2F on the survivin promoter site (47). In the present study, p53 expression levels did not change in the presence

of COL1, suggesting that survivin (*Birc5*) mRNA upregulation is not mediated by p53 expression modulation.

Cyclin B1 plays an important role in the G2/M transition during the cell cycle in normal cells (48). Its overexpression is associated with numerous human tumors including HCC (21, 49). It has also been reported as an indicator of tumor malignancy (50, 51). Its overexpression in oesophageal squamous cell carcinoma has been linked to invasiveness and metastatic potentials (52). An increase in its gene expression driven by the presence of COL1 *in vivo* could be an indicator of increased tumorigenic potential in the presence of liver fibrosis.

ILK, The kinase associated with the integrin- $\beta$ 1 subunit mediates intracellular signalling triggered by interactions with the ECM component (53). Recently, ILK overexpression has been associated with enhanced tumorigenicity in human HCC samples (22). In a separate study, its expression was also linked to apoptosis resistance in HCC cell lines (54). Here we report that *ILK* (*Ilk*) overexpression was associated with the presence of COL1 suggesting that cells exposed to COL1 have an increased ability to interact with the ECM. No variations in gene expression, on the other hand, were observed for integrin- $\alpha$ 1 (*Itga1*) or integrin- $\beta$ 1 (*Itgb1*). Their presence however confirmed that dt-Hepa1-6 had the integrins necessary to transmit cell signals elicited by COL1.

Even if cell proliferation was not affected by COL1 *in vitro*, conditions are likely to be significantly different in the *in vivo* tumor micro-environment. Other



aspects of the liver microenvironment have been shown to modify hepatoma cell behaviour *in vitro*, such as the activation of hepatic stellate cells that enhance proliferation and matrix support stiffness that increase chemoresistance and proliferation (18, 19). Activated HSC have also been shown to induce angiogenesis and could therefore influence HCC development (55). COL1 overabundance in liver fibrosis could still be an inducer of overall survival without affecting the proliferation rate of HCC.

In the soft-agar colony formation model that mimics the 3 dimensional development of cancer, we have clearly shown that the presence of COL1 provides an advantage to cells allowing them to form more visible colonies. It is conceivable that the addition of COL1 may have altered the assay by giving cells a matrix for attachment. However, when normal Hepa1-6 cells were seeded in soft-agar containing COL1, they only formed  $2.7 \pm 0.9$  colonies (data not shown) and we have already shown that no differences in proliferation were found when cells were seeded in a monolayer (article 2). Taken together, these data support the role of COL1 in providing an advantage to cells beyond that of being a substrate for anchorage.

The COL1-associated improvement in cell adhesion could alter the implantation of the tumor *in vivo* by increasing the efficiency of cell attachment. However, a plastic surface does not accurately reflect the liver vascular surface. Nonetheless, COL1 deposition associated with liver fibrosis could modify this

aspect of the experiment. TAA has been shown to be cytotoxic for dt-Hepa1-6 (Figure 4A) and could thus interfere with tumor development *in vivo*.

Fibrotic C57/bl6 mice developed a higher tumor load and increased AFP levels in comparison to non-fibrotic mice. This process was partly reversed in mice that had a 2 week recovery period before dt-Hepa1-6 inoculation. Yang et al. (2010) have hypothesized that liver fibrosis increases tumorigenicity by downregulating tumor-infiltrating CD4+ and CD8+ populations (56). In the present study, the difference observed between fibrotic and non fibrotic animals was reproduced in both C57/bl6 and T-cell impaired nude mice. The effect of fibrosis on the development of tumors in the nude mice was substantial. During the characterisation of this model, it was shown that fibrosis in nude mice regresses more slowly in comparison with the protocol used with the C57/bl6 mice. This could explain the drastic increase in *AFP* expression observed in fibrotic nude mice. No effect was seen in nude mice that were subjected to a subcutaneous implantation suggesting that liver fibrosis exerts its effect by the presence of its associated factors such as COL1 in the tumor micro-environment.

More interestingly, fibrosis gave implanted cells a survival advantage when they were treated with CP. This result confirms all previous experiments *in vitro* and is in accord with the hepatoprotective effect observed in normal hepatocytes *in vivo* (25). This effect was abolished by fibrosis regression, confirming that the pro-carcinogenic effect was indeed exerted by ECM.

In conclusion, we have shown that liver fibrosis increases HCC tumorigenicity *in vivo* and survival *in vitro*. This effect could be explained by the sensitivity of HCC cells to COL1 triggering rapid and high phosphorylation of ERK1/2, leading to increased survivin (*Birc5*), cyclin B1 (*Ccnb1*) and ILK (*Ilk*) mRNA levels. These results confirm the importance of the liver fibrotic micro-environment in cancer progression and chemoresistance.

## 5.6 References

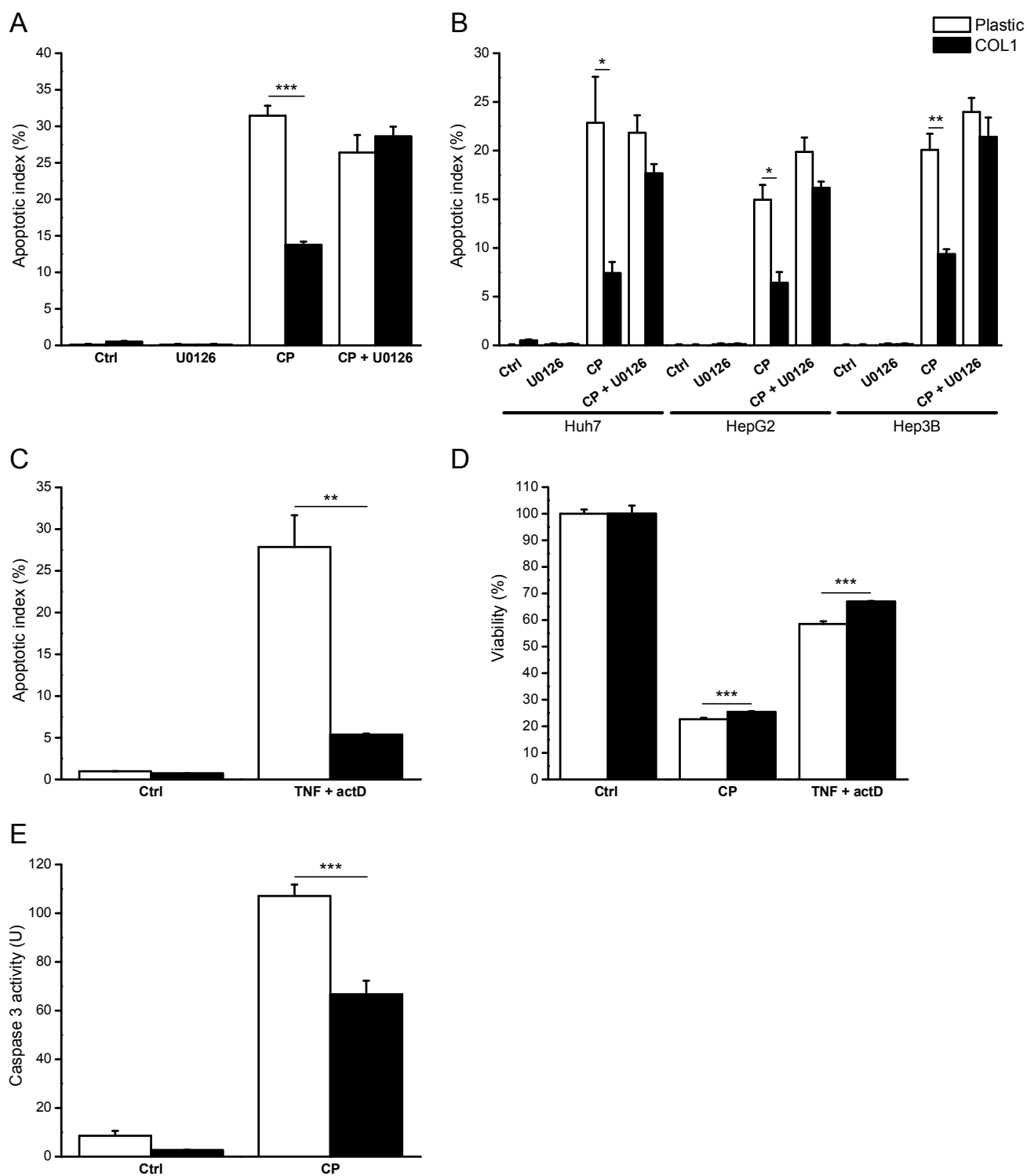
1. Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010;16:3603-3615.
2. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010;29:4989-5005.
3. Velazquez RF, Rodriguez M, Navascues CA, Linares A, Perez R, Sotorrios NG, Martinez I, et al. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 2003;37:520-527.
4. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
5. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003;38:257-265.
6. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2010.
7. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:195-206.
8. Ramachandran P, Iredale JP. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM* 2012;105:813-817.
9. Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008;12:759-768, viii.
10. Ambrosone CB, Harris CC. The development of molecular epidemiology to elucidate cancer risk and prognosis: a historical perspective. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010;1:84-91.
11. Loeb LA, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res* 2008;68:6863-6872.
12. Pogribny IP, Muskhelishvili L, Tryndyak VP, Beland FA. The role of epigenetic events in genotoxic hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene. *Mutat Res* 2011;722:106-113.
13. Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2012;56:769-775.
14. Salguero Palacios R, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Gressner OA, et al. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2008;88:1192-1203.
15. Saiman Y, Friedman SL. The role of chemokines in acute liver injury. *Front Physiol* 2012;3:213.
16. Wu K, Ding J, Chen C, Sun W, Ning BF, Wen W, Huang L, et al. Hepatic TGF-beta gives rise to tumor-initiating cells and promotes liver cancer development. *Hepatology* 2012.
17. Marra M, Sordelli IM, Lombardi A, Lamberti M, Tarantino L, Giudice A, Stiuso P, et al. Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *J Transl Med* 2011;9:171.

18. Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, Benten D, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2011;53:1192-1205.
19. Amann T, Bataille F, Spruss T, Muhlbauer M, Gabele E, Scholmerich J, Kiefer P, et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100:646-653.
20. Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, Pellegrini C, Donadon M, Torzilli G, Santambrogio R, et al. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;54:2040-2044.
21. Weng L, Du J, Zhou Q, Cheng B, Li J, Zhang D, Ling C. Identification of cyclin B1 and Sec62 as biomarkers for recurrence in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma after surgical resection. *Mol Cancer* 2012;11:39.
22. Chan J, Ko FC, Yeung YS, Ng IO, Yam JW. Integrin-linked kinase overexpression and its oncogenic role in promoting tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011;6:e16984.
23. Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* 2007;230:105-116.
24. Wu SD, Ma YS, Fang Y, Liu LL, Fu D, Shen XZ. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treat Rev* 2012;38:218-225.
25. Bourbonnais E, Raymond VA, Ethier C, Nguyen BN, El-Leil MS, Meloche S, Bilodeau M. Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury. *Gastroenterology* 2012;142:130-139 e134.
26. Ethier C, Raymond VA, Musallam L, Houle R, Bilodeau M. Antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes associated with downregulation of proapoptotic Bid protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G298-308.
27. Sobell HM. Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5328-5331.
28. Eum HA, Billiar TR. TNF/TNF receptor 1-mediated apoptosis in hepatocytes. *Adv Exp Med Biol* 2011;691:617-624.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
30. Wenqi D, Li W, Shanshan C, Bei C, Yafei Z, Feihu B, Jie L, et al. EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1277-1285.
31. Sugden B, Mark W. Clonal transformation of adult human leukocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* 1977;23:503-508.
32. Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol* 2007;7:14.
33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.

34. Hsu CM, Hsu YA, Tsai Y, Shieh FK, Huang SH, Wan L, Tsai FJ. Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392:473-478.
35. Hong JY, Kwon SS, Kim GH, Kim JW, Sato E, Cho KH, Shim EB. Computational modeling of apoptotic signaling pathways induced by cisplatin. *BMC Syst Biol* 2012;6:122.
36. Kuhla A, Eipel C, Siebert N, Abshagen K, Menger MD, Vollmar B. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNFalpha-dependent Fas/FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure. *Apoptosis* 2008;13:1427-1438.
37. Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* 2000;96:4002-4003.
38. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;40:1117-1123.
39. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003;22:2729-2740.
40. Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* 2010;430:199-205.
41. Zhang R, Ma L, Zheng M, Ren J, Wang T, Meng Y, Zhao J, et al. Survivin knockdown by short hairpin RNA abrogates the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Cancer Gene Ther* 2010;17:275-288.
42. Wang Q, Shu R, He H, Wang L, Ma Y, Zhu H, Wang Z, et al. Co-silencing of Birc5 (survivin) and Hspa5 (Grp78) induces apoptosis in hepatoma cells more efficiently than single gene interference. *Int J Oncol* 2012;41:652-660.
43. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 2005;9:360-372.
44. Zhao X, Ogunwobi OO, Liu C. Survivin inhibition is critical for Bcl-2 inhibitor-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2011;6:e21980.
45. Cao W, Xie YH, Li XQ, Zhang XK, Chen YT, Kang R, Chen X, et al. Burn-induced apoptosis of cardiomyocytes is survivin dependent and regulated by PI3K/Akt, p38 MAPK and ERK pathways. *Basic Res Cardiol* 2011;106:1207-1220.
46. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002;277:3247-3257.
47. Raj D, Liu T, Samadashwily G, Li F, Grossman D. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis* 2008;29:194-201.
48. Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 2002;9:931-943.

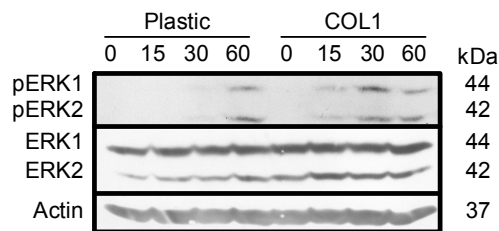
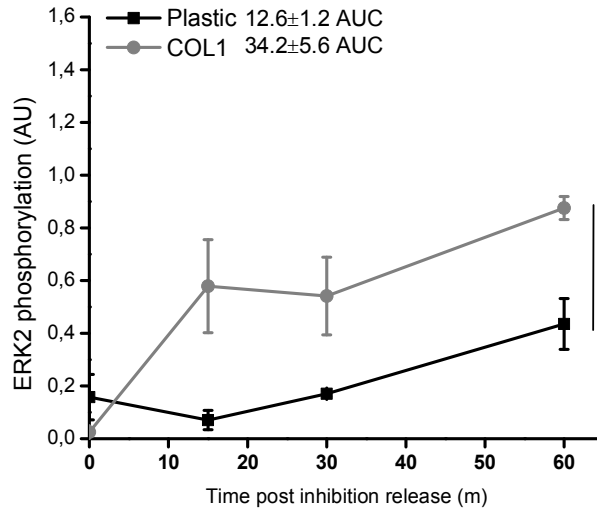
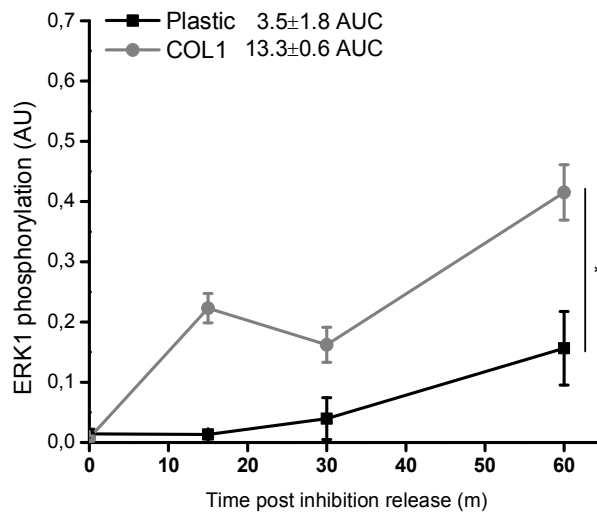
49. Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Hong WK, Mao L. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res* 2000;60:4000-4004.
50. Aaltonen K, Amini RM, Heikkila P, Aittomaki K, Tamminen A, Nevanlinna H, Blomqvist C. High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *Br J Cancer* 2009;100:1055-1060.
51. Begnami MD, Fregnani JH, Nonogaki S, Soares FA. Evaluation of cell cycle protein expression in gastric cancer: cyclin B1 expression and its prognostic implication. *Hum Pathol* 2010;41:1120-1127.
52. Song Y, Zhao C, Dong L, Fu M, Xue L, Huang Z, Tong T, et al. Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis. *Carcinogenesis* 2008;29:307-315.
53. Durbin AD, Hannigan GE, Malkin D. Oncogenic ILK, tumor suppression and all that JNK. *Cell Cycle* 2009;8:4060-4066.
54. Su JM, Wang LY, Liang YL, Zha XL. Role of cell adhesion signal molecules in hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:4667-4673.
55. Coulouarn C, Corlu A, Glaise D, Guenon I, Thorgeirsson SS, Clement B. Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2012;72:2533-2542.
56. Yang MC, Chang CP, Lei HY. Induction of liver fibrosis in a murine hepatoma model by thioacetamide is associated with enhanced tumor growth and suppressed antitumor immunity. *Lab Invest* 2010;90:1782-1793.

## 5.7 Figures and tables





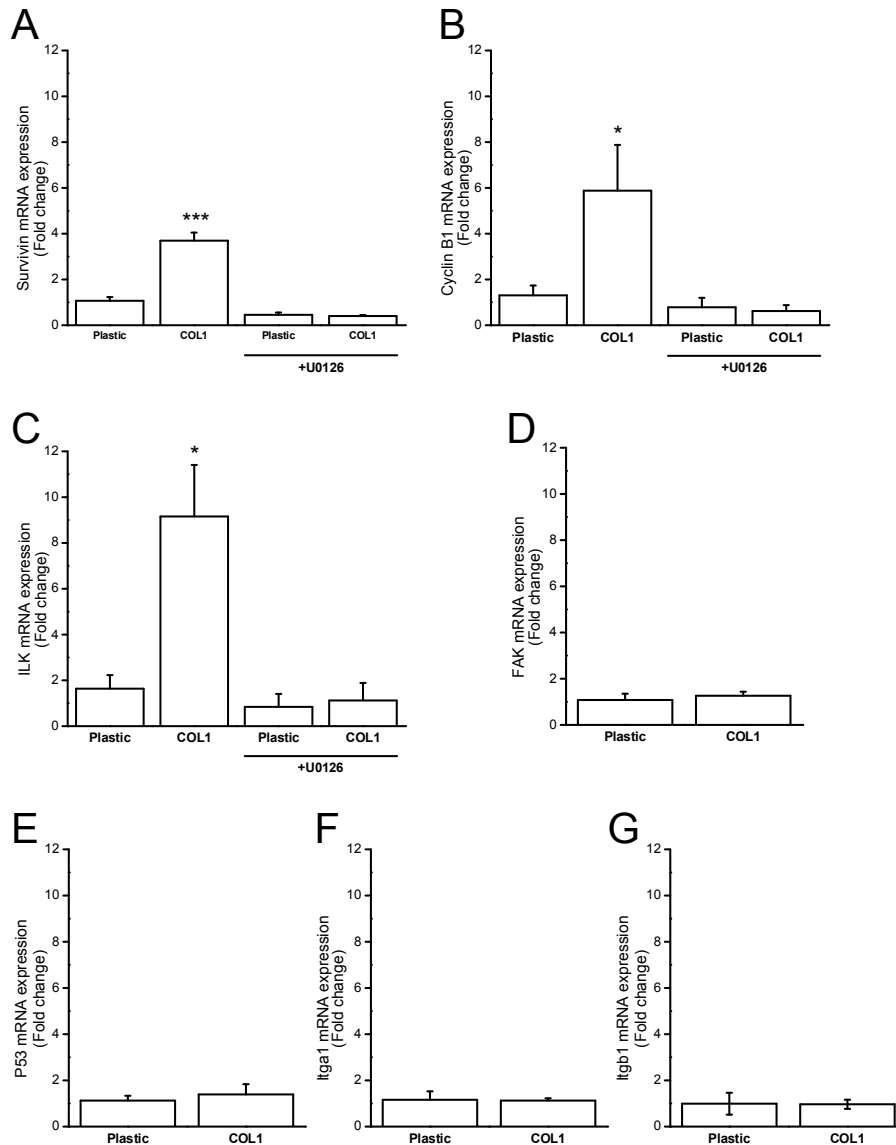
**Figure 1: COL1 protects against cell death in the hepatoma cell lines.** All experiments were done on plastic or COL1 coated plates [13.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]. After 7 hours of attachment in DMEM medium containing 10% FBS, medium was replaced with serum-free fresh medium overnight. (A) The apoptotic index of murine dt-Hepa1-6 cell line incubated 1h in media with or without the MAPK inhibitor, U0126 [25 $\mu\text{M}$ ] and then in fresh serum-free media with or without CP [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] for 24h. (B) The apoptotic index of human Huh7, HepG2 and Hep3B cell lines after addition of CP [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] with or without U0126 [25 $\mu\text{M}$ ] for 24h. (C) The apoptotic index of dt-Hepa1-6 cell line after addition of TNF- $\alpha$  [50ng/mL] + ActD [10nM] for 48h. (D) Viability of the dt-Hepa1-6 cell line after addition of CP [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] for 24h or TNF- $\alpha$  [50ng/mL] + ActD [10nM] for 48h. (E) Caspase 3 activity of dt-Hepa1-6 cell line after addition of CP [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] for 24h. Control (Ctrl) results expressed in this figure refer to cells in media only for the same period of the treatment. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )



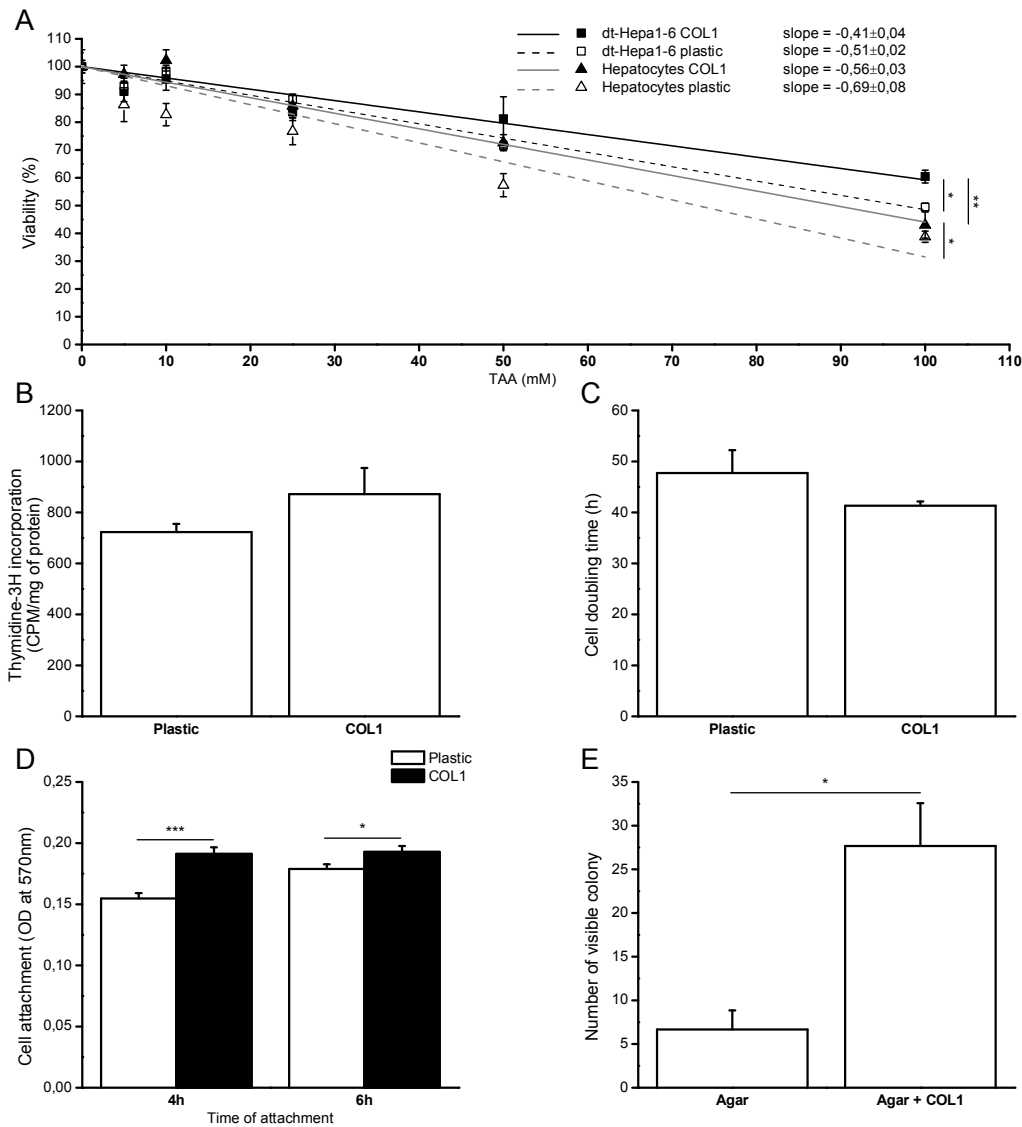
**Figure 2: ERK1/2 phosphorylation is enhanced by COL1.** Dt-Hepa1-6 were seeded on plastic or COL1 coated plastic [ $13.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] in serum containing media for 7h followed by serum-free media overnight. The inhibition of ERK1/2 phosphorylation with U0126 [ $25\mu\text{M}$ ] was carried out for 1 hour.

Media was replaced with fresh media (time zero) to allow the rephosphorylation of ERK1/2 for 1h and aliquots collected at time 0, 15, 30 and 60 min. Densitometry using ImageJ of phosphorylated and total ERK1/2 (p44-p42) was used in the analysis. B-actin was used as control. The area under the

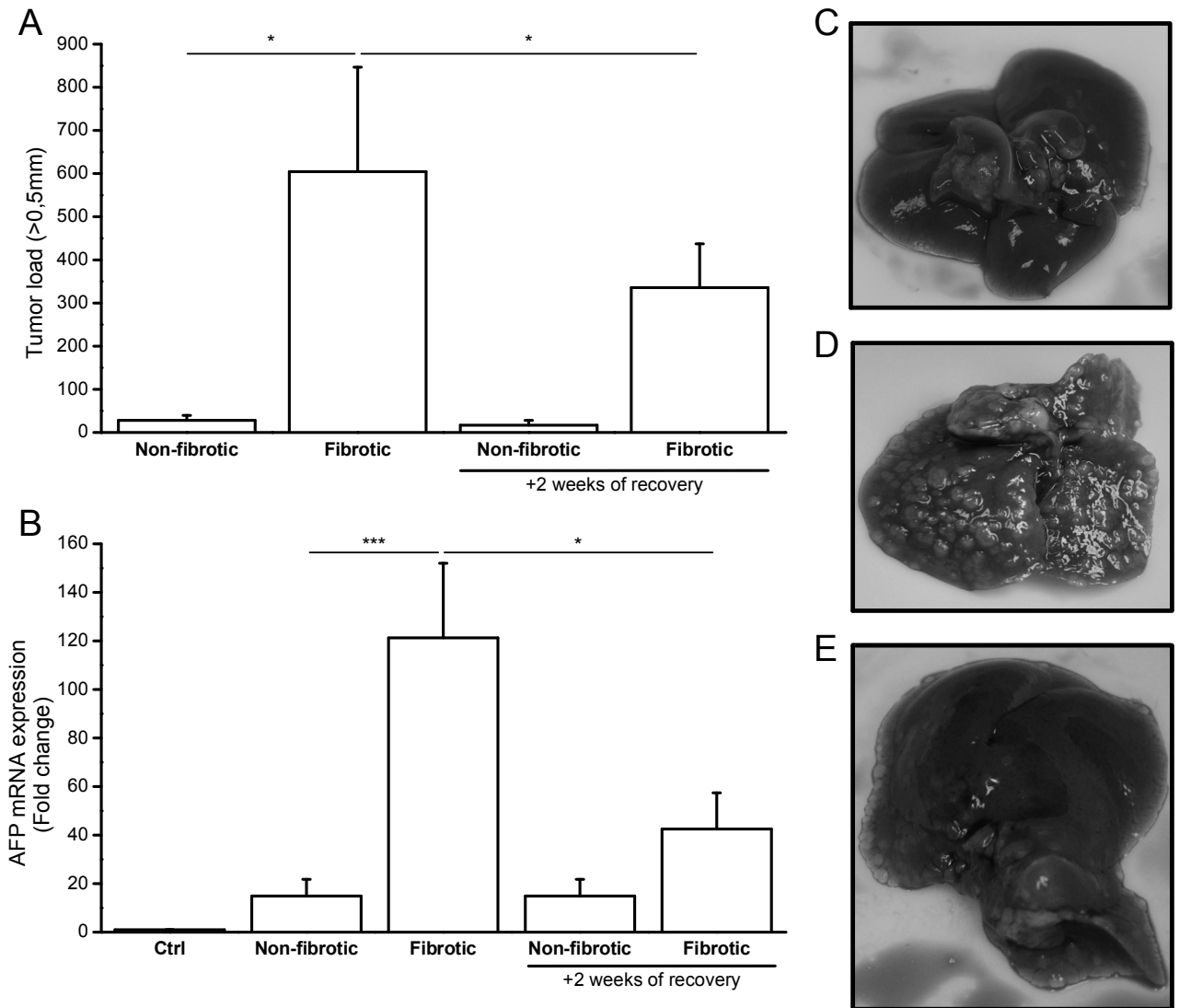
curve (AUC) of each individual experiment was performed and used for statistical analysis. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )



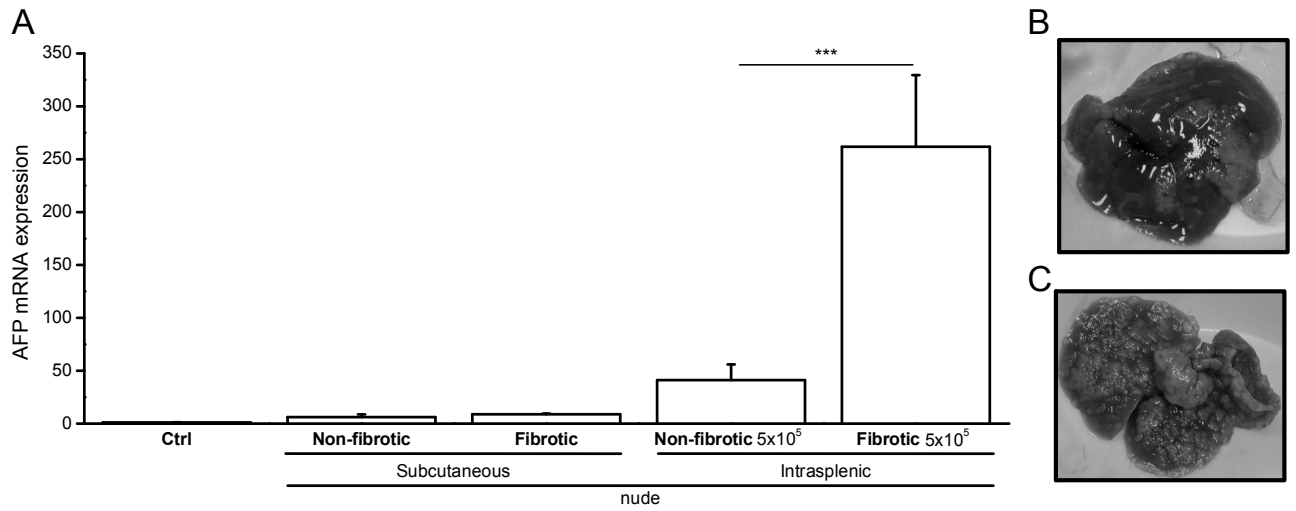
**Figure 3: COL1 increases Survivin, CyclinB1 and ILK gene expression through ERK1/2 pathway while FAK, P53, Itga1 and Itgb1 gene expression is not influenced by COL1.** (A) Gene expression levels of survivin (*Birc5*), (B) Cyclin B1 (*Ccnb1*) and (C) ILK (*Ilk*) were quantified following qRT-PCR. Cells were seeded on plastic or COL1 coated plates [13.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] for 7 hours in serum-containing media and then overnight in serum-free media. The following day the cells were incubated in the presence or absence of the MAPK inhibitor U0126 [25 $\mu\text{M}$ ] in serum-free media for 24h. (D) Gene expression levels by qPCR of FAK (*Ptk2*), (E) p53 (*Trp53*), (F) integrin- $\alpha$ 1 (*Itga1*) and (G) integrin- $\beta$ 1 (*Itgb1*). Cells were seeded on plastic alone or COL1 coated plastic [13.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] for 7 hours media with serum. Media was replaced overnight with serum-free DMEM and then replaced again with fresh serum-free media and cells were incubated for 24h. (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )



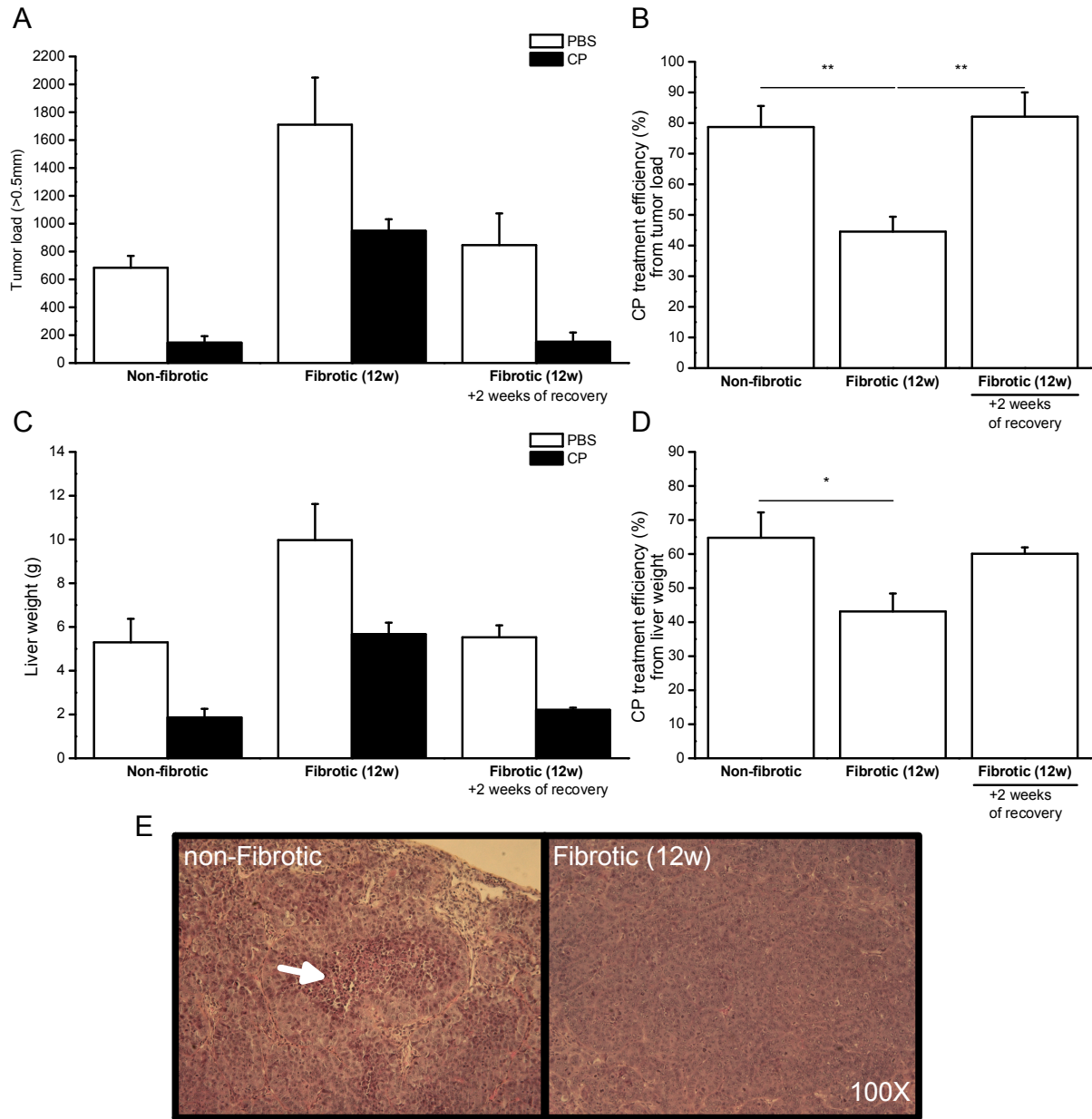
**Figure 4: Dt-Hepa1-6 are sensitive to TAA toxicity, COL1 is not influencing proliferation but increases attachment and 3 dimensional development.** Unless stated, all cells were seeded on plastic alone or COL1 coated plastic [13.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] for 7 hours in serum containing media, which was then replaced with serum-free media overnight. (A) The viability of dt-Hepa1-6 cells and primary hepatocytes when determined in the presence of increasing TAA doses [5-100mM] for 24h. (B)  $^3\text{H}$ - Thymidine incorporation for 24h of dt-Hepa1-6 in DMEM without serum. (C) The cell doubling time of dt-Hepa1-6 serum containing media during a 72h window analysis. (D) For the analysis of dt-Hepa1-6 attachment, cells were directly seeded in serum free media and analysed after 4h and 6h of seeding. (E) 10K isolated cells were seeded in a soft-agar gel with or without COL1 [653 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. Cells were kept in culture with weekly supplementation of media for a total of 4 weeks and then visible colonies were counted. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )



**Figure 5: Liver fibrosis enhances HCC progression in immunocompetent C57/bl6 mice.** C57/bl6 immunocompetent mice were inoculated according to different experimental designs described in Table 1 with the dt-Hepa1-6 cell line. (A) Tumor load (>0.5mm), (B) *AFP* mRNA expression of the 6 groups detailed in Table 1 and (C) representative pictures of the non-fibrotic, (D) fibrotic and (E) fibrotic livers followed by a 2 week recovery period. Ctrl represents relative control values for AFP levels consistent with normal C57/bl6 liver samples. (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )



**Figure 6: Liver fibrosis enhances HCC progression in immunodeficient nude mice.** Immunodeficient nude mice were inoculated with dt-Hepa1-6 following the 5 experimental designs described in Table 2. (A) *AFP* mRNA expression of the 5 experimental groups detailed in Table 2 and representative photographs of liver slices from (B) nude non-fibrotic 5x10<sup>5</sup> and (C) fibrotic 5x10<sup>5</sup> groups. Ctrl refers to control AFP levels obtained from normal nude mice liver samples. (\*\*\*)  $P < 0.001$



**Figure 7: Liver fibrosis decreases efficacy of cisplatin treatment in C57/bl6 inoculated with HCC.** C57/bl6 mice were inoculated with dt-Hepa1-6 following the 8 experimental designs enumerated in Table 3. Treatment efficiency was calculated following this formula:  $(1 - (\text{CP treated tumor load or liver weight} / \text{PBS treated tumor load or liver weight}))$  and reported as a percentage representing the percentage of tumors eliminated by CP treatment per treatment condition. (A) Visible tumor (>0.5mm) were counted manually at time of sacrifice and used to calculate (B) CP treatment efficiency from tumor load. (C) Whole liver were weight at time of sacrifice and used to calculate (D) CP treatment efficiency from liver weight. (E) Representative microphotographs of HCC tumors from non-fibrotic and fibrotic



mice treated with CP, where white arrow represent intra-tumoral cell death  
(100X magnification).

**Table 1: Experimental design of HCC inoculation using C57/bl6 mice.**

<u>Group name</u>	<u>Treatment</u>	<u>Inoculation</u>	<u>Treatment (post-inoculation)</u>
<b>Non-fibrotic</b>	12 weeks saline	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	21 days non-treated
<b>Fibrotic</b>	12 weeks TAA	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	21 days non-treated
<b>Non-fibrotic+2 weeks of recovery</b>	12 weeks saline +2 weeks non-treated	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	21 days non-treated
<b>Fibrotic+2 weeks of recovery</b>	12 weeks TAA + 2 weeks non-treated	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	21 days non-treated

**Table 2: Experimental design of HCC inoculation using FoxN1 nu/nu nude mice.**

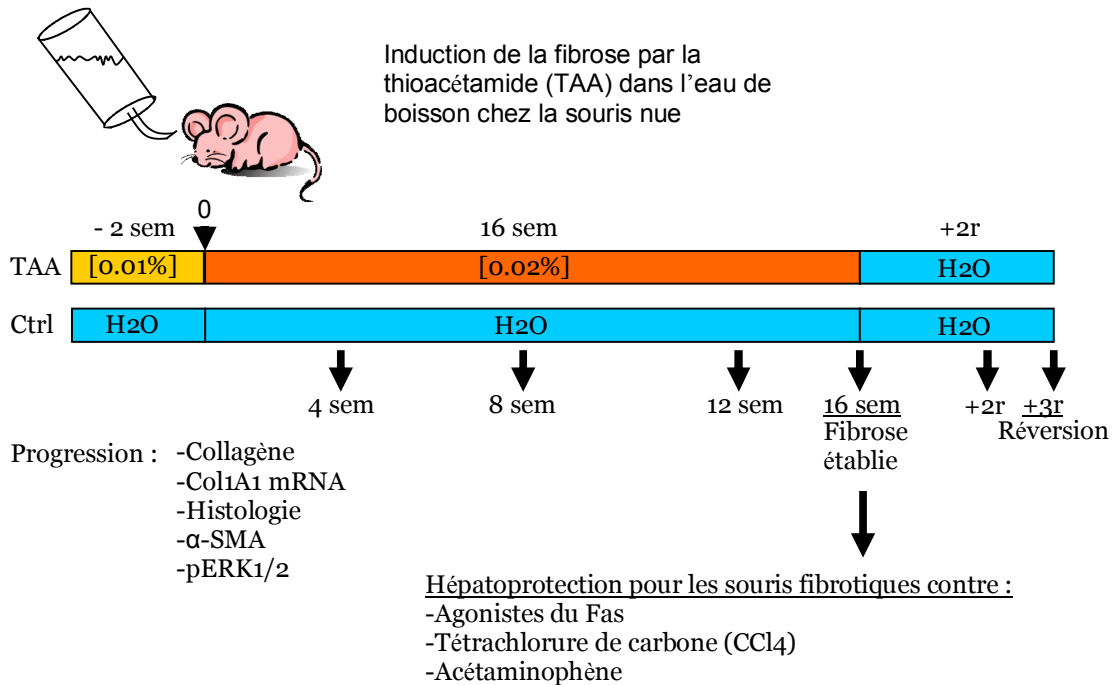
<u>Group name</u>	<u>Treatment</u>	<u>Inoculation</u>	<u>Treatment (post-inoculation)</u>
<b>Nude non-fibrotic</b>	16 weeks H <sub>2</sub> O	1x10 <sup>6</sup> cells subcutaneous	21 days non-treated
<b>Nude fibrotic</b>	16 weeks TAA	1x10 <sup>6</sup> cells subcutaneous	21 days non-treated
<b>Nude non-fibrotic 5x10<sup>5</sup></b>	16 weeks H <sub>2</sub> O	5x10 <sup>5</sup> cells intrasplenic	21 days non-treated
<b>Nude fibrotic 5x10<sup>5</sup></b>	16 weeks TAA	5x10 <sup>5</sup> cells intrasplenic	21 days non-treated

**Table 3: Experimental design of HCC inoculation followed by cisplatin treatment in C57/bl6 mice.**

<u>Group name</u>	<u>Treatment</u>	<u>Inoculation</u>	<u>Treatment (post-inoculation)</u>
<b>Non-fibrotic PBS</b>	12 weeks saline	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	PBS (vehicule)
<b>Non-fibrotic CP</b>	12 weeks saline	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	Cisplatinum 3mg/Kg of bw
<b>Fibrotic (12w) PBS</b>	12 weeks TAA	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	PBS (vehicule)
<b>Fibrotic (12w) CP</b>	12 weeks TAA	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	Cisplatinum 3mg/Kg of bw
<b>Fibrotic+2 weeks of recovery PBS</b>	12 weeks TAA +2 weeks non-treated	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	PBS (vehicule)
<b>Fibrotic+2 weeks of recovery CP</b>	12 weeks TAA + 2 weeks non-treated	1x10 <sup>6</sup> cells intrasplenic	Cisplatinum 3mg/Kg of bw

## Chapitre 6 - Discussion

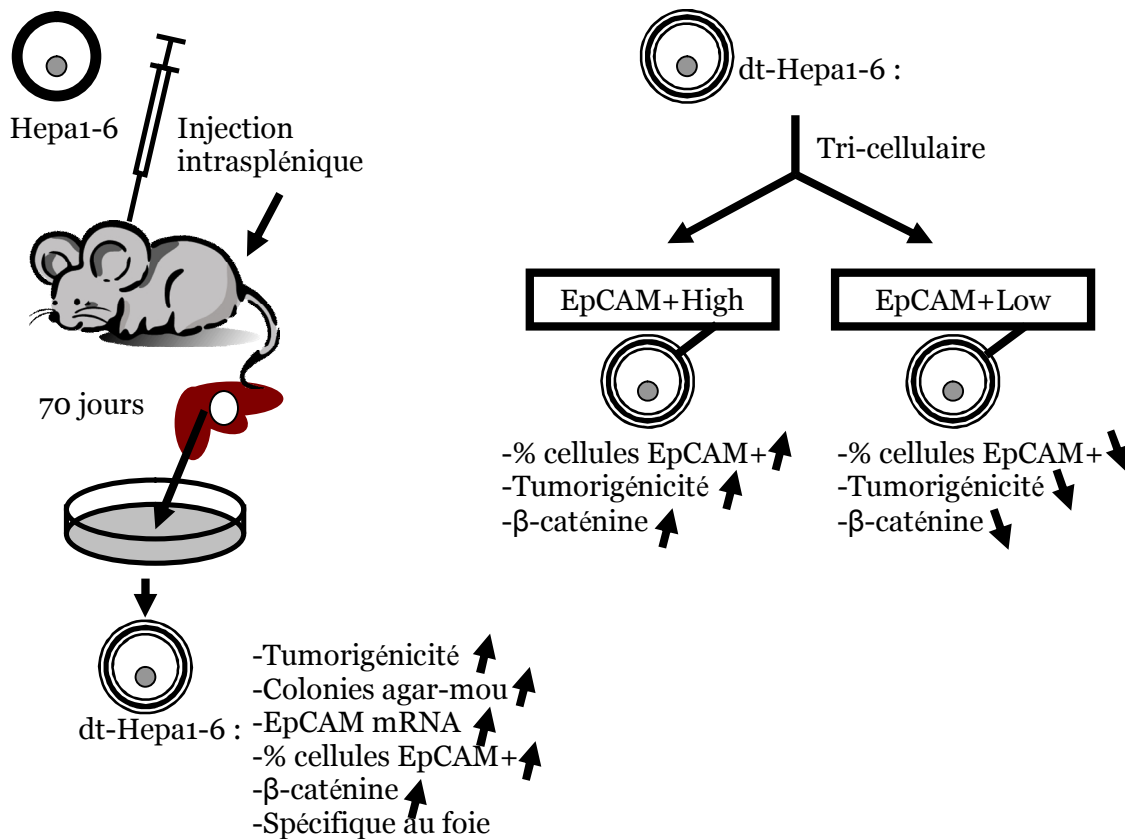
La première partie de notre travail expérimental a servi à démontrer qu'un protocole de fibrogenèse hépatique par administration de TAA dans l'eau de boisson, avec un prétraitement à demi-dose de 2 semaines, entraînait le développement d'une fibrose hépatique significative et reproductible en 16 semaines chez la souris nue immunodéficente et ce, sans mortalité. De plus, la fibrose induite reproduit l'effet hépatoprotecteur observé chez des animaux non immunodéficients. Ce protocole expérimental avait été développé dans le but de tester la sensibilité de lignées de CHC à la présence d'une fibrose hépatique (Figure 6.1).



**Figure 6.1 : Résumé des résultats principaux de l'article 1.** Un protocole reproductible de fibrogenèse à la TAA dans l'eau de boisson a été

établi. La présence d'une hépatoprotection contre 3 agents cytotoxiques a été démontrée.

Nous avons cependant ensuite réussi à créer un nouveau modèle de CHC à partir de la lignée de CHC murine Hepa1-6. En injectant ces cellules dans des souris syngéniques C57/bl6 par diffusion portale via la voie intrasplénique, nous avons sélectionné une lignée démontrant une grande aptitude à développer des tumeurs *in vivo* au sein même du parenchyme hépatique et sans effraction du foie. Cette lignée, nommée dt-Hepa1-6, s'est avérée majoritairement composée d'une sous-population cellulaire exprimant à sa surface la protéine EpCAM. En enrichissant par tri cellulaire la lignée en cellule EpCAM+, nous avons démontré que cette sous-population était en bonne partie responsable de l'augmentation de la tumorigénicité des dt-Hepa1-6 (Figure 6.2).



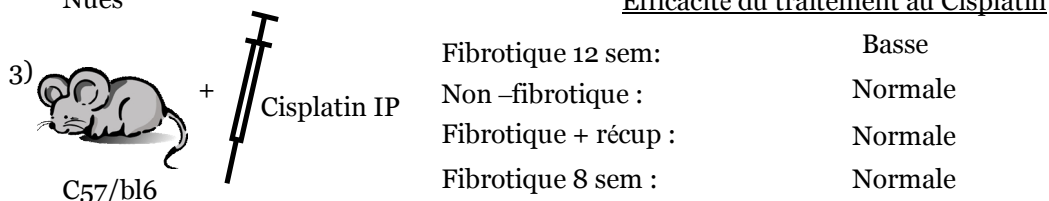
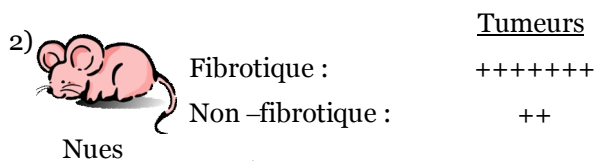
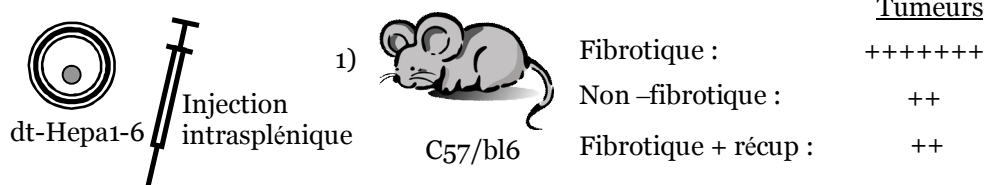
**Figure 6.2 : Résumé des résultats principaux de l'article 2.** Une lignée de CHC à fort pouvoir tumorigénique et dont la présence de cellules EpCAM+ est accrue a été développée. La sous-population EpCAM+ est associée à l'augmentation de la tumorigénicité et est en corrélation avec la présence de  $\beta$ -caténine.

Nous avons alors pu utiliser ces modèles pour répondre à notre hypothèse. En présence de COL1, la lignée dt-Hepa1-6 ainsi que 3 lignées de CHC humains se sont montrées plus résistantes à la mort cellulaire induite par le CP. Ceci confirmait l'effet protecteur du COL1 observé sur les hépatocytes normaux. *In vivo*, nous avons démontré que la présence de fibrose hépatique favorisait le développement du CHC induit par l'injection de dt-Hepa1-6 tant chez la souris immunocompétente que la souris immunodéficiente, indiquant que l'action de la fibrose peut avoir lieu dans un contexte de faible réponse immunitaire. Nous

avons pu aussi vérifier que la fibrose induisait une hépatoprotection *in vivo* sur les cellules de CHC. L'efficacité du traitement au CP s'est montrée réduite lorsque le CHC s'était développé dans un foie fibrotique (Figure 6.3).

**In vitro :** COL1 : -Hépatoprotection contre Cisplatine et TNF- $\alpha$ +ActD  
 -Hépatoprotection inhibée par U0126 (ERK1/2 inh)  
 -Phosphorylation ERK1/2  $\uparrow$   
 -Survivin mRNA  $\uparrow$

**In vivo :**



**Figure 6.3 : Résumé des résultats principaux de l'article 3.** Le COL1 protège les cellules de CHC *in vitro* contre des agents cytotoxique et ce par la voie ERK1/2. La présence de fibrose *in vivo* favorise le développement du CHC tant chez la souris immunocompétente C57/bl6 que la souris immunodéficiente nue. La présence de fibrose hépatique induit une résistance à l'agent chimiothérapeutique Cisplatine.

La présence d'un phénomène d'hépatoprotection associé à la fibrose hépatique a été démontré précédemment dans notre laboratoire (172). Notre modèle de souris nue confirme cette observation. Ce résultat nous a poussés à vérifier l'implication de la fibrose dans la progression du CHC.



Le protocole de fibrogenèse chez la souris nue fut au départ développé dans le laboratoire afin de palier à la faible implantation in vivo de la lignée Hepa1-6 chez la souris C57/bl6. Les souris nues, par leur quasi-absence en lymphocytes T, peuvent tolérer les allogreffes, mais par contre, elles n'offrent pas une aussi grande tolérance à l'établissement de cancer que d'autres modèles murins comme les souris Rag2 IL2rg<sup>-/-</sup>. L'établissement de ce protocole de fibrogenèse au TAA dans les différentes souches immunodéficientes disponibles devra être caractérisé afin de déterminer si la fibrose obtenue peut être similaire à celle observée chez les souris immunocompétentes. D'une souche à l'autre, on pourrait observer des disparités dans le taux de fibrose atteint à un même temps de traitement, la nature du déficit immunitaire pouvant influencer la progression de la fibrose. Cependant de façon générale, même dans des cas d'immunodéficiences sévères, il est possible d'obtenir une fibrose hépatique (28). Pour plusieurs souches immunodéficientes, la sensibilité aux agents hépatotoxiques est accrue (28), de sorte que notre modèle à deux paliers de doses constantes dans l'eau de boisson sera sûrement plus adapté pour limiter la mortalité de ces souches de souris qui sont reconnues comme étant plus fragiles.

Le suivi de l'évolution de la fibrose par microscopie bi-photonique SHG, qui par une propriété physique permet d'identifier les fibres de collagène sans marquage préalable, permettrait potentiellement de nouvelles observations du phénomène. Cette étude pourrait ainsi permettre de suivre la réversibilité de la

fibrose surtout si l'utilisation se faisait en intra-vitale sur différents animaux au cours de la période de récupération de 14 jours. Il serait ainsi possible de quantifier de façon différente le processus de fibrose.

Nos observations sur l'hétérogénéité de la lignée de CHC à fort potentiel tumorigénique, la lignée dt-Hepa 1-6, est en accord avec les théories des CSC. Tout comme Yamashita et al. (2007), nous avons pu établir une corrélation entre la présence à la surface des cellules d'EpCAM, l'expression protéique de la  $\beta$ -caténine et la tumorigénicité (262). Yamashita et al. (2007) ont tenté d'établir des marqueurs de sous-population cellulaire de CHC qui seraient associés à un pronostic défavorable. Ils ont ainsi révélé le rôle potentiel d'EpCAM dans le CHC à l'aide de banque d'échantillons humains (235) et par l'utilisation de lignées cellulaires enrichies artificiellement par tri-cellulaire (234). Dans notre étude, nous avons forcé la sélection *in vivo* en injectant des cellules Hepa1-6 dans des souris C57/bl6 jusqu'à l'obtention de tumeurs visibles au foie, imitant ainsi les processus de sélection naturelle qu'il est possible d'observer dans le développement néoplasique. Les souris étant immunocompétentes, leur système immunitaire induisait potentiellement une pression de sélection sur le développement du CHC limitant la progression aux clones les plus aptes à survivre aboutissant à la sélection d'une lignée enrichie pour sa population EpCAM positive. La pression de sélection n'était pas seulement due à la présence d'un système immunitaire efficace mais aussi à une sélection exercée selon les capacités d'adaptation physique des cellules implantées. Un exemple d'une capacité physique sélectionnée lors de cette expérience est

l'augmentation, chez les dt-Hepa1-6, du taux de formation de colonies en agar-mou, où l'habileté des cellules à croître de façon isolées les unes des autres et sans ancrage est évaluée. Notre but était d'obtenir une lignée ayant le pouvoir de croître dans le foie. Ainsi, en isolant une tumeur se développant au sein même du foie, nous avons potentiellement sélectionné des cellules idéalement adaptées à l'environnement hépatique des souris C57/bl6. Une méthode similaire fut utilisée afin de sélectionner *in vivo* des cellules de CHC pour leur potentiel métastatique (263). Notre méthode d'implantation intrasplénique est, par contre, plus appropriée à la sélection *in vivo*, car elle augmente la pression de sélection en additionnant le stress du passage dans la circulation sanguine, l'établissement de tumeurs à partir de cellules disséminées et l'arrimage spécifique au foie, contrairement aux modèles d'implantation sous-cutanées ou *in situ*. Nos résultats suivent l'hypothèse selon laquelle les tumeurs de CHC sont hétérogènes et que certaines sous-populations cellulaires sont responsables de leur implantation. L'apparition d'une sous-population EpCAM positive dans les cellules dt-Hepa1-6 témoigne de la sélection de cellules cancéreuses ayant des caractéristiques de cellules souches (264). D'un point de vue technique, EpCAM pourrait aussi nous être utile afin de mesurer la charge tumorale des foies implantés avec la lignée dt-Hepa1-6 : en effet, de façon similaire à ce que nous avons fait quand nous avons utilisé l'AFP comme marqueur de la charge tumorale, il serait possible d'utiliser EpCAM. La présence d'EpCAM seul ne suffit pas à déterminer si la cellule cancéreuse est issue d'une cellule souche, d'autres marqueurs comme CD133 ou CD90 sont aussi associée à des cellules cancéreuses montrant des propriétés de cellules

souches (265). L'évaluation du comportement des différentes sous-populations permet de confirmer la présence ou non de ce type de populations cellulaires cancéreuses. Par ailleurs, l'utilisation d'EpCAM comme marqueur diagnostique ou pronostique du CHC humain a été évaluée et s'avère d'un potentiel intéressant à développer (266). Par exemple, la présence dans la circulation sanguine de cellules de CHC exprimant EpCAM après une résection est associée à un plus haut taux de récurrence (264), s'expliquant par la capacité des cellules souches cancéreuses à reconstituer une tumeur (267).

Nous avons aussi déterminé que la charge cellulaire nécessaire pour induire des tumeurs visibles n'était que de  $1 \times 10^5$  cellules avec la lignée dt-Hepa1-6. De plus, à une concentration cellulaire aussi faible que  $1 \times 10^3$  cellules, il était possible d'obtenir des tumeurs microscopiques 28 jours après injection. Cette caractéristique nous permettrait potentiellement d'étudier l'efficacité de traitements adjuvants post-résection chirurgicale, car la faible dose de cellules à fort potentiel tumorigène mimerait bien les cellules restantes à la suite d'une intervention chirurgicale.

La sélection de la lignée dt-Hepa1-6 à partir de la lignée Hepa1-6 nous a permis d'étudier l'influence de la fibrose sur le développement du CHC en nous fournissant un modèle de CHC hautement reproductible et hépato-spécifique. À l'avenir, l'utilisation d'un modèle de sélection similaire sur des lignées humaines pourra permettre de confirmer nos résultats dans un contexte plus proche de la réalité. Pour effectuer un suivi des cellules de CHC humains dans

le foie de souris, il serait possible d'utiliser une sonde d'ARN spécifique au foie comme l'albumine humaine permettant le suivi de toutes les lignées d'origine hépatique exprimant ou non l'AFP.

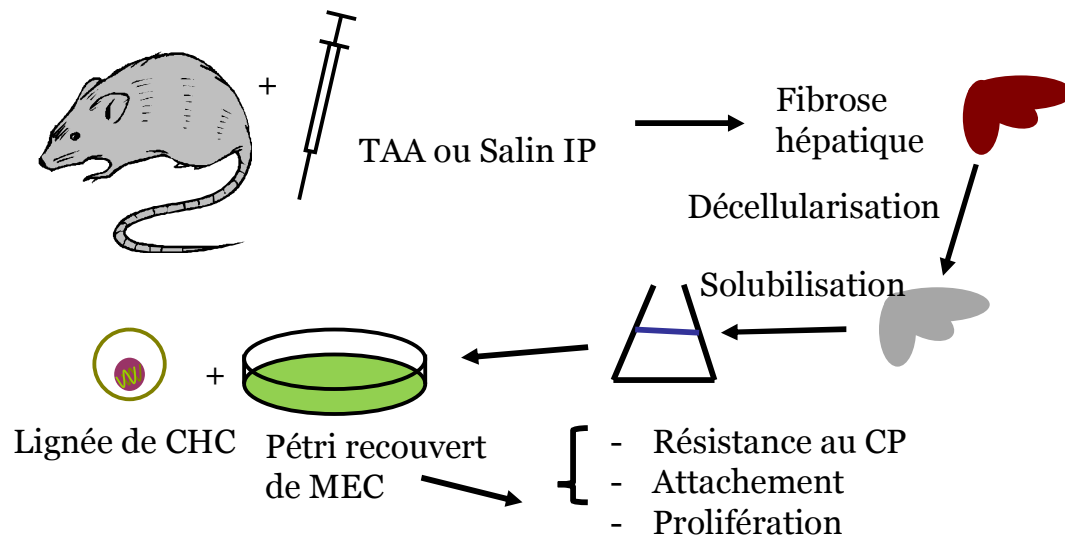
Les résultats obtenus sur l'influence de la fibrose sur le développement du CHC confirment le rôle de ce phénomène physiopathologique dans la carcinogénèse hépatique. Kornek et al. (2008), en voulant évaluer le lien entre fibrose et CHC, ont démontré que le développement d'une tumeur implantée directement dans le foie de souris était accélérée et était accompagné de plus de tumeurs satellites lorsque les souris étaient fibrotiques (253). Contrairement à cette étude, notre modèle utilise une implantation diffuse et nous permet dès lors de suivre le développement de tumeur provenant de cellules uniques. Toutefois, nos observations vont dans la même direction. Yang et al. (2010), alors qu'ils cherchaient à déterminer pourquoi la fibrose hépatique favorisait l'implantation du CHC, ont observé que l'augmentation d'implantation de CHC chez les souris fibrotiques était corrélée à une baisse des lymphocytes infiltrateurs de tumeur CD4+ et CD8+ et ainsi à une baisse de la réponse immunitaire anti-tumorale (255). Nos résultats obtenus chez la souris nue nous laissent à penser que même en présence d'un très faible niveau de cellules T, la fibrose favorise le développement du CHC. Cependant, l'étude de Yang et al. (2010) n'a pas été réalisée dans un environnement exempt d'inflammation et dans des conditions de fibrose où un effet hépatoprotecteur aurait pu être observé puisque la période de traitement par le TAA pré-implantation se situait en dessous du temps nécessaire à l'établissement d'une fibrose. De plus,

l'utilisation du TAA après la période d'implantation tumorale fait en sorte que les tumeurs devaient se développer au sein d'un foie où devait siéger une réaction inflammatoire active (255).

La MEC et plus précisément le COL1 n'expliquent pas à eux seuls le phénomène de promotion du CHC par la fibrose hépatique. Il est fort probable que d'autres acteurs physiques et cellulaires soient aussi impliqués. Ainsi, Schrader et al. (2011) ont aussi étudié le rôle de la matrice extracellulaire sur le comportement des cellules de CHC *in vitro* : leurs résultats ont démontré qu'une surface possédant une rigidité similaire à celle d'un foie fibrotique augmentait la résistance du CHC aux agents de chimiothérapie par rapport à une surface mimant la densité d'un foie normal (257). Coulouarn et al. (2012) ont tenté d'évaluer l'interaction CSH/CHC en réalisant des expériences de co-culture et en analysant les profils d'expression génétiques des deux types cellulaires (232). Ils ont ainsi pu démontrer que les CSH activées stimulaient la motilité et la production de cytokines pro-inflammatoires chez les cellules de CHC (232). Les cellules de CHC, quant à elles, stimulaient la production chez les CSH de VEGFA et de MMP9 créant ainsi un milieu pro-angiogénique (232).

Bien qu'importante, l'étude *in vitro* de l'impact du COL1 sur le comportement des cellules de CHC ne permet pas de comprendre complètement le lien fibrose et cancer. Notre laboratoire a récemment mis au point un modèle permettant d'isoler par décellularisation la matrice extra-cellulaire hépatique, de la solubiliser en milieu acide afin de l'utiliser comme surface d'attachement in

in vitro (Figure 6.4). En utilisant la matrice d'animaux non-fibrotiques et fibrotiques, il sera possible de comparer directement ces deux conditions *in vitro*. La croissance, la résistance aux agents chimiothérapeutiques et l'adhésion pourront alors être évalués dans un environnement plus proche de la réalité.



**Figure 6.4 : Perspective : évaluation de l'influence de la MEC fibrotique et fibrotique de rats sur le comportement des CHC.** Des rats seront soumis à un protocole de fibrogénèse hépatique. Leurs foies seront décellularisés et la MEC solubilisée afin d'en recouvrir des pétris pour évaluer son influence sur le comportement des lignées de CHC.

Dans notre projet, l'implantation du CHC s'est toujours faite après la fin du traitement et donc en absence du stimulus fibrogène. Nous avons d'ailleurs démontré que les cellules dt-Hepa1-6 étaient sensibles à la présence de TAA *in vitro*. Selon ces résultats, l'impact du TAA sur le développement du CHC ne permettait pas de continuer le traitement fibrogénique. De plus, l'utilisation d'un agent initiateur chimique tel que le DEN ne peut être suivi d'un traitement au TAA, car il serait impossible de différencier l'effet du TAA de celui de la

fibrose (268). Un modèle génétique limitant la réversibilité de la fibrose en rendant inefficace les enzymes de dégradation de la MEC, par exemple un KO de la métallothionéine ou la collagénase (269), pourrait permettre de séparer la phase d'induction de fibrose de celle d'implantation de CHC et de se retrouver en présence d'un niveau de fibrose hépatique stable à long terme.

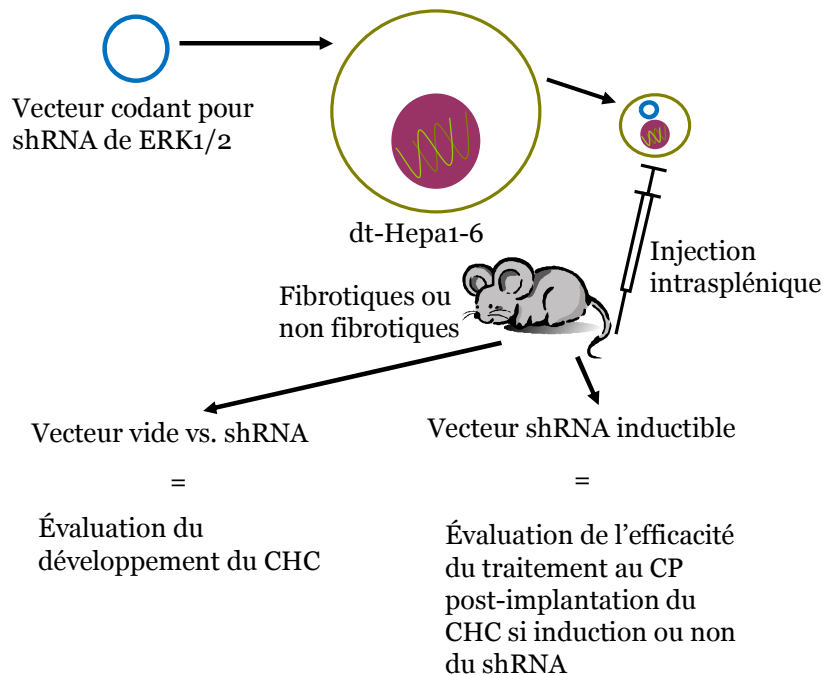
Nous avons établi que la fibrose hépatique, en plus de favoriser le développement du CHC *in vivo*, offrait un effet hépatoprotecteur sur les cellules de CHC qui se traduisait par une chimiorésistance. Ces résultats sont d'une grande importance clinique, car ils impliquent qu'en présence de fibrose ou de cirrhose les traitements donnés aux patients pourraient s'avérer moins efficaces. D'ailleurs, il a déjà été démontré que l'utilisation d'agents classiques de chimiothérapie n'avait que peu ou pas d'efficacité chez les patients atteints de CHC (270). La découverte de molécules anti-fibrosantes en amont du traitement du CHC représente donc un enjeu majeur. De même, l'évaluation des voies par lesquelles la fibrose induit sa chimiorésistance reste à documenter. En dehors de la limitation de l'apoptose induite par le COL1 observée *in vitro*, d'autres voies pourraient être impliquées dans la baisse d'efficacité du CP en condition fibrotique. Le CP induit l'apoptose par création d'adduits d'ADN mais peut aussi produire une réponse apoptotique par d'autres voies (271). Récemment Guégan et al. (2013) ont montré que la voie des MAPK était impliquée dans la toxicité induite par le CP (272). D'un autre côté, la présence de fibrose module cette voie. Il est donc possible que la chimiorésistance au CP induite par la fibrose soit secondaire à une modulation



de la voie MAPK limitant la toxicité du CP. Un autre mécanisme serait une augmentation du glutathion libre, limitant les dommages du CP, par stimulation de la glutathion synthétase (273). Une analyse de l'activité enzymatique de la glutathion synthétase et des niveaux de glutathion libre nous permettrait d'évaluer cette possibilité. Finalement, le rôle de certains transporteurs/ pompes, tel que l'ATP7A (Copper-transporting ATPase 1) (274) ou la MRP2 (Multidrug resistance-associated protein 2) (275) connus pour leur capacité à limiter la diffusion du CP dans la cellule et dans le noyau, pourrait être aussi mis en cause.

La voie ERK1 fut étudiée au laboratoire en profondeur avec des hépatocytes normaux et des souris KO pour cette protéine. En insérant un vecteur exprimant un shRNA pour ERK1 dans la lignée dt-Hepa1-6 par transfection, il serait alors possible d'obtenir une inhibition soutenue de cette voie dans les cellules cancéreuses (Figure 6.5). Par contre, il sera important durant la sélection des cellules transfectées de maintenir un pool varié de cellules témoignant du caractère hétérogène de la tumeur. En évaluant la présence d'EpCAM à la surface de ces cellules, il sera possible d'évaluer si la lignée comprend encore des cellules de la sous-population ayant des traits de CSC. La sélection en parallèle de cellules exprimant un vecteur vide nous permettra de confirmer que le potentiel tumorigène est encore présent même s'il est amputé par l'inhibition d'ERK1. Ces lignées pourront alors être caractérisées *in vitro* et *in vivo* et comparées afin de confirmer le rôle prépondérant d'ERK1 dans la transmission du signal hépatoprotecteur stimulé par la MEC.

En utilisant un vecteur inducible, c'est-à-dire dont l'expression est stimulée par l'ajout d'une molécule, il sera possible d'évaluer si la présence de ERK1 est nécessaire à l'hépatoprotection *in vivo* (Figure 6.5). Pour ce faire, nous injecterons tout d'abord les cellules transfectées par voie intrasplénique. Après une période de 5 jours pour permettre un développement des foyers tumoraux et toujours être en présence d'une importante fibrose hépatique, nous injecterons l'agent inducteur puis soumettrons par la suite les animaux aux traitements de CP ou de Sorafenib. Les foies seront ensuite analysés en histologie et par immunofluorescence afin de déterminer le taux d'apoptose dans les foyers tumoraux.



**Figure 6.5 : Perspective : évaluation *in vivo* de l'inhibition de l'expression d'ERK1/2 sur le développement et la résistance aux agents chimiothérapeutiques des CHC.** Les cellules dt-Hepa1-6 seront transfectées avec un vecteur codant pour un shRNA dirigé contre ERK1/2. Elles seront ensuite injectées dans des souris C57/bl6 fibrotiques et non fibrotiques.

Son influence sur le développement du CHC sera évaluée en comparant un vecteur vide et un vecteur codant pour le shRNA. L'efficacité du traitement au CP sera déterminée par induction ou non d'un vecteur inductible codant pour le shRNA après implantation du CHC.

Bien que la présence de fibrose joue un rôle non-négligeable dans le développement du CHC, elle n'est pas nécessaire à son apparition. Dans notre modèle, il y a développement de CHC dans la souris en l'absence de fibrose. De plus, bien que le CHC se développe dans la majorité des cas sur foie cirrhotique, il peut aussi se développer occasionnellement sur foie normal (189). Plusieurs modèles d'étude du CHC sont possibles sur foie sain par exemple par induction chimique au DEN (276) ou encore par surexpression d'oncogènes comme la  $\beta$ -catenin et Ha-Ras (277).

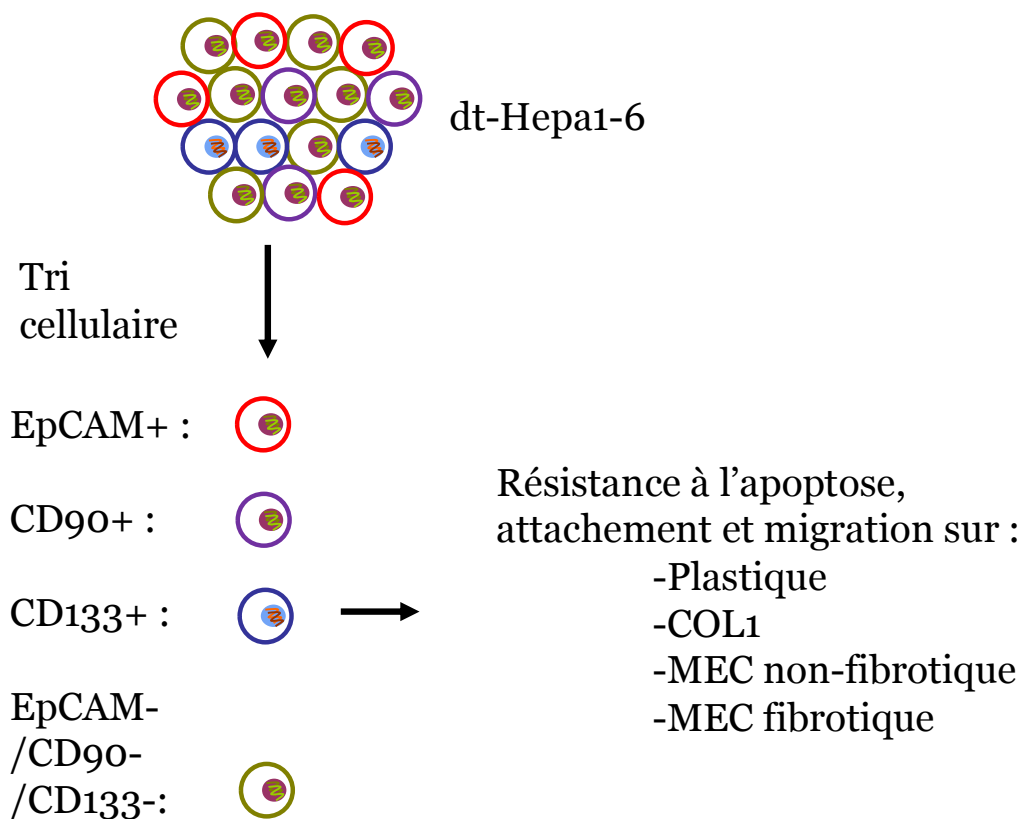
A l'avenir, il serait intéressant d'évaluer la composition des tumeurs obtenues avec la lignée dt-Hepa1-6 originelle et enrichies ou appauvries en cellules EpCAM positives. Ceci permettrait d'établir si les tumeurs se développent de façon anarchique ou si leur composition dépend de celle du lot de cellules injectées. De plus, l'évaluation du profil d'expression génétique des cellules enrichies pour la molécule de surface EpCAM nous permettrait de mieux cibler les acteurs potentiels de cette voie et des autres voies éventuellement impliquées dans la tumorigénicité. L'inhibition de l'expression d'EpCAM par l'ajout de siRNA nous permettrait d'évaluer *in vitro* si la capacité à former des colonies en agar-mou est modifiée ou encore de vérifier *in vivo* l'implantation à des temps précoces (par exemple 3.5 jours). L'ajout d'un plasmide codant pour EpCAM afin de stimuler artificiellement sa production nous permettrait aussi

de tester si EpCAM seul arrive à induire l'effet pro-tumorigène. De la même façon qu'avec ERK1, la transfection de la lignée dt-Hepa1-6 par un vecteur codant pour un shRNA ciblant EpCAM nous permettrait de confirmer son importance dans le développement des CHC *in vivo*.

Étant donné qu'EpCAM n'est qu'un des marqueurs d'intérêt des CSC, il serait important d'évaluer la présence d'autres marqueurs fréquemment décrits comme étant associés au phénotype de CSC. Par exemple, CD133 est associé au caractère souche de plusieurs cancers dont le CHC. D'ailleurs, tout comme EpCAM, il est exprimé dans les cellules hépatiques progénitrices. De plus, la présence de CD90, un autre marqueur des cellules progénitrices hépatiques, associé à EpCAM serait spécifique d'une sous-population de CSC avec un haut potentiel invasif. En créant, par tri cellulaire, différentes sous-populations, il serait possible d'évaluer le rôle de ces fractions dans le développement du CHC. Une des caractéristiques des CSC est leur pouvoir de recréer une tumeur complexe à partir d'une cellule. En créant des sous-populations négatives pour chaque marqueur, nous pourrions vérifier si les cellules qui n'expriment pas ces molécules à leur surface sont à même de créer une tumeur et ainsi de confirmer le modèle des CSC.

En étudiant le comportement des différentes sous-populations sur plastique, COL1, MEC normale et fibrotique, nous pourrions aussi évaluer si l'influence de la MEC sur les cellules du CHC est identique pour toutes les sous-fractions

cellulaires ou si certaines sous-fractions sont mieux adaptées à la fibrose hépatique (Figure 6.7).



**Figure 6.7 : Perspective : évaluation de l'influence du COL1 et de la MEC fibrotique sur les différentes sous-populations de CSC.** La lignée dt-Hepa1-6 sera trié afin d'obtenir des sous-populations enrichie en EpCAM+, CD90+ et CD133+. Une population négative pour ces 3 facteurs sera aussi isolée. Les sous-populations seront alors soumises à des analyses d'apoptose, d'attachement et de migration sur plastique, COL1, MEC non-fibrotique ou fibrotique.

L'expression de l'ARN de la survivin a été associée, dans cette étude, à la présence de COL1. Une évaluation de l'expression protéique de la survivin permettrait de confirmer les précédents résultats. De plus, l'inhibition par siRNA de la survivin évaluerait la contribution réelle de la survivin dans le processus d'hépatoprotection.

Une étude d'expression génomique, à l'aide de micro-puces, de cellules ayant été cultivées sur plastique, COL1, MEC normale ou fibrotique ainsi que des échantillons de tumeurs provenant de souris normales ou fibrotiques permettrait potentiellement d'établir de nouvelles cibles avec pour but de bloquer l'influence de la MEC fibrotique sur le CHC. Une étude plus approfondie de ces voies de signalisation basée sur l'expérience proposée avec ERK1 permettrait aussi de dégager des pistes thérapeutiques potentielles. En utilisant les cellules des sous-populations du CHC, nous pourrions aussi déterminer les voies les plus importantes pour s'attaquer au CSC.

L'avenir du projet passera par l'étude du CHC d'origine humaine. L'induction de fibrose hépatique dans des modèles immunodéficients tel que les souris RAG2 IL2rg<sup>-/-</sup> permettrait l'évaluation de l'influence de la fibrose sur des CHC primaires d'origine humaine. Le modèle développé dans cette thèse permettra d'évaluer dans un environnement se rapprochant de la réalité l'efficacité des traitements disponibles.

Il serait aussi intéressant de procéder à l'évaluation de l'efficacité des agents thérapeutiques disponibles sur les différentes sous-populations composant les CHC afin de déterminer les combinaisons optimales de traitement. Ceci pourrait éventuellement être effectué sur une base individuelle à partir des cellules isolées des tumeurs de chaque patient de façon à cibler les agents avec le meilleur potentiel de réponse thérapeutique.



## **Chapitre 7 - Conclusion**

La présence de fibrose hépatique et de son principal composant, le COL1, augmentent la survie cellulaire ainsi que la progression du CHC. Ces effets sont accompagnés d'une augmentation de l'expression génique de la survivin et passent potentiellement par la voie MAPK.



## Chapitre 8 - Références

1. Wheeler PR, Heath JW, Young B. Histologie fonctionnelle. 1re éd. ed. Paris: De Boeck Université, 2001: vi , 413 p.
2. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003;200:504-515.
3. Bacon BR, O'Grady JG. Comprehensive clinical hepatology. 2nd ed. St. Louis, Mo. ; London: Elsevier Mosby, 2006: xiii, 723 p.
4. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2010.
5. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 2000;218:213-234.
6. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005;85:979-1000.
7. Roediger M, Miosge N, Gersdorff N. Tissue distribution of the laminin beta1 and beta2 chain during embryonic and fetal human development. *J Mol Histol* 2010;41:177-184.
8. Zhu C, Coombe DR, Zheng MH, Yeoh GC, Li L. Liver progenitor cell interactions with the extracellular matrix. *J Tissue Eng Regen Med* 2012.
9. Nejjarı M, Hafdi Z, Dumortier J, Bringuier AF, Feldmann G, Scoazec JY. alpha6beta1 integrin expression in hepatocarcinoma cells: regulation and role in cell adhesion and migration. *Int J Cancer* 1999;83:518-525.
10. Ke AW, Shi GM, Zhou J, Huang XY, Shi YH, Ding ZB, Wang XY, et al. CD151 amplifies signaling by integrin alpha6beta1 to PI3K and induces the epithelial-mesenchymal transition in HCC cells. *Gastroenterology* 2011;140:1629-1641 e1615.
11. Carloni V, Romanelli RG, Mercurio AM, Pinzani M, Laffi G, Crottozzi G, Gentilini P. Knockout of alpha6 beta1-integrin expression reverses the transformed phenotype of hepatocarcinoma cells. *Gastroenterology* 1998;115:433-442.

12. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 2008;71:357-370.
13. Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2009;2:4.
14. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003;38:257-265.
15. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol* 2012;3:56.
16. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006;26:1175-1186.
17. Miller AM, Horiguchi N, Jeong WI, Radaeva S, Gao B. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:787-793.
18. Wood S, Pithadia R, Rehman T, Zhang L, Plichta J, Radek KA, Forsyth C, et al. Chronic alcohol exposure renders epithelial cells vulnerable to bacterial infection. *PLoS One* 2013;8:e54646.
19. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008;47:729-736.
20. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003;38:1188-1198.
21. Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:777-785.
22. Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW, Rosenberg HF, et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* 2006;74:1471-1479.
23. Aoudjehane L, Pissaia A, Jr., Scatton O, Podevin P, Massault PP, Chouzenoux S, Soubrane O, et al. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest* 2008;88:973-985.

24. Liu Y, Meyer C, Muller A, Herweck F, Li Q, Mullenbach R, Mertens PR, et al. IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF-beta-independent Smad signaling. *J Immunol* 2011;187:2814-2823.
25. Yan S, Wang L, Liu N, Wang Y, Chu Y. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol* 2012;90:421-428.
26. Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012;143:765-776 e761-763.
27. Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:345803.
28. Hyon MK, Kwon E, Choi HJ, Kang BC. Dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and recovery in NOD/SCID mice. *J Vet Med Sci* 2011;73:739-745.
29. Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemsa D, Gressner AM. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997;113:277-285.
30. Lang A, Sakhnini E, Fidder HH, Maor Y, Bar-Meir S, Chowers Y. Somatostatin inhibits pro-inflammatory cytokine secretion from rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005;25:808-816.
31. Breitkopf K, Roeyen C, Sawitza I, Wickert L, Floege J, Gressner AM. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine* 2005;31:349-357.
32. Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007;46:1064-1074.
33. Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002;7:d1720-1726.
34. Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007;56:284-292.
35. Friedman SL. Transcriptional regulation of stellate cell activation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21 Suppl 3:S79-83.

36. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311-335.
37. Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012;142:938-946.
38. Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, Kronenberg M, Cheroutre H. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *J Immunol* 2011;186:5549-5555.
39. Lindquist JN, Parsons CJ, Stefanovic B, Brenner DA. Regulation of alpha1(I) collagen messenger RNA decay by interactions with alphaCP at the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 2004;279:23822-23829.
40. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384.
41. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Woodworth T, Vassiliadis E, Bay-Jensen AC. Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers--are they the cause or the consequence of the disease? *Clin Biochem* 2010;43:793-804.
42. Schierwagen R, Leeming DJ, Klein S, Granzow M, Nielsen MJ, Sauerbruch T, Krag A, et al. Serum markers of the extracellular matrix remodeling reflect antifibrotic therapy in bile-duct ligated rats. *Front Physiol* 2013;4:195.
43. Liu T, Wang X, Karsdal MA, Leeming DJ, Genovese F. Molecular serum markers of liver fibrosis. *Biomark Insights* 2012;7:105-117.
44. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076.
45. Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int* 2010;30:669-682.
46. Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, Copple BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G582-592.

47. Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int* 2009;29:1010-1021.
48. Lebrec D, Moreau R. [Progress in portal hypertension]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33:799-810.
49. Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2010;16:281-288.
50. Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burchardt E, Schoonhoven R, et al. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001;35:749-755.
51. Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY, Clement B, Rissel M, Deugnier Y, Campion JP, et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol* 1990;137:1333-1342.
52. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549.
53. Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS, Iredale JP. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol* 2007;178:5288-5295.
54. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012.
55. Issa R, Zhou X, Trim N, Millward-Sadler H, Krane S, Benyon C, Iredale J. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl4-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J* 2003;17:47-49.
56. Zhou X, Murphy FR, Gehdu N, Zhang J, Iredale JP, Benyon RC. Engagement of alphavbeta3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2004;279:23996-24006.

57. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, Pradere JP, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 2012;143:1073-1083 e1022.
58. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008;10:e17.
59. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5060-5065.
60. Iacobini C, Menini S, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Scipioni A, Salvi L, Cordone S, et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver. *J Hepatol* 2011;54:975-983.
61. Traber PG, Chou H, Zomer E, Hong F, Klyosov A, Fiel MI, Friedman SL. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. *PLoS One* 2013;8:e75361.
62. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-851.
63. Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:425-436.
64. Moore KP, Aithal GP. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. *Gut* 2006;55 Suppl 6:vi1-12.
65. Bosoi CR, Rose CF. Brain edema in acute liver failure and chronic liver disease: similarities and differences. *Neurochem Int* 2013;62:446-457.
66. Hasper D, Jorres A. New insights into the management of hepato-renal syndrome. *Liver Int* 2011;31 Suppl 3:27-30.
67. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305-311.
68. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, Marschall HU, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* 2002;123:1238-1251.

69. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 2008;95:646-656.
70. Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol* 2008;89:251-263.
71. Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1635-1648.
72. George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003;39:756-764.
73. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008;49:1068-1076.
74. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004;40:47-51.
75. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002;37:206-213.
76. Berres ML, Koenen RR, Rueland A, Zaldivar MM, Heinrichs D, Sahin H, Schmitz P, et al. Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2010;120:4129-4140.
77. Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, McKeegan WL. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol* 2003;163:1653-1662.
78. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, et al. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999;276:G1059-1068.
79. Czochra P, Klopčič B, Meyer E, Herkel J, Garcia-Lazaro JF, Thieringer F, Schirmacher P, et al. Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. *J Hepatol* 2006;45:419-428.

80. Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005;117:237-250.
81. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 1996;71:57-81.
82. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* 2007;67:11141-11146.
83. Shirakami Y, Gottesman ME, Blaner WS. Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis is suppressed in lecithin:retinol acyltransferase-deficient mice primarily through retinoid actions immediately after carcinogen administration. *Carcinogenesis* 2012;33:268-274.
84. Salguero Palacios R, Roderfeld M, Hemmann S, Rath T, Atanasova S, Tschuschner A, Gressner OA, et al. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 2008;88:1192-1203.
85. Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology* 2007;230:105-116.
86. Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, Staudinger JL, et al. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1955-1963.
87. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007;25:619-647.
88. Qin J, Vinogradova O, Plow EF. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* 2004;2:e169.
89. Lange A, Wickstrom SA, Jakobson M, Zent R, Sainio K, Fassler R. Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature* 2009;461:1002-1006.
90. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996;379:91-96.



91. Hsia DA, Lim ST, Bernard-Trifilo JA, Mitra SK, Tanaka S, den Hertog J, Streblov DN, et al. Integrin alpha4beta1 promotes focal adhesion kinase-independent cell motility via alpha4 cytoplasmic domain-specific activation of c-Src. *Mol Cell Biol* 2005;25:9700-9712.
92. Han M, Wen JK, Zheng B, Liu Z, Chen Y. Blockade of integrin beta3-FAK signaling pathway activated by osteopontin inhibits neointimal formation after balloon injury. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:283-290.
93. Bianchi-Smiraglia A, Paesante S, Bakin AV. Integrin beta5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. *Oncogene* 2013;32:3049-3058.
94. Patsenker E, Stickel F. Role of integrins in fibrosing liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301:G425-434.
95. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
96. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999;400:886-891.
97. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiol. Rev.* 2010;90:1165-1194.
98. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999;29:1-4.
99. Black D, Bird MA, Samson CM, Lyman S, Lange PA, Schrum LW, Qian T, et al. Primary cirrhotic hepatocytes resist TGFbeta-induced apoptosis through a ROS-dependent mechanism. *J Hepatol* 2004;40:942-951.
100. Kuhla A, Eipel C, Siebert N, Abshagen K, Menger MD, Vollmar B. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNFalpha-dependent Fas/FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure. *Apoptosis* 2008;13:1427-1438.
101. Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 1993;73:213-216.
102. Duan H, Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 1997;385:86-89.

103. Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 2007;27:155-162.
104. Shima Y, Nakao K, Nakashima T, Kawakami A, Nakata K, Hamasaki K, Kato Y, et al. Activation of caspase-8 in transforming growth factor-beta-induced apoptosis of human hepatoma cells. *Hepatology* 1999;30:1215-1222.
105. Boatright KM, Salvesen GS. Caspase activation. *Biochem Soc Symp* 2003;233-242.
106. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231-241.
107. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008;134:1641-1654.
108. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-656.
109. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-8607.
110. Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007;12:815-833.
111. Schafer ZT, Kornbluth S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* 2006;10:549-561.
112. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009;361:1570-1583.
113. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-44.
114. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ* 2012;19:75-86.
115. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 2013;59:583-594.
116. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates

- programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 2009;137:1112-1123.
117. Moriwaki K, Chan FK. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev* 2013;27:1640-1649.
118. Yin XM, Ding WX, Gao W. Autophagy in the liver. *Hepatology* 2008;47:1773-1785.
119. Wang Y, Singh R, Xiang Y, Czaja MJ. Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy are required for hepatocyte resistance to oxidant stress. *Hepatology* 2010;52:266-277.
120. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:1125-1136.
121. Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:3-13.
122. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* 2010;20:748-762.
123. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 2014;24:92-104.
124. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117-1134.
125. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:127-155.
126. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. Prevention of TNF-alpha-induced apoptosis in polyamine-depleted IEC-6 cells is mediated through the activation of ERK1/2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G479-490.
127. Keating GM, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs* 2009;69:223-240.
128. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 2006;58:621-631.

129. Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007;45:1298-1305.
130. Tao GZ, Lehwald N, Jang KY, Baek J, Xu B, Omary MB, Sylvester KG. Wnt/beta-catenin signaling protects mouse liver against oxidative stress-induced apoptosis through the inhibition of forkhead transcription factor FoxO3. *J Biol Chem* 2013;288:17214-17224.
131. Lehwald N, Tao GZ, Jang KY, Papandreou I, Liu B, Liu B, Pysz MA, et al. beta-Catenin regulates hepatic mitochondrial function and energy balance in mice. *Gastroenterology* 2012;143:754-764.
132. Tan X, Behari J, Cieply B, Michalopoulos GK, Monga SP. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 2006;131:1561-1572.
133. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-252.
134. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;40:1117-1123.
135. Carassou P, Meijer L, Le Moulec S, Aoun J, Bengrine-Lefevre L. [Cell cycle and molecular targets: CDK inhibition]. *Bull Cancer* 2012;99:163-171.
136. Kaufmann WK. Cell cycle checkpoints and DNA repair preserve the stability of the human genome. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:31-41.
137. Giangrande PH, Zhu W, Schlisio S, Sun X, Mori S, Gaubatz S, Nevins JR. A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription. *Genes Dev* 2004;18:2941-2951.
138. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:518-528.
139. Hitchens MR, Robbins PD. The role of the transcription factor DP in apoptosis. *Apoptosis* 2003;8:461-468.
140. Deane NG, Parker MA, Aramandla R, Diehl L, Lee WJ, Washington MK, Nanney LB, et al. Hepatocellular carcinoma results from chronic cyclin D1 overexpression in transgenic mice. *Cancer Res* 2001;61:5389-5395.

141. Gruebele A, Zawaski K, Kaplan D, Novak RF. Cytochrome P450E1- and cytochrome P450B1/2B2-catalyzed carbon tetrachloride metabolism: effects on signal transduction as demonstrated by altered immediate-early (c-Fos and c-Jun) gene expression and nuclear AP-1 and NF-kappa B transcription factor levels. *Drug Metab Dispos* 1996;24:15-22.
142. Mico BA, Pohl LR. Reductive oxygenation of carbon tetrachloride: trichloromethylperoxyl radical as a possible intermediate in the conversion of carbon tetrachloride to electrophilic chlorine. *Arch Biochem Biophys* 1983;225:596-609.
143. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
144. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187:185-194.
145. Moyer AM, Fridley BL, Jenkins GD, Batzler AJ, Pelleymounter LL, Kalari KR, Ji Y, et al. Acetaminophen-NAPQI hepatotoxicity: a cell line model system genome-wide association study. *Toxicol Sci* 2011;120:33-41.
146. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:1327-1331.
147. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187:211-217.
148. Meyers LL, Beierschmitt WP, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;93:378-387.
149. Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2003;144:279-288.
150. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 2010;51:246-254.
151. Eum HA, Billiar TR. TNF/TNF receptor 1-mediated apoptosis in hepatocytes. *Adv Exp Med Biol* 2011;691:617-624.

152. Liedtke C, Trautwein C. The role of TNF and Fas dependent signaling in animal models of inflammatory liver injury and liver cancer. *Eur J Cell Biol* 2012;91:582-589.
153. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:565-576.
154. Sobell HM. Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5328-5331.
155. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol* 1994;153:1778-1788.
156. Pinkoski MJ, Brunner T, Green DR, Lin T. Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G354-366.
157. Haddad Y, Vallerand D, Brault A, Haddad PS. Antioxidant and hepatoprotective effects of silibinin in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:nep164.
158. Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, Proudfoot AT. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet* 1977;2:432-434.
159. North TE, Babu IR, Vedder LM, Lord AM, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Zon LI, et al. PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:17315-17320.
160. Bahcecioglu IH, Koca SS, Poyrazoglu OK, Yalniz M, Ozercan IH, Ustundag B, Sahin K, et al. Hepatoprotective effect of infliximab, an anti-TNF-alpha agent, on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Inflammation* 2008;31:215-221.
161. Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. *Inflammation* 2008;31:91-98.
162. Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S, Mathurin P, Jouet P, Piquet MA, Davion T, et al. A double-blind randomized controlled trial of infliximab

- associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004;39:1390-1397.
163. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med* 2009;30:29-41.
164. Singh N, Khullar N, Kakkar V, Kaur IP. Attenuation of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury with Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *BioDrugs* 2014.
165. Kim Y, You Y, Yoon HG, Lee YH, Kim K, Lee J, Kim MS, et al. Hepatoprotective effects of fermented *Curcuma longa* L. on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food Chem* 2014;151:148-153.
166. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Denizeau F, Bilodeau M. Resistance to Fas-induced apoptosis in hepatocytes: role of GSH depletion by cell isolation and culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G709-718.
167. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Bilodeau M. EGF mediates protection against Fas-induced apoptosis by depleting and oxidizing intracellular GSH stocks. *J Cell Physiol* 2004;198:62-72.
168. Ethier C, Raymond VA, Musallam L, Houle R, Bilodeau M. Antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes associated with downregulation of proapoptotic Bid protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G298-308.
169. Sano W, Watanabe F, Tamai H, Furuya E, Mino M. Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology* 1995;108:1785-1792.
170. Jegatheeswaran S, Siriwardena AK. Experimental and clinical evidence for modification of hepatic ischaemia-reperfusion injury by N-acetylcysteine during major liver surgery. *HPB (Oxford)* 2011;13:71-78.
171. Hara Y, Akamatsu Y, Maida K, Kashiwadata T, Kobayashi Y, Ohuchi N, Satomi S. A new liver graft preparation method for uncontrolled non-heart-beating donors, combining short oxygenated warm perfusion and prostaglandin E1. *J Surg Res* 2013;184:1134-1142.
172. Bourbonnais E, Raymond VA, Ethier C, Nguyen BN, El-Leil MS, Meloche S, Bilodeau M. Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury. *Gastroenterology* 2012;142:130-139 e134.

173. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-823.
174. Nordling CO. A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 1953;7:68-72.
175. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-28.
176. Barrett JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 1993;100:9-20.
177. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
178. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-737.
179. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-715.
180. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008;13:153-166.
181. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1:313-323.
182. Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006;44:240-251.
183. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
184. Schwarz RE, Smith DD. Trends in local therapy for hepatocellular carcinoma and survival outcomes in the US population. *Am J Surg* 2008;195:829-836.



185. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010;29:4989-5005.
186. Saeki R, Nagai H, Kaneko S, Unoura M, Yamanaka N, Okamoto E, Kobayashi K, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in human hepatocellular carcinoma detected by restriction landmark genomic scanning. *J Hepatol* 2000;33:99-105.
187. Unsal H, Yakicier C, Marcais C, Kew M, Volkmann M, Zentgraf H, Isselbacher KJ, et al. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:822-826.
188. Ozdemir B, Abd-Almageed W, Roessler S, Wang XW. iSubgraph: Integrative Genomics for Subgroup Discovery in Hepatocellular Carcinoma Using Graph Mining and Mixture Models. *PLoS One* 2013;8:e78624.
189. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012;142:1264-1273 e1261.
190. Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature* 2005;436:930-932.
191. Kwun HJ, Jang KL. Dual effects of hepatitis C virus Core protein on the transcription of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *J Viral Hepat* 2003;10:249-255.
192. Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986.
193. Cho J, Baek W, Yang S, Chang J, Sung YC, Suh M. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:59-66.
194. Alisi A, Giambartolomei S, Cupelli F, Merlo P, Fontemaggi G, Spaziani A, Balsano C. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 2003;22:2573-2580.
195. Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 2003;38:820-828.

196. Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 2001;82:2235-2241.
197. Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, et al. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4801-4811.
198. Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology* 2005;333:324-336.
199. Park CY, Choi SH, Kang SM, Kang JI, Ahn BY, Kim H, Jung G, et al. Nonstructural 5A protein activates beta-catenin signaling cascades: implication of hepatitis C virus-induced liver pathogenesis. *J Hepatol* 2009;51:853-864.
200. Eslam M, Booth DR, George J, Ahlenstiel G. Interaction of IFNL3 with insulin resistance, steatosis and lipid metabolism in chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2013;19:7055-7061.
201. Moucari R, Asselah T, Cazals-Hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, Sobesky R, et al. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:416-423.
202. Lee AT, Ren J, Wong ET, Ban KH, Lee LA, Lee CG. The hepatitis B virus X protein sensitizes HepG2 cells to UV light-induced DNA damage. *J Biol Chem* 2005;280:33525-33535.
203. Jia L, Wang XW, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer* 1999;80:875-879.
204. Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, et al. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J Biol Chem* 2004;279:15460-15471.
205. Zhu YZ, Zhu R, Fan J, Pan Q, Li H, Chen Q, Zhu HG. Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16(INK4A) promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2010;17:98-107.

206. Lee JO, Kwun HJ, Jung JK, Choi KH, Min DS, Jang KL. Hepatitis B virus X protein represses E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1. *Oncogene* 2005;24:6617-6625.
207. Yang L, He J, Chen L, Wang G. Hepatitis B virus X protein upregulates expression of SMYD3 and C-MYC in HepG2 cells. *Med Oncol* 2009;26:445-451.
208. Yang L, Ma Z, Wang D, Zhao W, Chen L, Wang G. MicroRNA-602 regulating tumor suppressive gene RASSF1A is overexpressed in hepatitis B virus-infected liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2010;9:803-808.
209. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010;51:1820-1832.
210. Guzman G, Brunt EM, Petrovic LM, Chejfec G, Layden TJ, Cotler SJ. Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis? *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1761-1766.
211. Ish-Shalom D, Christoffersen CT, Vorwerk P, Sacerdoti-Sierra N, Shymko RM, Naor D, De Meyts P. Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor. *Diabetologia* 1997;40 Suppl 2:S25-31.
212. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000;378:259-268.
213. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006;43:163-172.
214. Chang Q, Zhang Y, Beezhold KJ, Bhatia D, Zhao H, Chen J, Castranova V, et al. Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. *J Hepatol* 2009;50:323-333.
215. Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010;16:3603-3615.
216. Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxid Med Cell Longev* 2010;3:178-185.

217. Elmberg M, Hulterantz R, Ekbom A, Brandt L, Olsson S, Olsson R, Lindgren S, et al. Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives. *Gastroenterology* 2003;125:1733-1741.
218. Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S79-86.
219. von Delius S, Lersch C, Schulte-Frohlinde E, Fend F, Dobritz M, Schmid RM, Eckel F. Hepatocellular carcinoma associated with hereditary hemochromatosis occurring in non-cirrhotic liver. *Z Gastroenterol* 2006;44:39-42.
220. Singh P, Kaur H, Lerner RG, Patel R, Rafiyath SM, Singh Lamba G. Hepatocellular Carcinoma in Non-cirrhotic Liver Without Evidence of Iron Overload in a Patient with Primary Hemochromatosis. Review. *J Gastrointest Cancer* 2010.
221. Chenoufi N, Loreal O, Drenou B, Cariou S, Hubert N, Leroyer P, Brissot P, et al. Iron may induce both DNA synthesis and repair in rat hepatocytes stimulated by EGF/pyruvate. *J Hepatol* 1997;26:650-658.
222. Hann HW, Stahlhut MW, Hann CL. Effect of iron and desferoxamine on cell growth and in vitro ferritin synthesis in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 1990;11:566-569.
223. Marrogi AJ, Khan MA, van Gijssel HE, Welsh JA, Rahim H, Demetris AJ, Kowdley KV, et al. Oxidative stress and p53 mutations in the carcinogenesis of iron overload-associated hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1652-1655.
224. Houghlum K, Ramm GA, Crawford DH, Witztum JL, Powell LW, Chojkier M. Excess iron induces hepatic oxidative stress and transforming growth factor beta1 in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1997;26:605-610.
225. Green R, Esparza I, Schreiber R. Iron inhibits the nonspecific tumoricidal activity of macrophages. A possible contributory mechanism for neoplasia in hemochromatosis. *Ann N Y Acad Sci* 1988;526:301-309.
226. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127:S35-50.
227. Hamaguchi M, Takeda N, Kojima T, Ohbora A, Kato T, Sarui H, Fukui M, et al. Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the

diagnostic criteria for the metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 2012;18:1508-1516.

228. Koh WP, Robien K, Wang R, Govindarajan S, Yuan JM, Yu MC. Smoking as an independent risk factor for hepatocellular carcinoma: the Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer* 2011;105:1430-1435.

229. Prisco M, Romano G, Peruzzi F, Valentini B, Baserga R. Insulin and IGF-I receptors signaling in protection from apoptosis. *Horm Metab Res* 1999;31:80-89.

230. Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lecluse Y, Housset C, Lacombe ML, et al. Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2005;167:869-877.

231. Amann T, Bataille F, Spruss T, Muhlbauer M, Gabele E, Scholmerich J, Kiefer P, et al. Activated hepatic stellate cells promote tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100:646-653.

232. Coulouarn C, Corlu A, Glaise D, Guenon I, Thorgeirsson SS, Clement B. Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2012;72:2533-2542.

233. Shafritz DA, Oertel M, Menthen A, Nierhoff D, Dabeva MD. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology* 2006;43:S89-98.

234. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009;136:1012-1024.

235. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:1451-1461.

236. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* 1999;77:699-712.

237. Chaves-Perez A, Mack B, Maetzel D, Kremling H, Eggert C, Harreus U, Gires O. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 2013;32:641-650.

238. Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 2009;69:5627-5629.
239. Denzel S, Maetzel D, Mack B, Eggert C, Barr G, Gires O. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer* 2009;9:402.
240. Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 2003;285:50-58.
241. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, et al. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:1484-1497.
242. Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G45-54.
243. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, et al. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology* 2014;146:562-572.
244. Yi M, Hu F, Joyce M, Saxena V, Welsch C, Chavez D, Guerra B, et al. Evolution of a Cell Culture-Derived Genotype 1a Hepatitis C Virus (H77S.2) during Persistent Infection with Chronic Hepatitis in a Chimpanzee. *J Virol* 2014;88:3678-3694.
245. Gray R, Peto R, Brantom P, Grasso P. Chronic nitrosamine ingestion in 1040 rodents: the effect of the choice of nitrosamine, the species studied, and the age of starting exposure. *Cancer Res* 1991;51:6470-6491.
246. Farber E, Solt D, Cameron R, Laishes B, Ogawa K, Medline A. Newer insights into the pathogenesis of liver cancer. *Am J Pathol* 1977;89:477-482.
247. Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818.
248. de Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, de Mello ES, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;49:1055-1061.

249. Kamegaya Y, Hiasa Y, Zukerberg L, Fowler N, Blackard JT, Lin W, Choe WH, et al. Hepatitis C virus acts as a tumor accelerator by blocking apoptosis in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2005;41:660-667.
250. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004;113:1774-1783.
251. Huynh H, Soo KC, Chow PK, Panasci L, Tran E. Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs. *Clin Cancer Res* 2006;12:4306-4314.
252. Shnyder SD, Cooper PA, Scally AJ, Bibby MC. Reducing the cost of screening novel agents using the hollow fibre assay. *Anticancer Res* 2006;26:2049-2052.
253. Kornek M, Raskopf E, Tolba R, Becker U, Klockner M, Sauerbruch T, Schmitz V. Accelerated orthotopic hepatocellular carcinomas growth is linked to increased expression of pro-angiogenic and prometastatic factors in murine liver fibrosis. *Liver Int* 2008;28:509-518.
254. Hazari S, Hefler HJ, Chandra PK, Poat B, Gunduz F, Ooms T, Wu T, et al. Hepatocellular carcinoma xenograft supports HCV replication: a mouse model for evaluating antivirals. *World J Gastroenterol* 2011;17:300-312.
255. Yang MC, Chang CP, Lei HY. Induction of liver fibrosis in a murine hepatoma model by thioacetamide is associated with enhanced tumor growth and suppressed antitumor immunity. *Lab Invest* 2010.
256. Figueiredo ML, Wentworth KM, Sandgren EP. Quantifying growth and transformation frequency of oncogene-expressing mouse hepatocytes in vivo. *Hepatology* 2010;52:634-643.
257. Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, Benten D, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2011;53:1192-1205.
258. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007;446:1030-1037.
259. Patel VN, Knox SM, Likar KM, Lathrop CA, Hossain R, Eftekhari S, Whitelock JM, et al. Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate

modulates FGF10 activity during ex vivo submandibular gland branching morphogenesis. *Development* 2007;134:4177-4186.

260. Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, Conroy MJ, Ryan EJ, Hegarty JE, O'Farrelly C, et al. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 2008;57:1121-1128.

261. Jeong WI, Park O, Gao B. Abrogation of the antifibrotic effects of natural killer cells/interferon-gamma contributes to alcohol acceleration of liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:248-258.

262. Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:10831-10839.

263. Li Y, Tian B, Yang J, Zhao L, Wu X, Ye SL, Liu YK, et al. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive in vivo selection and studies on metastatic characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:460-468.

264. Sun YF, Xu Y, Yang XR, Guo W, Zhang X, Qiu SJ, Shi RY, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology* 2013;57:1458-1468.

265. Guo Z, Li LQ, Jiang JH, Ou C, Zeng LX, Xiang BD. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2014;20:2098-2106.

266. Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, Riethdorf S, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2013;133:2165-2171.

267. Liu AY, Cai Y, Mao Y, Lin Y, Zheng H, Wu T, Huang Y, et al. Twist2 promotes self-renewal of liver cancer stem-like cells by regulating CD24. *Carcinogenesis* 2014;35:537-545.

268. Gervasi PG, Longo V, Marzano M, Saviozzi M, Malvaldi G. Chronic liver injury by thioacetamide and promotion of hepatic carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1989;115:29-35.



269. Jiang Y, Kang YJ. Metallothionein gene therapy for chemical-induced liver fibrosis in mice. *Mol Ther* 2004;10:1130-1139.
270. Qin S, Bai Y, Lim HY, Thongprasert S, Chao Y, Fan J, Yang TS, et al. Randomized, multicenter, open-label study of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin versus doxorubicin as palliative chemotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma from Asia. *J Clin Oncol* 2013;31:3501-3508.
271. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31:1869-1883.
272. Guegan JP, Ezan F, Theret N, Langouet S, Baffet G. MAPK signaling in cisplatin-induced death: predominant role of ERK1 over ERK2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2013;34:38-47.
273. Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E. Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU Int* 2005;95:1086-1090.
274. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:4661-4669.
275. Materna V, Liedert B, Thomale J, Lage H. Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int J Cancer* 2005;115:393-402.
276. Stahl S, Ittrich C, Marx-Stoelting P, Kohle C, Altug-Teber O, Riess O, Bonin M, et al. Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology* 2005;42:353-361.
277. Harada N, Oshima H, Katoh M, Tamai Y, Oshima M, Taketo MM. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res* 2004;64:48-54.

# Curriculum vitae

## Scolarité :

2007- 20 mai 2014 :

Étudiant au Ph.D. en Sciences Biomédicales avec passage direct de la M.Sc. au Ph.D. à l'Université de Montréal.

2004-2007 :

B.Sc. Biochimie à l'Université du Québec à Montréal (UQÀM).

## Publications :

Type 1 collagen and liver fibrosis enhance hepatocellular carcinoma progression and chemotherapeutic resistance through an ERK1/2 mediated pro-survival effect. Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau. En attente pour soumission.

In vivo cell selection of a highly tumorigenic hepatocellular carcinoma cell line with characteristics of tumor initiating cells. Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau. En attente pour soumission.

Experimental liver fibrosis in a nude mouse model. Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau. En attente pour soumission.

## Présentation orale :

2011 - CDDW (Canadian Digestive Diseases Week) Vancouver, BC, Canada

Titre : IN VIVO SELECTION OF A HIGHLY TUMORIGENIC HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINE TRIGGERED BY INTRASPLENIC ORTHOTOPIC ENGRAFTMENT IN C57/BL6 MICE.

Auteurs : Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau

## Présentations par affiches :

2013 - Congrès annuel des étudiants du CRCHUM

Titre : EPCAM POSITIVE HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL SUBPOPULATION IS HIGHLY TUMORIGENIC.

Auteurs : Benoit Lacoste, Grégory Merlen, Valérie-Ann Raymond, Marc Bilodeau.

2013 - AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases)

Washington, DC, USA

Titre : EPCAM POSITIVE HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL SUBPOPULATION IS HIGHLY TUMORIGENIC.

Auteurs : Benoit Lacoste, Grégory Merlen, Valérie-Ann Raymond, Marc Bilodeau.

2012 - AACR (American Association of Cancer Research) Chicago, USA.  
Titre : Is development of hepatocellular carcinoma driven by liver homing signals?

Auteurs : Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau.

2011 - Congrès annuel des étudiants du CRCHUM

Titre : INFLUENCE DE LA FIBROSE HÉPATIQUE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE.

Auteurs : Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau.

2010 - AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) Boston, USA.

Titre : Variability of the response to cisplatinum and immunosuppressive agents of hepatocellular carcinoma cell lines

Auteurs : Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau.

2010 - AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) Boston, USA.

Titre : Establishment of a reproducible liver fibrosis model in Nude mice through the administration of thioacetamide in drinking water

Auteurs : Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau.

2009 – Congrès annuel des étudiants du CRCHUM.

Titre : INFLUENCE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE SUR LE DÉVELOPPEMENT ET LE MAINTIEN DU CARCINOME HÉPATOCELLULAIRE

Auteurs : Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau.

2008 - AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) San Francisco, USA

Titre : DOES EXTRACELLULAR MATRIX FAVOR THE MAINTENANCE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS?

Auteur : Benoit Lacoste, Valérie-Ann Raymond et Marc Bilodeau.

### **Bourses :**

2013 – Bourse de perfectionnement Défi CRCHUM pour assister au congrès de l'AASLD.

2010 – Bourse de perfectionnement Défi CRCHUM pour assister au congrès de l'AASLD.

2008 - Bourse de voyage Olive-Beaudry-Leriché de l'Université de Montréal pour assister au congrès de l'AASLD.

**Autres :**

Membre de l'Ordre de Chimiste du Québec depuis mars 2012.

Représentant Étudiant au Comité Institutionnelle de Protection des Animaux (CIPA) du CRCHUM de juin 2011 à avril 2013.

**Aptitudes :**

- Méthodes biochimiques de base (Western blot, RT-PCR).
- Culture de cellules hépatiques de lignées continues et primaires.
- Utilisation de modèles in vivo et chirurgicaux sur des souris.
- Rédaction de protocoles de recherche sur modèles animaux.
- Test de viabilité, prolifération, mort cellulaire, agar-mou et de migrations
- Immunomarquage pour microscopie en fluorescence.
- Utilisation et entretien des microscopes en lumière transmise et fluorescence.
- Préparation d'échantillons pour analyses cytométriques.
- Gestion de laboratoire et formation des nouveaux étudiants.
- Rédaction et révision d'articles scientifiques.
- Élaboration et mise point de nouvelles méthodes (résolution de problèmes)
- Utilisation et mise au point de méthode de HPLC.
- Entretien et réparation de HPLC.
- Rédaction de demande de fonds.
- Faire la révision éthique de protocoles de recherche animale